

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FLÚOR EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Alfredo Rigalli

Laura I. Pera

Verónica Di Loreto

Lucas R.M. Brun

PRÓLOGO

Durante 20 años he trabajado sobre los efectos biológicos del flúor, tiempo en que he tropezado numerosas veces con grandes dificultades técnicas a la hora de medir la concentración de flúor en una muestra. Estas dificultades fueron sorteadas no sin esfuerzo y con la ayuda de mucha gente del Laboratorio de Biología Ósea. Hemos desarrollado varias técnicas para medir diferentes tipos de compuestos con flúor, las que posibilitaron importantes avances en el estudio de la biología del flúor y sus derivados.

El trabajo constante en el tema me ha dado grandes satisfacciones y ha motivado la escritura de este libro que contiene qué se debe hacer en cada situación, detalles que habitualmente no se encuentran en la bibliografía consultada.

Un objetivo menos visible es mi preocupación por la acumulación de flúor bajo diferentes formas químicas en el medio ambiente como consecuencia del uso indiscriminado de compuestos conteniendo este halógeno de propiedades fascinantes. Espero que este libro contribuya a que sean muchos los laboratorios que determinen flúor en el medio ambiente y sean muchas las voces que alerten sobre los efectos indeseables que comenzarán a ocurrir de alcanzarse valores críticos de fluoruro en el agua, suelo y aire de nuestro planeta.

Agradezco la colaboración de los coautores de este libro y a quien me inició en el tema, el Dr. Rodolfo C. Puche, director del Laboratorio de Biología Ósea.

Dr. Alfredo Rigalli

ÍNDICE

PRÓLOGO.....	2
Los autores.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
MÉTODOS COLORIMÉTRICOS.....	10
DETERMINACIÓN DE ANIÓN FLUORURO POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA.....	13
MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS.....	15
ELECTRODO DE ION ESPECÍFICO.....	15
MACROTÉCNICA POTENCIOMÉTRICA.....	30
POTENCIOMETRÍA DIRECTA EN SOLUCIONES ACUOSAS.....	31
MICROTÉCNICA POTENCIOMÉTRICA.....	33
POTENCIOMETRICA - CON DISOLUCIÓN O MICRODIFUSIÓN.....	34
MICROPOTENCIOMETRÍA DIRECTA.....	36
MICROADAPTADOR PARA POTENCIOMETRÍA DIRECTA.....	40
DESTILACIÓN DE FLÚOR.....	42
DESTILACIÓN DE FLÚOR.....	42
DIFUSIÓN ISOTÉRMICA.....	43
MICROTÉCNICA DE HALLSWORTH.....	45
MICROTÉCNICA μ DI.....	46
DIFUSIÓN ISOTÉRMICA FACILITADA POR HEXAMETILDISILOXANO.....	51
MEDICIÓN DE FLÚOR EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	53
TAMAÑO Y COMPLEJIDAD DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	53
CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	53
MEDICIÓN DE FLUOREMIAS.....	55
MEDICIÓN DE FLÚOR EN UÑAS.....	56
MEDICIÓN DE FLÚOR EN ESMALTE DENTAL.....	57
MEDICIÓN DE FLÚOR EN ORINA - DILUCIÓN CON SOLUCIÓN FISIOLÓGICA.....	58
DETERMINACIÓN DE FLÚOR ÁCIDO LÁBIL Y FLÚOR ÁCIDO RESISTENTE.....	60
DETERMINACIÓN DE FLÚOR ÁCIDO LÁBIL.....	60
DETERMINACIÓN DE FLÚOR ÁCIDO RESISTENTE.....	62
DETERMINACIÓN DE FLÚOR IÓNICO.....	64
DETERMINACIÓN POR ADSORCIÓN SOBRE FOSFATO DE CALCIO.....	64
DETERMINACIÓN POR ADSORCIÓN Y DIFUSIÓN.....	65
DETERMINACIÓN ADSORCIÓN-REPOSICIÓN.....	67
DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA CON PATRONES DISUELTOS EN SUERO.....	68
MÉTODO AUTOMATIZADO.....	70
DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA DIRECTA CON PATRONES ACUOSOS.....	71
DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA CON ADICIÓN - DILUCIÓN.....	72
DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA CON ADICIÓN.....	75
MEDICIÓN DE FLUORURO CON CORRECCIÓN DE FLÚOR BASAL.....	80
DETERMINACIÓN DE MONOFLUOROFOSFATO.....	86
MEDICIÓN DE MONOFLUOROFOSFATO POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	86
RESEÑA SOBRE EL FLÚOR.....	90
METABOLISMO DEL FLUORURO.....	91
USO DEL FLUORURO EN LA PREVENCIÓN DE CARIES DENTALES.....	96
EFECTOS TÓXICOS DEL FLUORURO.....	96
ÍNDICE ANALÍTICO.....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

Los autores

Alfredo Rigalli. Doctor de la Universidad Nacional de Rosario, investigador adjunto del CONICET y del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario. Docente de Química Biológica e integrante del Laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Revisor de Fluoride, publicación de la International Society for Fluoride Research. Miembro titular y actual presidente de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

Laura I. Pera. Doctora en Ciencias Biomédicas. Docente de Química Biológica e integrante del Laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Miembro titular y actual tesorera de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Actualmente trabaja en el desarrollo de nuevas técnicas para la medición de flúor.

Verónica Di Loreto. Doctora en Ciencias Biomédicas. Docente de Química Biológica y Física Biológica e integrante del Laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Desarrolla investigaciones sobre el efecto del fluoruro sobre el metabolismo fosfocálcico. Miembro titular y actual secretaria de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral.

Lucas R.M. Brun. Médico graduado de la Universidad Nacional de Rosario. Docente de Química Biológica e integrante del Laboratorio de Biología Ósea de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Desarrolla investigaciones en el metabolismo del monofluorofosfato de sodio y fosfatasa alcalina intestinal. Miembro de la Sociedad de Biología de Rosario.

1

INTRODUCCIÓN

El flúor es un elemento de amplia aplicación en salud humana y la industria. En salud se lo emplea para el tratamiento de la osteoporosis en dosis que se encuentran entre 5-100 mg de fluoruro de sodio (NaF)/día, debido a su poder osteoformador [1]. Estudios clínicos más recientes han demostrado que con los esquemas terapéuticos actuales la medicación con flúor es inefectiva [2]. Otra droga con flúor utilizada ha sido el monofluorofosfato, ya sea combinada con calcio [3], con sodio [4] o glutamina [5].

El fluoruro es un potente estimulador de proteínas involucradas en la transducción de señales, como las proteínas G y MAPK [6], e inhibidor de enzimas que controlan el ciclo celular [7]. Actúa sobre otras vías de transducción de señales aumentando los niveles de diacilglicerol e inositol trifosfato [8]. Presenta efecto también sobre los niveles de AMPc [9].

Se utilizan compuestos con flúor en el tratamiento y la prevención de caries: en dentífrico con concentraciones de 1000-1500 ppm, líquido de lavado y comprimidos con 1-2 mg de fluoruro [10]. De utilización más reciente son los barnices dentales que emplean concentraciones de hasta 25000 ppm [11]. El efecto del flúor contenido en el agua de bebida como prevención de caries es materia de discusión [12]. Los investigadores que sostienen el uso del flúor como preventivo en la aparición de caries, no desechan la posibilidad de fluorosis debido a la sobreexposición al flúor producida por el aporte de otras fuentes, como alimentos y contaminación ambiental [13].

Actualmente la exposición al flúor proveniente de fuentes naturales está aumentada. Se ha estimado que, a partir del uso de dentífrico, los niños pueden ingerir más flúor que el recomendado [14]. La utilización de aguas fluoradas produce ingestas mayores a las previstas ya que todos los alimentos preparados con dicha agua tienden a concentrar flúor [15,16].

La leche maternizada reconstituida con agua fluorada, aporta 100-200 veces más fluoruro que la leche materna o de vaca [111]. El procesamiento de cereales para consumo también concentra fluoruro [17]. Una taza de té puede tener más fluoruro que lo recomendado para la ingesta diaria [111].

Anestésicos como el metoxiflorano, sevoflorano, enflorano e isoflorano, por metabolización producen compuestos con flúor y fluoruro que pueden conducir a disfunción renal, inhibición enzimática y falla multiorgánica [18,19].

La utilización de compuestos con flúor como pesticidas, está incrementándose. El fluor aluminio de sodio o criolita es utilizado como pesticida de frutas, aceptándose hasta 7 ppm. El sulfuril fluoruro (SO_2F_2) es también utilizado como pesticida en reemplazo del metilbromuro. Existe además una larga lista de pesticidas que tienen en sus moléculas, además de flúor, bromo y cloro y su acción no es debida a la liberación de fluoruro. Entre los pesticidas con flúor orgánico se encuentran trifluralin, fluometuron and benefin. El fluoruro de sodio se utiliza como veneno de ratas y hormigas.

Si bien no son las más comunes, se han reportado gran cantidad de intoxicaciones por ingestión de o exposición a compuestos con flúor [20,21]. El contacto con ácido fluorhídrico es común, ya sea por ingestión [22, 23, 24, 25], por inhalación [26] o por exposición de la piel a la cual le produce grandes quemaduras [27]. También puede ocurrir intoxicación por defecto en la deionización del agua utilizada para hemodiálisis [28]. Existen productos de uso doméstico, como los utilizados para pulido de pisos, que contienen fluorosilicato [29]. En la bibliografía existe documentación acerca de casos de confusión de productos alimenticios con productos para el grabado de vidrios

[³⁰]. Algunos productos para la conservación de maderas contienen fluoruro de potasio [³¹].

Las tabletas utilizadas para tratamiento de la osteoporosis y la prevención de caries dentales tienen bajos niveles de flúor, sin embargo se han informado casos de intoxicación [³²].

Los efectos tóxicos son dosis dependiente y están relacionados fundamentalmente a los niveles que el fluoruro alcanza en el plasma y los tejidos.

Los compuestos con flúor se utilizan en la elaboración de productos industriales con fines diversos. El perfluorooctanosulfonil fluoruro es un producto utilizado en preparación de superficies de papeles de embalaje, alfombras y artículos textiles. Dependiendo del grado de polimerización, se degrada a perfluorooctanosulfonato que es un producto estable que tiende a bioacumularse con consecuencias aun desconocidas. Muchos productos contienen compuestos fluorados. El Teflón (politetrafluoroetileno) utilizado para el recubrimiento de implementos de cocina adiciona fluoruro a las comidas [³³]. Los cloro fluoro carbonos (CFCs) son utilizados como líquidos en refrigeración y se atribuye a ellos el efecto invernadero, haciéndolos responsables de la destrucción de la capa de ozono. El fluoruro de calcio y magnesio son utilizados en la industria del vidrio. El espatoflúor (CaF_2) fue utilizado por siglos como fundente de rocas a partir de la cual se obtienen metales. Un ejemplo clásico es la obtención de aluminio. Se han utilizado 168000 toneladas de espatoflúor en el primer trimestre de 2005. Estas industrias generan gran cantidad de productos con fluoruro en forma soluble que contaminan suelos y aguas superficiales. Es importante tener en cuenta que el fluoruro de sodio es una sal altamente soluble, pudiendo alcanzar el valor de 1 mol/L. Muchas industrias generan aerosoles que contienen fluoruro, entre estas se encuentran fundiciones de aluminio y zinc, plantas de enriquecimiento de uranio, fábricas de ladrillos y cerámica.

Las rocas con alto contenido de fosfato se utilizan como fertilizantes, estas pueden contener hasta un 5% de fluoruro. Cuando se utilizan con el fin mencionado, se adiciona entre 8-20 Kg/hectárea, aportando entre 400-1000 g de fluoruro por hectárea que se incorporará a los vegetales de

consumo humano (aumentando el aporte de fluoruro) o al ganado que consuman el pastoreo. Por lo expuesto, es previsible observar un incremento de la exposición al flúor por parte de la población como así también la aparición de fluorosis y sus complicaciones. El control de la exposición al flúor se lleva a cabo mediante mediciones del mismo fundamentalmente en plasma. La medida de flúor en uñas, conveniente por la facilidad en la obtención de la muestra, es prometedora.

La medición de flúor es una práctica frecuente en terapéutica y casos de intoxicación. Durante años se han desarrollado técnicas que pueden ser enmarcadas en dos tipos de metodología:

1- Colorimétrica: Esta metodología se fundamenta en la reacción del fluoruro con compuestos cuyo producto presenta una absorción a una longitud de onda específica (Ver capítulo 2).

2- Potenciométrica: Esta metodología se fundamenta en la utilización de un electrodo de ion específico sensible al fluoruro. La diferencia de potencial desarrollada por este electrodo, combinado con uno de referencia es proporcional a la concentración de fluoruro en la muestra (Ver capítulo 3).

Menos frecuente es la metodología en la que se aplica la cromatografía gaseosa (Ver capítulo 2), debido al elevado costo del equipamiento, el mayor tiempo insumido en una determinación y la necesidad de contar con personal capacitado para la aplicación de estas técnicas.

Es importante tener presente que el flúor se encuentra en la naturaleza reducido, con número de oxidación -1 y no participa en procesos de óxido-reducción. Sin embargo, se lo puede encontrar formando desde enlaces con un alto porcentaje de carácter iónico hasta enlaces con un elevado carácter covalente.

Para interpretar las diferentes técnicas y tomar la decisión sobre la metodología a aplicar es necesario conocer las formas más comunes en las que el flúor puede formar parte de distintos compuestos. Las metodologías existentes se fundamentan en la reacción del fluoruro con algún compuesto o la detección de fluoruro mediante un electrodo de ión específico. Por lo tanto,

cualquier especie de flúor que no se encuentre al estado de fluoruro, no será detectada y necesitará un procesamiento previo para su detección.

El flúor puede existir como:

1- Flúor iónico: se lo conoce como fluoruro (F^-). Forma parte de sales como el NaF y el CaF_2 .

Aunque en las dos sales mencionadas el fluoruro es el anión presente, también se debe tener en cuenta que la disociación puede ser muy diferente.

2- Flúor ácido lábil: corresponde a flúor ligado a compuestos ya sea por enlace iónico o covalente pero que se desprende de la muestra como ácido fluorhídrico, por tratamiento con ácido fuerte.

Por ejemplo el MFP no contiene fluoruro pero sí tiene flúor unido covalentemente que se hidroliza por ácido y se libera como ácido fluorhídrico.

3- Flúor ácido resistente: es flúor unido a compuestos por enlace covalente. En general se refiere a compuestos donde el flúor está unido a carbonos, como por ejemplo el flurbiprofeno. En algunos casos este flúor puede ser liberado en el organismo por degradación de la molécula carbonada que lo contiene. Estos compuestos liberan el flúor por calcinación, generando NaF.

2

MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Las sales de circonio con alizarin sulfonato de sodio [34], en solución ácida, forman una laca de color rosa. La determinación de fluoruro se fundamenta en la acción decolorante que éste ejerce sobre la laca. La coloración rosada original se va tornando amarilla a medida que aumenta la concentración de fluoruro, por formación del complejo hexafluorcirconato (IV), $Zr F_6^{2-}$.

Como desventajas del método, podemos mencionar sustancias que interfieren. Estas pueden ser eliminadas por destilación [35]. La presencia de sustancias que alcalinizan el medio, como metales trivalentes (Fe^{3+} y Al^{3+}) disminuyen el valor de concentración hallado. Por el contrario la presencia de hexametáfosfato de sodio ($[NaPO_3]_6$), fosfato (PO_4^{3-}), cloruro (Cl) y sulfato (SO_4^{2-}) producen errores por exceso.

Método SPADNS

Solución SPADNS: 958 mg 2-(parasulfofenilazo)-1,8-dihidroxi-3,6-naftalen disulfonato de sodio, también conocido como ácido 4,5-dihidroxi-3-(parasulfofenilazo)-2,7-naftalendisulfónico.

Reactivo de circonio: 133 mg de cloruro de circonilo octahidratado ($ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$), 350 mL HCl concentrado y agua csp 500 mL.

Los reactivos ácidos de circonio y SPADNS mencionados se mezclan en partes iguales, siendo la mezcla estable por un año.

Solución para ajuste a cero: 10 mL de solución SPADNS más 103 mL de agua y 7 mL de HCl

concentrado.

Cincuenta mL de muestra o soluciones estándar de fluoruro de sodio se mezclan con 10 mL de la solución obtenida por mezcla del reactivo ácido de circonio y SPADNS.

Se lee absorbancia a 570 nm y se calcula la concentración de las muestras por interpolación con la curva de absorbancia en función de la concentración de las soluciones estándar.

La técnica tiene un coeficiente de variación comprendido entre 8 y 17%.

Método visual con alizarina

El método se basa en la comparación visual de soluciones estándar con las obtenidas utilizando muestras incógnitas. El mismo puede ser adaptado fácilmente a medidas espectro o fotolorimétricas. En esta sección se describen según el trabajo original.

Solución estándar de fluoruro: NaF 10 µg/mL. Preparar las soluciones estándar a partir de esta solución de manera que exista al menos una solución de mayor y otra de menor concentración que la muestra a medir.

Solución A: 300 mg cloruro de circonilo octahidratado en 50 mL de solución con agua destilada.

Solución B: 70 mg de 3-alizarín sulfonato de sodio¹ en 50 mL de solución con agua destilada.

Solución C: Agregar lentamente la solución B sobre la solución A con agitación constante. La solución se clarifica rápidamente al dejar en reposo unos minutos.

Solución D: Mezclar 100 mL de HCl concentrado y 400 mL de agua destilada.

Solución E: Mezclar 33 mL de ácido sulfúrico concentrado en 400 mL de agua destilada.

Solución F: Luego de dejar enfriar la solución E, mezclarla con la solución D.

Reactivo ácido de alizarín circonilo: Mezclar 100 mL de solución C con los 800 mL de solución F. Aforar con agua destilada a 1000 mL. El reactivo debe cambiar de rojo a amarillo en el lapso de 1 hora. Es estable 6 meses al abrigo de la luz solar directa.

¹ También conocido como rojo de alizarina S.

Solución de metarsenito de sodio: 5 g de NaAsO_2 en 1 L de solución con agua destilada. Esta solución se utiliza para eliminar interferencias producidas por el anión cloruro.

Procedimiento: a 100 mL de las soluciones estándar o igual volumen de muestra, agregar 5 mL de reactivo ácido de alizarín circonilo. Comparar visualmente la intensidad del color de las soluciones estándar y las muestras para estimar la concentración. Si las muestras tienen cloruro, agregar una gota de metarsenito de sodio.

La aplicación de la técnica en 20 laboratorios diferentes sobre una muestra sintética conteniendo sólo fluoruro dio un coeficiente de variación de aproximadamente 5%. El coeficiente de variación aumentó si las muestras eran alcalinas o contenían sulfato y hexametáfosfato.

Método de complexona

El método se fundamenta en la destilación del flúor de la muestra y la posterior reacción del destilado con el reactivo azul de lantano, que forma un cromóforo azul que se lee espectrofotométricamente a 620 nm.

Las interferencias son las mismas que para los otros métodos y se eliminan por destilación. El método ha sido diseñado para ser aplicada a aguas potables, de desecho y superficiales, pero bien puede ser adaptado a medidas de otro tipo de muestras.

Solución stock de NaF: 2.21 g de NaF anhidro en 1 L de solución con agua destilada (1 mg F/mL).

Preparación de soluciones estándar de 0.1-2 mg/L a partir de esta solución stock.

Azul de flúor-alizarina stock: disolver 960 mg de alizarina en 100 mL de agua destilada, agregar 2 mL de amoníaco concentrado y mezclar hasta disolución. Agregar 2 mL de ácido acético glacial, diluir a 250 mL y guardar en frasco color ámbar en heladera.

Buffer acetato/acético: disolver 60 g de acetato de sodio anhidro y 100 mL de ácido acético

glacial en 1 L de solución con agua destilada.

Solución stock de nitrato de lantano: disolver 1.08 g de $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ en 250 mL de solución con agua destilada. La solución debe almacenarse a 4 °C.

Reactivo de color: mezclar en el siguiente orden: 300 mL de buffer acetato/acético, 150 mL de acetona, 50 mL de butanol terciario, 36 mL de azul de flúor alizarina, 40 mL de nitrato de lantano, 2 mL de polioxietileno y 23 mL de lauril éter. Diluir la mezcla a 1 L con agua destilada.

El reactivo es estable 2-4 días.

Mezclar este reactivo con muestras y soluciones estándar en volúmenes iguales.

Leer absorbancia de muestras y soluciones estándar a 620 nm.

DETERMINACIÓN DE ANIÓN FLUORURO POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA

La aplicación de la cromatografía gaseosa al análisis de aniones inorgánicos se basa en la transformación de los aniones no volátiles en derivados volátiles. A pesar de las numerosas técnicas existentes y el descubrimiento de nuevos derivados volátiles, el análisis de aniones por cromatografía gaseosa, no es utilizado con frecuencia.

Una ventaja importante de este tipo de análisis de aniones es la excelente sensibilidad y especificidad de los detectores disponibles ante muchos elementos que interfieren con los aniones comunes. Para el caso de los halógenos se utilizan exitosamente el detector de captura electrónica y el detector microcolumbimétrico, cuya selectividad ofrece técnicas potencialmente superiores.

Derivados de los haluros

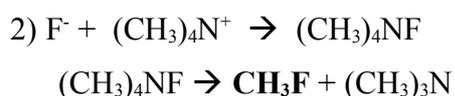
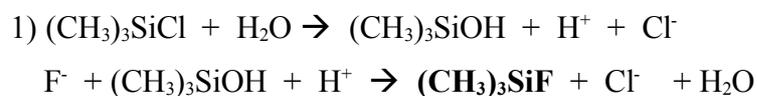
A pesar que muchos compuestos que contenían halógenos habían sido analizados rutinariamente por cromatografía gaseosa durante muchos años, recién en 1968 Fresen, Cox y Witter fueron los primeros en formar halo-derivados con el propósito de analizar un haluro. Ellos determinaron

fluoruro en varios materiales biológicos extrayendo el fluoruro y haciéndolo reaccionar con trimetilclorosilano en benceno para formar trimetilfluorosilano (reacción 1). Este método fue aplicado satisfactoriamente para el análisis cuantitativo de fluoruro en el esmalte dental.

El método más general informado para el análisis por cromatografía gaseosa de haluros involucra su reacción con iones tetraalquilamonio y la subsiguiente eliminación térmica de los alquil-haluros (reacción 2). El fluoruro actúa de manera diferente a los otros haluros, formando metilfluoruro desde su sal de tetraetilamonio, pero descomponiéndose a fluoruro de hidrógeno cuando está involucrada una cadena alquílica mayor.

Reacciones de formación de derivados

A continuación se representan las reacciones de derivatización de compuestos con flúor. En negrita se representa el compuesto que sufre los procesos de separación en las columnas.



El uso de la cromatografía gaseosa sólo es recomendable si se dispone de un cromatógrafo gaseoso en uso continuo, de manera que el gasto insumido en columnas, jeringas de inyección, gases y trampas para gases no deseados no influya en el costo de la determinación. Si no se dispone de cromatógrafo gaseoso, obviamente no se justifica bajo ningún punto de vista la inversión en este instrumental sólo para medir flúor. La técnica potenciométrica ofrece todas las posibilidades de medición, a menor costo, esfuerzo y con mayor precisión.

MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

ELECTRODO DE ION ESPECÍFICO

La concentración de fluoruro puede ser determinada mediante potenciometría directa utilizando un electrodo de ion específico. Este electrodo consiste en un cristal de fluoruro de lantano (LaF_3) con 0.3% de europio. Este cristal actúa como una membrana conductora iónica en la cual sólo el fluoruro puede actuar como ion móvil [36, 37]. El cristal separa una solución de NaF de referencia (habitualmente 0.001 mol/L) que se encuentra en el interior del electrodo, de la solución en la que se desea medir la concentración, Ilustración 1. En la solución de referencia se sumerge un alambre de plata cubierto de AgCl, que hace contacto con el cable coaxil que conectará al voltímetro.

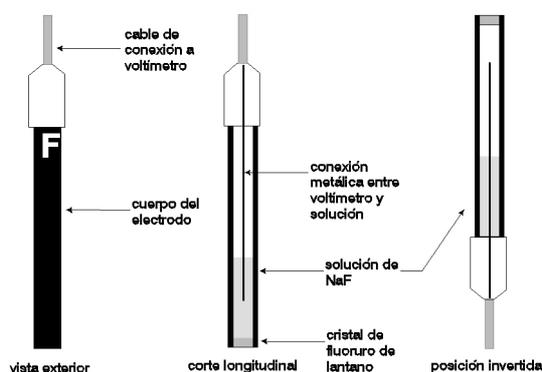


Ilustración 1: Vista exterior y corte longitudinal del electrodo. Efecto del cambio de posición del electrodo sobre la

disposición de la solución interna.

Como se puede observar el electrodo con este tipo de construcción no puede actuar en posición invertida, ya que la solución deja de estar en contacto con el cristal de fluoruro de lantano.

Existen otros electrodos que presentan una esponja entre el cristal y el conductor metálico que permite que la solución de NaF del interior haga contacto con el cristal y el conductor metálico aún cuando el electrodo está en posición invertida. Básicamente todas las marcas de electrodos presentan sus modelos con algunas de las especificaciones mencionadas. Para más información sobre características de electrodos, consultar en este capítulo modelos de electrodos.

Al colocar este electrodo en contacto con una solución de fluoruro se produce una asimetría en la distribución de iones fluoruro a ambos lados que desarrolla un potencial, el cual puede medirse conectando el electrodo de fluoruro a un electrodo de referencia de Ag/AgCl. El potencial medido depende de la actividad del ion fluoruro (a) en la solución como describe la ecuación de Nernst. Ambos electrodos se conectan a un milivoltímetro de escala expansible o ganancia variable.

$$E = E^{\circ} - S \cdot \log a$$

E = potencial medido

E° = potencial de referencia

S = pendiente

La actividad del ion fluoruro está relacionada con la concentración de fluoruro libre en la muestra (C_f)

$$a = \gamma \cdot C_f$$

γ : coeficiente de actividad

El coeficiente de actividad está muy influenciado por la fuerza iónica (μ) del medio

$$\gamma = f(\mu)$$

$$\mu = 1/2 \cdot \sum C_i \cdot z_i^2$$

C_i : concentración del i-ésimo ion.

z_i : valencia del i-ésimo ion.

La concentración total de fluoruro en la solución (C_t) es la suma de la concentración del fluoruro libre (C_f) y la concentración del fluoruro unido (C_b) a compuestos o elementos, así:

$$C_t = C_f + C_b$$

$$C_f = C_t - C_b$$

$$a = \gamma \cdot (C_t - C_b)$$

La actividad será tanto más parecida a la concentración total de la muestra cuanto menor sea la fracción de flúor unida, situación que se logra con agregado de buffer de ajuste de pH y fuerza iónica conocidos con las siglas TISAB². Han sido utilizadas diversas soluciones reguladoras de pH y fuerza iónica, con diferentes composiciones. Un TISAB debe cumplir básicamente tres condiciones:

1- Ajustar la fuerza iónica de las muestras. La forma de hacer esto es aumentando la fuerza iónica

² TISAB: siglas de total ionic strength adjustment buffer.

de tal manera que las diferencias se minimicen. El agregado de TISAB establece una fuerza iónica uniforme en todas las muestras y los patrones, creando en todos un valor constante de γ , de esta manera la actividad es proporcional a la concentración total.

2- Ajustar el valor de pH de manera que se eviten las interferencias producidas por el ion oxhidrilo.

3- Complejar cationes que pueden tener flúor ligado formando iones complejos estables como ocurre con los cationes Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} y en general cationes tri y tetravalentes.

Más adelante en este capítulo se describen soluciones apropiadas para la medición potenciométrica de fluoruro en diferentes muestras donde el fluoruro se halla en solución.

$$E = E^o - S \cdot \log \gamma \cdot (C_t - C_b)$$

Si $C_b = 0$

$$E = E^o - S \cdot \log \gamma \cdot C_t$$

Si μ es constante, entonces γ es constante, aplicando propiedad de logaritmo,

$$E = E^o - S \cdot \log \gamma - S \log C_t$$

$$E^{o'} = E^o - S \cdot \log \gamma$$

Si reemplazamos

$$E = E^{o'} - S \cdot \log C_t$$

El potencial medido (E) sigue la ecuación anterior en el rango de concentraciones 1 mol/L (solución saturada de NaF) a 10^{-5} mol/L. A concentraciones del orden de 10^{-5} mol/L o menores, el electrodo se desvía de la ecuación de Nernst y la respuesta deja de ser lineal.

En la Tabla 1 se describen los volúmenes de soluciones patrones, agua y TISAB necesarios para realizar una curva de calibración completa (Ilustración 2). Es aconsejable la realización de la misma al iniciar el trabajo con el electrodo. En mediciones posteriores bastará con la utilización de los patrones cercanos a la concentración de la muestra a medir.

Materiales: solución patrón 0.1 mol/L de NaF, pipetas de 1 mL y 10 mL, agua destilada, TISAB, tubos de ensayo. Las soluciones necesarias se obtienen a partir de la solución 0.1 mol/L y de las diluciones que a partir de ella se preparan.

Tabla 1: Curva de calibración electrodo de fluoruro.

[F ⁻] mol/L	Concentración y volumen de solución patrón utilizada para preparar el patrón cuya concentración se expresa en la primer columna, mol/L						mL H ₂ O	volumen final, mL	mL TISAB
	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}			
10^{-1}	1.0						9.0	8.5	0.85
$5 \cdot 10^{-2}$	0.5						7.5	10.0	1.00
10^{-2}		1.0					9.0	8.5	0.85
$5 \cdot 10^{-3}$		0.5					9.5	10.0	1.00
10^{-3}			1.0				9.0	7.5	0.75
$5 \cdot 10^{-4}$			0.5				9.5	10.0	1.00
10^{-4}				1.0			9.0	7.5	0.75
$7.5 \cdot 10^{-5}$				0.75			9.25	10.0	1.00
$5 \cdot 10^{-5}$				0.5			9.5	10.0	1.00
$2.5 \cdot 10^{-5}$				0.25			9.75	10.0	1.00
10^{-5}					1.0		9.0	9.0	0.90
$7.5 \cdot 10^{-6}$					0.75		9.25	10.0	1.00
$5 \cdot 10^{-6}$					0.5		9.5	10.0	1.00
$2.5 \cdot 10^{-6}$					0.25		9.75	10.0	1.00
10^{-6}						1.0	9.0	10.0	1.00

Es aconsejable la utilización de un milivoltímetro que permita modificar la sensibilidad. Según la ecuación de Nernst, un cambio en diez veces la concentración es acompañada de una modificación del potencial en aproximadamente 59 mV. Si el voltímetro permite ampliar la sensibilidad se puede llegar a tener medidas de potencial que difieran hasta en 600 mV cuando las concentraciones difieren en un factor de 10.

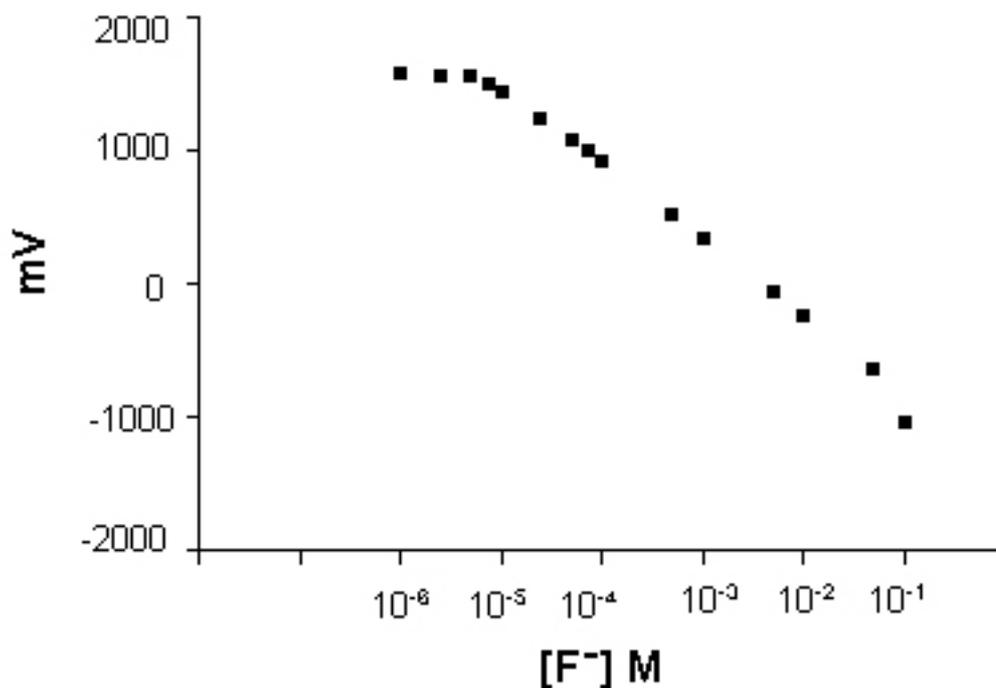


Ilustración 2: Curva de calibración obtenida con las soluciones descritas en la Tabla 1

Además permite, sin cambiar la pendiente, ajustar a una concentración determinada un valor deseado de E, o sea desplazar la curva de calibración hacia arriba o hacia abajo

TISAB

TISAB para medición de la concentración de flúor en agua

Frant et al [³⁸] propusieron para la medición de fluoruro en aguas de consumo, un TISAB con la

siguiente composición: 57 mL de ácido acético glacial, 58 g de cloruro de sodio y 0.3 g de citrato de sodio, más agua csp 1000 mL y pH 5-5.5. Este TISAB cumple con las tres condiciones básicas mencionadas anteriormente. Utilizando este TISAB se consiguen valores de concentración de flúor comparables con los obtenidos con el método SPADNS en una gran cantidad de aguas de bebida. Sugieren que este buffer también podría ser utilizado para mediciones en orina.

Utilizar el TISAB en proporción 1:1 con la muestra de agua. Las soluciones estándar de NaF son tratadas de la misma manera. Utilizando patrones de NaF en agua destilada el potencial medido sigue la ecuación de Nernst hasta 5 $\mu\text{mol/L}$, al agregar el TISAB en la proporción mencionada la linealidad con los patrones decrece, siguiendo la ecuación de Nernst hasta 26 $\mu\text{mol/L}$. Esta aparente pérdida de sensibilidad es atribuida a la disminución del coeficiente de actividad como consecuencia de aumento de la fuerza iónica y dilución de la muestra al medio. Si bien puede considerarse una desventaja, es importante tener en cuenta que las medidas de muestras serán más confiables dado que la fuerza iónica de patrones y muestras será muy similar.

TISAB para medición de flúor en orina

En nuestro laboratorio experimentamos con un TISAB compuesto por ácido cítrico 2 mol/L ajustado a pH 5-5.5 con solución Sørensen³. Este TISAB es apropiado para la medición de fluoruro en soluciones acuosas como aguas de bebida y orina. Cumple con las tres condiciones de un TISAB mencionadas anteriormente. Se utiliza en una proporción muestra:TISAB = 10:1.

TISAB para medición de flúor en solución libre de cationes complejables por fluoruro

En nuestro laboratorio, para la medición de fluoruro en muestras líquidas donde no se encuentran cationes complejables por el fluoruro, se utiliza un TISAB que cumple sólo con las dos primeras

³ Solución Sørensen: solución de NaOH saturada, aproximadamente 17 N.

condiciones: ajuste de fuerza iónica y pH. Este TISAB tiene una composición HAc 2 mol/L y NaAc 2 mol/L con pH 5.5. Se utiliza en una proporción muestra:TISAB = 10:1. Se obtuvieron resultados comparables a los obtenidos con el TISAB para medición de flúor en orina.

La ventaja de este TISAB sobre los anteriores es la facilidad de preparación y además no tiene problemas de conservación a temperatura ambiente. Aunque su concentración es elevada no forma precipitados.

TISAB para electrodo ELIT 8221

Cumple las características de un TISAB. Ajustando el valor de pH a 5.5, libera al fluoruro de complejos formados con protones, aluminio y otros cationes. Homogeneiza la fuerza iónica de muestras y patrones. Para su preparación: disolver 57 mL ácido acético, 45 g cloruro de sodio y 4 g de CDTA (ácido 1,2-diamino ciclohexan N,N,N,N-tetraacético) en 500 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 5.5 por adición de NaOH 5 mol/L, agregar agua hasta volumen final de 1 L.

Interferencias

Como se mencionó anteriormente el potencial desarrollado depende de la actividad del ion fluoruro la cual depende de la concentración del fluoruro libre, por lo tanto cualquier fenómeno físico o químico que conduzca a una disminución del fluoruro libre alterará la medida.

1) Influencia del pH: el HF es un ácido débil de $K_a: 4.57 \times 10^{-4}$.



A medida que el pH disminuye, aumenta la concentración de hidronios y por lo tanto la relación $[\text{F}^-]/[\text{HF}]$ disminuye. Si el pH es mayor que 5 esta relación supera el valor de 50, en estas

condiciones todo el flúor de la muestra se encuentra como fluoruro.

El ion oxhidrilo (OH^-) puede producir medidas de potenciales erróneos al utilizar el electrodo de ion específico. El oxhidrilo suma su efecto al del ion fluoruro. Cuando las concentraciones de oxhidrilo sean elevadas, el potencial medido será mayor. Esta interferencia es más importante cuanto menor es la concentración de fluoruro. Para eliminar este error, el pH debe ser menor que 9.

Como se dijimos anteriormente, cuanto menor es la concentración de fluoruro mas importante puede ser el efecto de la concentración de oxhidrilos. Con el fin de eliminar este problema se deben ajustar las muestras y los patrones a pH 5-5.5 con un buffer citrato de sodio 2 mol/L, que además permite ajustar la fuerza iónica del medio y actúa como complejante de metales pesados como el Al^{3+} , Fe^{3+} , etc. que también interfieren en la medición de fluoruro, por producir un aumento de la fracción de fluoruro unido (C_b).

2) Los iones de metales pesados como Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , La^{3+} , Zr^{4+} , son cationes que forman complejos muy estables con el fluoruro, disminuyendo la fracción libre en la muestra.

Con el agregado de citrato de sodio 2 mol/L, estos cationes pasan a formar parte de complejos mas estables con el citrato, dejando al fluoruro libre.

3) Calcio-fosfato: el calcio forma CaF_2 con el fluoruro, compuesto insoluble cuya interferencia también es eliminada por el agregado de buffer citrato 2 mol/L.

El fosfato por sí solo no interfiere, pero la formación de precipitado de ortofosfato de calcio adsorbe el fluoruro de la solución.

4) Otros iones: el acetato, citrato, Na^+ , K^+ , cloruro, yoduro y bromuro, no interfieren en la lectura, al menos en las concentraciones habituales de las muestras procesadas.

Efecto de la temperatura

Todas las medidas (muestras y patrones) deben ser realizadas a la misma temperatura ya que la pendiente de la ecuación de Nernst es una función directa de la temperatura. El electrodo con cristal de fluoruro de lantano presenta cambios de 2% en la lectura por cada grado centígrado de diferencia.

Matrices

El electrodo de fluoruro sólo mide actividades del ion si este se encuentra en medio acuoso. Por ello es muy importante distinguir las matrices en las que el fluoruro puede estar contenido; estas son variadas en cuanto a su composición y características, pero las podemos agrupar en simples y complejas.

a) Matrices simples: el fluoruro se encuentra libre o bien complejado con cationes, (Al^{3+} , Fe^{3+} , H_3O^+ , etc) pero en medio acuoso, lo que permite que la lectura pueda hacerse directamente con el electrodo previo agregado de buffer citrato 2 mol/L de pH 5.5. Incluimos en este grupo: aguas, orina y plasma.

b) Matrices complejas: el fluoruro se encuentra unido a constituyentes de la muestra, que impiden su extracción como fluoruro por simple dilución en agua. Para este tipo de muestras antes de poder realizar las mediciones, se debe aplicar un método de aislamiento. Con este fin se han desarrollado dos métodos:

1- Destilación: el flúor es separado por destilación como ácido fluorsilícico [111].

2- Difusión isotérmica: el fluoruro de la muestra se destila isotérmicamente como ácido fluorhídrico [³⁹]. Incluimos en este grupo de muestras: heces, productos alimenticios, hueso y plasma.

Límite de detección del electrodo

Como se mencionó anteriormente, cuando la concentración de fluoruro es menor a 10^{-5} mol/L, la respuesta del electrodo se desvía de la ecuación de Nernst y por debajo de 10^{-6} mol/L es común que el electrodo sea insensible a cambios de concentración, dando lecturas de potencial constante. Es conveniente que el usuario determine el límite de detección del electrodo en las condiciones de trabajo de cada laboratorio. Para ello se deben realizar diluciones desde 10^{-1} mol/L hasta 10^{-10} mol/L y graficar los valores obtenidos. Se debe trazar una línea horizontal con aquellos puntos que tienen igual valor de potencial y con los puntos en que se cumple la ecuación de Nernst, se realiza una regresión lineal entre el potencial y el logaritmo de la concentración. La intersección de ambas rectas indica el límite de detección de nuestro electrodo.

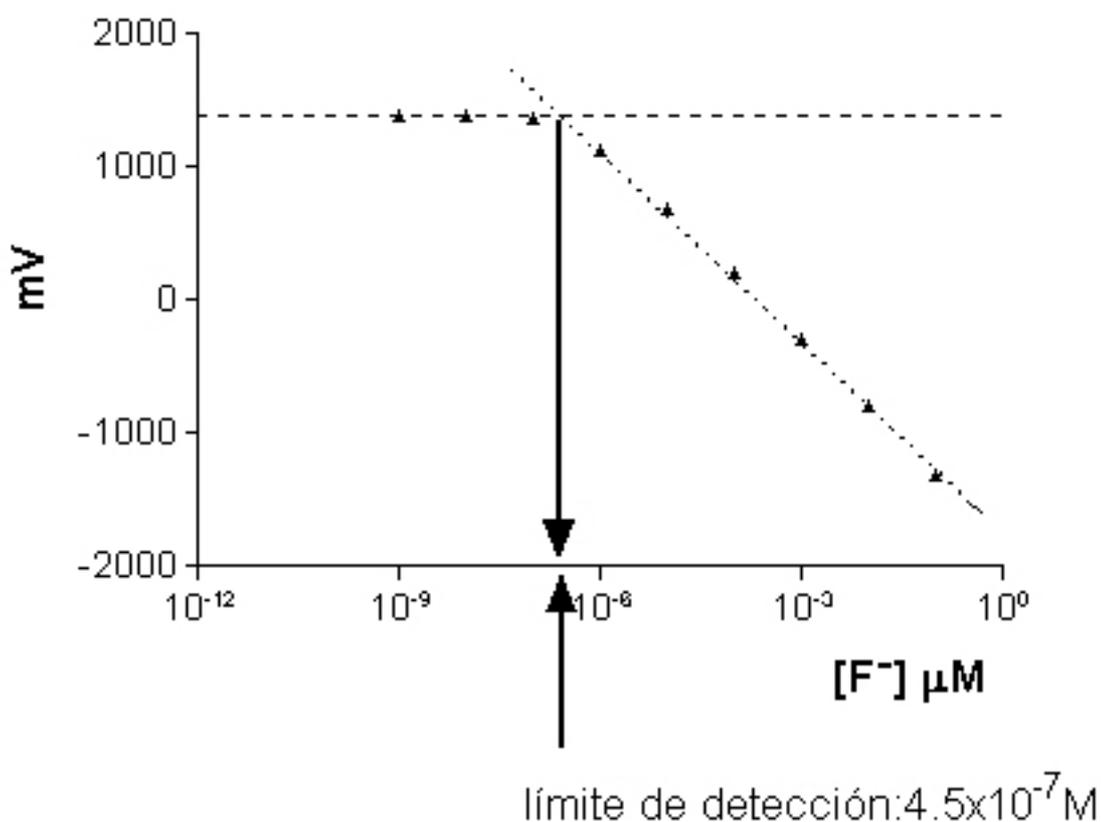


Ilustración 3: Gráfica para obtener el límite de detección del electrodo

En la Ilustración 3 se muestra la gráfica con la que se obtuvo el límite de detección de un

electrodo. En este caso el valor obtenido fue 4.5×10^{-7} mol/L ($0.45 \mu\text{mol/L}$).

Cualquier valor inferior a esta concentración no puede ser leído directamente, sino que requiere un proceso de concentración de la muestra por destilación isotérmica.

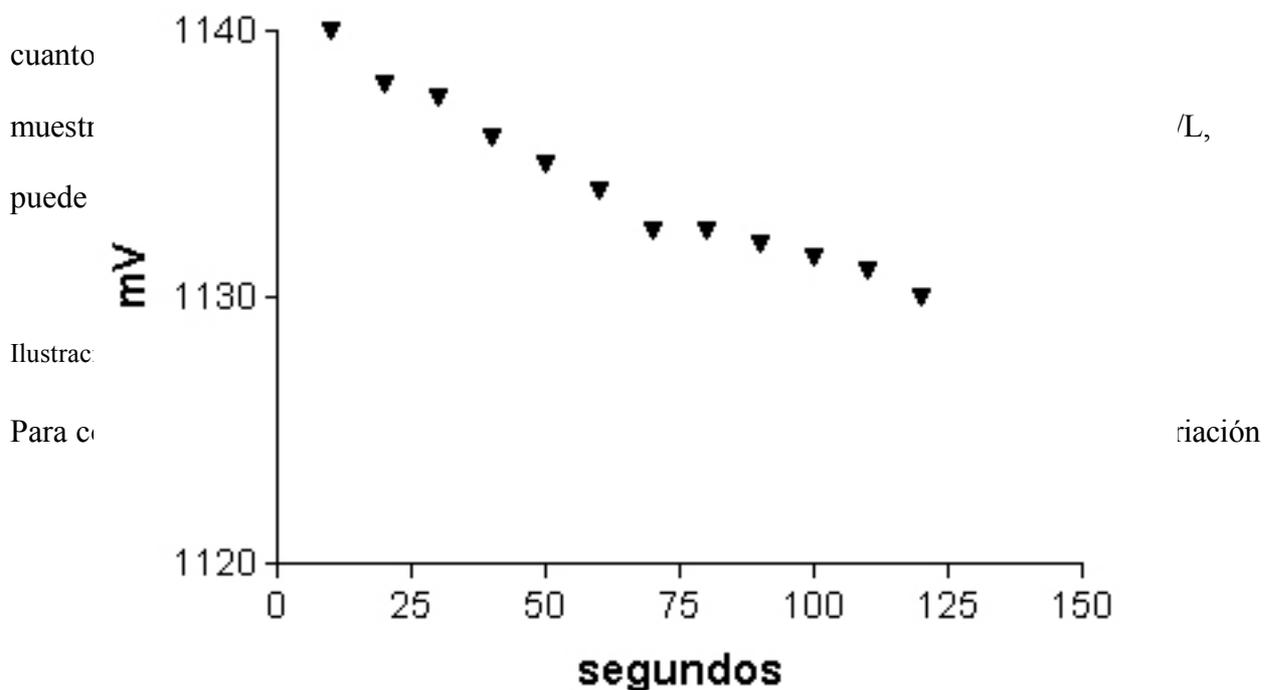
En la Tabla 2 se detallan los volúmenes de solución estándar utilizados y de agua necesarios para preparar una curva que permita calcular el índice de detección. Se parte de un patrón 0.1 mol/L y luego por diluciones sucesivas se preparan las otras soluciones.

Tabla 2: Preparación de soluciones para calcular el límite de detección del electrodo de fluoruro.

[F ⁻] mol/L	Concentración y volumen de solución patrón utilizada para preparar el patrón cuya concentración se expresa en la primer columna, mol/L					mL H ₂ O	volumen final, mL	mL TISAB
	10^{-1}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-9}			
10^{-1}	10					--	8.9	0.89
10^{-2}	1.0					9.0	10.0	1.0
10^{-3}	0.1					9.9	8.9	0.89
10^{-4}		1.0				9.0	10.0	1.0
10^{-5}		0.1				9.9	8.9	0.89
10^{-6}			1.0			9.0	10.0	1.0
10^{-7}			0.1			9.9	8.9	0.89
10^{-8}				1.0		9.0	10.0	1.0
10^{-9}				0.1		9.9	9.0	0.9
10^{-10}					1.0	9.0	10.0	1.0

Tiempo de lectura

Cuando un electrodo se sumerge en una solución, existe un tiempo durante el cual el potencial varía hasta alcanzar una lectura estable. Este tiempo de estabilización de las lecturas es más corto



puede considerarse oscilación propia del instrumento, Ilustración 5.

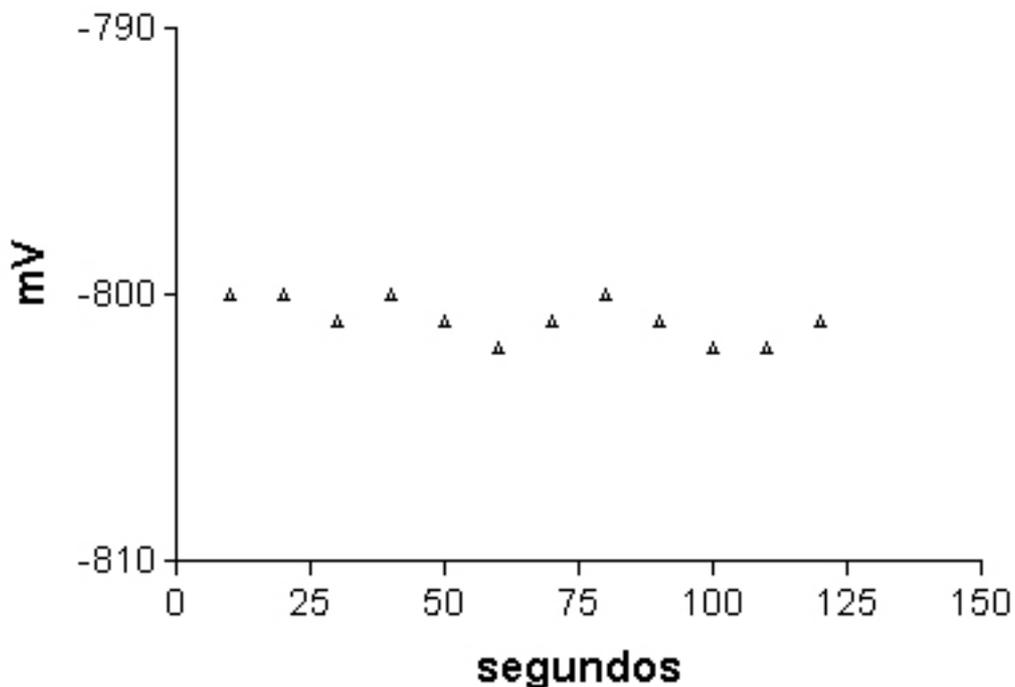


Ilustración 5. Estabilización de lectura del potencial para una solución 10^{-3} mol/L en función del tiempo

Modelos de electrodos

ELIT 8221

Es un electrodo de estado sólido de membrana cristalina y está diseñado para la medición de fluoruro en agua.

Especificaciones físico-químicas: Longitud con y sin contacto: 140 y 130 mm. Diámetro 8 mm, resistencia a 25 °C menor a 2.5 MOhm. Volumen mínimo de muestra para lectura 5 mL.

Especificaciones químicas: tiempo de preacondicionamiento 5 minutos. Rango de pH 4-8. Rango de temperatura: 5-80 °C. Temperatura óptima 25 °C. Recomendado para uso con TISAB en proporción 1:1 V/V.

Se recomienda el uso con un electrodo de referencia de simple unión. La pendiente a 25 °C es

54±5 mV por década de concentración y tiene un comportamiento Nernstiano entre 0.1 y 1900 ppm. El límite de detección es 0.02 ppm y su tiempo de respuesta⁴ menor a 10 segundos. El tiempo para alcanzar lecturas estables es de 2-3 minutos. El “drift” en una solución 1000 ppm es menor a 3 mV durante 8 horas.

La única interferencia es el anión oxhidrilo con un coeficiente de selectividad⁵ de 0.1, interferencia que es eliminada manteniendo el pH en un valor inferior a 8.

Orion 94-09

Electrodo constituido por un cristal de fluoruro de lantano. Se utiliza combinado con un electrodo de referencia independiente.

Orion 96-09

Electrodo constituido por un cristal de fluoruro de lantano. Es un electrodo combinado con un electrodo de referencia, ambos en un mismo sensor.

Construcción de un electrodo de fluoruro

El electrodo de fluoruro es un electrodo de estado sólido, donde la región sensible es un cristal de fluoruro de lantano (LaF₃). Vogel et al [112] describieron una forma sencilla de construcción de un microelectrodo.

A partir de un cristal de LaF₃ con 0.3% de europio de 1.6 mm de arista se pule una pieza esférica.

A un tip de una micropipeta se le corta una porción de manera que el diámetro del orificio sea ligeramente menor que la esfera del cristal, Ilustración 6. Luego se calienta el cristal en una cuchara metálica hasta una temperatura que pueda derretir el plástico del tip. Se coloca el tip sobre la esfera y se succiona por medio de una conexión realizada en el tip a una bomba de vacío.

⁴ Tiempo de respuesta: tiempo necesario para alcanzar el 90% de la lectura final al ser colocado en una nueva solución.

⁵ Coeficiente de selectividad: es una expresión de la extensión de la respuesta de un electrodo de ion selectivo a un ion interfiriente en proporción al ion medido. Por ejemplo, un coeficiente de 0.1 implica que el electrodo responde 10 veces más al ion primario que al interfiriente. Es decir si la solución contiene ambos iones, el ion interfiriente contribuye alrededor de un 10% en el cambio de la señal del electrodo cuando es inmerso en una solución testigo. El coeficiente de selectividad no es un valor constante, dependiendo de la fuerza iónica, la concentración de ambos iones y la temperatura.

De esta manera la esfera se incrusta en el plástico. Finalmente se pule la superficie de la esfera que queda hacia afuera del tip utilizando un papel de lija. El pulido se realiza hasta obtener una superficie plana que finalmente se pule a brillo de espejo utilizando óxido de aluminio. En el interior del tip se coloca una solución de KCl 0.1 mol/L y NaF 0.001 mol/L saturada en AgCl. Debe contener un alambre de plata cubierto de AgCl que esté sumergido en la solución y que haga contacto con un cable coaxial. Este último será la conexión con el voltímetro. Luego se sella con una resina epoxi de manera de aislar la solución interior del aire. No deben quedar burbujas en la solución interior, para lo cual es necesario eliminarlas con el uso de una jeringa.

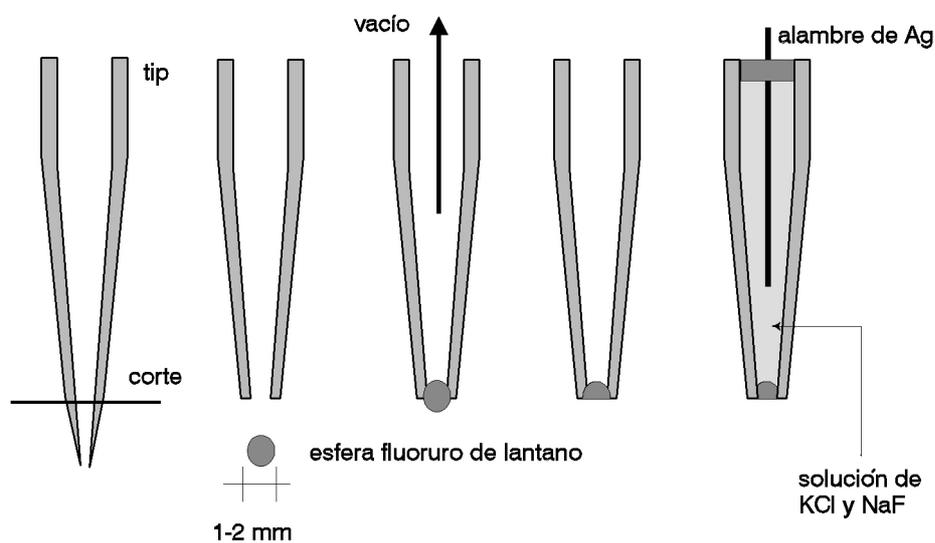


Ilustración 6: Pasos de construcción de un microelectrodo de fluoruro de estado sólido.

En el caso que se desee utilizar este electrodo en forma invertida, es conveniente que la solución interior tenga el agregado de 0.2-0.5% de agar-agar, de esta manera aunque quede alguna burbuja la misma no hace contacto con la zona sensible del electrodo.

Una vez construido el electrodo, dejarlo sumergido en solución 10^{-3} mol/L de NaF durante 1 semana y finalmente comprobar el rango de linealidad de la lectura de los milivoltios en función

del logaritmo de concentración del analito y su pendiente. Habitualmente se obtiene linealidad hasta concentraciones de fluoruro de 10^{-5} mol/L y respuesta hasta 10^{-6} mol/L. La pendiente debe ser cercana a 60 mV por cada diez veces de cambio en la concentración de fluoruro de la muestra.

MACROTÉCNICA POTENCIOMÉTRICA

Esta técnica es fácilmente aplicable a aquellos líquidos donde el fluoruro está libre o se puede dejar libre con el agregado de un TISAB y cuando se dispone de grandes volúmenes de muestra. Se requieren volúmenes de muestra suficientes para poder lavar los electrodos al menos dos veces con la solución a medir, ya que de lo contrario se producen grandes errores en el potencial desarrollado especialmente si las diferencias de concentración con la solución medida anteriormente es grande. Dos lavados son suficientes para estabilizar las lecturas.

POTENCIOMETRÍA DIRECTA EN SOLUCIONES ACUOSAS

Los electrodos de fluoruro y de referencia se colocan sobre un soporte de acrílico que permite mantenerlos en posición vertical. Se establece entre ellos un contacto iónico a través de la solución a medir y se elimina fácilmente la muestra una vez realizada la medición (Ilustración 7). Este último proceso se realiza por aspiración con una jeringa o bomba de vacío.

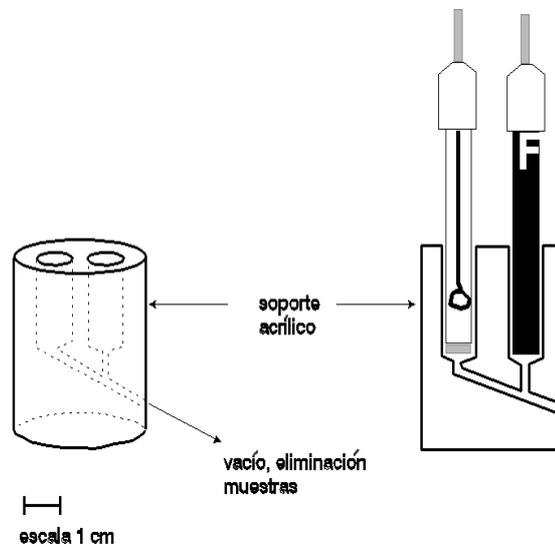


Ilustración 7: A la izquierda, vista tridimensional del soporte de acrílico. En línea de puntos se muestran los orificios y canales realizados en el bloque. A la derecha, corte transversal del soporte con los electrodos colocados en posición de lectura.

Las muestras y los patrones se deben preparar con el agregado de 10% de buffer citrato 2 mol/L, luego se colocan en un orificio, que por inundación llena el otro (Ilustración 8). Luego se colocan los electrodos, teniendo la precaución que no queden burbujas, especialmente en la parte sensible del electrodo de flúor y en el puente que une ambos compartimientos. En caso de quedar burbujas deben eliminarse ya que pueden ocasionar errores en las lecturas de potencial. Se espera el tiempo necesario para obtener la lectura estable y se registra el potencial. El lavado del sistema se realiza repitiendo los pasos seguidos para la carga y lectura de la muestra, pero utilizando agua destilada. Si se dispone de volúmenes suficientes de muestra y patrones, es aconsejable el lavado del sistema con los mismos antes de la lectura.

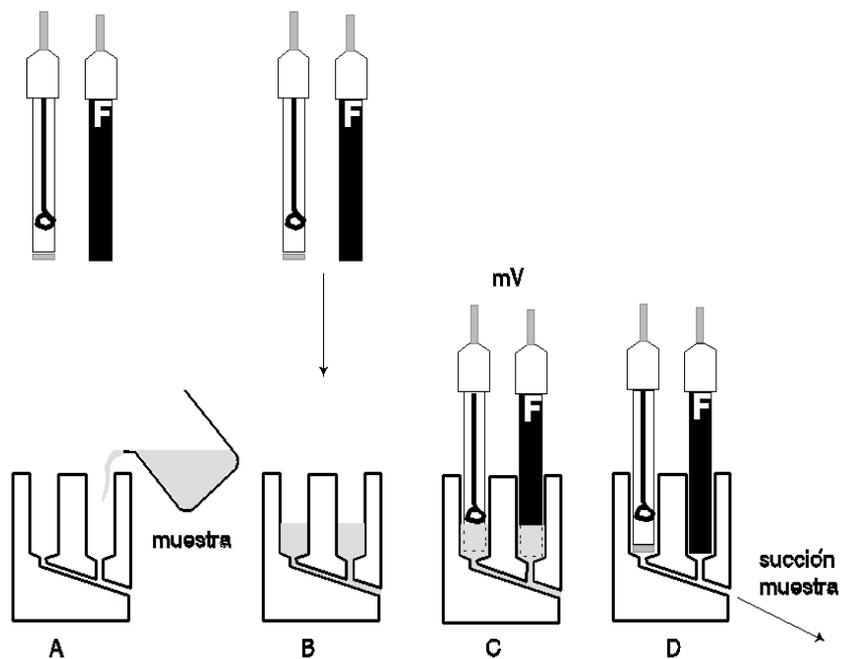


Ilustración 8: Procedimiento de medida con macrotécnica. A y B: colocación de la muestra. C: colocación de los electrodos y medida del potencial. D: eliminación de la muestra. Para el lavado del sistema se repiten los pasos A, B, C y D con agua destilada.

La curva de calibración se procesa de la misma manera que las muestras.

Ventajas: rapidez y sencillez. No requiere cuidados en el volumen de muestra gastado y permite un fácil lavado del equipo. Las curvas de calibración obtenidas son comparables a otras técnicas.

Desventaja: requiere volúmenes de muestra superiores a 1 mL.

Una variante para este sistema puede ser la utilización de dos electrodos sumergidos en un pequeño vaso de precipitación. La desventaja de esta disposición es que el volumen de muestra necesario es aun mayor.

POTENCIOMETRÍA DIRECTA POST-CALCINACIÓN

Torma et. al propusieron un método para la medición de flúor en alimentos usando el electrodo

de ion específico. Esta técnica prevé la mineralización de la muestra por calcinación y disolución de la misma en medio ácido. Previa medida con el electrodo, la muestra se ajusta a pH neutro con una solución buffer, que no debe contener iones interfirientes.

Procedimiento

Tomar 10 g de muestras de alimento.

Mineralizar la muestra por calcinación en un crisol.

Agregar a las cenizas obtenidas 100 mL de ácido perclórico al 72%.

Transferir la mezcla a un sistema de destilación a vapor de Claissen.

Agregar perlas de vidrio.

Agregar 50 mL de agua destilada.

Calentar hasta 120 °C sin el tubo de vapor.

Conectar el tubo de vapor y destilar manteniendo la temperatura entre 135 y 150 °C.

Recolectar 400 mL de destilado.

Agregar NaOH 0.5 mol/L hasta pH ligeramente alcalino (fijado con fenolftaleína).

Ajustar a 500 mL.

Transferir 50 a 70 mL a un recipiente de 100 mL.

Neutralizar con HCl 0.1 mol/L.

Agregar 10 mL de buffer de Mac Ilvaine ⁶ de pH 7.

Medir con el electrodo de ion específico.

Procesar simultáneamente testigos de NaF en agua de concentraciones comparables a la de la muestra, preparadas a partir de NaF 1000 ppm.

⁶ 3.53 ml de ácido cítrico 0.1 mol/L con 16.47 ml de fosfato monoácido de sodio 0.2 mol/L de pH 7.

Recuperación y reproducibilidad del método

Con este método se hallan porcentajes de flúor en alimentos que no discrepan de los obtenidos con el método colorimétrico-destilación. La ventaja del método es ser más preciso y más rápido. Para concentraciones debajo de 1 ppm el tiempo necesario para alcanzar medidas de potencial estable es más prolongado.

El método no muestra interferencia por presencia de iones que comúnmente alteran la medición de fluoruro con el electrodo.

MICROTÉCNICA POTENCIOMÉTRICA

El electrodo de ion específico tiene una zona sensible de aproximadamente 0.5 cm de diámetro y está diseñado, según el manual, para ser sumergido en una solución, junto con un electrodo de referencia. Este procedimiento requiere de al menos 1 mL de muestra con soportes adecuados o 5 mL si se trabaja con un recipiente convencional.

Sin embargo, se han realizado intentos de maximizar la utilización del electrodo adaptándolo a muestras de volúmenes reducidos.

Como paradigma de este aprovechamiento del electrodo se puede citar el trabajo de Hallsworth, desarrollado para la medición de muestras con flúor en matrices complejas como el hueso y diente. Este método se describe a continuación.

POTENCIOMÉTRICA - CON DISOLUCIÓN O MICRODIFUSIÓN

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico. La curva de calibración se prepara disolviendo NaF de calidad analítica en agua. Fue desarrollada para medir flúor en matrices complejas como esmalte dental, hueso y cenizas [40]. La

técnica permite medir volúmenes de solución tan pequeños como 1 μL y es confiable si la misma se lleva a cabo como mínimo por quintuplicado. De ser necesario, los autores describen un ingenioso sistema de destilación que permite concentrar el fluoruro en 10 μL de un buffer. Es uno de los pocos trabajos en que es reconocida la memoria del electrodo. El lector es alertado acerca de la dificultad al medir muestras de concentraciones muy diferente por el mencionado fenómeno de memoria. Se utiliza un electrodo de referencia de calomel diseñado que permite el acople con el electrodo de flúor de manera que la muestra queda confinada como un pequeño disco líquido entre el electrodo de fluoruro y el de referencia (Ilustración 9).

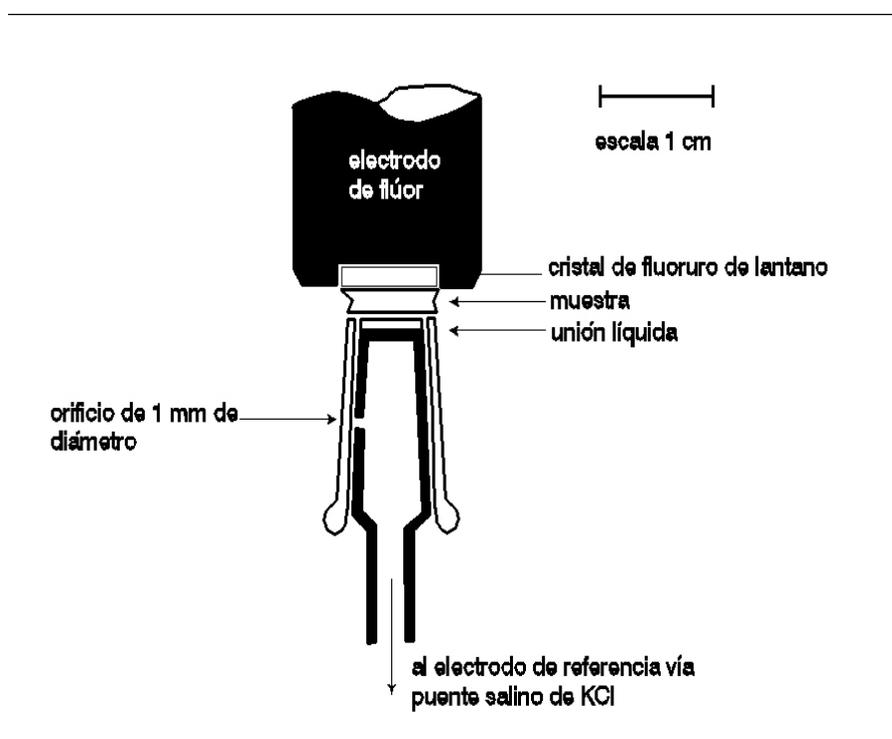


Ilustración 9: Ensamble del electrodo de flúor con el electrodo de referencia

Procedimiento

Dado que el procedimiento es aplicable a muestras insolubles o de constitución muy compleja, la

medición requiere disolución o difusión isotérmica, respectivamente.

Muestras que no requieren destilación:

1- Disolución: en una policubeta de material plástico se colocan 10 μL de HClO_4 1 mol/L y 20 μg de dentina, hueso, etc. Se agita por vibración durante 30 segundos y luego se centrifuga.

En el sobrenadante se obtiene el fluoruro.

2- Se adicionan 4 μL de buffer acetato⁷, de esta manera el pH final es 5.2 a 5.3.

3- Se mide el potencial con un electrodo de ion específico y un electrodo de referencia de calomel conectados a través de una unión especialmente diseñada de manera que el volumen de muestra se distribuye como una fina capa líquida sobre la zona sensible del electrodo.

4- El tiempo de estabilización es de 1 minuto o más. Las dos primeras mediciones se desestiman y se realizan quintuplicados de cada muestra. Si se necesitan tiempos de medición más prolongados se debe utilizar un mecanismo antievaporación, de manera de evitar la variación de concentración durante el proceso de medición.

5- Las soluciones estándar de NaF, se preparan disolviendo esta droga en una mezcla de 4 partes de buffer acetato: 1 parte de HClO_4 .

6- Las concentraciones de las muestras se determinan por interpolación del potencial hallado para las muestras con la curva de calibración hallada para los testigos.

Si las muestras requieren microdifusión se utiliza el dispositivo y procedimiento descrito en el capítulo 4, destilación isotérmica.

Recuperación y reproducibilidad del método

Realizando las mediciones por quintuplicado se obtiene un error menor al 12%.

⁷ Buffer acetato: 20.7 g de NaOH, 300 ml de H_2O , 28.7 ml de HAc glacial, 1.05 g de ácido cítrico y agua csp 500 ml. La solución tiene luego de preparada pH aproximadamente 7. Este buffer se utiliza para neutralizar el HClO_4 1 mol/L en una proporción buffer acetato: $\text{HClO}_4 = 4:1$

Límite de detección: 10 pg de fluoruro en 1 μ L de solución.

Reproducibilidad en el rango 2.6-105 μ mol/L.

Recuperación utilizando microdifusión: 89-105%, con reproducibilidad en el rango 1-100 ng de flúor.

Coefficiente de variación intraensayo para medidas en hueso 3.7%.

MICROPOTENCIOMETRÍA DIRECTA

El electrodo de ion específico puede conectarse con el electrodo de referencia mediante un soporte construido en acrílico como el que se detalla en la Ilustración 10. Este soporte presenta un orificio donde se coloca el electrodo de referencia y una superficie plana donde se colocará la muestra y el electrodo de flúor. El electrodo de referencia y el de flúor están en contacto electrolítico a través de un puente salino, que se halla dentro de un tubo de polietileno en la parte inferior del soporte. El dispositivo permite trabajar con muestras de 50-100 μ l sin necesidad de enjuagar los electrodos. Esta técnica se aplica directamente a aquellos líquidos donde el fluoruro esta libre y en concentraciones mayores de 0.45 μ mol/L, pero que el volumen de muestra disponible no alcanza 1 mL.

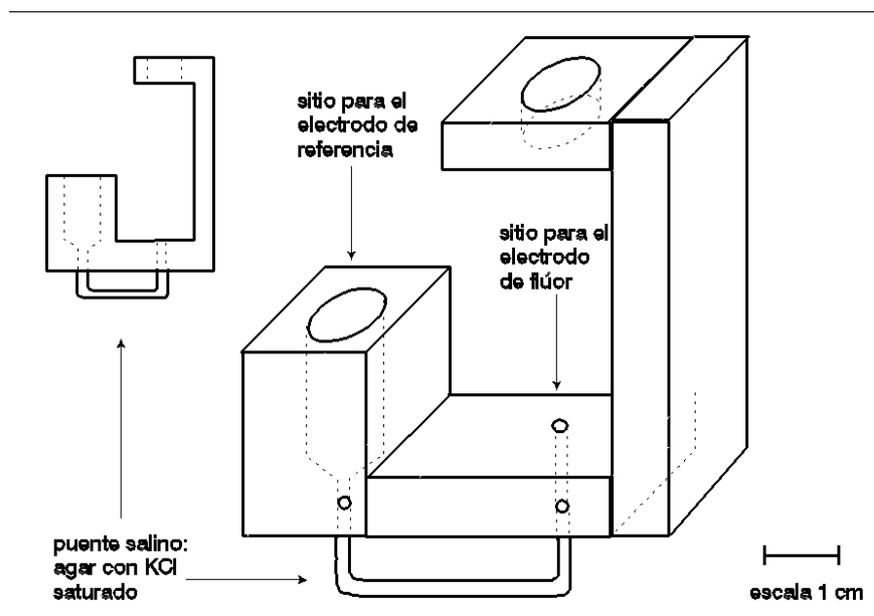


Ilustración 10: Soporte de acrílico para los electrodos de referencia y de ion específico.

La muestra y patrones deben tener un 10% de buffer citrato de sodio 2 mol/L y se ubican realizando contacto entre la zona sensible del electrodo y el puente salino. Antes de colocar la muestra se debe secar con papel de filtro la superficie sensible del electrodo de fluoruro y la superficie de acrílico del soporte, donde desemboca el puente salino, bajo el electrodo de fluoruro (Ilustración 11 y Ilustración 12).

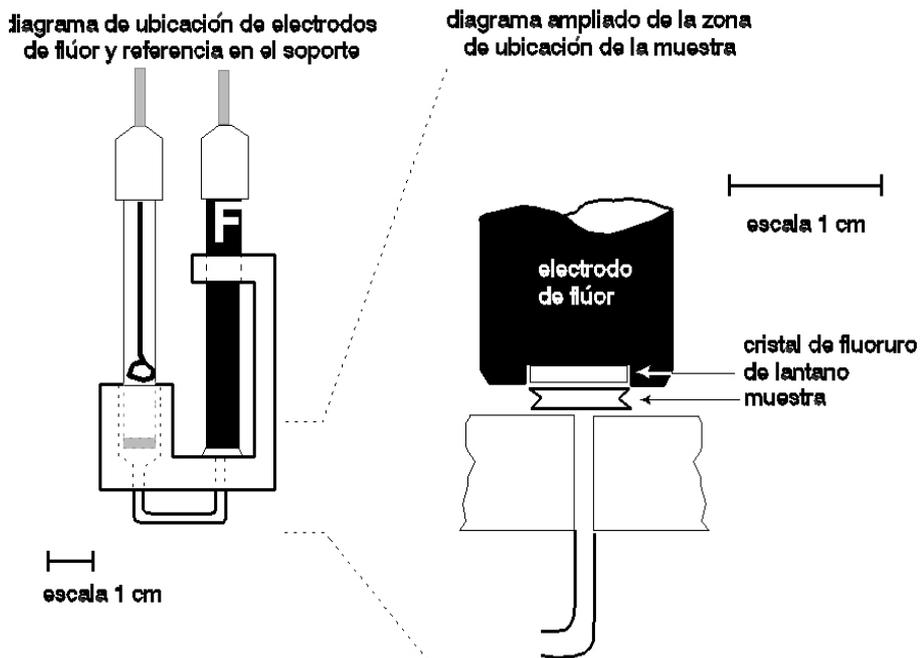


Ilustración 11: A la izquierda: ubicación de los electrodos de referencia y fluoruro en el soporte para microtécnica potenciométrica. A la derecha ampliación de la zona sensible del electrodo y puente salino.

Se coloca la solución a medir con micropipeta (Ilustración 12), luego se baja el electrodo de fluoruro realizando movimientos giratorios hasta que quede una luz de 1-2 mm, de esta manera la muestra ocupa toda la superficie del sensor.

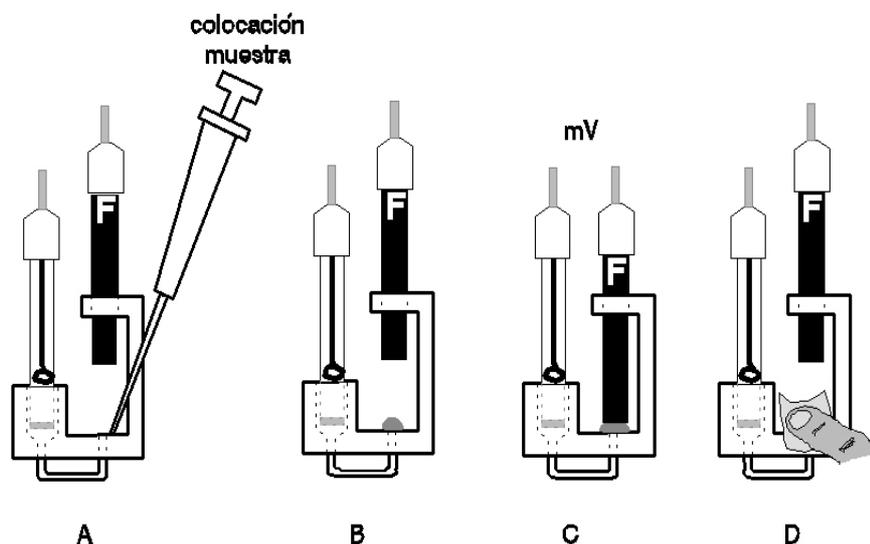


Ilustración 12: Medición de fluoruro por microtécnica potenciométrica. A: colocación de la muestra, B y C: ajuste del electrodo de fluoruro a su posición de lectura. D: limpieza de la zona donde se ubicó la muestra con un papel absorbente.

El tiempo de espera para las lecturas es igual que para la macrotécnica potenciométrica, siendo suficiente 60 segundos para todas las concentraciones.

El electrodo de referencia se mantiene fijo, sumergido en una solución saturada de KCl saturado en AgCl. Solamente es necesario desplazar verticalmente el electrodo de fluoruro para retirar la muestra ya leída, secar las superficies y colocar la nueva muestra a leer.

La curva de calibración es la misma que se utiliza con macrotécnica y como en toda medición la precisión de las mediciones decrece al aumentar la dilución.

En la Ilustración 13 se muestran las curvas de calibración con patrones de NaF y 10% de TISAB, obtenidas con el mismo electrodo (Orion 94-09, Mass, USA) con macro y microtécnica. En el caso de macrotécnica se utilizaron 5 mL de cada patrón, mientras que con la microtécnica el

volumen fue de 100 μ l. En todos los casos el tiempo de lectura del potencial desarrollado fue de 1 minuto y las mediciones se realizaron a temperatura de 20 $^{\circ}$ C.

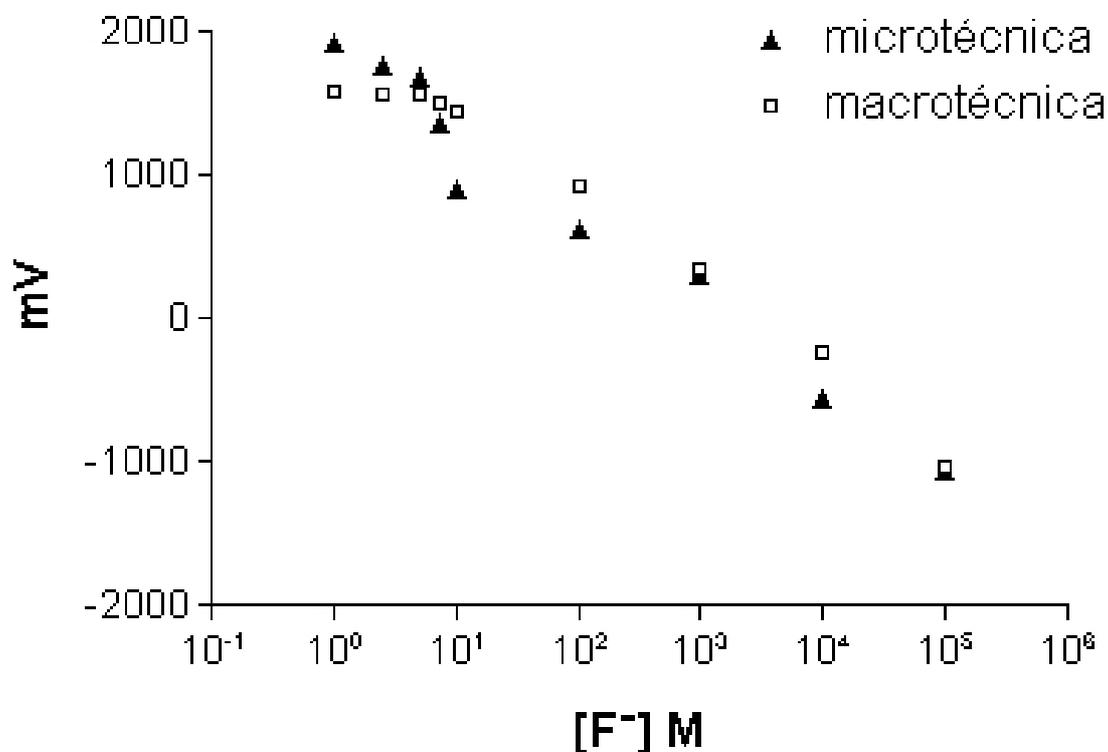


Ilustración 13: Curva de calibración con macro y microtécnica.

Como puente salino se puede utilizar la misma solución que llena el receptáculo del electrodo de referencia (KCl saturado, saturado en AgCl), teniendo la precaución que el nivel del líquido en dicho receptáculo sea igual a la superficie plana donde se coloca la muestra. Otra posibilidad es llenar el tubo de polietileno que soporta el puente salino con una solución de agar-agar al 2% disuelto en KCl saturado, saturado en AgCl. Al llenar el puente con agar-agar se debe tener la precaución que no queden burbujas dentro del mismo ya que estas impedirán el contacto electrolítico del sistema.

La comparación de ambos puentes salinos indicó que la precisión y sensibilidad son mayores a bajas concentraciones cuando se utiliza el puente de agar-agar, con respecto al puente de solución

acuosa, Ilustración 14. A concentraciones mayores a 10 $\mu\text{mol/L}$ no se notaron diferencias.

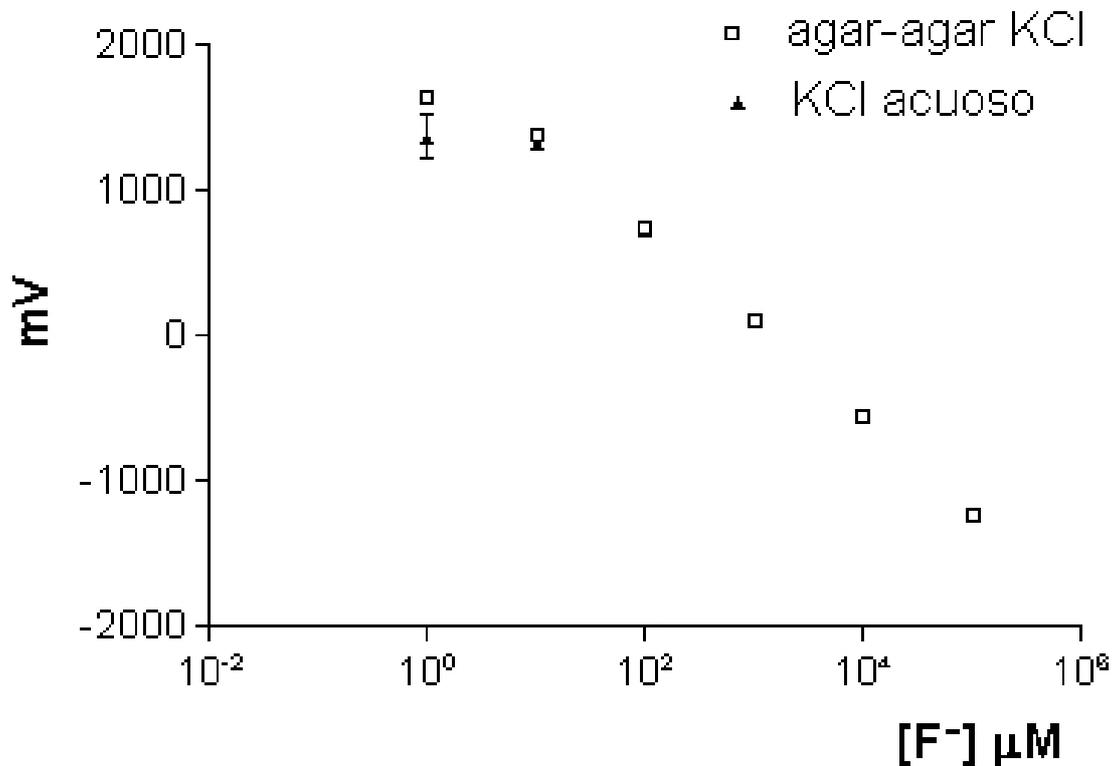


Ilustración 14: Comparación del puente salino utilizado en la microtécnica potenciométrica. Se puede observar que para concentraciones mayores a 100 $\mu\text{mol/L}$ coinciden ambas mediciones.

Un inconveniente en las medidas potenciométricas es que el electrodo presenta histéresis importante especialmente cuando se pasa de soluciones concentradas a diluidas.

Para estudiar esto, se realizó una curva de calibración de 10^{-6} a 10^{-1} mol/L. Al final de la curva se midió el potencial para una solución de concentración 10^{-5} mol/L, tres veces consecutivas. Sin lavado previo, se calculó el valor de la concentración de fluoruro utilizando la curva de calibración. La experiencia se realizó utilizando un puente salino de KCl acuoso y un puente de KCl en agar-agar. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Medida de histéresis con puente de KCl acuoso o puente de

KCl en agar-agar				
	puente KCl acuoso		puente KCl agar-agar	
[F ⁻] μmol/L (analítica)	10	10	10	10
	1°	3°	1°	3°
	medición	medición	medición	medición
[F ⁻] μmol/L (medida)	700	330	70	27
error%	6900	3200	600	170

Si no se lava la superficie donde se ubica la muestra y se realizan lecturas de potenciales de soluciones 10.000 veces más diluidas que la anterior se pueden obtener errores de hasta 6900% según se observa en la Tabla 3.

Se repitió la misma experiencia pero realizando la curva en el orden 10^{-1} - 10^{-6} mol/L y al finalizar la curva se determinó la concentración de una solución de concentración analítica 10^{-2} mol/L. En este caso el error fue inferior al 5%. Por lo tanto es aconsejable ordenar las muestras y los patrones para la lectura del potencial, haciendo una previa estimación de la concentración. Además es conveniente leer 2 veces cada muestra, tomando el segundo valor.

Buffer para medición directa con macro o microtécnica

El buffer utilizado en un principio fue citrato de sodio 2 mol/L pH 5.5. Este buffer se agrega en una proporción buffer:muestra = 1:10. De esta manera se logra ajustar el pH y la fuerza iónica de las muestras a un valor constante. El problema de este buffer es que una vez preparado comienza a precipitar debido a su elevada concentración. Este fenómeno se observa a temperatura ambiente, pero se retarda si el buffer se conserva a -20 °C.

Se preparó buffer ácido acético/acetato de potasio 5.51 mol/L de HAc y 5.51 mol/L KAc. Se utilizó en proporción buffer:muestra = 1:10. El buffer concentrado se preparó de la siguiente manera: 15.71 mL de ácido acético glacial densidad 1.0576 g/mL 99.5% P/P y se le adicionaron

22.59 g de KAc. Se ajustó a 50 mL de volumen final con agua destilada.

Los resultados obtenidos comparando el buffer ácido acético 5.51 N, acetato de potasio 5.51 mol/L con ácido cítrico 1 mol/L citrato de sodio 1 mol/L, utilizando testigos cuyas concentraciones oscilan entre 10^{-3} y 10^{-6} mol/L de NaF, fueron:

Buffer ácido acético acetato de potasio

$$r^2 = 0.7852$$

$$\text{pendiente} = -0.00573$$

$$n = 4$$

Buffer ácido cítrico / citrato de sodio

$$r^2 = 0.8539$$

$$\text{pendiente} = -0.00748$$

$$n = 4$$

Conclusión: para estas concentraciones y realizando una medición directa no existen diferencias significativas entre ambos buffers. Se debe tener en cuenta que el buffer ácido acético/acetato de potasio ajusta la fuerza iónica y el pH, pero no tiene la propiedad de liberar el fluoruro unido a cationes trivalentes como el Fe^{3+} .

MICROADAPTADOR PARA POTENCIOMETRÍA DIRECTA

Si se dispone de un electrodo de fluoruro que permita lecturas en forma invertida se puede construir un sistema que se adapta al electrodo, permitiendo la estabilización de varias muestras simultáneamente [112].

Este dispositivo consiste en un anillo de silicona o algún material inerte que se adosa al electrodo y en el que se han realizado orificio pasantes, Ilustración 15. El diámetro de los orificios dependerá del capilar utilizado como puente salino. En estos orificios se colocan las muestras y luego se introduce un capilar conectado al puente salino, que conecta con el electrodo de

referencia.

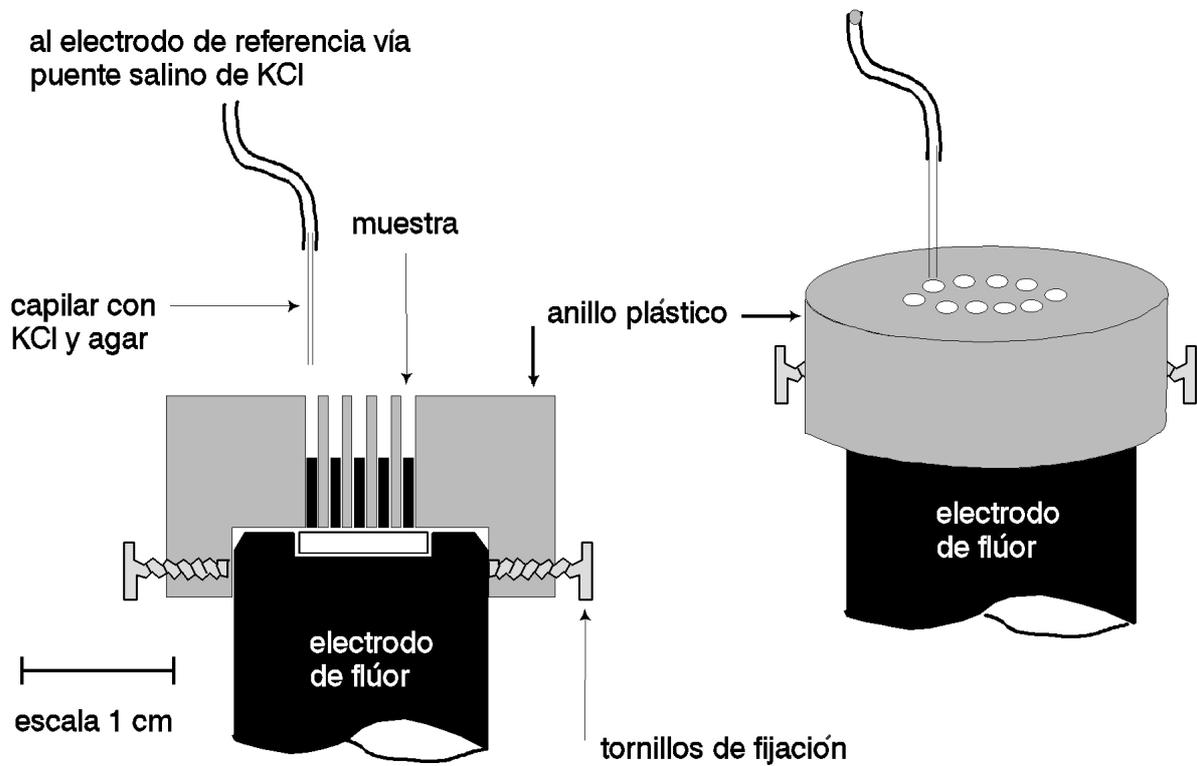


Ilustración 15: Adaptador para medición de múltiples muestras. El dispositivo permite a todas las muestras el mismo tiempo de equilibrio con el electrodo.

Las muestras se colocan en los orificios, de esta manera todas tienen el mismo tiempo de estabilización con el electrodo de fluoruro y se cambia el capilar de un orificio a otro, registrándose la medida del potencial desarrollado.

Para la limpieza de cada orificio se realiza por succión y lavado utilizando una micropipeta.

4

DESTILACIÓN DE FLÚOR

DESTILACIÓN DE FLÚOR

El flúor de una muestra puede ser destilado como ácido fluorhídrico (HF) o bien como ácido fluorsilícico. Este proceso se lleva a cabo en medio ácido y sólo es posible si el flúor se encuentra al estado de fluoruro o formando compuestos donde el enlace puede romperse por la presencia de ácido y calor. Este método requiere volúmenes importantes de muestras (aproximadamente 100 mL) que dependerá en gran medida de la concentración de flúor.

Como reactivo para crear el medio ácido se utiliza ácido sulfúrico (H_2SO_4). Se debe recordar que si el método de determinación que se aplicará es colorimétrico con sales de circonio, el sulfato es un interviniente. El problema potencial de interferencia se soluciona controlando cuidadosamente que la temperatura de destilación no supere los 180 °C. El cloruro también es un interfiriente potencial que la destilación no eliminará, ya que en presencia de ácido sulfúrico puede destilar como ácido clorhídrico (HCl). Para prevenir la interferencia posterior se puede agregar al líquido sometido a destilación, cristales de sulfato de plata (Ag_2SO_4). Este agregado transforma el cloruro en cloruro de plata que permanece insoluble aún en un medio fuertemente ácido.

Procedimiento: En un balón de destilación se colocan 200 mL de ácido sulfúrico concentrado, 400 mL de agua destilada y cristales de sulfato de plata, dependiendo de la presencia de cloruros. Luego se agregan 25-35 perlas de vidrio y se destila a 180 °C para eliminar contaminantes de

flúor. Se descarta el destilado y se agregan 300 mL de la muestra. Se repite la destilación hasta que todo el fluoruro haya destilado

DIFUSIÓN ISOTÉRMICA

La difusión o destilación isotérmica permite además de concentrar el fluoruro de la muestra, aislarlo en un medio de fuerza iónica conocida. La destilación isotérmica se fundamenta en que el fluoruro en medio ácido se transforma en ácido fluorhídrico, compuesto volátil que puede ser recogido sobre una solución alcalina, por ejemplo NaOH, logrando así aislarlo de la matriz compleja. Utilizando un volumen de solución alcalina menor que el volumen de la muestra se logra concentrar el fluoruro de la muestra en un factor igual a la relación de volúmenes.

$$\text{factor de concentrac ión} = \frac{\text{volumen de muestra}}{\text{volumen de solución alcalina}}$$

Al tratar la muestra con HCl 6 mol/L saturada de hexametildisiloxano, el fluoruro se protoniza



En este medio, el equilibrio se desplaza hacia la derecha, favoreciendo la formación de HF, que por su volatilidad se separa de la muestra acidificada. El HF en contacto con una solución de NaOH 1.63 N, se transforma nuevamente en fluoruro, donde queda atrapado.



De esta manera logramos obtener el fluoruro aislado en una solución alcalina.

La solución anterior debe ser neutralizada para garantizar la lectura de la concentración de fluoruro. Este procedimiento puede llevarse a cabo con HCl y luego agregarle buffer citrato de sodio 2 mol/L para ajustar el pH a 5-5.5. El inconveniente en el ajuste del pH, radica en que el

NaOH remanente es variable según el HF destilado y el tiempo de destilación, además el punto de equilibrio es difícil de hallar por ser el NaOH y el HCl ambos base y ácido fuerte.

La neutralización puede llevarse a cabo adicionando HAc diluido, con lo cual es más fácil hallar el punto de equivalencia, por ser el HAc un ácido débil, además queda en la muestra una concentración de acetato y ácido acético (si este es agregado en exceso) que regula el pH del medio a un valor aproximado a 4.75. Este método de neutralización presenta ventajas tanto en el tiempo de trabajo como en la facilidad para alcanzar un valor de pH adecuado.

Cuando la muestra es sólida (heces, huesos o dieta) se produce una destilación de agua de la solución de hidróxido de sodio a la muestra, lo cual no ocurre en las soluciones estándar por ser soluciones acuosas. Por esta causa el volumen en el tubo con hidróxido de sodio queda ligeramente menor, y por lo tanto, los volúmenes se deben ajustar en todas las soluciones antes de leer. El dispositivo utilizado debe ser plástico, ya que el HF ataca el vidrio, además debe ser hermético y permitir mezclar los reactivos una vez cerrados.

El tiempo requerido para la recuperación total del fluoruro de la muestra es 72 horas, observándose una recuperación rápida en las primeras horas y luego más lenta. La primer fase puede ser por disolución de fluoruro en la superficie del NaOH y la segunda fase, debido a la difusión a todo el volumen de solución.

Se deben procesar las muestras y los patrones simultáneamente para obtener la curva de calibración. Si utilizáramos una curva preparada con NaF, sin someterla a destilación, la fuerza iónica de los medios sería diferente a la de las muestras y las lecturas de potencial no serían comparables.

Como dijimos, el tiempo mínimo para una recuperación del 100% es de 72 horas, pero no debe exceder a una semana, ya que si esto sucede, el HCl 6 mol/L utilizado para crear el medio ácido en la muestra, difunde a la solución alcalina produciendo una neutralización parcial. Luego, al

agregar el HAc, puede encontrarse un exceso de ácido lo que hace que el pH sea muy inferior a 5, valor que es inadecuado para efectuar la determinación.

Se han diseñado diferentes sistemas para lograr la destilación en condiciones isotérmicas. A continuación se describen diseños de las cámaras utilizadas.

MICROTÉCNICA DE HALLSWORTH

Hallsworth et al [112] diseñaron un dispositivo de destilación empleando tubos de polipropileno como se detalla en Ilustración 16.

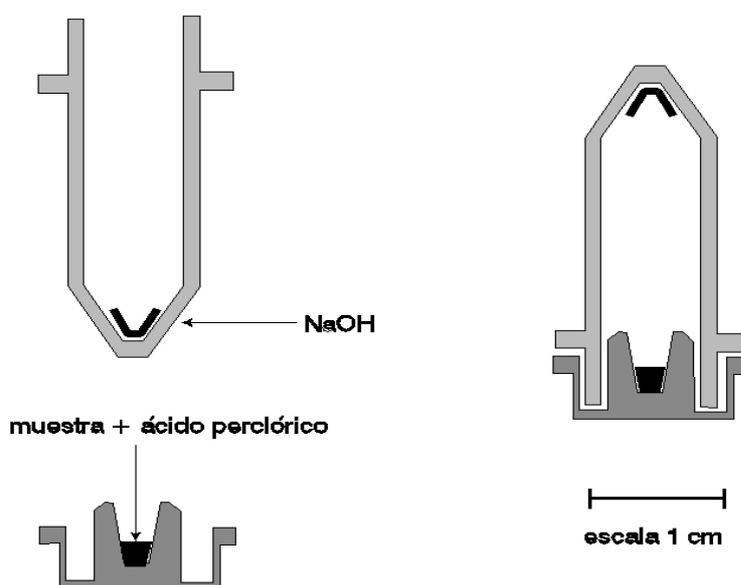


Ilustración 16: Cámara de destilación isotérmica propuesta por Hallsworth

Básicamente, se colocan en el tubo 5 μL de NaOH 0.1 mol/L, a continuación se lleva a sequedad.

Por otra parte se coloca la muestra en la tapa y se calcula el volumen exacto por pesada con una balanza de sensibilidad ± 0.1 mg. Se adicionan 50 μL de HClO_4 al 60% y se tapa. Las cámaras tapadas se colocan en un container con perlas de NaOH⁸ y se mantienen a 60 °C por 16 horas.

Procedimiento:

⁸ El objetivo de conservarlos en un container con NaOH es evitar la posible contaminación con fluoruro de alguna fuente volátil.

- 1- Se coloca en una cámara 5 μL de NaOH 0.1 mol/L y se seca de manera que el NaOH quede pegado en la tapa de la cámara como una lámina.
- 2- Se coloca la muestra cuyo volumen se calcula por pesada.
- 3- Se agregan 50 μL de HClO_4 , diluido al 60%. Se tapa inmediatamente.
- 4- Se permite la destilación durante 16 horas a 60 °C. Durante este período se produce la destilación del HF que es atrapado en la fina capa de NaOH de la tapa.
- 5- Se abren las cámaras y al tubo con NaOH se le adicionan 10 μL de una mezcla de 4 partes de buffer acetato y una parte HClO_4 1 mol/L.
- 6- Se permite la disolución.
- 7- Se mide con el electrodo ubicado en el dispositivo descrito utilizando soluciones estándar de NaF procesados de la igual manera que las muestras (disueltos en una mezcla 4:1 = buffer acetato: HClO_4).

Recuperación y reproducibilidad del método

Luego de quintuplicado obtienen un error menor al 12%.

Límite de detección: 10 pg de fluoruro en 1 μL de solución.

Reproducibilidad en el rango 2.6-105 $\mu\text{mol/L}$.

Recuperación utilizando microdifusión: 89-105%, con reproducibilidad en el rango 1-100 ng de flúor.

Coefficiente de variación intraensayo para medidas en hueso 3.7%.

MICROTÉCNICA μDI

En nuestro laboratorio desarrollamos un dispositivo que cumple con el objetivo perseguido [41] en la destilación isotérmica. El mismo consiste en un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad y un

microtubo de 100 μL (Ilustración 17). Este último se puede preparar cortando la parte final del cubre aguja de una aguja descartable.

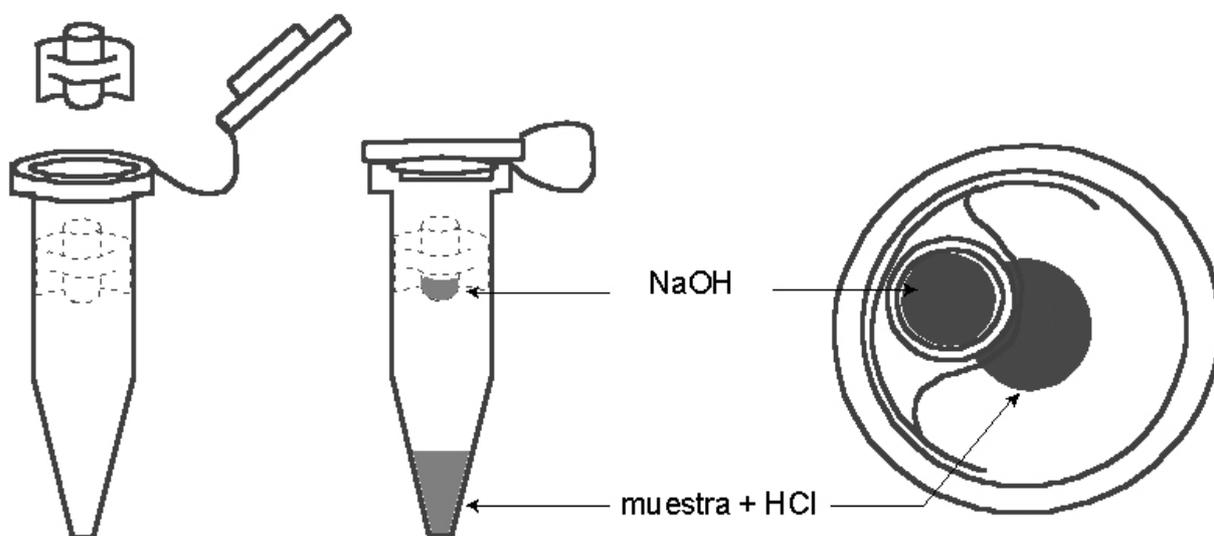


Ilustración 17: Cámara de destilación isotérmica. A la izquierda sistema antes de ensamblar. En el centro se observa la cámara cerrada. A la derecha vista superior de la cámara con las soluciones cargadas.

El microtubo se coloca en una lámina de celuloide con un corte que permite su sujeción. En el microtubo se coloca el NaOH y en el fondo del tubo Eppendorf la muestra y el ácido clorhídrico. Se tapa y se esperan 72 horas, manteniendo las muestras a temperatura ambiente.

Tiempo de destilación

Con el fin de determinar el tiempo necesario para completar la destilación isotérmica, se prepararon soluciones 0.1 mol/L de NaF en agua destilada y se colocaron en las cámaras de destilación 100 μL de estas soluciones con 100 μL de HCl 6 N. Las cámaras se mantuvieron a temperatura ambiente y tres cámaras se destaparon a tiempos sucesivos a partir de las 3 horas, determinándose la concentración de fluoruro en el tubo con NaOH previa neutralización a pH 5-5.5. La Ilustración 18 muestra los datos de recuperación de fluoruro en la trampa de NaOH a

diferentes tiempos. A partir de los 3 días la recuperación es de 100% y se puede comprobar que existen dos cinéticas de destilación. Una destilación rápida que involucra los proceso de destilación del ácido fluorhídrico de la superficie de la solución ácida y su reacción en la superficie de la solución de NaOH formando NaF. Luego se inicia otra fase más lenta probablemente limitada en velocidad por los fenómenos de difusión del HF hacia la superficie de la solución ácida y del fluoruro hacia el seno de la solución de NaOH.

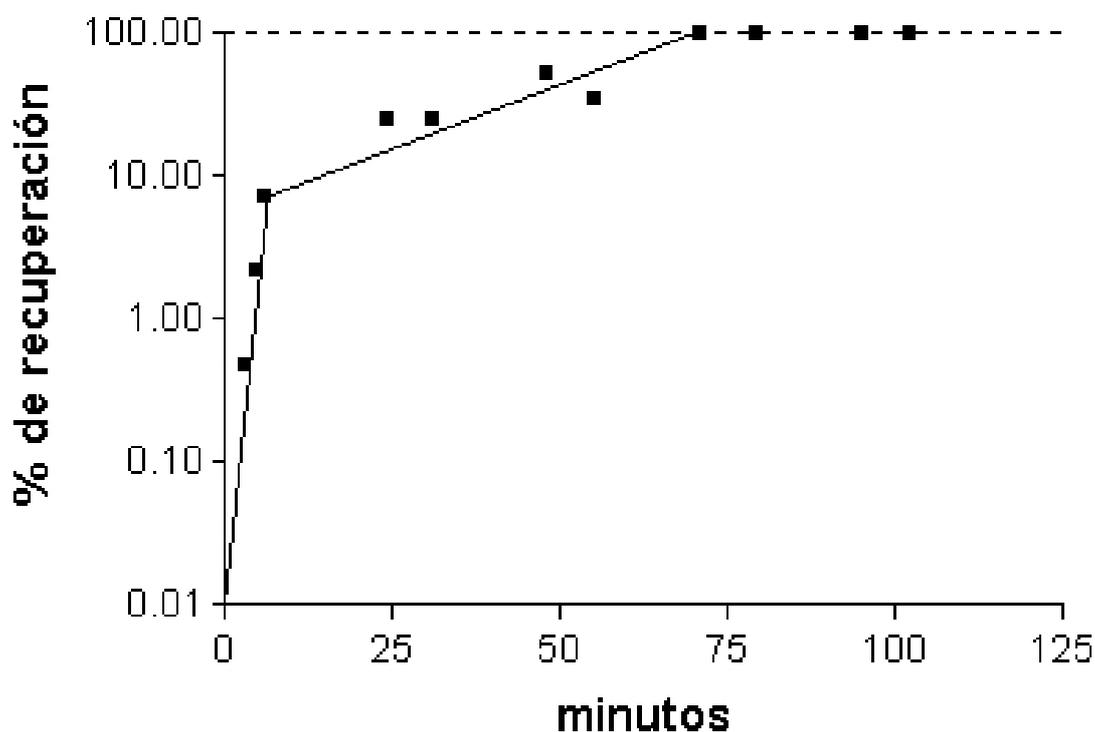


Ilustración 18: Comprobación del tiempo necesario para realizar la microdestilación isotérmica.

La observación de la Ilustración 18 revela que el porcentaje de flúor de la solución que se puede perder en el proceso de carga de las muestras es insignificante. A pesar de esto, se aconseja cargar el volumen de NaOH en el microtubo, luego la muestra y finalmente agregar el HCl sobre la muestra, tapando el tubo Eppendorf inmediatamente después del agregado del ácido.

Neutralización de la trampa alcalina

El microtubo con NaOH luego de la destilación debe ser ajustado a pH 5-5.5, de manera que el electrodo pueda medir adecuadamente la concentración de fluoruro y no dar medidas erróneas por ser el medio muy alcalino o extremadamente ácido.

La neutralización puede realizarse con HCl o HAc. El microtubo contiene inicialmente 20 μL de NaOH 1.65 mol/L, o sea 33 microequivalentes de NaOH. Considerando las concentraciones de flúor más alta (0.1 mol/L), la cantidad de ácido fluorhídrico que puede destilar es 10 microequivalentes, es decir que la cantidad de NaOH es suficiente pero es claro que la cantidad final de microequivalentes de NaOH a neutralizar es incierta. Se utilizaron 20 μL de HCl 12 mol/L diluido a 1/8 (30 microequivalentes) y 20 μL de HAc glacial diluido a 1/6. A los tubos neutralizados con HCl luego se les adicionó 3 μL de TISAB, de manera de hacer un ajuste del pH a 5-5.5. A los neutralizados con HAc no se les realizó dicha adición, ya que el agregado de HAc genera un buffer in situ de pH aproximadamente 5. En este caso no es necesario el agregado de TISAB, ya que el pH se ajusta por el agregado de HAc y en la trampa no existen cationes complejantes del fluoruro que pudieran interferir en la medición. Dada la alta fuerza iónica creada por el NaOH 1.65 mol/L y el HAc adicionado, esta es lo suficientemente homogénea en todos los tubos de manera que se puede prever que el coeficiente de actividad de anión fluoruro será igual en todos los microtubos.

Para concentraciones mayores o iguales a 100 $\mu\text{mol/L}$, las curvas de calibración realizadas no difirieron entre ambos ajustes, Tabla 4. Sin embargo para concentraciones menores a la mencionada la curva no presentó pendiente para los patrones ajustados con HCl, Ilustración 19. Aún a concentraciones en las que ambas neutralizaciones parecen no diferir, la variación en el potencial medido de tubos neutralizados con HCl es mayor.

Tabla 4: Potencial medido luego de la destilación con diferentes soluciones neutralizantes de la

trampa

Solución neutralizante	concentración	mV \pm SD
HCl 12 mol/L diluido 1/8 + TISAB	10^{-4} mol/L	469 \pm 62
	10^{-2} mol/L	-500 \pm 58
HAc glacial diluido 1/6	10^{-4} mol/L	404 \pm 34
	10^{-2} mol/L	-745 \pm 11

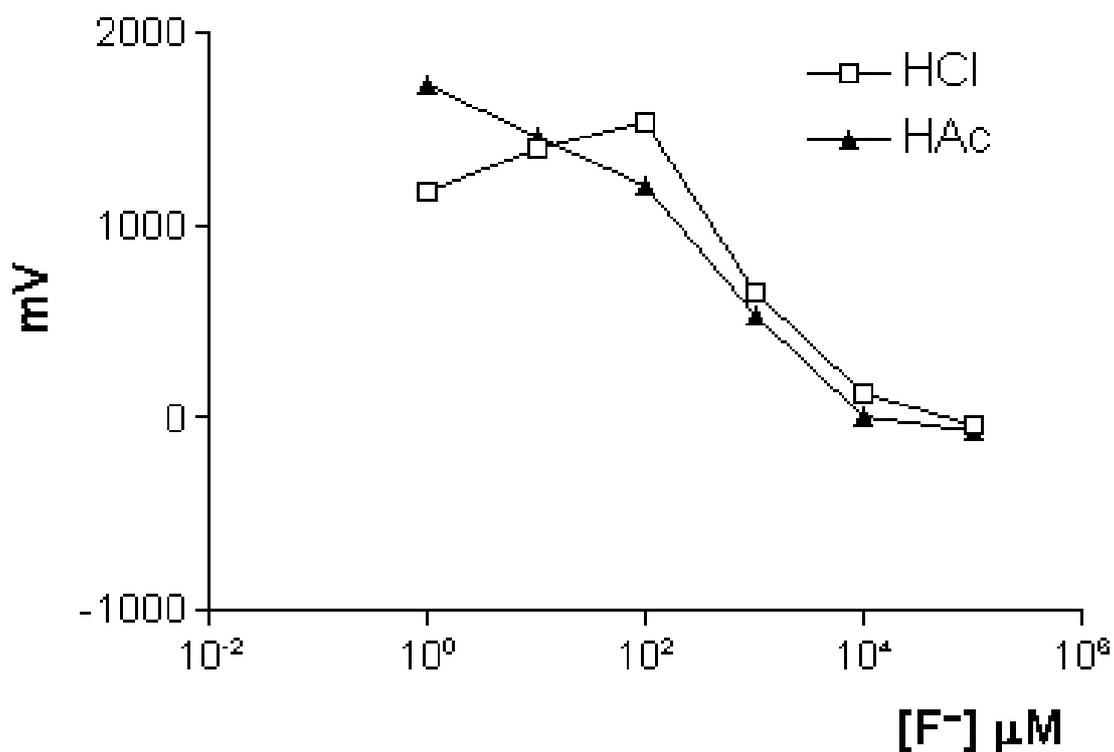


Ilustración 19: Curva de calibración con patrones de NaF neutralizados luego de la microdestilación con HCl o HAc.

Se aconseja la neutralización con HAc glacial diluido (en este caso a 1/6). Con este agregado se logra una respuesta más homogénea en los patrones y el método es más sencillo ya que consta de un solo paso de neutralización.

La solución de HAc a utilizar debe ser titulada contra el NaOH que se utiliza en el microtubo para asegurar un ajuste perfecto al pH deseado (5-5.5).

Técnica para la titulación: Se coloca 1 mL de NaOH 1.65 mol/L en un vaso de precipitación de 50 mL y se agregan 20 mL de agua destilada. Se diluye 1/20 la solución de HAc glacial que se utilizará para preparar la dilución. Se coloca el sistema en un agitador magnético y se agrega HAc diluido 1/20 en alícuotas de 0.2 mL. Se registra el pH de la solución con la ayuda de un pH-metro. Los datos de pH obtenidos en función de los mililitros de HAc 1/6 generan una curva como se muestra en la Ilustración 20.

En el ejemplo de la ilustración mencionada se observa que 1.5 mL de la dilución de HAc, neutralizan exactamente 1 mL de NaOH, es decir que 0.075 mL de ácido acético glacial son necesarios para neutralizar el NaOH del microtubo. Se debe agregar el doble de HAc, es decir 0.15 mL HAc glacial, para neutralizar el NaOH y que quede un excedente exactamente igual de HAc de manera de constituir un buffer HAc/AcNa de capacidad reguladora máxima.

1 mL NaOH.....0.15 mL HAc glacial

0.02 mL NaOH ... x = 0.003 mL HAc glacial.

Se puede calcular la dilución a realizar de manera que los 0.003 mL de HAc queden contenidos en 20 µL de dilución

$$n^{\circ} \text{ dilución} = \frac{\text{volumen final}}{\text{volumen inicial}} = \frac{20}{3} = 6.7$$

En base al cálculo anterior, se coloca 1 mL de HAc glacial y se agregan 5.7 mL de agua destilada, de esta manera se obtiene una solución diluida 6.7 veces. Adicionando 20 µL de esta solución al microtubo, se obtendrá un pH cercano a 5, apto para la lectura con el electrodo.

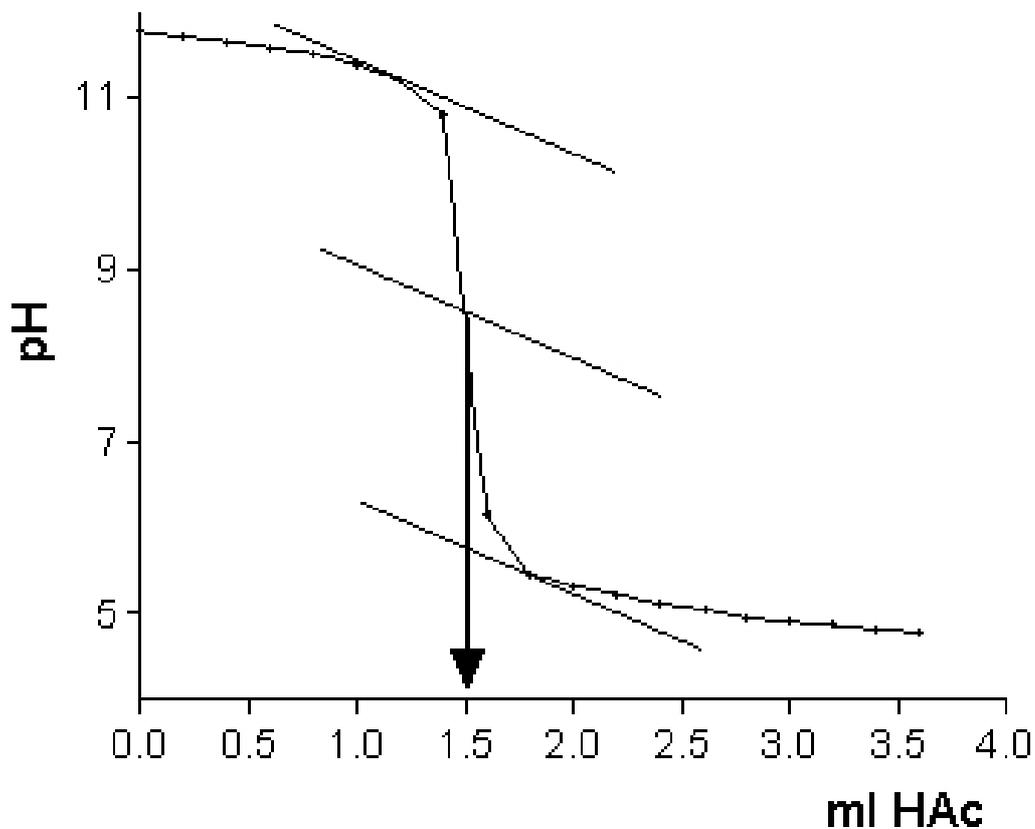


Ilustración 20: Curva de titulación de NaOH 1.65 mol/L con ácido acético glacial diluido a 1/6

La neutralización con HAc diluido a 1/7 puede realizarse agregando el ácido sobre el volumen remanente de NaOH, al abrir las cámaras, o bien abrir las cámaras y colocar el microtubo a 37 °C durante 24 horas de manera de evaporar el líquido y luego agregar el ácido. De esta manera se logra obtener un volumen más homogéneo y por lo tanto un concentración más confiable. La Tabla 5 muestra el coeficiente de regresión de la curva testigo y el coeficiente de variación de dos plasmas medidos por cuadruplicado de dos muestras.

Tabla 5: Efecto del secado de las trampas alcalinas sobre la precisión de la medición		
	Agregado de HAc previo secado	Agregado de HAc sin secado
coeficiente de correlación	-0.944	-0.905
CV% muestra 1	15%	24%
CV% muestra 2	3%	21%

Recuperación

Se adicionaron 50 $\mu\text{mol/L}$ de NaF a plasma humano y se determinó la concentración de fluoruro en el plasma con y sin agregado de NaF. La recuperación de la técnica fue de 68.6%.

La medición de orina por medición directa o por destilación presentó una buena correlación lineal ($r = 0.93$) $a = -65.7 \mu\text{mol/L}$ $b = 1.75$.

Para mediciones de contenidos intestinales se obtuvo una correlación lineal entre los valores medidos por μDI y potenciometría directa: ($r = 0.84$) $a = -7.98 \mu\text{mol/L}$ $b = 2.02$.

Los resultados indican que las mediciones directas sobreestiman los valores respecto a los medidos por μDI pero a baja concentración la medición directa no detecta el fluoruro presente en las muestras.

DIFUSIÓN ISOTÉRMICA FACILITADA POR HEXAMETILDISILOXANO

Esta técnica fue desarrollada por Taves [112] y modificada por Whitford [42].

En una placa de Petri de material plástico (Falcon 1007) se colocan 2 mL de agua destilada.

Sobre la misma se adiciona la muestra a medir (plasma, uñas, cenizas, orina, etc.). Cincuenta μL de NaOH 0.05 mol/L, solución que actúa como trampa del fluoruro, se colocan en tres gotas sobre la parte interna de la tapa de la placa. El borde exterior de la parte inferior de la placa se unta con vaselina permitiendo un cierre hermético. La tapa presenta un pequeño orificio por el cual se adicionan 2 mL de H_2SO_4 1.5 mol/L saturado en hexametildisiloxano. Inmediatamente se tapa el orificio con vaselina y se mantiene la placa a temperatura ambiente por una noche con agitación rotacional permanente (Ilustración 21).

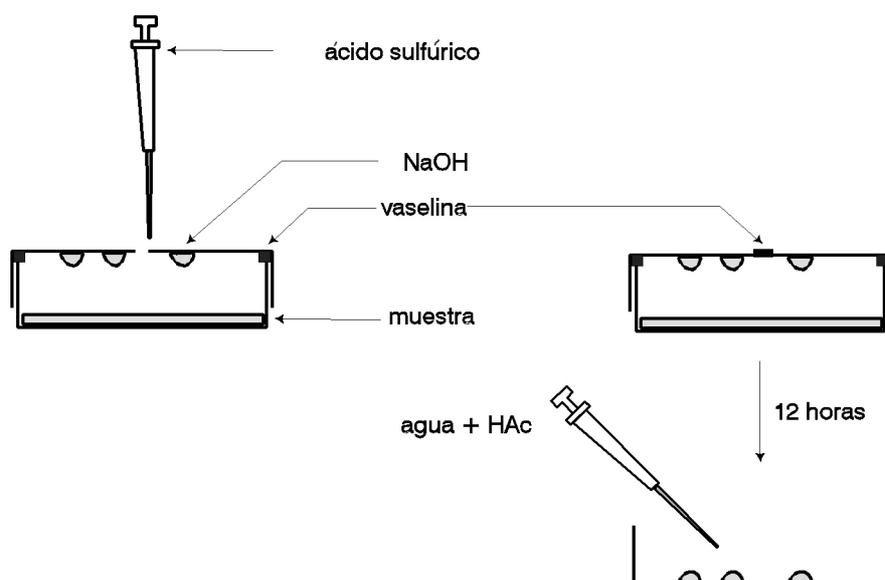


Ilustración 21: Cámara de destilación isotérmica del método de Taves modificado por Whitford.

Al día siguiente se destapa y sobre las gotas de NaOH que se encuentran en la tapa, se adicionan 25 μL de ácido acético 0.2 mol/L de manera de ajustar el pH a 5. Se diluye la solución a un volumen final de 75 μL por agregado de agua destilada.

Simultáneamente se procesan testigos con las mismas cantidades y volúmenes de manera de obtener curvas de calibración sin destilación y estimar la recuperación del proceso. Se utilizan testigos que contienen entre 5 nmol y 200 nmol de NaF disueltos en agua destilada. El procedimiento tiene una recuperación mayor al 99%.

MEDICIÓN DE FLÚOR EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

TAMAÑO Y COMPLEJIDAD DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tanto el tamaño como la complejidad de la muestra (matriz) determinan el tipo de técnica a aplicar. La Tabla 6 resume los principales casos.

Tabla 6: Tamaño de la muestra, concentración y técnica a aplicar para la medición de flúor.

Matriz	Tamaño muestra	[Flúor] $\mu\text{mol/L}$	Técnica
simple	mayor de 1 mL	mayor de 0.45	macrotécnica potenciométrica
	menor de 1 mL	mayor de 0.45	microtécnica potenciométrica
	independiente	menor de 0.45	microtécnica potenciométrica con μDI
compleja	independiente	independiente	microtécnica potenciométrico con μDI

CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Muestras acuosas

Las muestras acuosas (orina, agua de bebida, soluciones, etc.) pueden ser guardadas en heladera o a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ si la determinación se hará con posterioridad a su obtención. Si bien es recomendable el plástico como material del contenedor, si la muestra tiene un pH que no es inferior a 5 se puede guardar en recipiente de vidrio, como lo demuestran los datos obtenidos con el experimento que se detalla a continuación:

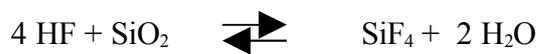
Se preparó una solución 10^{-3} mol/L de NaF y se adicionó TISAB de pH 5-5.5, la solución se fraccionó en 6 alícuotas, tres de ellas en frascos de plástico y otras tres en frascos de vidrio. Se conservó a -20 °C durante 3 meses, al cabo de este período se descongelaron y se midió la concentración de flúor utilizando micropotenciometría directa. Los valores obtenidos fueron:

Frascos de plástico: $(1.26 \times 10^{-3} \pm 2.56 \times 10^{-5})$ mol/L

Frascos de vidrio : $(1.23 \times 10^{-3} \pm 1.04 \times 10^{-4})$ mol/L

Las medias no difieren significativamente ($p > 0.05$).

Se debe tener la precaución que la muestra no sea guardada en medio ácido ya que el ácido fluorhídrico es volátil, y además que el recipiente sea de plástico, ya que si es de vidrio, el fluoruro se combina con el SiO_2 .



y como el SiF_4 es covalente, disminuye la actividad del fluoruro en la muestra.

Orinas

Si la concentración de fluoruro no es medida inmediatamente las muestras se deben conservar a -20 °C. Es conveniente adicionar 10% de TISAB de pH 5-5.5, especialmente cuando se sospecha que la orina puede tener pH más ácido.

Heces

Se conservan secas o calcinadas, en el caso que no sea necesario el estudio simultáneo de moléculas orgánicas. En caso contrario se deben guardar a -20 °C.

Plasma

Si no se determina la concentración inmediatamente, es conveniente congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin ningún agregado.

Huesos

Los huesos se pueden conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ si además de la medición de flúor se desean hacer estudios que involucren moléculas orgánicas complejas. En caso que solo sea necesario el estudio del material mineral, se pueden conservar secos, colocándolos en una estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante o bien calcinados a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Uñas

Las uñas se cortan con alicate, se lavan con agua destilada y se pueden conservar a temperatura ambiente [⁴³].

Superficie ósea

Las muestras de superficie ósea se obtiene por el método de grabado descrito para esmalte dental en este capítulo. Si la muestra se obtiene de esta manera se debe procesar inmediatamente, dado el medio ácido de la misma. Si se desea mantener el hueso para su posterior medición, es conveniente conservarlo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

MEDICIÓN DE FLUOREMIAS

Las concentraciones de fluoruro en plasma oscilan entre 0.5 y $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ para poblaciones no

expuestas, mientras que para poblaciones expuestas se pueden encontrar valores de 2-10 μM , dependiendo este valor del volumen de distribución del fluoruro y de la función renal.

Por lo tanto, se pueden hacer mediciones aplicando la técnica de difusión y posterior lectura con microtécnica, con lo cual se eliminan los problemas de las bajas concentraciones, ya que así la muestra se concentra 10 veces.

A menudo las concentraciones de fluoruro existentes en plasma permiten la lectura directamente con micro o macrotécnica, pero como generalmente el volumen disponible es escaso, se aplica la primera.

Se compararon curvas de calibración diluyendo el patrón con agua destilada y con plasma libre de fluoruro y se encontró que las curvas no difieren en pendientes pero si en alturas.

En la dilución con plasma encontramos lecturas mayores, a igual concentración, indicando posiblemente la existencia de dos fenómenos: 1- mayor fuerza iónica, que origina, como se mencionó anteriormente, la lectura de un mayor potencial. 2- o que exista en plasma una ligera unión de algún componente, el cual no libera el fluoruro al agregarse el buffer citrato de sodio.

Por lo tanto, para leer directamente plasma se debe preparar la curva de calibración con plasma libre de fluoruro.

MEDICIÓN DE FLÚOR EN UÑAS

La medición de flúor en uñas se utiliza como medida de la exposición crónica al flúor

[⁴⁴, ⁴⁵, ⁴⁶, ⁴⁷, ⁴⁸, ⁴⁹, ⁵⁰, ⁵¹]. La medida potenciométrica luego de destilación isotérmica es de sencilla

realización [112]. Se procesan cortes de uñas de peso conocido simultáneamente con testigos de NaF. Ambos son sometidos a destilación isotérmica (capítulo 4) y luego la solución alcalina que actúa como trampa para el NaF es medida potencioméricamente (capítulo 3).

MEDICIÓN DE FLÚOR EN ESMALTE DENTAL

La obtención de muestra de esmalte dental se puede hacer por método de grabado, el que puede llevarse a cabo por inmersión (aplicable a piezas dentarias extraídas) o bien in vivo aplicando el método de ventana [112].

Método de ventana

Se realiza un orificio de 2 mm de diámetro en una cinta engomada con la ayuda de un sacabocado. Se pega la cinta sobre la corona dentaria presionando los bordes del orificio de manera que quede bien adherida al esmalte. Sobre la zona de esmalte expuesta, creada por la ventana circular de la cinta se colocan con una micropipeta 10 μL de HClO_4 0.5 mol/L. Se deja en contacto 15 segundos y se retira la solución con la misma micropipeta. Se coloca el líquido obtenido en un microtubo de centrifuga. Se agregan 10 μL de agua destilada sobre la ventana para lavar la zona grabada, se deja en contacto 10 segundos y se retira el líquido, juntándolo con la solución anterior. El procedimiento se debe llevar a cabo tantas veces como sea necesario. En cada aplicación se removerá una capa de esmalte.

A las muestras obtenidas se adicionan 20 μL de TISAB, al que previamente se le agregó NaOH sólido, de manera de lograr una concentración 0.25 mol/L de esta base. El NaOH agregado neutralizará el HClO_4 y el TISAB cumplirá la función de homogeneizar pH, fuerza iónica y complejar cationes interfirientes.

Método de inmersión

Permite obtener muestra de una lámina de esmalte de la corona completa de una pieza dentaria. Se colocan 200 μL de HClO_4 0.25 mol/L en un microtubo de centrifuga. La corona de la pieza dentaria se sumerge en la solución durante 15 segundos y se retira. Si se desea obtener muestras de más de una capa de esmalte, se puede pasar por soluciones sucesivas. Luego se agrega a cada

tubo 200 μL de TISAB con agregado de NaOH como se describió en el método de ventana.

Ya sea que la solución se obtuviera por método de ventana o inmersión, se realiza la determinación utilizando un electrodo de fluoruro y se procesa simultáneamente una curva de calibración con patrones de NaF.

El TISAB agregado a los patrones de NaF debe contener NaOH 0.125 mol/L y HClO_4 0.125 mol/L de manera de crear el mismo ambiente iónico de las muestras.

Recuperación y reproducibilidad del método

La cantidad de fluoruro en el esmalte dentario es habitualmente elevado por lo tanto se obtienen concentraciones superiores a 10^{-5} mol/L, que están dentro del rango de linealidad del electrodo. Con estas concentraciones el coeficiente de variación es de 3% y para muestras cuya concentración es cercana a 10^{-6} mol/L el coeficiente de variación se eleva a 15%.

MEDICIÓN DE FLÚOR EN ORINA - DILUCIÓN CON SOLUCIÓN FISIOLÓGICA

La orina es un fluido donde por lo general no existen concentraciones importantes de metales trivalentes que complejen el fluoruro. Por lo tanto, la medición potenciométrica de fluoruro puede llevarse a cabo ajustando el pH de la muestra y la fuerza iónica.

Singer et al. [52] propusieron un método en que ajustan el pH por agregado de NaOH o HClO_4 y diluyen la muestra con NaCl 9 g/L. El método utiliza un electrodo de ion específico y testigos de NaF diluidos en solución fisiológica.

Procedimiento

Curva de titulación: solución de NaF stock 100 ppm en solución fisiológica. A partir de esta se preparan soluciones 0.1 - 1 ppm en NaCl 9 g/L. Antes de hacer la dilución final se ajusta a pH 6.5 con NaOH o HClO_4 .

Las muestras de orina se ajustan a pH 4.8-8.6 por agregado de NaOH o HClO₄ 1 mol/L según corresponda. Luego 10 mL de orina se llevan a un volumen final de 25 mL con solución fisiológica. No se halló diferencia diluyendo a 25 mL volúmenes de orina que variaron de 3 mL a 10 mL.

Se sumergen los electrodos de fluoruro y de referencia en la solución con agitación permanente, se espera el tiempo necesario para alcanzar una medida de potencial constante, habitualmente entre 5 y 30 minutos.

La concentración de fluoruro en orina se obtiene interpolando el voltaje obtenido con la curva de los patrones de NaF (mV vs Log [F⁻]). Se debe hacer la corrección por la dilución realizada.

Recuperación y reproducibilidad del método

El método tiene una recuperación de 98.3±3.8% (90-105%) para el agregado de 0.2-0.4 ppm a orinas con concentraciones iniciales de 0.22-0.88 ppm. Los valores de concentración de fluoruro obtenidos con este método no discreparon de los obtenidos con método colorimétrico [⁵³], luego de aislar el fluoruro por destilación o microdifusión [⁵⁴]. La adición de 165 µg/mL de calcio o 50 µg/mL de magnesio no interfirieron en la medida de fluoruro. La modificación del pH entre 5 y 7.6 no produjo medidas diferentes de la concentración de fluoruro en muestras de orina.

6

DETERMINACIÓN DE FLÚOR ÁCIDO LÁBIL Y FLÚOR ÁCIDO RESISTENTE

La determinación de la concentración de compuestos con flúor, donde el flúor no es detectado por el electrodo es un problema habitual en el laboratorio. Una muestra además de fluoruro (F^-) puede contener flúor ácido lábil y flúor ácido resistente.

DETERMINACIÓN DE FLÚOR ÁCIDO LÁBIL

Denominamos flúor ácido lábil (FAL) al flúor que no se encuentra libre como fluoruro y por lo tanto no puede ser detectado por el electrodo de ion específico en forma directa, pero se desprende como ácido fluorhídrico cuando los compuestos son tratados con un ácido fuerte. Este flúor puede estar constituido por átomos ligados por enlace covalente que se hidrolizará en medio ácido, como ocurre con el MFP o bien por sales que contienen fluoruro pero son poco disociadas como el CaF_2 y el Na_3AlF_6 .

El término FAL debe ser cuidadosamente analizado en cada caso. Por ejemplo, si se dispone de una muestra con fluoruro de sodio en agua destilada, todo el fluoruro es detectable por medición directa. En este caso la concentración de flúor ácido lábil es cero.

Si en cambio, la solución acuosa además de fluoruro de sodio posee Al^{3+} , la definición de flúor ácido lábil surgirá del TISAB utilizado. Si se utilizó un TISAB que cumple las tres condiciones, al medir por potenciometría directa, todo el fluoruro será medido ya que aquel que se encuentre ligado al Al^{3+} será desplazado del complejo, en consecuencia la muestra no contiene flúor ácido lábil. En caso de utilizarse un TISAB que cumple sólo con el ajuste de fuerza iónica y pH, al medir por potenciometría directa se determinará la concentración del fluoruro que no se halla formando parte del complejo. Todo el flúor que se halla formando parte del complejo será desplazado cuando la muestra se trate con un ácido fuerte. En este caso, la concentración de flúor ácido lábil será la diferencia entre la medición potenciométrica luego de tratar con ácido fuerte y la medición directa sin tratamiento con este ácido.

Para su determinación se debe realizar destilación de la muestra con ácido sulfúrico como se detalla en el capítulo 4. Al aplicar destilación a una muestra, tanto el FAL como el fluoruro se desprenderán como ácido fluorhídrico. Llamaremos μDI a la suma de FAL y F^- . La concentración de FAL se obtendrá por diferencia entre la concentración medida luego de destilación (μDI) y la concentración medida por potenciometría directa (F^-).

$$FAL = \mu DI - F^-$$

El FAL puede determinarse tanto en muestras líquidas como sólidas.

Procedimiento para muestras líquidas:

1- Se realiza destilación isotérmica de una alícuota de la muestra (capítulo 4) y se mide posteriormente la solución obtenida por potenciometría directa (capítulo 3). De esta manera se obtiene el valor de μDI .

2- Se determina la concentración de flúor por potenciometría directa (capítulo 3). De esta manera se obtiene el valor de F⁻.

Por diferencia entre el valor hallado en 1 y 2 se obtiene el valor de FAL.

Procedimiento para muestras sólidas

Si la muestra puede ser solubilizada se prepara una solución y se procede como se indicó para muestras líquidas.

En el caso que la muestra sea insoluble, sólo se podrá determinar μDI .

DETERMINACIÓN DE FLÚOR ÁCIDO RESISTENTE

Denominamos flúor ácido resistente (FAR) al flúor que se halla ligado a compuestos por enlace covalente, de manera que en una muestra acuosa es indetectable por el electrodo de ion específico y no se desprende como ácido fluorhídrico al ser tratada esta con un ácido fuerte. La determinación de FAR requiere un proceso de mineralización de la muestra, por ejemplo por calcinación, posterior solubilización y medición potenciométrica. Con este procedimiento se obtiene el valor de flúor total de la muestra. Si en una alícuota se mide FAL y en otra fluoruro, por diferencia entre el valor de flúor total y FAL más fluoruro se puede obtener el valor de FAR.

Procedimiento para muestras líquidas

1- Se coloca un volumen conocido de muestra (habitualmente 10-100 μL) sobre un comprimido de CaSO_4 de aproximadamente 50 mg, de manera que el CaSO_4 absorba dicha muestra. Si el volumen a colocar sobre el comprimido supera su capacidad de absorción, la muestra puede ser agregada por fracciones, secando el CaSO_4 en estufa a 60 °C entre cada agregado, tantas veces como sea necesario, hasta cargar el volumen total.

2- Los trozos de CaSO_4 con las muestras absorbidas se calcinan en una mufla a 500 °C, durante 6

horas.

3- Se pulveriza el CaSO_4 calcinado.

4- Sobre el CaSO_4 pulverizado se aplica la técnica de microdestilación isotérmica para poder determinar la concentración de flúor total (FT).

5- Sobre una alícuota de la muestra se realiza microdestilación isotérmica (capítulo 4), obteniéndose la concentración de flúor (μDI).

6- Por diferencia entre los valores obtenidos en 4 y 5 se obtiene el FAR.

$$\text{FAR} = \text{FT} - \mu\text{DI}$$

Simultáneamente se debe procesar una curva de calibración con concentraciones adecuadas de NaF , que serán sometidas a los mismos procedimientos que las muestras.

DETERMINACIÓN DE FLÚOR IÓNICO

DETERMINACIÓN POR ADSORCIÓN SOBRE FOSFATO DE CALCIO

Este método se fundamenta en la adsorción del flúor iónico sobre un precipitado de fosfato de calcio, quedando el flúor no iónico en el sobrenadante. Fue desarrollado para aplicar a diferentes tipos de muestras biológicas [55], presentando como principal desventaja el gran volumen de muestra necesario para su aplicación.

Básicamente consiste en tratar una muestra con fosfato de calcio, luego de un período de tiempo se centrifuga y se descarta el sobrenadante. El sedimento (fosfato de calcio con fluoruro adsorbido) es disuelto en medio ácido, finalmente la solución se ajusta a pH 6 y se mide la concentración de fluoruro con el electrodo de ion específico. Soluciones estándar de NaF son procesadas de la misma manera.

Procedimiento

1- Preparación del fosfato de calcio: Se mezclan cantidades estequiométricas de fosfato diácido de potasio (ajustado a pH 7.5 con amoníaco) y acetato de calcio. Ambas sales deben tener baja cantidad de impurezas de fluoruro. Por recristalización se obtiene fosfato de calcio de mayor grado de pureza. Se lava el precipitado con agua bidestilada y finalmente se seca a 100 °C y se

pulveriza.

2- Adsorción del fluoruro: Se mezclan 5 mL de plasma con 10 mg de fosfato de calcio en tubos plásticos. Los tubos se tapan y se colocan en un agitador durante 1 hora a 35-40 °C. Al finalizar este período se centrifugan. El precipitado se trata con 0.5 mL de ácido perclórico 0.5 mol/L y 2 mL de citrato de sodio 0.5 mol/L. Luego de agitación vigorosa hasta disolución del precipitado, se centrifuga para eliminar posibles precipitados de proteínas adsorbidas por el fosfato de calcio. El sobrenadante límpido tiene un pH próximo a 6.

3- Se mide el milivoltage desarrollado por la solución utilizando un electrodo de ion específico para ion fluoruro.

4- Las soluciones de NaF de concentraciones conocidas se procesan siguiendo los pasos 2 y 3 y los voltajes desarrollados por estas soluciones se utilizan para calcular la concentración de fluoruro de las muestras de plasma. Con los milivoltios y los logaritmos de las concentraciones de las soluciones estándar se realiza una regresión lineal.

5- La concentración de las muestras de plasma se calcula utilizando los voltajes medidos, por interpolación con la curva de calibración obtenida con las soluciones estándar.

Recuperación y reproducibilidad del método

El método tiene una recuperación de 93-103% para el agregado de aproximadamente 5 $\mu\text{mol/L}$ de fluoruro. Los valores obtenidos correlacionan perfectamente con otros métodos de medición de flúor iónico. El 98% del $^{18}\text{F}^-$ agregado a muestras fue recuperado en el precipitado de fosfato de calcio. Este último dato indica que todo el fluoruro iónico sería medido por esta técnica, sin embargo los autores no aseguran cuanto del flúor no iónico es adsorbido sobre el precipitado.

DETERMINACIÓN POR ADSORCIÓN Y DIFUSIÓN

Este método se fundamenta en la adsorción del flúor iónico sobre un precipitado de fosfato de

calcio y su posterior determinación colorimétrica. Es la combinación del método anterior y el colorimétrico de Bäumlner-Glinz. Fue desarrollado para aplicar a diferente tipos de muestras biológicas [112]. Su desventaja es el gran volumen de muestra necesario para su aplicación y el tiempo de difusión. La ventaja es que no requiere un electrodo de ion específico.

Básicamente consiste en tratar una muestra con fosfato de calcio, luego de un período de tiempo se centrifuga y se descarta el sobrenadante. El sedimento (fosfato de calcio con fluoruro adsorbido) es disuelto en medio ácido en un recipiente cerrado. El fluoruro difunde de la solución como HF que reacciona con NaOH generando NaF sobre un papel de filtro. El papel se trata con agua destilada, obteniéndose una solución alcalina de NaF que es neutralizada y sobre la que finalmente se lleva a cabo la reacción con el agente complejante cerio-alizarina. La medición se hace espectrofotométricamente.

Procedimiento

1- Preparación del fosfato de calcio: Se mezclan cantidades estequiométricas de fosfato diácido de potasio (ajustado a pH 7.5 con amoníaco) con acetato de calcio. Ambas sales deben tener baja cantidad de impurezas de fluoruro. Por recristalización, se obtiene fosfato de calcio de mayor grado de pureza. Se lava el precipitado con agua bidestilada, se seca a 100 °C y luego se pulveriza.

2- Adsorción del fluoruro: Se mezclan 5 mL de plasma con 10 mg de fosfato de calcio en tubos plásticos. Los tubos se tapan y se colocan en un agitador durante 1 hora a 35-40 °C. Al finalizar este período se centrifugan y se guarda el precipitado para tratamiento posterior.

3- Se coloca el precipitado en recipientes plásticos con tapa hermética con 4 mL de ácido perclórico al 50% P/P durante 24 horas para permitir la difusión del HF de la solución. El HF se recupera sobre círculos de papel de filtro embebidos en 50 µL de NaOH 1.6 mol/L. En los filtros el HF se transforma en NaF. Pasadas las 24 horas de difusión los filtros son colocados en tubos

de polietileno previamente pesados, se adicionan 2 mL de agua y se neutraliza con HCl hasta punto final con fenolftaleína. Finalmente el volumen se ajusta a 3 mL.

4- Se adicionan 2 mL de reactivo complejante cerio-alizarina y se mide la absorbancia a 610 nm.

5- Se procesan soluciones de NaF de concentraciones conocidas siguiendo los pasos 2, 3 y 4.

Con las absorbancias de estas soluciones y sus correspondientes concentraciones se realiza una curva de calibración.

6- La concentración de las muestras de plasma se calcula por interpolación con la curva de calibración obtenida con las soluciones estándar, utilizando las absorbancias medidas en las soluciones desconocidas.

Recuperación y reproducibilidad del método

Los valores de flúor iónico obtenidos con este método no discrepan de los valores obtenidos con el método de determinación de flúor iónico por adsorción sobre fosfato de calcio.

DETERMINACIÓN ADSORCIÓN-REPOSICIÓN

Este método se fundamenta en la adsorción del flúor iónico sobre un precipitado de fosfato de calcio y el posterior agregado de una solución estándar de fluoruro de sodio hasta restablecer la concentración inicial. Fue desarrollado para aplicar a diferente tipos de muestras biológicas [112].

Sus desventajas son el gran volumen de muestra necesario para su aplicación y el tiempo demandado para alcanzar voltajes estables.

Básicamente consiste en medir en la muestra el voltaje desarrollado por electrodo de ion específico. Luego de obtener este valor de voltaje, se adiciona a la muestra fosfato de calcio. Con este tratamiento se elimina de la muestra el flúor iónico. Se separa el sobrenadante por centrifugación y al mismo se le agrega una solución de NaF. Con el electrodo de ion específico se monitorea el voltaje, y se detiene el agregado de NaF cuando se iguala la primer lectura.

Procedimiento

- 1- Se mezclan 3 mL de muestra con 3 mL de agua bidestilada y se ajusta el pH al valor de 5.8 con ácido perclórico 0.5 mol/L.
- 2- A esta solución se le mide el voltaje desarrollado por el electrodo de ion específico. El procedimiento puede requerir hasta 2 horas para lograr voltajes estables.
- 3- Una alícuota de plasma similar, con el mismo agregado de agua, es tratada con 10 mg de fosfato de calcio, para adsorber el flúor iónico. El procedimiento se lleva a cabo durante 1 hora a 35-40 °C con agitación permanente.
- 4- Se filtra el sobrenadante a través de un filtro Millipore de 0.45 μm para eliminar cualquier vestigio de fosfato de calcio.
- 5- Al filtrado se adiciona NaF 1 ppm con una microbureta en alícuotas de 20 μL . El voltaje desarrollado por el electrodo es registrado y se continúa con el procedimiento hasta que el voltaje iguale al valor obtenido en el punto 2.
- 6- Con el volumen de solución de NaF 1 ppm se calculan la cantidad de μmoles de fluoruro contenidos en 3 mL de plasma y la concentración de la muestra.

DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA CON PATRONES DISUELTOS EN SUERO

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico y un electrodo de referencia de calomel. La curva de calibración se prepara disolviendo NaF en suero o plasma de perro con bajo contenido de flúor. Fue desarrollado para utilización en clínica [56] por su mayor sencillez. Sus desventajas son el gran volumen de muestra necesario para su aplicación y la dificultad de contar con grandes volúmenes de plasma o suero de animales no expuestos al fluoruro.

Básicamente consiste en medir en la muestra el voltaje desarrollado por electrodo de ion

específico, procesando de la misma manera soluciones estándar preparadas con suero como diluyente.

Procedimiento

1- Se mezcla 1 mL de suero o solución estándar con 0.06 mL de buffer acetato (preparado por mezcla de partes iguales de ácido acético 10 mol/L e hidróxido de sodio 5 mol/L).

2- Se mide el potencial con un electrodo de ion específico y un electrodo de referencia de calomel. Las lecturas se realizan cada minuto hasta obtener un valor constante (entre 2 y 5 minutos).

3- Se calcula la concentración de las muestras de plasma por interpolación con la curva obtenida entre el potencial y el logaritmo de la concentración de las soluciones estándar.

Preparación de soluciones estándar: a partir de NaF 1 mol/L se diluye con suero de perro, el cual ha sido mantenido con agua destilada como bebida y alimentado con leche suplementada con vitamina D y minerales. Como otra opción los autores proponen la utilización de suero de humanos jóvenes que no ingieran agua fluorada durante las 24 horas previas a la extracción de sangre.

Recuperación y reproducibilidad del método

Los valores de flúor iónico obtenidos por este método no discrepan de aquellos obtenidos con el método de adsorción y difusión, el método de difusión directa y con las gráficas de Gran. La correlación de este método con el método de difusión directa tiene una pendiente que no discrepa de 1 y una ordenada al origen de 1.18 $\mu\text{mol/L}$.

El buffer utilizado en la muestra produce una disminución del flúor ácido lábil de 0.3% en una hora y media, con el consecuente incremento en el valor de flúor iónico. Si las muestras se almacenan sin buffer a 4 °C, muestran un incremento del flúor iónico de 1.3-1.7%.

MÉTODO AUTOMATIZADO

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando tecnología de automatización. La curva de calibración se prepara disolviendo NaF en suero con bajo contenido de flúor. Fue desarrollado con el fin de mejorar la relación número de muestras: tiempo empleado [57]. Su principal desventaja es el sistema automático requerido. El método descrito no hace mención al volumen de plasma o suero necesario para la determinación.

Básicamente consiste en medir en la muestra el voltaje desarrollado por electrodo de ion específico, procesando de la misma manera soluciones estándar preparadas con suero como diluyente.

Procedimiento

- 1- Muestras y soluciones estándar se mezclan con un buffer de fuerza iónica (TISAB).
- 2- Soluciones estándar de NaF de 0.75-13.85 $\mu\text{mol/L}$ se hacen fluir por el instrumento para realizar la calibración, obteniéndose una gráfica de voltaje en función del tiempo.

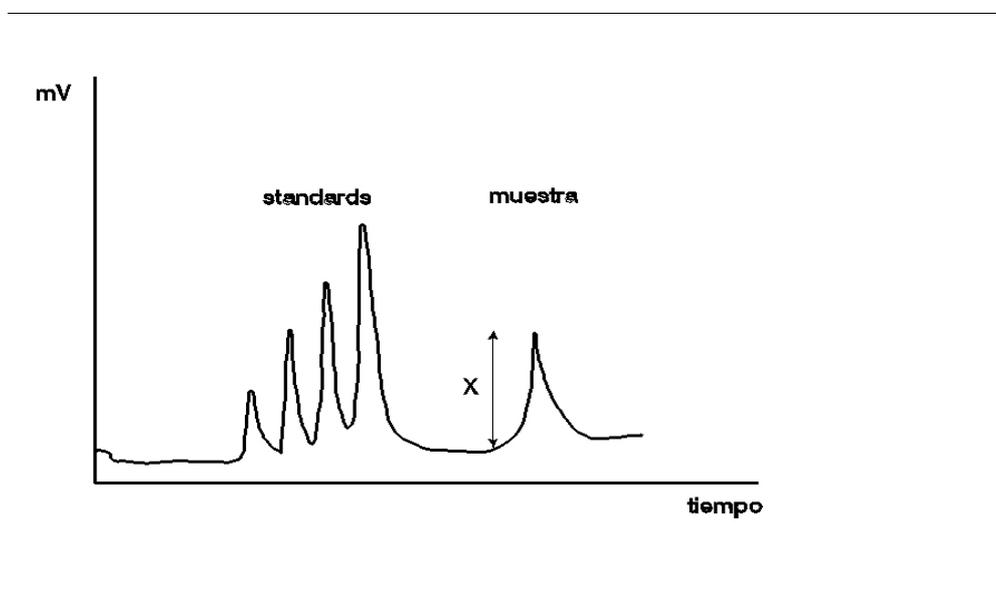


Ilustración 22: Gráfica para medición de fluoruro por método automatizado.

Cada concentración produce una señal. Se mide la altura de esta señal (Ilustración 22) desde el valle hasta el pico (“x”) y se obtiene una correlación entre “x” y concentración de fluoruro. La lectura se realiza durante 30 segundos y el lavado entre cada solución durante 210 segundos.

3- A continuación se pasan las muestras, midiéndose “x” para cada caso, valor que se utiliza para calcular la concentración de la muestra por interpolación con la curva de calibración obtenida con las soluciones estándar.

Recuperación y reproducibilidad del método

Los valores de flúor iónico obtenidos correlacionan bien con el método realizado manualmente para 54 muestras ($r = 0.9675$).

La recuperación de una cantidad fija de fluoruro adicionada a las muestras fue de 94.7-100%.

El coeficiente de variación intraensayo para concentraciones de fluoruro de 0.78 y 13.85 $\mu\text{mol/L}$ fue de 6.1% y 1.1% respectivamente.

El coeficiente de variación interensayo realizado sobre una muestra durante 3 meses fue del 5.5%.

DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA DIRECTA CON PATRONES ACUOSOS

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico. La curva de calibración se prepara disolviendo NaF en agua. Fue desarrollada para medir flúor en plasma [58]. Según sus autores es de extrema sencillez y alta reproducibilidad.

Básicamente consiste en medir en la muestra el voltaje desarrollado por electrodo de ion específico, procesando de la misma manera soluciones estándar preparadas con agua destilada.

Muestras y soluciones estándar son mezclados en partes iguales con un TISAB de composición no descrita en el trabajo (provisto por ORION).

Procedimiento

- 1- Se mezcla 1 volumen de plasma o solución estándar con igual volumen de TISAB.
- 2- Se deja estabilizar el milivoltímetro 15-30 minutos antes de comenzar las mediciones.
- 3- Se mide el potencial con un electrodo de ion específico y un electrodo de referencia.
- 4- Se calcula la concentración de las muestras de plasma por interpolación con la curva obtenida en el potencial y el logaritmo de la concentración de las soluciones estándar.

Preparación de soluciones estándar: a partir de NaF provisto por ORION por dilución con agua destilada.

Recuperación y reproducibilidad del método

Coefficiente de variación intraensayo (n = 13) 5-7%.

Recuperación 95-105% aproximadamente.

DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA CON ADICIÓN - DILUCIÓN

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico. No requiere curva de calibración y los parámetros del electrodo se obtienen por adición de una cantidad conocida de fluoruro a la muestra y posterior dilución de la solución. Fue desarrollada con el fin de proveer al laboratorio clínico de una técnica confiable y sencilla para medir flúor iónico en plasma [59]. Según sus autores es de extrema sencillez, confiable y relativamente rápida si se dispone de 6 electrodos de fluoruro adosados a un único voltímetro. Básicamente consiste en medir en la muestra el voltaje desarrollado por electrodo de ion específico. Sobre la misma muestra se agrega una cantidad conocida de una solución estándar de fluoruro, registrándose el nuevo potencial. Finalmente se mide el potencial de la muestra diluida a la mitad. Con los tres potenciales medidos se aplica un cálculo que permite obtener la concentración de fluoruro en el plasma.

Deducción de la ecuación de cálculo

El potencial medido por el voltímetro (E) se ajusta por la ecuación de Nernst

$$E = E^{\circ} + S \cdot \log \gamma \cdot f \cdot C$$

donde

E° : potencial estándar.

S: pendiente de la Ecuación de Nernst o factor de Nernst.

γ : coeficiente de actividad.

f: fracción del ion del elemento medido.

C: concentración del elemento medido.

Cuando se sumerge el electrodo en la muestra de concentración C_x , el potencial medido E_1 , queda expresado por la expresión:

$$E_1 = E^{\circ} + S \cdot \log \gamma_1 \cdot f_1 \cdot C_x$$

donde

γ_1 : coeficiente de actividad en la muestra de plasma.

f_1 : fracción de fluoruro en la muestra medida.

Luego de la adición de un volumen conocido (V_{std}) de una solución de concentración conocida (C_{std}), el potencial medido: E_2 , queda expresado por la fórmula:

$$E_2 = E^{\circ} + S \cdot \log \gamma_2 \cdot f_2 \cdot \frac{C_x \cdot V_{plasma} + C_{std} \cdot V_{std}}{V_{plasma} + V_{std}}$$

donde

γ_2 : coeficiente de actividad en la muestra de plasma luego del agregado de una solución estándar.

f_2 : fracción de fluoruro en la muestra luego del agregado de solución estándar.

Restando miembro a miembro E_2 y E_1 , se obtiene:

$$\Delta E = S \cdot \log \gamma_2 \cdot f_2 \cdot \frac{C_x \cdot V_{plasma} + C_{std} \cdot V_{std}}{V_{plasma} + V_{std}} - S \cdot \log \gamma_1 \cdot f_1 \cdot C_x$$

que reordenando

$$\Delta E = S \cdot \log \cdot \frac{\gamma_2 \cdot f_2 (C_x \cdot V_{plasma} + C_{std} \cdot V_{std})}{(V_{plasma} + V_{std}) \cdot \gamma_1 \cdot f_1 \cdot C_x}$$

Suponiendo $\gamma_1 = \gamma_2$ y $f_1 = f_2$,

$$\Delta E = S \cdot \log \cdot \frac{(C_x \cdot V_{plasma} + C_{std} \cdot V_{std})}{(V_{plasma} + V_{std}) \cdot C_x}$$

despejando C_x

$$C_x = \frac{C_{std} \cdot V_{std}}{10^{\frac{\Delta E}{S}} (V_{plasma} + V_{std}) - V_{plasma}}$$

Por otro lado la pendiente S se calcula utilizando el valor E_2 y el potencial medido (E_3) luego de diluir a la mitad la solución obtenida luego de la adición.

$$E_3 = E^o + S \cdot \log \gamma_3 \cdot f_3 \cdot \frac{C_x \cdot V_{plasma} + C_{std} \cdot V_{std}}{(V_{plasma} + V_{std}) \cdot 2}$$

Restando miembro a miembro E_2 y E_3 se obtiene:

$$\Delta E = E^o + S \cdot \log \gamma_2 \cdot f_2 \cdot \frac{C_x \cdot V_{plasma} + C_{std} \cdot V_{std}}{(V_{plasma} + V_{std})} - E^o - S \cdot \log \gamma_3 \cdot f_3 \cdot \frac{C_x \cdot V_{plasma} + C_{std} \cdot V_{std}}{(V_{plasma} + V_{std}) \cdot 2}$$

reordenando y suponiendo $\gamma_2 = \gamma_3$ y $f_2 = f_3$,

$$\Delta E = S \cdot \log 2$$

A partir de la cual se calcula S .

$$S = \frac{\Delta E}{\log 2}$$

Procedimiento

- 1- Se mezcla 1 mL de plasma con un 5% V/V de TISAB⁹.
- 2- Se sumerge el electrodo y se mide el potencial: E1.
- 3- Se retiran 100 μL de muestra.
- 4- Se adicionan 100 μL de solución de NaF aproximadamente 100 veces más concentrada que la muestra. Se mide el nuevo potencial: E2.
- 5- Se retiran 500 μL de la solución y se agregan 500 μL de agua destilada. Se mide el potencial de la dilución obtenida: E3.
- 6- Se aplica la ecuación para calcular la concentración incógnita (Cx)
- 7- Se multiplica el valor de concentración hallada por 1.05 (factor dependiente de la dilución de la muestra causada por el agregado de TISAB).

Preparación de soluciones estándar: a partir de NaF 100 ppm en agua destilada.

Recuperación y reproducibilidad del método

Coefficiente de variación intraensayo 6.7% y 1.8% para concentraciones de fluoruro 0.5 $\mu\text{mol/L}$ y 2.6 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente. Coeficiente de variación interensayo: 7.6% para una concentración de fluoruro de 0.7 $\mu\text{mol/L}$.

Recuperación 99.7%.

Mediciones de fluoruro iónico en plasma de personas sanas: 0.55 $\mu\text{mol/L}$ con un rango de 0.31-1 $\mu\text{mol/L}$. En pacientes dializados, el valor medio hallado fue 2.46 $\mu\text{mol/L}$, con un rango de 0.4-4.3 $\mu\text{mol/L}$.

El límite de detección del electrodo con esta técnica es 0.13 $\mu\text{mol/L}$.

⁹ TISAB: 354 mg/L de acetato de amonio, 213.5 mL/L de ácido clorhídrico 11.6 M, 19.8 g/L CDTA (ácido 1,2-ciclohexilendinitrilotetracético), 0.07 g/L rojo cresol, pH: 5-5.2

DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA CON ADICIÓN

Este método se fundamenta en la determinación potenciométrica utilizando un electrodo de ion específico y adición de una cantidad de fluoruro conocido. No requiere curva de calibración y los parámetros del electrodo se calculan previamente, considerándose un dato invariante e independiente de las condiciones de la muestra. Fue desarrollada con el fin de proporcionar un método rápido y confiable para determinar el contenido de fluoruro en alimentos [60]. Es un método más sencillo que el propuesto por Fuchs [112]. Requiere instrumental de laboratorio sencillo además del voltímetro y el electrodo de fluoruro. Básicamente consiste en disolver la muestra seca en HCl, diluir con un buffer adecuado y medir el potencial desarrollado por el electrodo de ion específico. Sobre la misma muestra se agrega una cantidad conocida de una solución estándar de fluoruro, registrándose el nuevo potencial. Con los dos potenciales medidos se aplica un cálculo que permite obtener el porcentaje en peso de fluoruro en la muestra.

Deducción de la ecuación de cálculo

El potencial medido por el voltímetro (E) se ajusta por la ecuación de Nernst

$$E = E^{\circ} + S \cdot \log C$$

donde

E° : potencial estándar.

S : pendiente de la Ecuación de Nernst o factor de Nernst.

C : concentración de fluoruro.

Cuando se sumerge el electrodo en la muestra diluida con buffer citrato, la concentración de fluoruro es C_x , el volumen es V_1 y el potencial medido E_1 , queda expresado por la expresión

$$E_1 = E^{\circ} + S \cdot \log \cdot C_x$$

C_x se puede expresar como $\mu\text{g de F}/V_1$

$$E_1 = E^o + S \cdot \log \frac{\mu g F}{V_1}$$

Luego de la adición de un volumen conocido (V_{std}) de una solución de concentración conocida (C_{std}), la cantidad de fluoruro de la solución será $\mu g F + \mu g F_{estandar}$ y el volumen $V_1 + V_{std}$, el potencial medido: E_2 , queda expresado por la fórmula:

$$E_2 = E^o + S \cdot \log \frac{\mu g F + \mu g F_{standard}}{V_1 + V_{std}}$$

donde

Restando miembro a miembro E_2 y E_1 , se obtiene:

$$\Delta E = S \cdot \log \frac{\mu g F + \mu g F_{standard}}{V_1 + V_{std}} - S \cdot \log \frac{\mu g F}{V_1}$$

que reordenando

$$\frac{\Delta E}{S} = \log \cdot \frac{\frac{\mu g F + \mu g F_{standard}}{V_1 + V_{std}}}{\frac{\mu g F}{V_1}}$$

reordenando

$$10^{\left(\frac{\Delta E}{S}\right)} = \frac{\frac{\mu g F + \mu g F_{standard}}{V_1 + V_{std}}}{\frac{\mu g F}{V_1}}$$

$$10^{\left(\frac{\Delta E}{S}\right)} \cdot \frac{\mu g F}{V_1} = \frac{\mu g F + \mu g F_{standard}}{V_1 + V_{std}}$$

Si consideramos $V_1 + V_{std} = V_2$

$$10^{\left(\frac{\Delta E}{S}\right)} \cdot \frac{\mu g F}{V_1} = \frac{\mu g F + \mu g F_{standard}}{V_2}$$

$$10\left(\frac{\Delta E}{S}\right) \frac{\mu\text{g } F}{V_1} = \frac{\mu\text{g } F}{V_2} + \frac{\mu\text{g } F_{\text{standard}}}{V_2}$$

agrupando los términos con ug F

$$10\left(\frac{\Delta E}{S}\right) \frac{\mu\text{g } F}{V_1} - \frac{\mu\text{g } F}{V_2} = \frac{\mu\text{g } F_{\text{standard}}}{V_2}$$

tomando factor común a la izquierda

$$\left[\frac{10\left(\frac{\Delta E}{S}\right)}{V_1} - \frac{1}{V_2} \right] \mu\text{g } F = \frac{\mu\text{g } F_{\text{standard}}}{V_2}$$

$$\mu\text{g } F = \frac{\frac{\mu\text{g } F_{\text{standard}}}{V_2}}{\left[\frac{10\left(\frac{\Delta E}{S}\right)}{V_1} - \frac{1}{V_2} \right]}$$

Tomando denominador común en el denominador

$$\mu\text{g } F = \frac{\frac{\mu\text{g } F_{\text{standard}}}{V_2}}{\left[\frac{10\left(\frac{\Delta E}{S}\right) \cdot V_2 - V_1}{V_1 \cdot V_2} \right]}$$

Sacando factor común V2 en el denominador

$$\mu\text{g } F = \frac{\frac{\mu\text{g } F_{\text{standard}}}{V_2}}{\left[\frac{\left(10\left(\frac{\Delta E}{S}\right) - \frac{V_1}{V_2} \right) V_2}{V_1 \cdot V_2} \right]}$$

reacomodando V₁ y simplificando V₂ , se obtiene

$$\mu\text{g } F = \frac{\mu\text{g } F_{\text{standard}} \left(\frac{V_1}{V_2} \right)}{\left(10 \left(\frac{\Delta E}{S} \right) - \frac{V_1}{V_2} \right)}$$

Los μg de F de la solución estándar se puede reemplazar por el producto entre la concentración de la solución estándar expresada en ppm ($\text{ppm}_{\text{estándar}}$) multiplicada por el volumen adicionado expresado en mililitros ($\text{mL}_{\text{estándar}}$), resultando

$$\mu\text{g } F = \frac{\text{ppm}_{\text{standard}} \cdot \text{mL}_{\text{standard}} \left(\frac{V_1}{V_2} \right)}{\left(10 \left(\frac{\Delta E}{S} \right) - \frac{V_1}{V_2} \right)}$$

La pendiente S se asume igual a 59.2 a 25 °C, adicionándole 0.2 por cada grado de aumento de temperatura por encima de 25 °C o restándole el mismo valor por cada grado por debajo de 25 °C¹⁰.

Para calcular el porcentaje en peso de fluoruro en la muestra se utiliza la ecuación:

$$\% F = \frac{(\mu\text{g } F - \mu\text{g}_{\text{blanco}}) \cdot 100}{g_{\text{muestra}} \cdot 10^6}$$

donde g_{muestra} , es la masa de muestra seca colocada en el vaso de precipitación para ser disuelta con HCl y $\mu\text{g}_{\text{blanco}}$, es el valor de μg de flúor obtenido para un blanco realizado simultáneamente.

Procedimiento

- 1- Se mezcla en un vaso de precipitación la muestra (0.4-5 g), que debe estar seca y molida de manera de pasar por un tamiz de 10 mesh.
- 2- Se agregan 20 mL de HCl concentrado.
- 3- Se agita durante 1 hora.

¹⁰ Por ejemplo, a 37°C, S = 61.6.

- 4- Se adicionan 500 mL de buffer citrato ¹¹.
- 5- Se coloca el voltímetro en 0 mV, y se sumerge el electrodo en agua destilada durante 1 minuto.
- 6- Se sumerge el electrodo en la muestra resultante del punto 4. Luego de 3 minutos, se lee el potencial desarrollado por los electrodos.
- 7- Se adiciona 1 mL de solución estándar de NaF 10.0 mg/mL (10000 ppm). Se mide el nuevo potencial luego de 3 minutos de estabilización.
- 8- Se aplica la ecuación deducida ($\mu\text{g F}$) para calcular la cantidad de μg de la muestra.
- 9- Preparación del blanco de reactivos: repetir pasos 2-8.

Recuperación y reproducibilidad del método

Como la técnica propone trabajar con un volumen de 520 mL (muestra diluida en HCl + buffer citrato) y luego adicionar 1 mL de solución estándar, se considera que la fuerza iónica varía poco como para que tenga efecto sobre la pendiente, razón por la cual se utiliza un valor constante.

La técnica propuesta tiene una recuperación de 90-108 %.

MEDICIÓN DE FLUORURO CON CORRECCIÓN DE FLÚOR BASAL

Es habitual suponer que los reactivos utilizados en la determinación de fluoruro están libres de fluoruro. Este método ^[61] propone una manera de descontar el fluoruro presente en el blanco. La técnica utiliza un electrodo de ion específico. La ventaja de esta técnica es que descuenta el fluoruro presente en los reactivos, extendiendo la linealidad de la curva de calibración hasta 0.26 $\mu\text{mol/L}$, Ilustración 23. La desventaja es que requiere un gran volumen de muestras y patrones.

¹¹ Buffer citrato: 740 g de ácido cítrico + 680 mL de amoníaco concentrado. Ajustar a pH = 7 con ácido cítrico. Agua csp 3 litros.

Procedimiento

Se coloca un volumen V_1 de solución blanco (agua, TISAB, etc) en un recipiente y se mide el potencial E_1 . Se agrega un volumen V_2 de una solución estándar con una masa m_2 de fluoruro y se mide el nuevo potencial, E_2 . Se agrega nuevamente un volumen V_1 de solución blanco y se mide el voltaje desarrollado por los electrodos. Aplicando el modelo matemático que se desarrolla más abajo se calcula la masa m_1 y la concentración C_1 de flúor en las soluciones blanco. Este valor será luego sumado a la concentración de las soluciones estándar al realizar la curva de calibración. Al calcular la concentración de los desconocidos este mismo valor debe ser restado. De esta manera se logra tener linealidad en la curva de calibración hasta concentraciones de fluoruro de $0.26 \mu\text{mol/L}$.

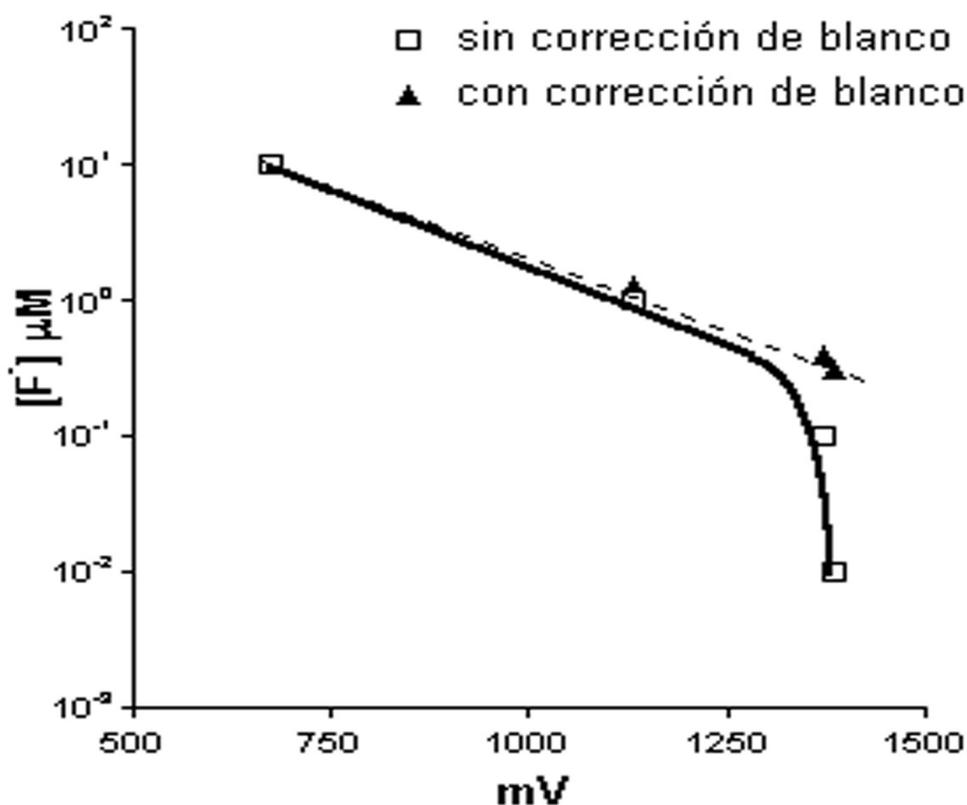


Ilustración 23: Curva de calibración típica para el electrodo de ion específico sin descontar el contenido de flúor de los reactivos (□) y con la corrección propuesta por esta técnica (▲)

Las medidas se realizan convencionalmente con los electrodos, preparando los patrones y muestras con agregado de un 10% de TISAB.

Los autores proponen la medición en una solución de pH 1 lograda con HClO₄, con la que obtienen linealidad hasta concentraciones inferiores a 1 μmol/L. La medición en medio ácido perclórico tiene la ventaja que este ácido tiene muy baja concentración de fluoruro.

Tratamiento matemático

El potencial medido (E_1) al colocar el electrodo en una mezcla de partes iguales de agua destilada y TISAB (blanco) es:

$$E_1 = E^o - S \cdot \log \frac{\gamma_1 \cdot \alpha_1 m_1}{V_1}$$

donde E^o es el potencial debido a la naturaleza de los electrodos, S la pendiente o factor de Nernst, γ_1 el coeficiente de actividad, α_1 la fracción molar de flúor al estado de fluoruro libre, m_1 la masa de fluoruro y V_1 el volumen inicial.

Cuando la solución anterior se agrega un pequeño volumen V_2 con una masa m_2 no hay cambios apreciables en γ_1 y α_1 , por lo que podemos suponer que sus valores son constantes. Luego del agregado el potencial medido (E_2) estará dado por la expresión:

$$E_2 = E^o - S \cdot \log \left[\gamma_1 \cdot \alpha_1 \left(\frac{m_1 + m_2}{V_1 + V_2} \right) \right]$$

Luego se adiciona un volumen de solución inicial igual al volumen V_1 . En este caso el potencial medido (E_3) será:

$$E_3 = E^o - S \cdot \log \left[\gamma_1 \cdot \alpha_1 \left(\frac{2m_1 + m_2}{2V_1 + V_2} \right) \right]$$

restando $E_2 - E_1$ y $E_3 - E_1$ se obtiene

$$\Delta E_{21} = E_2 - E_1 = E^o - S \cdot \log \left[\gamma_1 \cdot \alpha_1 \left(\frac{m_1 + m_2}{V_1 + V_2} \right) \right] - E^o + S \cdot \log \frac{\gamma_1 \cdot \alpha_1 m_1}{V_1}$$

reordenando

$$\Delta E_{21} = -S \cdot \log \left[\gamma_1 \cdot \alpha_1 \left(\frac{m_1 + m_2}{V_1 + V_2} \right) \right] + S \cdot \log \frac{\gamma_1 \cdot \alpha_1 m_1}{V_1}$$

aplicando propiedad de logaritmo

$$\Delta E_{21} = -S \cdot \log \frac{\gamma_1 \cdot \alpha_1 \left(\frac{m_1 + m_2}{V_1 + V_2} \right)}{\frac{\gamma_1 \cdot \alpha_1 m_1}{V_1}}$$

simplificando el coeficiente de actividad y el grado de disociación, reordenando resulta:

$$\Delta E_{21} = -S \cdot \log \frac{m_1 + m_2}{m_1} \cdot \frac{V_1}{V_1 + V_2}$$

de la misma manera para $E_3 - E_1$

$$\Delta E_{31} = E_3 - E_1 = E^o - S \cdot \log \left[\gamma_1 \cdot \alpha_1 \left(\frac{2m_1 + m_2}{2V_1 + V_2} \right) \right] - E^o + S \cdot \log \frac{\gamma_1 \cdot \alpha_1 m_1}{V_1}$$

$$\Delta E_{31} = -S \cdot \log \left[\gamma_1 \cdot \alpha_1 \left(\frac{2m_1 + m_2}{2V_1 + V_2} \right) \right] + S \cdot \log \frac{\gamma_1 \cdot \alpha_1 m_1}{V_1}$$

$$\Delta E_{31} = -S \cdot \log \frac{\gamma_1 \cdot \alpha_1 \left(\frac{2m_1 + m_2}{2V_1 + V_2} \right)}{\frac{\gamma_1 \cdot \alpha_1 m_1}{V_1}}$$

eliminando el coeficiente de actividad y el porcentaje de disociación y reordenando los términos

$$\Delta E_{31} = -S \cdot \log \frac{2m_1+m_2}{m_1} \cdot \frac{V_1}{2V_1+V_2}$$

dividiendo Δ_{31} por Δ_{21} , resulta

$$\Delta = \frac{\Delta E_{31}}{\Delta E_{21}} = \frac{-S \cdot \log \frac{2m_1+m_2}{m_1} \cdot \frac{V_1}{2V_1+V_2}}{-S \cdot \log \frac{m_1+m_2}{m_1} \cdot \frac{V_1}{V_1+V_2}}$$

simplificando, tomando logaritmo natural y distribuyendo resulta:

$$\Delta = \frac{\Delta E_{31}}{\Delta E_{21}} = \frac{\ln \frac{2m_1+m_2}{m_1} + \ln \frac{V_1}{2V_1+V_2}}{\ln \frac{m_1+m_2}{m_1} + \ln \frac{V_1}{V_1+V_2}}$$

reordenando

$$\Delta = \frac{\ln \left(2 + \frac{m_2}{m_1} \right) + \ln \frac{V_1}{2V_1+V_2}}{\ln \left(1 + \frac{m_2}{m_1} \right) + \ln \frac{V_1}{V_1+V_2}}$$

si llamamos $N1 = \ln \frac{V_1}{2V_1+V_2}$ y $N2 = \ln \frac{V_1}{V_1+V_2}$, la expresión anterior resulta:

$$\Delta = \frac{N1 + \ln \left(2 + \frac{m_2}{m_1} \right)}{N2 + \ln \left(1 + \frac{m_2}{m_1} \right)}$$

denominando $x = \frac{m_2}{m_1}$, la expresión resulta:

$$\Delta = \frac{N1 + \ln(2+x)}{N2 + \ln(1+x)}$$

recordando que el desarrollo en serie del logaritmo

$$\ln(a+x) = \ln a + 2 \left[\frac{x}{2a+x} + \frac{1}{3} \left(\frac{x}{2a+x} \right)^3 + \dots \right]$$

desarrollando en serie los logaritmos de la expresión anterior, y tomando sólo el primer término del corchete del desarrollo en serie resulta:

$$\Delta = \frac{N1 + \ln 2 + 2 \left(\frac{x}{4+x} \right)}{N2 + \ln 1 + 2 \left(\frac{x}{2+x} \right)}$$

operando y luego agrupando los términos con x^2 , x y los términos independientes, resulta

$$[\Delta N2 + 2\Delta - N1 - \ln 2 - 2]x^2 + [6\Delta N2 + 8\Delta - 6N1 - 6 \ln 2 - 4]x + [8\Delta N2 - 8N1 - 8 \ln 2] = 0$$

si llamamos a los coeficientes de las x

$$[\Delta N2 + 2\Delta - N1 - \ln 2 - 2] = a$$

$$[6\Delta N2 + 8\Delta - 6N1 - 6 \ln 2 - 4] = b$$

$$[8\Delta N2 - 8N1 - 8 \ln 2] = c$$

la expresión resulta

$$ax^2 + bx + c = 0$$

que es una ecuación cuadrática de sencilla resolución con la ecuación

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

que permite obtener x y así m_1 y como se conoce V_1 , se puede calcular C_1 , que es la concentración de fluoruro en el blanco, valor que se debe restar a las muestras y patrones de fluoruro de sodio.

Reproducibilidad y recuperación

La técnica fue utilizada para medir fluoremia en personas no expuestas a dosis excesivas de fluoruro, obteniéndose valores que varían de 1-7 $\mu\text{mol/L}$. También se utilizó en la medición del contenido de flúor en agua destilada, leche en polvo y hueso, muestras en las que se determinó la

recuperación. En todos los casos se obtuvieron recuperaciones entre 97-101% y los coeficientes de variación oscilaron entre 2-4% dependiendo de la concentración de la muestra investigada. La única aproximación en el cálculo que presenta la técnica es la utilización del primer término del desarrollo en serie del logaritmo. Cuando se utilizaron sucesivos términos de dicho desarrollo los resultados no difirieron más de 2-3%, valores que están dentro del coeficiente de variación de la técnica.

Para obtener valores precisos de la concentración de flúor en el blanco se aconseja un agregado V_2 , de manera que el Δ_{21} sea cercano a 20-25 mV.

El contenido de flúor en diferentes sustancias utilizadas en la determinación de flúor, que se asumen libres de fluoruro, fue similar al hallado colorimétricamente luego de destilación o por el método de adición simple de Fuchs [112].

DETERMINACIÓN DE MONOFLUOROFOSFATO

El monofluorofosfato de sodio (MFP, Na_2PFO_3) es una sal ampliamente utilizada en forma de comprimidos en el tratamiento de la osteoporosis y como aditivo en pastas dentífricas, para la prevención de caries dentales [111]. El flúor se halla ligado al fosfato por un enlace covalente. Este enlace, a diferencia de los enlaces F-C es inestable y puede ser degradado por hidrólisis. El proceso se lleva a cabo por acción enzimática [62], por la acción de ácidos [112] o espontáneamente [63, 64].

Luego de una dosis de MFP, en el plasma existen dos fracciones de flúor: fluoruro y flúor ligado a proteínas por enlace ácido lábil [65, 66]. En el hueso de ratas tratadas con MFP se encuentra fluoruro, flúor ácido lábil y flúor ácido resistente [67, 68]. El estudio de la farmacocinética del monofluorofosfato ha planteado un desafío en lo que respecta a las técnicas de medición. La medición de MFP en soluciones se puede realizar potenciométricamente luego de la destilación del flúor, luego de la hidrólisis ácida del compuesto, o bien luego de la hidrólisis enzimática.

MEDICIÓN DE MONOFLUOROFOSFATO POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Esta técnica fue desarrollada para el estudio de la estabilidad y farmacocinética del MFP [69]. La técnica es aplicable a soluciones acuosas o a muestras sólidas previa disolución en agua destilada. Una alícuota de la muestra acuosa se somete a la hidrólisis por la acción de la enzima

fosfatasa alcalina intestinal de rata. Se realiza la medición potenciométrica de fluoruro en las muestras con y sin tratamiento enzimático. La diferencia entre la concentración de fluoruro de la muestra tratada con fosfatasa alcalina intestinal y la alícuota sin tratar permite hallar la concentración de MFP en la muestra.

Procedimiento

Solución 1: Se mezclan 0.2 mL de muestra acuosa con 0.02 mL de fosfatasa alcalina purificada del intestino de la rata¹² y 0.02 mL de buffer carbonato/bicarbonato 0.5 mol/L pH 10. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente.

Solución 2: Se mezclan 0.2 mL de muestra acuosa con 0.02 mL de agua destilada y 0.02 mL de buffer carbonato/bicarbonato.

Se agrega a las soluciones 1 y 2, 0.02 mL de buffer ácido acético/acetato de sodio 2 mol/L / 2 mol/L para ajustar el pH a 4-5¹³. Simultáneamente se procesan testigos de NaF mezclando 0.2 mL de solución de NaF de concentración acorde a las muestras, se adiciona 0.02 mL de agua y 0.02 mL de buffer carbonato-bicarbonato. Finalmente, se adicionan 0.02 mL de buffer ácido acético/acetato de sodio 2 mol/L / 2 mol/L y se determina potenciométricamente el voltaje de las soluciones estándar con los que se construirá una curva de calibración. El voltaje de las soluciones 1 y 2 se mide de la misma manera. Se calculan las concentraciones de fluoruro en las soluciones 1 y 2 utilizando la curva de calibración y por diferencias entre ellas, se obtiene la concentración de MFP en la muestra.

¹² La fosfatasa alcalina utilizada presentaba una actividad específica 0.2-0.3 μmol MFP/min.mg proteína. La misma puede ser ajustada a otro valor teniendo la precaución de dejar pasar el tiempo necesario para producir la hidrólisis total del MFP de la muestra.

¹³ La concentración de los buffers puede ser modificada en caso de dificultades de medición por fuerza iónica

Precauciones

En la Ilustración 24 se representa la variación de la concentración de fluoruro de una solución de MFP 9.2 mmol/L, al ser tratada con fosfatasa alcalina intestinal. Como se puede observar en 20 minutos alcanza un valor estable que no discrepa de la concentración inicial de MFP. La gráfica también indica que si no se aguarda el tiempo necesario para la hidrólisis, adicionando el buffer ácido acético/acetato de sodio, el proceso de hidrólisis se detiene y la concentración de MFP será subestimada.

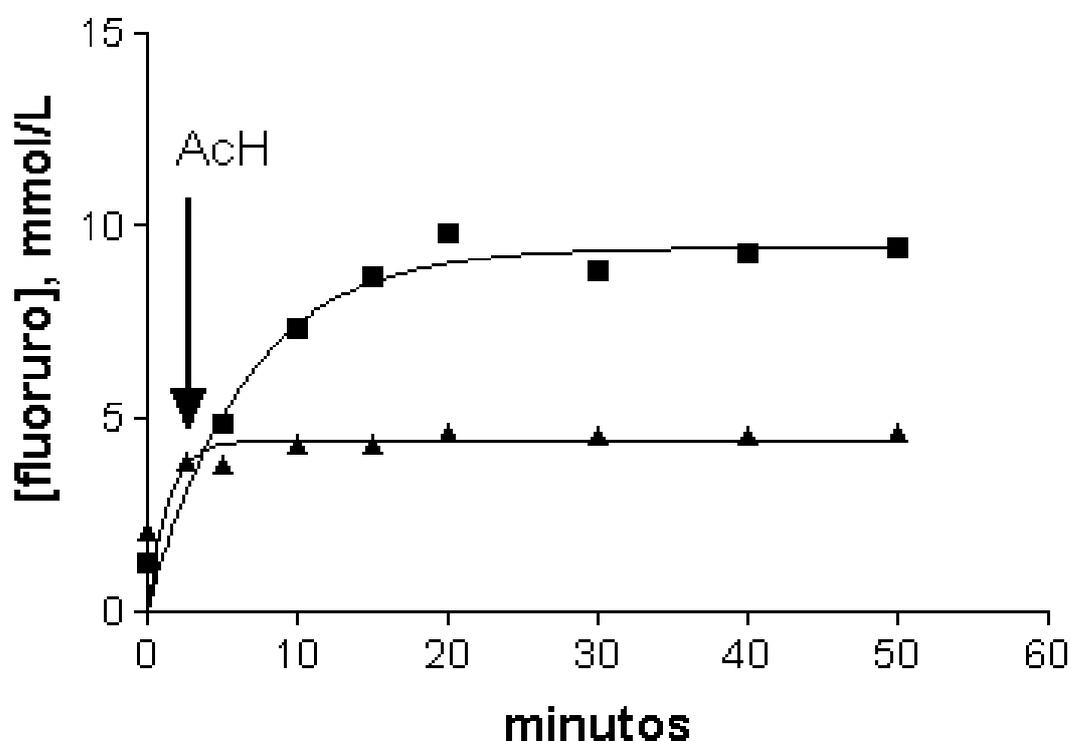


Ilustración 24: Concentración de fluoruro en una solución de MFP 9.2 mmol/L tratada con fosfatasa alcalina intestinal (■) a pH 10. Los ▲, representan la variación de la concentración de fluoruro de una solución de MFP de la misma concentración en presencia de fosfatasa alcalina a la que se acidificó por agregado de buffer ácido acético/acetato de sodio.

Es aconsejable comprobar el tiempo necesario para obtener la hidrólisis completa de una solución de MFP de concentración adecuada a las muestras a medir cada vez que se prepare la fosfatasa alcalina para la hidrólisis. Para ello, se prepara una solución de MFP de concentración conocida y

se adiciona fosfatasa alcalina intestinal manteniendo las proporciones de muestra, enzima y buffers. Se obtienen alícuotas de la solución a tiempos sucesivos y se determina fluoruro por potenciometría directa. El tiempo requerido de incubación es aquel en el que la concentración de fluoruro medida alcanza el valor de la solución de MFP preparada.

Preparación de fosfatasa alcalina

Si no se dispone de fosfatasa alcalina purificada, la misma se puede obtener del intestino de la rata. Para medidas de concentraciones de MFP mayores a 0.1 mmol/L, no es necesario una purificación de la enzima. Se procede como se detalla a continuación:

- 1- Se toma un número adecuado de ratas adultas (para obtener suficiente fosfatasa alcalina para realizar aproximadamente 500 mediciones, son necesarias 2 ratas adultas de 200-300 g). Previo ayuno de 24 horas y con agua destilada como agua de bebida.
- 2- Se realiza la eutanasia del animal.
- 3- Se practica una laparotomía mediana.
- 4- Se corta con tijera el intestino a la altura del píloro, con una pinza se toma el extremo libre del intestino y se realiza tensión verticalmente hacia arriba. El intestino se irá despegando hasta llegar al ciego. Se corta en este sector y se eliminan sectores que puedan tener restos de alimento.
- 5- Con la ayuda de una jeringa, se pasa a través del intestino seccionado 10 mL de agua destilada, de manera de eliminar restos de alimento y secreciones digestivas.
- 6- Se corta el intestino longitudinalmente con tijera iris de manera de exponer la mucosa intestinal.
- 7- Se apoya la mucosa sobre el borde de un portaobjeto y se desliza el intestino de manera que la mucosa sea extraída por el filo del vidrio.
- 8- Se pasa la mucosa obtenida por raspado a un tubo de plástico, se diluye 1:10 con buffer TrisHCl 20 mmol/L MgCl₂ 1 mmol/L pH 8.2.
- 9- Se homogeneiza la muestra.

10- Se fracciona y se congela a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La solución preparada y guardada en estas condiciones es estable por al menos 5 años.

11- En el momento de utilizar la solución de enzima, se descongela y se agrega el volumen necesario. Si la solución de fosfatasa alcalina no es utilizada totalmente puede congelarse nuevamente, no perdiendo actividad.

9

RESEÑA SOBRE EL FLÚOR

El flúor es el elemento más electronegativo, por lo que existe reducido en la naturaleza al estado de fluoruro, con número de oxidación (-1). Esto implica la imposibilidad de participar en reacciones de oxidorreducción.

Se lo encuentra en la naturaleza formando parte de rocas y sales, constituyendo el 0.03% P/P de la corteza terrestre. Se lo halla principalmente como espatoflúor: CaF_2 , criolita: Na_3AlF_6 y NaF , siendo los dos primeros insolubles. El NaF es el compuesto de flúor con mayor comercialización [70].

El fluoruro ingresa al organismo de manera crónica, ya sea en forma espontánea o como recurso terapéutico. La forma más común de ingestión de fluoruro es con el agua de bebida, que puede contener desde trazas (10^{-6} mol/L) hasta 2800 mg/L (0.15 mol/L), la mayor concentración conocida, o bien agua con agregado de fluoruro en cuyo caso las concentraciones oscilan entre 0.6 y 1.7 mg/L [112].

La proporción de fluoruro en el aire es insignificante ($1 \mu\text{g}/\text{m}^3$), aunque existen poblaciones de riesgo que se encuentran expuestas a ambientes con alta concentración de fluoruro como los trabajadores de industrias metalúrgicas, del aluminio, del vidrio o farmacéuticas. Algunos alimentos poseen elevado contenido de flúor: ciertos peces pueden contener hasta 100 mg/Kg, el

té puede llegar a contener hasta 200 mg/Kg (una taza contiene 0.7 a 1.4 mg de NaF) [71]. Los vegetales de zonas de suelos ricos en fluoruro o bien procesados con aguas fluoradas son una fuente importante de flúor [72].

Como recurso terapéutico se utilizan dosis que oscilan entre 10 y 100 mg de NaF por día, principalmente en el tratamiento de osteoporosis e infrecuentemente en la enfermedad de Paget [73], y en el tratamiento de lesiones óseas por mieloma múltiple [74, 75]. La dosis letal de NaF es de 4 g por vía oral [112], siendo el principal efecto tóxico la hemorragia gástrica [76].

METABOLISMO DEL FLUORURO

Absorción del fluoruro

El ion fluoruro se transforma en ácido fluorhídrico (HF) en el estómago ($pK_a = 3.23-3.45$) que al ser un ácido débil, adquiere fácilmente la forma protonada no iónica. El fluoruro es un millón de veces menos difusible que el HF [77] debido a su mayor radio de hidratación y carga. La absorción del fluoruro comienza en el estómago como HF, especialmente si el pH es menor de 4.4 [78]. El HF es liposoluble y atraviesa fácilmente las membranas [79, 80, 81].

Al pasar al intestino se transforma nuevamente en fluoruro y es absorbido rápidamente por difusión simple. Este proceso de absorción en el estómago e intestino se lleva a cabo en un período que oscila entre 0.5 y 3 horas en el hombre [82, 83] y entre 15 y 30 minutos en la rata [84]. La absorción intestinal es mayor si se lo administra como NaF que si se lo hace como CaF_2 [85]. Según Stookey [86] y Singer [87] la absorción sería modulada por la concentración plasmática de fluoruro, pero experimentos posteriores contradicen estos resultados [113] indicando que dicha absorción es independiente de los niveles plasmáticos.

Una pequeña fracción del fluoruro ingerido (menos del 20%) se pierde por materia fecal [113].

Si la dieta es rica en calcio, calcio y fósforo o cationes pesados como Al (III), Fe (III) y Cr (III)

se forman productos insolubles como el CaF_2 o complejos como FeF_5^{2-} , AlF_5^{2-} y CrF_5^{2-} y la absorción es menor [88, 89, 90].

Si bien el fósforo disminuye la absorción de fluoruro cuando se suministra en dietas ricas en calcio, con dietas de bajo contenido cálcico, aumenta la absorción del fluoruro y su eficacia en prevención de la osteoporosis [91, 92].

Fluoruro plasmático

Estudios con fluoruro radioactivo (^{18}F , emisor beta positivo, $t_{1/2} = 109.7$ minutos) muestran que el fluoruro sufre una rápida distribución en los tejidos blandos, donde aparentemente no se fija a las proteínas [93].

Carlson [113] informó que el fluoruro se distribuye un 72% en plasma y un 28% en glóbulos rojos; mientras que Husdan [94] postuló que la distribución del fluoruro es similar en glóbulos rojos y plasma.

Cuando se ingiere una dosis de fluoruro, el 96 al 97% del mismo se encuentra en forma difusible en el plasma y los tejidos blandos [113]. En una persona en ayunas sólo entre el 10 y 20% del flúor plasmático se encuentra en forma difusible [112, 112].

En ayunas la concentración de fluoruro plasmático tiene valores constantes [113], que oscilan entre 0.1 y 2 $\mu\text{mol/L}$. Con concentraciones de fluoruro como las detalladas y al pH sanguíneo la concentración de HF es muy baja, del orden de 0.1 nmol/L [42, 95].

La fluoremia va aumentando con la edad en ambos sexos [113, 96, 97, 98], aunque presenta la peculiaridad de que en los hombres es constante hasta los 45 años y luego comienza a incrementarse, mientras que en las mujeres se incrementa a lo largo de toda la vida.

La ingestión de fluoruro en forma terapéutica (10-100 mg de NaF/día) presenta una rápida absorción con un máximo en la concentración plasmática entre 0.5 y 3 horas para los seres humanos, alcanzando valores de hasta 40 $\mu\text{mol/L}$ y regresando a los niveles basales al cabo de

aproximadamente 3 a 4 horas [113].

La fluoremia está influenciada principalmente por el contenido de flúor óseo: existe una estrecha correlación positiva entre éste y la fluoremia [113], además:

a- La disminución de la velocidad de filtración glomerular reduce la excreción renal de fluoruro y consecuentemente aumenta la fluoremia. Esta podría ser la causa de la fluoremia que se presenta con la edad, por deterioro de la función renal.

b- El grado de actividad paratiroideo está correlacionado positivamente con la fluoremia. La inyección de paratohormona endovenosa determina aumento de la fluoremia. Posiblemente este efecto se deba a la estimulación de la resorción ósea determinada por la hormona paratiroidea, que movilizaría parte del fluoruro incluido en el cristal de fluorapatita [113].

c- Las intoxicaciones con vitamina D y las lesiones osteolíticas, también aumentan la fluoremia, posiblemente por las mismas razones expuestas en b-.

d- La administración de calcitonina endovenosa disminuye la fluoremia por disminución de la resorción ósea [113].

Excreción renal

La principal vía de excreción del fluoruro es renal [^{99,100}], aunque también se excreta en menor proporción por saliva [113].

Al no estar asociado a proteínas plasmáticas la filtración glomerular del fluoruro es libre [¹⁰¹]. La excreción urinaria depende de la ingesta, de la actividad del tejido óseo, de la concentración plasmática y la función renal.

Si el pH urinario oscila entre 5 y 5.6 el fluoruro se reabsorbe aproximadamente en un 95%, ya que a este pH el 10% del flúor se halla como HF, el cual es liposoluble [^{102,103,104}] y difusible hacia el espacio intersticial donde vuelve a ionizarse a fluoruro quedando así atrapado en dicho espacio, en forma inversa a lo que ocurre con la secreción de amoníaco [¹⁰⁵].

Si el pH urinario es alrededor de 7.8 a 8.0, la reabsorción no supera el 35%. Por lo tanto, la

excreción urinaria disminuye en casos de acidosis. Cuando se ingieren sales de aluminio la excreción aumenta dado que filtra complejo con fluoruro, impidiéndose su reabsorción.

Si el pH urinario es inferior a 5, el fluoruro se reabsorbe también en vejiga [106].

El aumento del volumen minuto de orina aumenta la excreción de fluoruro dado que hay una menor interacción con los elementos del fluido tubular y la orina es más alcalina en estas condiciones [112,113]. En algunas experiencias, sin embargo, no se observó este fenómeno, y además, se encontró que el clearance de fluoruro se halla dissociado de la excreción de cloruro, sodio y potasio [113].

Flúor óseo

a- Efecto sobre el mineral: probablemente el destino más importante del fluoruro absorbido es el mineral óseo, donde reemplaza al hidroxilo en el cristal de hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$ [107], transformándolo en fluorapatita [108], ya que el fluoruro por su carga y tamaño es similar al hidroxilo. La deposición de fluoruro en el mineral óseo depende de la edad, cantidad de flúor de la dieta y período durante el cual se realizó la ingesta [113].

El flúor óseo se halla estrechamente correlacionado con la fluoremia siendo mayor en adultos que en jóvenes [113], debido a que el hueso se va enriqueciendo con el transcurso del tiempo. La vida media del fluoruro en el hueso es de 8-9 años [109]. En ratas jóvenes en crecimiento el 50-70% del fluoruro óseo reabsorbido se redeposita en el hueso [110].

b- La deposición de fluoruro en hueso lleva a una disminución en el contenido de citrato y carbonato y aumento en el magnesio, pero no produce cambios en el contenido de calcio y fósforo [111].

c- Efecto sobre la arquitectura ósea: el hueso formado en presencia de fluoruro está poco mineralizado y posee una mala organización histológica, con alto contenido de osteoide [112]. Esta acumulación de osteoide se debe aparentemente a un aumento en la aposición y no a un retardo

en la maduración [113]. El hueso formado es menos deformable y más frágil [114].

Los cristales de fluorapatita son de menor tamaño y solubilidad [115, 116, 117].

Se sintetiza un colágeno que no es normal [118], se presenta aumento del número de osteoblastos [114, 119], aumento de la actividad osteoclástica [114] y el hueso es de menor porosidad [114], siendo estos efectos por acción directa del fluoruro y dosis dependientes.

Estos cambios son observados en un tiempo que es inversamente proporcional a la dosis de fluoruro administrada.

Se ha observado que mujeres de poblaciones que se hallaron expuestas a aguas de bebida con concentraciones relativamente altas de fluoruro, presentan menor frecuencia de fracturas vertebrales que mujeres de poblaciones donde el contenido de fluoruro en agua es bajo [120]. En poblaciones donde el agua de bebida contiene una parte por millón de fluoruro, la frecuencia de fracturas femorales fue significativamente menor que en poblaciones con aguas sin fluoruro [121]. No se ha encontrado diferencia en la maduración del esqueleto en mujeres jóvenes residentes en zonas con y sin fluoruro en las aguas de bebida [122].

No existe acuerdo respecto del efecto de la ingesta de fluoruro sobre el balance de calcio. Según algunos autores [123, 124, 125, 126], el fluoruro produce balances positivos de calcio, aunque otros [127, 128] encontraron que el mismo no es afectado por el fluoruro.

Todo lo expuesto indica la existencia de una acción del fluoruro sobre el tejido óseo, destacándose su actividad neoformadora, aunque con la formación de un hueso de características no habituales.

Al suministrar fluoruro con calcio y vitamina D, se observa aumento de la masa de hueso cortical y trabecular, aumento de celularidad y actividad osteoclástica. Durante ingestas crónicas de fluoruro se ha observado además, aumento de la excreción urinaria de hidroxiprolina y la fosfatasemia alcalina [129], ambos parámetros indicadores de la formación ósea.

Muchos trabajos y por diferentes métodos relatan el aumento de tejido óseo, disminución de la

reabsorción, aumento de la densidad, disminución de dolores óseos y de la frecuencia de fracturas en tratamientos crónicos con fluoruro [113,113,114,¹³⁰,¹³¹]. En todos estos trabajos se observa que la presentación de las mejorías requieren al menos de un año de tratamiento. Si bien los efectos son generales sobre el esqueleto, estos varían según la porción considerada del mismo [¹³²].

USO DEL FLUORURO EN LA PREVENCIÓN DE CARIES DENTALES

Está demostrado que el fluoruro utilizado en forma tópica sobre el esmalte dental tiene efecto beneficioso en la prevención de caries dentales [¹³³]. Los métodos eficaces incluyen el uso de dentífricos, colutorios y barnices. Estos producen una concentración local de fluoruro elevada que favorece el intercambio del oxhidrilo por el fluoruro en el cristal de hidroxiapatita. Un efecto adicional y no menos importante es el efecto bactericida que se logra con las concentraciones halladas en estos materiales.

La fluoración de aguas de consumo ha sido durante años una práctica habitual que se está dejando de lado. Al parecer no tendría el efecto beneficioso sostenido por sus defensores. El conocimiento actual permite afirmar que sería una práctica inapropiada que además expondría a la población a una dosis de flúor en muchos casos inadecuada [111].

EFFECTOS TÓXICOS DEL FLUORURO

Varios autores han descripto un cuadro de hiperparatiroidismo en seres humanos residentes en zonas de fluorosis (con gran contenido de flúor en agua de bebida) [¹³⁴,¹³⁵,¹³⁶]. El mismo efecto se ha observado en ratas sometidas a tratamiento crónico con fluoruro [¹³⁷].

Sin embargo, otros autores no encontraron estas alteraciones en la función paratiroidea ni en el hombre [¹³⁸,¹³⁹,¹⁴⁰] ni en la rata [114].

De todas maneras, la ingestión prolongada de grandes cantidades de fluoruro lleva a un cuadro denominado fluorosis, caracterizado por osteoesclerosis, endo y exostosis [141]. Estudios efectuados en 227 niños en Tanzania, en zonas caracterizadas por la gran concentración de fluoruro en el agua de bebida (21 ppm ó 1100 $\mu\text{mol/L}$), muestran gran cantidad de deformaciones óseas especialmente en los miembros inferiores: piernas curvadas, rodillas juntas y presencia de nódulos óseos. Además un gran porcentaje presenta dolores en rodillas, tobillos, columna, cadera, hombros, codo y muñeca [142]. Se ha demostrado ecocardiográficamente que la elasticidad de la aorta ascendente tiene pérdida de propiedades elásticas en habitantes de zonas de fluorosis, comparados con sujetos normales de la misma edad e índice de masa corporal [143]. Se han descrito una serie de efectos secundarios que se presentan después de la administración de fluoruro. Estos efectos no siempre se presentan si la dosis es baja. La dispepsia es el más común de ellos, además de gastritis y úlcera gástrica [144, 145, 146]. Estos problemas han sido en parte solucionados usando comprimidos con recubrimiento entérico, evitando de esta manera la disolución en el estómago y la formación de HF [113].

Se han comunicado casos de alteraciones hepáticas, con aumento de bilirrubina sérica, disminución de factores de coagulación y edema de retina [147], dermatitis y urticaria [148, 149, 150], diarrea [115], alteraciones de glándulas salivales, estomatitis y úlceras resistentes a antibióticos [115,115]. Todas estas alteraciones remitieron al suspender la terapia con fluoruro.

El fluoruro es un conocido inhibidor del metabolismo intermedio, especialmente de la glucólisis, por inhibición de la enzima enolasa [151, 152].

Rall en 1958 [153] demostró el efecto modulador del fluoruro sobre las proteínas G y la enzima adenil ciclasa. En algunos trabajos se ha informado inhibición de la adenil ciclasa en cultivos celulares [154], mientras que otros comunicaron aumento de la actividad de la adenil ciclasa en homogenado de células beta de páncreas de rata [155]. En ambos trabajos estos efectos fueron obtenidos con concentraciones de fluoruro del orden de 5 a 25 mmol/L, concentraciones 1000

veces mayores que las que se pueden encontrar en pacientes sujetos a tratamiento crónico.

En trabajos realizados *in vitro*, se encontró activación de la adenil ciclasa en células intactas [115,¹⁵⁶,¹⁵⁷], o en sistemas libres de células [¹⁵⁸]. Esta activación se halló también *in vivo* en ratas, pero con administración crónica de fluoruro en concentraciones comparables a las halladas en aguas de bebida [¹⁵⁹,¹⁶⁰]. Sin embargo, Wallin [¹⁶¹] demostró en 1977 la disminución de los niveles de AMPc urinario refractario a la administración de vasopresina.

El fluoruro también produce alteraciones renales que han sido muy estudiadas como consecuencia del empleo de un anestésico, el metoxiflorano, que se metaboliza dando fluoruro, identificado como responsable final de las alteraciones en la función renal. En perros, cuya fluoremia llegó a 400 $\mu\text{mol/L}$, se ha observado aumento del flujo urinario con disminución de la osmolaridad urinaria y la concentración de sodio en médula renal [¹⁶²]. En ratas con fluoremias de 200-300 $\mu\text{mol/L}$ se ha observado poliurea resistente a vasopresina exógena [¹⁶³,¹⁶⁴,¹⁶⁵]. La filtración glomerular sólo es afectada con fluoremias superiores a 500 $\mu\text{mol/L}$, también se ha encontrado por administración de fluoruro, hipoemia en corteza e hiperemia en médula, lo que determina un aumento de la perfusión medular con desaparición del gradiente osmótico renal [¹⁶⁶]. Sin embargo estos efectos renales no son observables a las dosis habituales de tratamiento.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que el fluoruro en concentraciones compatibles con las halladas en personas que residen en áreas con agua de consumo con alto contenido de flúor o reciben sales con flúor por el tratamiento de osteoporosis, produce disminución de la secreción de insulina [¹⁶⁷,¹⁶⁸,¹⁶⁹,¹⁷⁰]. Este efecto fue corroborado por estudios en zonas de fluorosis por investigaciones de nuestro laboratorio [¹⁷¹] y de otros centros de investigación [¹⁷²].

ÍNDICE ANALÍTICO

coeficiente de actividad.....	17
curva de calibración.....	19
determinación de flúor.....	..
con corrección basal.....	80
cromatografía gaseosa.....	13
en esmalte dental.....	57
en uñas.....	56
flúor ácido lábil.....	60
flúor ácido resistente.....	62
método adición dilución.....	72
método automatizado.....	70
método de adición.....	75
monofluorofosfato.....	86
determinación de monofluorofosfato.....	..
obtención fosfatasa alcalina.....	88
Ecuación de Nernst.....	16
electrodo de ion específico.....	16
electrodo de referencia.....	16
flúor.....	..
absorción intestinal.....	91
efectos tóxicos.....	96
excreción renal.....	93
óseo.....	94
propiedades.....	90
flúor ácido lábil.....	60
flúor iónico.....	64
fluoremia.....	92
fuerza iónica.....	17
matrices.....	24
método colorimétrico.....	10
método colorimétrico.....	..
método complexona.....	12
método SPADNS.....	10
visual con alizarina.....	11
método potenciométrico.....	15
microdestilación.....	42
difusión isotérmica.....	43
facilitada.....	51
tiempo requerido.....	47
trampa de fluoruro.....	47
muestras.....	..
agua.....	53
conservación.....	53
fluoremia.....	55
heces.....	54
hueso.....	55
orina.....	54
recipiente adecuado.....	53
tamaño.....	53
uñas.....	55
potenciometría directa.....	..
con disolución.....	34
macrotécnica.....	30

microadaptador de electrodos.....	40
microtécnica.....	33
post calcinación.....	32
soluciones acuosas.....	31
microtécnica	36
TISAB.....	17
complejante cationes.....	21
electrodo ELIT.....	22
para agua.....	20
para orina.....	21
para potenciometría directa.....	39
electrodo de ion específico.....	..
construcción.....	29
efecto de la temperatura.....	24
estabilidad.....	27
interferencias.....	22
límite detección.....	25
modelos.....	28

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Aloia JF, Zanzie I, Vaswani, A, Ellis K, Cohn SH. Combination therapy for osteoporosis with estrogen, fluoride and calcium. *J. Am. Geriatr. Soc* 30(1):13-17. 1982.
- 2 Riggs BL, O'Fallon WM, Lane A, Hodgson SF, Wahner HW, Muhs J, Chao E, Melton LJ. 3rd. Clinical trial of fluoride therapy in postmenopausal osteoporotic women: extended observations and additional analysis. *J. Bone Miner. Res.* 9(2): 265-275. 1994.
- 3 Affinito P, Di Carlo C, Primizia M, Petrillo G, Napolitano F, Tremolaterra F, Nappi C. A new fluoride preparation for the prevention of postmenopausal osteoporosis: calcium monofluorophosphate. *Gynecol.Endocrinol* 7(3):201-201. 1993.
- 4 Battmann A, Resch H, Libanati CR, Ludy D, Fischer M, Farley S, Baylink DJ. Serum Fluoride and serum osteocalcin levels in response to a novel sustained-release. *Osteoporosis Int.* 7:48-51. 1997.
- 5 Warneke G, Setnikar I. Bioavailability and pharmacokinetics of fluoride from two glutamine monofluorophosphate preparation. *Arzneimittelforschung* 43(5):584-590. 1993.
- 6 Anderson NG, Kilgour E, Sturgill TW. Activation of mitogen activated protein kinase (MAK) in BC3H1 myocytes by fluoroaluminate. *J. Biol. Chem* 266:(16) 10131-10135.1991.
- 7 Lau KH, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJ. A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism* 38(9): 858-868. 1989.
- 8 Aussel C, Mary D, Peyron JF, Pelassy C, Ferua B, Fehlmann M. Inhibition and activation of interleukin 2 synthesis by direct modification of guanosine triphosphate binding proteins. *J. Immunology* 140(1):215-220. 1988.
- 9 Allmann DV, Miller A, Kleiner HS. Effect of fluoridated water on 3',5' cyclic AMP levels in various rat tissues. *J. Dent. Res.* 57: 881. 1978
- 10 Stephen KW. Fluoride toothpastes, rinses, and tablets. *Adv Dent Res* 8:185-9. 1994.
- 11 Pessan JP, Pin ML, Martinhon CC, da Silva SM, Granjeiro JM, Buzalaf MAR. Analysis of fingernails and urine as biomarkers of fluoride exposure from dentifrice and varnish in 4- to 7-years-old children. *Caries Res.* 39(5):363-370. 2005.
- 12 Burgstahler A, Limeback H. Retreat of the fluoride fluoridation paradigm. *Fluoride* 37(4) 239-242. 2004.
- 13 Warren JJ, Levy SM. A review of fluoride dentifrice related to dental fluorosis. *Pediatr. Dent.* 21(4):265-271. 1999.
- 14 Levy SM, Guha-Chowdhury N. Total fluoride intake and implications for dietary fluoride supplementation. *J. Public Health Dent.* 59(4): 211-23. 1999.
- 15 Fomon SJ, Ekstrand J, Ziegler EE. Fluoride intake and prevalence of dental fluorosis: trends in fluoride intake with special attention to infants. *J. Public Health Dent.* 60(3):131-9. 2000.
- 16 Burgstahler AW. Fluoride in California wines and raisins. *Fluoride* 30: 142-146. 1997.
- 17 Warren JJ, Levy SM. Current and future role of fluoride in nutrition. *Dent. Clin. North Am.* 47(2): 225-243. 2003.
- 18 Nuscheler M, Conzen P, Schwender D, Peter K. Fluoride-induced nephrotoxicity: fact or fiction?. *Anaesthesist* 45 Suppl 1:S32-40. 1996
- 19 Goldberg ME, Cantillo J, Larijani GE, Torjman M, Vekeman D, Schieren H. Sevoflurane versus isoflurane for maintenance of anesthesia: are serum inorganic fluoride ion concentrations of concern? *Anesth. Anal.* 82(6):1268-72. 1996.
- 20 Dukes MNG. Fluoride. In *Side effects of drugs*, Annual 4. Ed. Excerpta Medica, Oxford, England. pp 354. 1980.
- 21 Church L. Fluorides: use with caution. *J. Dent. State Dent. Assoc* 19: 106. 1976.
- 22 Menchel SM, Dunn WA. Hydrofluoric acid poisoning. *J. Forensic. Med. Pathol* 5(3):245-248. 1984.
- 23 Mullins ME, Warden CR, Barnum DW. Pediatric death and fluoride-containing wheel cleaner. *Ann. Emerg. Med.* 31(4): 524-525. 1998.
- 24 Muriale L, Lee E, Genovese J, Trend S. Fatality due to acute fluoride poisoning following dermal contact with hydrofluoric acid in a falynology laboratory. *Ann. Occup. Hyg.* 40(6):705-710. 1996.
- 25 Bost RO, Springfield A. Fatal hydrofluoric acid ingestion: a suicide case report. *J. Anal. Toxicol.* 19(6):535-536. 1995.
- 26 Watson AA, Oliver JS, Thorpe JW. Accidental death due to inhalation of hydrofluoric acid. *Med. Sci. Law* 13:277-279. 1973.
- 27 Tepperman PB. Fatality due to acute systemic fluoride poisoning following a hydrofluoric acid skin burn. *J. Occup. Med.* 22:691-692. 1980.
- 28 Arnow PM, Bland LA, Garcia-Houchins S, Fridkin S, Fellner SK. An outbreak of fatal fluoride intoxication in a long-term hemodialysis unit. *Ann. Inter. Med.* 121(1):339-334. 1994.
- 29 Raikhlin-Eisenkraft B, Nutenko I, Kniznik D, Merzel J, Lev A. Death from fluorosilicate in floor polish. *Harefuah* 126(5):258-259. 1994.
- 30 Randall BB, Fraser BJ. Peanut butter and fatal fluoride poisoning. A case of mistaken identity. *Am. J. Forensic. Med. Pathol.* 15(1):40-43. 1994.
- 31 Wiese J, Klug E. Poisoning with a wood preservative. *Beitr. Gerichtl. Med.* 47: 103-106. 1989.
- 32 Eichler HG, Lenz K, Fuhrmann M, Hruby K. Accidental ingestion of NaF tablets by children: report of a poison control center and one case. *Int J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 20(7):334-338. 1982.
- 33 Marier J, Rose D. Environmental Fluoride. National Research Council of Canada. Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality. NRCC No. 16081. 1977.
- 34 Willard H, Winter O. *Industrial and Engineering Chemistry.* 5:7. 1933.
- 35 Lamar W. *Industrial and Engineering Chemistry Am Ed.* 17: 148. 1945.
- 36 Instruction manual-fluoride electrodes. ORION. Model 94-09 96-09.

- 37 Vogel GL, Chow LC, Brown WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res.* 17(1):23-31. 1983.
- 38 Frant MS, Ross JW. Use of a total ionic strength adjustment buffer for electrode determination of fluoride in water supplies. *Anal. Chem.* 40(7):1169-1171. 1968.
- 39 Taves D. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta* 15, 969-974. 1968.
- 40 Hallsworth AS, Weatherell JA, Deutsch D. Determination of subnanogram amounts of fluoride with the fluoride electrode. *Anal. Chem.* 48(12): 1660-1664. 1976.
- 41 Rigalli A, Alloatti R, Puche RC. Measurement of Total and Diffusible Serum Fluoride. *J. Clin. Lab. Analysis* 13:151-157. 1999.
- 42 Whitford GM. Some characteristics of fluoride analysis with the electrode. In. *The metabolism and toxicity of fluoride.* 2do Ed. HM Myier. Ed Karger, Base. pp 330-333. 1996.
- 43 Buzalaf MA, Caroselli EE, Cardozo de Oliveira RC, Granjeiro JM, Whitford GM. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. *J. Anal. Toxicol.* 28(4):249-252. 2004.
- 44 Buzalaf MA, Fukushima R, Granjeiro JM, Cury JA. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. *Fluoride* 9:185-192. 2002.
- 45 Whitford GM, Sampaio FC, Ameberg P, Von der Fehr FR. Fingernail fluoride: a method for monitoring fluoride exposure. *Caries Res.* 33(6):462-467. 1999.
- 46 Feskanich D, Owusu W, Hunter DJ, Willett WC, Ascherio A, Spiegelman D, Morris S, Spate VL, Colditz G. Use of toenail fluoride levels as an indicator for the risk of hip and forearm fractures in women. *Epidemiology* 9(4):412-416. 1998.
- 47 Spate VL, Morris JS, Baskett CK, Mason MM, Reams CL, Hunter DJ. Determination of fluoride in human nails via cyclic neutral activation analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem* 179:27-33. 1994.
- 48 Czarnowski W, Krechniak J. Fluoride in urine, hair and nails of phosphate fertilizer workers. *Br. J. Ind. Med.* 47(5):349-351. 1990.
- 49 Machoy Z. Effects of environmental upon fluoride content in nails in children. *Fluoride* 22:169-173. 1989.
- 50 Schamschula RG, Sugar E, Un PS, Toth K, Barnes DE, Adkins BL. Physiological indicators of fluoride exposure and utilization: and epidemiological study. *Community Dent. Oral Epidemiol* 13(2):104-107. 1985.
- 51 Schmidt CW, Leuschke W. Fluoride content in fingernails taken from persons with and without chronic fluoride exposure. *Fluoride* 23: 79-82. 1982.
- 52 Singer L, Armstrong WD, Vogel JJ. Determination of fluoride content of urine by electrode potential measurements. *J Lab and Clin Med* 74:354-358. 1969.
- 53 Singer L, Armstrong WD. Determination of fluoride in blood serum. *Anal. Chem.* 31:105. 1959.
- 54 Singer L, Armstrong WD. Determination of fluoride. Procedure based upon diffusion of hydrogen fluoride. *Anal Biochem.* 10: 495. 1965.
- 55 Venkateswarlu P, Singer L, Armstrong WD. Determination of ionic (plus ionizable) fluoride in biological fluids. Procedure based on absorption of fluoride ion on calcium phosphate. *Anal. Biochem.* 42(2): 350-359. 1971.
- 56 Fry BW, Taves DR. Serum fluoride analysis with the fluoride electrode. *J. Lab. Clin. Med.* 75:1020-1025. 1970.
- 57 Cowell DC. Automated fluoride ion determination. Determination of serum fluoride ion levels. *Annals Clin. Biochem.* 14(5):275-278. 1977.
- 58 Jardillier JC, Desmet G. Etude du fluor sérique et de ses combinaisons par une technique utilisant une électrode spécifique. *Clin. Chim. Acta* 47(3): 357-363. 1973.
- 59 Fuchs C, Dorn D, Fuchs CA, Henning HV, Mc Intosh C, Scheler F. Fluoride determination in plasma by ion selective electrodes: a simplified method for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta:* 60(2):157-167. 1975.
- 60 Melton JR, Hoover WL, Ayers JL. Known addition procedure for determining fluoride in feeds with an ion-specific electrode. *Journal of the AOAC* 57: 508-510. 1973.
- 61 Villa AE. Rapid method for determining very low fluoride concentration using an ion selective electrode. *Analyst* 113: 1299-1303. 1988.
- 62 Setnikar I, Arigoni R. Chemical stability and mode of gastrointestinal absorption of sodium monofluorophosphate. *Arzneimittelforschung* 38(1) 45-49. 1988.
- 63 Rigalli A, Iglesias AM, Puche RC. Long term stability of sodium monofluorophosphate. *Drug.Dev. and Ind. Pharm* 21(4):517-521. 1995.
- 64 Rigalli A, Ricci D, Puche RC. Instability of sodium monofluorophosphate in effervescent tablets. *Fluoride* 39 (1) 19-22. 2006.
- 65 Rigalli A, Morosano M, Puche RC. Bioavailability of fluoride administered as sodium fluoride or sodium monofluorophosphate to human. *Arzneimittelforschung.* 46(5),531-533. 1996.
- 66 Rigalli A, Pera L, Morosano M, Masoni A, Bocanera R, Tozzini R, Puche RC. In postmenopausal osteoporosis the bone increasing effect of monofluorophosphate is not depending of serum fluoride. *Medicina (B Aires)* 59:157-161. 1999.
- 67 Pera L, Rigalli A, Puche RC. Fluorine bound to non collagenous proteins in the bones of rats treated with monofluorophosphate (MFP) and sodium fluoride (NaF). *Bone* 24: 532. 1999.
- 68 Pera L, Brun LR, Rigalli A, Puche RC. Identification of bone α_2 -macroglobulin (α_2 M) related-proteins in rats treated with MFP. Its role in fluoride (F) bioavailability. *Biocell* 27(2): 234. 2003.
- 69 Rigalli A, Cabrerizo M, Beinlich A, Puche RC. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneimittelforschung.* 44(I), 651-655. 1994.
- 70 WHO: World Health Organization. Fluoride: Guidelines for drinking water quality. Vol 2. Health Criteria and

- other supporting information. Geneva. 1985.
- 71 Cook HA. Fluoride and tea. *Lancet* 2: 329. 1969.
- 72 Kramer L, Osis D, Wiatrowski E, Spencer H. Dietary fluoride in different areas in the United States. *Am J. Clin. Nutr.* 27(6):590-594. 1974.
- 73 Bernstein DS, Guri CD, Cohen P, Collins J, Tamvakopoulos S. The use of sodium fluoride in metabolic bone disease. *J. Clin. Invest.* 42: 916. 1963.
- 74 Choi SH, Sheeham FR. Multiple myeloma: Roentgen diagnosis of acute fluoride effect. *Geriatrics* 23(5): 137-141. 1968.
- 75 Neer RM, Zipking I, Carbone PP, Rosenberg LE. Effect of sodium fluoride therapy on calcium metabolism in multiple myeloma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 26(10):1059-1068. 1966.
- 76 Waldbott GL. Acute fluoride intoxication. *Acta. Med. Scand. Suppl.* 400:1-44. 1963.
- 77 Gutknecht J, Walter A. Hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 644(1): 153-156. 1981.
- 78 Whitford GM, Pashley DH. Fluoride absorption: the influence of gastric acidity. *Calcif. Tissue Int.* 36(3): 302-307. 1984.
- 79 Whitford GM, Taves D. Fluoride-Induced diuresis: Plasma concentrations in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 458-460. 1971.
- 80 Whitford GM, Callan RS, Wang HS. Fluoride absorption through the hamster cheek pouch: a pH-dependent event. *J. Appl. Toxicol.* 2(6): 303-306. 1982.
- 81 Whitford GM. Physiologic determinants of plasma fluoride concentrations. In Shupe JL, Peterson HB, Leone NC, eds. *Fluorides: Effects on vegetation, animals and human.* Salt Lake City Paragon Press 167-182. 1983.
- 82 Waterhouse C, Taves D, Munzer A. Serum inorganic fluoride: changes related to previous fluoride intake, renal function and bone resorption. *Clin. Science* 58(2): 145-152. 1980.
- 83 Chaleil O, Mauras Y, Allain P. Oral Pharmacokinetics of an enteric-coated sodium fluoride preparation. *Trace elements in Medicine* 1: 11-13. 1986.
- 84 Whitford GM, Williams JL. Fluoride absorption: Independence from plasma fluoride levels. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 181: 550-554. 1986.
- 85 McClure FJ, Mitchell HH, Hamilton TS, Kinser CA. Balances of fluoride ingested from sources in food and water by five young men. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 27: 159-170. 1945.
- 86 Stookey GK, Crane DB, Mühler JC. Role of skeleton and kidney in fluoride absorption in rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113: 336-370. 1963.
- 87 Singer L, Armstrong WD. Regulation of human plasma fluoride concentration. *J. Appl. Physiol.* 15: 508-510. 1960.
- 88 Spencer H, Kramer L, Osis D, Wiatrowsky E, Norris C, Lender M. Effect of calcium, phosphorus, magnesium and aluminum on fluoride metabolism in man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 355: 181-194. 1980.
- 89 Jowsey J, Riggs BL. Effect of concurrent calcium ingestion on intestinal absorption of fluoride. *Metabolism* 27: 971-974. 1978.
- 90 Warner MJ, Muhler JC. The effect of calcium and phosphorus on fluoride absorption. *J Dent. Res.* 39: 49-52. 1960.
- 91 Shambaugh GE, Petrovic A. Effects of sodium fluoride on bone. Application to otosclerosis and other dicalcifying bone diseases. *JAMA.* 204(11): 969-973. 1968.
- 92 Stookey GK, Crane DB, Mühler JC. Further studies on fluoride absorption. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115: 295-298. 1964.
- 93 Carlson CH, Armstrong WD, Singer L. Distribution and excretion of radiofluoride in the human. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104:235-239. 1960.
- 94 Husdan H, Vogl B, Oreopoulos D, Gryfe C, Rapoport A. Serum ionic fluoride: normal range and relationship to age and sex. *Clin Chem.* 22(11): 1884-1888. 1976.
- 95 Whitford GM, Pashley DH, Stringer GI. Fluoride renal clearance: a pH-dependent event. *Am. J. Physiol.* 230:527-532. 1976.
- 96 Hanhijarvi H, Anttonen VM, Pekkarinen A, Penttila B. The effect of artificially fluoridated drinking water on the plasma ionized fluoride content in certain clinical diseases and in normal individuals. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 31:104-105. 1972.
- 97 Parkins FM, Tinanoff N, Mountinho M, Anstey MB, Waziri MH. Relationships of human plasma fluoride and bone fluoride to age. *Calcif. Tissue Res.* 16: 335-338. 1974.
- 98 Ericsson Y, Gydell K, Hammarskiöld Th. Blood plasma fluoride: an indicator of skeletal fluoride content. *Mineral Metabolism*; 8: 30. 1973.
- 99 Largent EJ. Metabolism of inorganic fluorides. In *Fluoridation as a Public Health Measure.* JH Shaw, Ed. 49-78. American Association for the advancement of Science. Washington DC. 1954.
- 100 Spencer H, Lewin E, Wiatrowsky E, Samachson J. Fluoride metabolism in man. *Am. J. Med.* 49: 807-813. 1970.
- 101 Schiff H, Binswager U. Renal Handling of fluoride in healthy man. *Renal Physiol.* 5: 192-196. 1982.
- 102 Eisenberg AD, Bender GR, Marquis RE. Reduction in the aciduric properties of the oral bacterium. *Streptococcus mutans* GS-5 by fluoride. *Arch. Oral Biol.* 25(2): 133-135. 1980.
- 103 Eisenberg AD, Marquis RE. Enhanced transmembrane proton conductance in streptococcus mutans GS-5 due to ionophores and fluoride. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 19(5):807-812. 1981.
- 104 Eisenberg AD, Marquis RE. Uptake of fluorides by cells of *Streptococcus mutans* in dense suspensions. *J. Dent. Res.* 59(7): 1187-1191. 1980

- 105 Pitts RF. Physiology of the kidney and body fluids. Chicago Year Book, 217-221. 1974.
- 106 Whitford GM, Pashley DH, Reynolds KE. Fluoride absorption from the rat urinary bladder: a pH-dependent event. *Am. J. Physiol.* 232: F10-F15. 1977.
- 107 Zipkin L. Physiological effects of small doses of fluoride: effects on the skeleton of man. In: Fluorides and human health. PP 185-201 Monograph series N° 59. World health Organization. Geneva. 1970.
- 108 Posner AS, Eanes ED, Harper RA, Zipkin I. X-Ray diffraction analysis of the effect of fluoride on human bone apatite. *Arch. Oral Biol* 8:549-570. 1963.
- 109 Forbes GB, Taves DR, Smith FA, Kilpper RW Bone mineral turnover in a patient with osteogenesis imperfecta estimated by fluoride excretion. *Calcif. Tissue Res.* 25:283-288. 1978.
- 110 Guo MK, Nopakum J, Messer HH, Ophaug R., Singer L. Retention of skeletal fluoride during bone turnover in rats. *J. Nutr.* 118(3): 362-366. 1988.
- 111 Gron P, McCann HG, Bernstein D. Effect of fluoride on human osteoporotic bone mineral. A chemical and crystallographic study. *J. Bone Joint. Surg.* 48(5): 892-298. 1966.
- 112 Vigorita VJ, Suda MK. The microscopic morphology of fluoride induced bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 177:274-282. 1983.
- 113 Liu CC, Baylink DJ. Stimulation of bone formation and bone resorption by fluoride in thyroparathyroidectomized rats. *J. Dent. Res* 56(3): 304-311. 1977.
- 114 Stein JD, Granik G. Human vertebral bone: relation of strength, porosity and mineralization to fluoride content. *Calcif. Tissue Int.* 32(3) : 189-194. 1980.
- 115 Nelson DG, Featherstone JD, Duncan JF, Cutress TW. Effect of carbonate and fluoride on the dissolution behaviour of synthetic apatites. *Caries Res.* 17(3): 200-211. 1983.
- 116 Le Geros RZ, Tung MS. Chemical stability of carbonate and fluoride containing apatites. *Caries Res.* 17(5): 419-429. 1983.
- 117 Ludwing A, Dane S, Higuchi W, Fox J. Influence of fluoride ions on the dissolution kinetics of apatite powders. *J. Pharm. Belg.* 37: 141-149. 1982.
- 118 Uslu B. Effect of fluoride on collagen synthesis in the rat. *Res. Exp. Med.* 182(1): 7-12. 1983.
- 119 Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone forming cells. *Science*, 222: 330-332. 1983.
- 120 Bernstein DS, Sadowsky N. Prevalence of osteoporosis in high and low fluoride areas in North Dakota. *JAMA* 198(3): 499-504. 1966.
- 121 Simonen O, Laitinen O. Does fluoridation of drinking water prevent bone fragility and osteoporosis?. *Lancet*, 2:432-433. 1985.
- 122 Wenzel A, Thylstrup A, Melsen B. Skeletal development and dental fluorosis en 12-14 year old Danils girls from a fluoride and nonfluoride community. *Scand. J. Dent. Res.* 90: 83-88. 1982.
- 123 Rich C, Ensinnck J, Ivanovich P. The effect of sodium fluoride on calcium metabolism of subjets with metabolic bone diseases. *J. Clin Invest.* 43: 545-555. 1964.
- 124 Rose GA. A study of the treatment of osteoporosis with fluoride therapy and high calcium intake. *Proc. R. Soc. Med.* 58: 436-440. 1965.
- 125 Spencer H, Lewin I, Fowler J, Samachson J. Effect of sodium fluoride on calcium absorption and balances in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 22(4): 381-390. 1969.
- 126 Spencer H, Lender M. Adverse effects of aluminum-containing antacids on mineral metabolism. *Gastroenterology* 76(3): 603-606. 1979.
- 127 Singer L, Dale MD, Armstrong WD. Effect of high fluoride intake on utilization of dietary calcium and on solubility of calcified tissues. *J. Dent. Res.* 44: 582-586. 1965.
- 128 Brudevold F, Moreno E, Bakhos A. Fluoride complexes in drinking water. *Arch. Oral Biol.* 17(8): 1155-1163. 1972.
- 129 Manzke E, Baylink D, Vose G. Bone density, nondialyzable urinary hydroxyproline, serum 25-hydroxyvitamin D and serum parathyroid hormone during fluoride therapy. *Acta Endocrinology* 87(Suppl 215), 51. 1978.
- 130 Bernstein DS, Cohen P. Use of sodium fluoride in the treatment of osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol, Metab.* 27(2):197-210. 1967.
- 131 Briancon D, Meunier PJ. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium and vitamin D. *Orthop. Clin. North Am.* 12(3): 629-648. 1981.
- 132 Schulz EE, Gleason T, Flowers C, Brin B, Giordano O, Baylink D. Different accretion in trabecular and cortical osteoporotic bone treated with fluoride. *Clin. Res.* 36:3-9. 1988.
- 133 Russof LL, Konikoff BS, Frye JB, Johnston JE, Frye WW. Fluoride addition to milk and its effects on dental caries in school children. *Am. J. Clin. Nutr.* 11:94-101. 1962.
- 134 Faccini JM, Care AD. Effect of sodium fluoride on the ultrastructure of the parathyroid glands of the sheep. *Nature* 207(4):1399-1401.1965.
- 135 Teotia SP, Teotia M. Secondary hyperparathyroidism in patients with endemic skeletal fluorosis. *Br. Med. J.* 1: 637-640. 1973.
- 136 Teotia SP, Teotia M, Singh RK. Preliminary report on plasma fluoride, CT, 25-hydrocholecalciferol and immunoreactive parathyroid hormone and CT in patients with endemic fluorosis. *Fluoride*, 11: 115-119. 1978.
- 137 Ream LJ, Principato R. Fluoride stimulation of the rat parathyroid gland: An ultrastructural study. *Am. J. Anat.* 162(3):233-241. 1981.
- 138 Raisz LG, Taves DR. The effect of fluoride on parathyroid function and responsiveness in the rat. *Calcif. Tissue.*

Res. 1(3):219-228. 1967.

139 Rosenquist J, Boquist L. Effects of supply and withdrawal of fluoride. Experimental studies on growing and adult rabbits. Parathyroid morphology and function. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 81A(5): 637-644. 1973.

140 Singh A, Singh BM, Singh ID, Jolly SS, Malhotra KC. Parathyroid function in endemic fluorosis. *Ind. J. Med. Res.* 54(6): 591-597. 1966.

141 Sankaran B, Gadekar NG. Skeletal fluorosis, bone and tooth. New York Pergamon Press, Inc. PP 357. 1964.

142 Christie D. The spectrum of radiographic bone changes in children with fluorosis. *Radiology* 136(1):85-90. 1980.

143 Varol E, Akcay S, Ersoy IH, Ozaydin M, Koroglu BK, Varol

Aortic S. Elasticity is Impaired in Patients

with Endemic Fluorosis. *Biol Trace Elem Res.* 133(2): 121-127. 2010

144 Douglas TE. Fluoride dentifrice and stomatitis. *Northwest Med.* 56(9):1037-1039. 1957.

145 Feltman E, Kosel G. Prenatal and postnatal ingestion of fluorides. Fourteen years of investigation. Final report. *J. Dent. Med.* 16:190-199. 1961.

146 Nagant De Deuxchaisnes C, Krane SM. Paget's Disease of bone: clinical and metabolic observations. *Medicine (Baltimore)* 43: 233-266. 1964.

147 Geall MG, Beilin LJ. Sodium fluoride and optic neuritis. *Br. Med. J.* 2:355-356. 1964.

148 Epstein E. Effect of fluorides in acne vulgaris. *Stanford Med. Bul.* 9(4):243-244. 1951.

149 Shea JJ, Gillespie SM, Waldbott GL. Allergy to fluoride. *Annals of Allergy*, 25:388-391. 1967.

150 Waldbott GL. Allergic reactions to fluoride. *J. Asthma Res.* 105:51-64. 1964.

151 Bernanke D, Epstein FH. Metabolism of the renal medulla. *Am. J. Physiol.* 208: 541-545. 1965.

152 Mazze RI. Methoxyflurane nephropaty. *Environ Health Perspect.* 15:111-119. 1976.

153 Rall TW, Sutherland EW. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.* 232(2): 1065-1076. 1958.

154 Chen CJ, Anast CS, Brown EM. Effects of fluoride on parathyroid hormone secretion and intracellular second messengers in bovine parathyroid cells. *J. Bone. Miner. Res.* 3 (3): 279-289. 1988.

155 Howell SL, Montague W. Adenylate cyclase activity in isolated rat islets of Langerhans. Effects of agents which alter rates of insulin secretion. *Biochim. Biophys. Acta.* 320(1): 44-52. 1973.

156 Korman LY, Lemp GF, Jackson MJ, Gardner JD. Mechanism of action of ATP on intestinal epithelial cells cyclic AMP mediated stimulation of active ion transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 721(1): 47-54. 1982.

157 Mornstad H, Van Dijken J. Caries preventive doses of fluoride and cyclic AMP levels in human plasma. *Caries Res.* 16(4):277-281. 1982.

158 Sutherland EW, Rall TW, Menon T. Adenyl cyclase. Distribution, preparation and properties. *J. Biol. Chem.* 237: 1220-1227. 1962.

159 Allmann D, Shahed A. Effect of NaF on Cyclic-AMPC and glucose-Metabolism in isolated hepatocytes. *J. Cell. Biol.* 75: A 178. 1977.

160 Allmann D, Miller A, Kleiner HS. Effect of fluoridated water on 3', 5' cyclic-AMP levels in various rat tissues. *J. Dent. Res.* 57 (9-10): 881. 1978.

161 Wallin JD, Kaplan RA. Effect of sodium fluoride on concentrating and diluting ability in the rat. *Am. J. Physiol.* 232(4) F335-F340. 1977.

162 Frascino JA. Effect of inorganic fluoride on the renal concentrating mechanism. Possible nephrotoxicity in man. *J. Lab. Clin. Med.* 79(2): 192-203. 1972.

163 Crandell WB, Pappas SG, Mac Donald A. Nephrotoxicity associated with methoxyflurane anesthesia. *Anesthesiology*, 27(5): 591-607. 1966.

164 Rush GF, Willis LR. Renal tubular effects of sodium fluoride. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223(2): 275-279. 1982.

165 Mazze RI, Cousins MJ, Kosek JC. Dose-related methoxyflurane nephrotoxicity in rats: a biochemical and pathologic correlation. *Anesthesiology* 36(6): 571-587. 1972.

166 Whitford GM, Taves DR. Fluoride-induced diuresis: renal tissue solute concentrations, functional, hemodynamic, and histologic correlates in the rat. *Anesthesiology*, 39(4): 416-427. 1973.

167 Rigalli A, Ballina JC, Roveri E, Puche RC. Inhibitory effect of fluoride on the secretion of insulin. *Calcif. Tissue Int.* 46(5):333-338. 1990.

168 Rigalli A, Ballina JC, Puche RC. Bone mass increase and glucose tolerance in rats chronically treated with sodium fluoride. *Bone Miner.* 16(2):101-108. 1992

169 Rigalli A, Alloati R, Menoyo I, Puche RC. Comparative study of the effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittelforschung.* 45(3): 289-292. 1995.

170 Menoyo I, Rigalli A, Puche RC. Effect of fluoride on the secretion of insulin in the rat. *Arzneimittelforschung.* 55(8) 455-460. 2005.

171 de la Sota M, Puche RC, Rigalli A, Fernandez LM, Benassati S, Boland R. Modificaciones en la masa ósea y en la homeostasis de la glucosa en residentes de la zona de Bahía Blanca con alta ingesta espontánea de flúor. Changes in bone mass and in glucose homeostasis of subjects with high spontaneous fluoride intake. *Medicina (B Aires).* 57(4): 417-420. 1997.

172 Trivedi N, Mithal A, Gupta SK, Godbole MM. Reversible impairment of glucose tolerance in patients with endemic fluorosis. Fluoride collaborative Study Group. *Diabetologia* 36(9):826-828. 1993.