



Centro de Investigación en
Materiales Avanzados, S.C.



Universitat
de les Illes Balears

DESARROLLO DE UN SISTEMA AUTOMÁTICO PARA LA
EXTRACCIÓN Y PRE-CONCENTRACIÓN DE ^{131}I EN
MUESTRAS BIOLÓGICAS Y RESIDUOS HOSPITALARIOS

TESIS

para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL
(CIMAV)**

MÁSTER EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA (UIB)

Presenta:

Donagi Esparza Palomera

Asesores:

Dra. Luz Olivia Leal Quezada (CIMAV)

Dra. Laura Ferrer Trovato (UIB)

Dr. Víctor Cerdà Martín (UIB)

Chihuahua, Chihuahua, Mayo de 2018

A mis padres por siempre apoyarme y peinar mis alas para así
volar tan alto como yo desee.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por el apoyo económico que me brindó durante los años de maestría, a través de una beca mixta.

Al Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) S.C. y a la Universitat de les Illes Balears (UIB, Palma de Mallorca, España), por aceptarme como alumna de maestría en el marco del convenio de doble titulación firmado entre ambas instituciones, el cual me permitió realizar una estancia en Palma de Mallorca, España.

También quiero expresar mi agradecimiento a la (UIB) por las ayudas brindadas durante mi estancia, enmarcadas en el programa de Ayudas para alumnos de doble titulación.

El trabajo experimental se ha llevado a cabo en el LaboRA – Laboratorio de Radioactividad Ambiental de la UIB, quien agradece el soporte financiero mediante el proyecto CTM2013-42401-R de la Agencia Estatal de Investigación cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (AEI/FEDER).

A mi familia, por siempre ayudarme a cumplir mis metas y por todo el cariño que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis asesores, Dra. Luz Leal, Dra. Laura Ferrer y Dr. Víctor Cerdà, por apoyarme durante la maestría.

Agradezco enormemente a mi segunda familia, mis amigos: Mony, Andie, Rubén, Jud, Emmanuel, Paloma, Meli (Muchis), Estefanía (Mi carnalita) y Puig, por estar conmigo en todo momento, apoyarme y ayudarme en lo que podían.

Por último, pero no menos importante, agradezco a Víctor (pato) por tenerme paciencia, animarme cada vez que las cosas salían mal, estar presente en los momentos felices y hacer cada instante mejor.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	iv
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Capítulo 1 Introducción.....	7
1.1. Radionúclidos.....	8
1.2. Radioisótopos de yodo.....	9
1.3. Uso de ¹³¹ I en Medicina Nuclear.....	11
1.4. Resina “CL Resin”.....	13
1.5. Técnicas de análisis por inyección en flujo.....	13
1.5.1. Lab-on-valve (LOV).....	13
1.6. Contador de Centelleo Líquido.....	15
1.6.1. Disminución de la eficiencia de contaje.....	17
1.7. Optimización de variables.....	17
1.7.1. Ensayos de cribado o <i>screening</i>	18
1.7.2. Método de superficie de respuesta.....	19
Capítulo 2 Hipótesis.....	21
2.1. Hipótesis.....	22
Capítulo 3 Objetivos.....	23
3.1. Objetivo general.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
Capítulo 4 Metodología.....	25
4.1. Equipos e instrumentación utilizada.....	26
4.2. Software AutoAnalysis.....	30
4.2.1. Configuración del hardware.....	31
4.2.2. Desarrollo del método analítico.....	32
4.2.3. Ejecución del método.....	33
4.3. Reactivos y materiales.....	33
4.3.1. Pre-acondicionamiento de la resina “Cl-resin”.....	34

4.3.2. Muestras.....	34
4.4. Procedimiento analítico.....	34
4.5. Cálculos.....	37
4.5.1. Eficiencias.....	37
4.5.2. Actividad.....	38
4.5.3. Actividad mínima detectable.....	39
Capítulo 5 Resultados y discusión.....	41
5.1. Optimización.....	42
5.2. Parámetros analíticos.....	48
5.2.1. Eficiencia de detección.....	48
5.2.2. Volumen de preconcentración y eficiencia de extracción.....	49
5.2.3. Actividad Mínima Detectable.....	50
5.2.4. Reproducibilidad.....	51
5.3. Análisis de interferencias.....	52
5.4. Prevención del proceso de oxidación.....	53
5.5. Comparación con un método alternativo.....	54
5.6. Análisis de muestras.....	55
Capítulo 6 Conclusiones.....	57
Recomendaciones.....	59
Referencias bibliográficas.....	60

Índice de figuras

Figura 1.- Esquema de desintegración del ^{131}I	10
Figura 2.- Discos rotatorios de las válvulas de selección.....	14
Figura 3.- Pieza de LOV, fabricada con polimetilmetacrilato (PMMA).	15
Figura 4.- Interacción entre una muestra radioactiva y el líquido de centelleo	16
Figura 5.- Componentes de un contador de centelleo líquido.....	16
Figura 6.- Diseño esquemático para la matriz de Doehlert para dos variables.	19
Figura 7.- Módulo multijeringa CRISON	26
Figura 8.-Válvula solenoide ubicada en el cabezal de la jeringa	27
Figura 9.- Complementos y conexiones del módulo multijeringa CRISON	28
Figura 10.- Sistema LOV	29
Figura 11.- Sistema Lab-On-Valve (LOV) propuesto.	29
Figura 12.- Espectros beta de dos patrones de ^{131}I . a) 0.5 Bq y b) 5 Bq.	30
Figura 13.- Ventana de “hardware”	31
Figura 14.- Ventana de “Methods”	32
Figura 15.- Diagrama de Pareto para el <i>screening</i>	44
Figura 16.- Superficie de respuesta de la matriz Doehlert	46
Figura 17.- Diagrama de Pareto para la prueba de robustez.	48
Figura 18.- Porcentaje de extracción	50

Índice de tablas

Tabla 1.- Diseño factorial	18
Tabla 2.- Matriz de Doehlert.....	20
Tabla 3.- Procedimiento analítico del sistema.....	36
Tabla 4.- Matriz experimental para el diseño factorial.....	43
Tabla 5.- Tabla ANOVA de los resultados del <i>screening</i>	44
Tabla 6.- Matriz experimental para el diseño de Doehlert.....	45
Tabla 7.- Tabla de ANOVA de los resultados de la superficie de respuesta	46
Tabla 8.- Matriz experimental para la prueba de robustez	47
Tabla 9.- Eficiencia de detección de ¹³¹ I.....	48
Tabla 10.- Actividad Mínima Detectable (AMD)	50
Tabla 11.- Reproducibilidad del método propuesto.....	51
Tabla 12.- Parámetros analíticos del sistema	51
Tabla 13.- Ensayo de evaluación de interferencias de cloruros.....	53
Tabla 14.- Ensayos del proceso de oxidación del yoduro	53
Tabla 15.- Comparación entre espectrometría gamma y el método propuesto para el análisis de una muestra de residuos hospitalarios	54
Tabla 16.- Análisis de muestras reales	55

Resumen

El ^{131}I es un radionúclido ampliamente utilizado en Medicina Nuclear debido a que presenta desintegraciones beta y gamma, por lo que puede utilizarse tanto para radioterapia como para la obtención de imágenes. Generalmente los residuos producidos en los hospitales por pacientes tratados (heces, orina y saliva) son almacenados en depósitos hasta que su actividad decae por debajo del valor permitido por la administración competente, para ser vertidos al drenaje público. Estas actividades se estiman teóricamente suponiendo que el 100% del ^{131}I utilizado ha sido excretado en el hospital, consideración que se hace por seguridad retrasando la gestión de los residuos hospitalarios. Es por esto que se propone un método automatizado y rápido para separar y pre-concentrar ^{131}I de muestras biológicas (orina, saliva) y de residuos hospitalarios, con posterior detección por centelleo líquido.

El sistema automático desarrollado se basa en una técnica de análisis por inyección en flujo, conocida como Lab-On-Valve (LOV), ofreciendo múltiples ventajas, entre las que cabe destacar la minimización de la manipulación de reactivos, muestras y patrones radioactivos, un menor consumo de éstos y por consiguiente una reducción de los residuos generados durante el análisis, un menor tiempo de análisis y una elevada precisión.

Las extracciones y lecturas de las muestras se pueden llevar a cabo durante el mismo día, dado que la frecuencia de extracción varía de $1.4 - 4 \text{ h}^{-1}$, dependiendo de la cantidad de volumen de muestra pre-concentrado, más dos horas de lectura de cada vial. El volumen máximo de muestra que se puede pre-concentrar es de 20 mL, presentado eficiencias medias de extracción de $85 \pm 5\%$. La actividad mínima detectable (AMD) para la determinación de ^{131}I , es de 0.05 Bq. La precisión del método desarrollado fue de 7% ($n=5$), expresado como desvío estándar relativo.

El sistema es capaz de analizar satisfactoriamente muestras biológicas (saliva y orina) y residuos hospitalarios, con recuperaciones que oscilan entre 89 – 111%, indicando que el método resulta apropiado para el monitoreo de ^{131}I en hospitales, consiguiendo así una vigilancia más completa y eficiente de su entrada al medioambiente.

Abstract

^{131}I is a radionuclide widely used on Nuclear Medicine due to their beta and gamma disintegrations, therefore can be use not only on radiotherapy but also to obtain images. Generally, hospital wastes produced by treated patients (feces, urine and saliva) are storage in reservoirs until its activity is under the allowed value established by the qualified agency in order to discharge them into sewage. The waste activity is theoretically estimated assuming that the 100% of used ^{131}I has been excreted in the hospital delaying the waste management. Hence an automated and quick method is proposed to separate and preconcentrate ^{131}I from biological samples (urine and saliva) and hospital waste, followed by a liquid scintillation detection.

The automated developed system is based on a flow injection analysis technique, Lab-On-Valve (LOV), which offers different advantages, such as minimization of reagent and samples manipulation, reduction of reagents and samples volumes and consequent waste generation, shorter analysis time and a high precision.

Sample extractions and measurements can be done during the same day, since the extraction time rounds $1.4 - 4 \text{ h}^{-1}$, depending on the pre-concentrated sample volume, plus two hours of lecture for each vial. The maximum sample volume that can be preconcentrate is 20 mL, reaching an average efficiency extraction of $85 \pm 5\%$. The minimum detectable activity (MDA) to determine ^{131}I , is 0.05 Bq. The developed method precision is 7.3% (n=5), expressed as relative standard deviation.

The system is able to analyze biological samples (urine and saliva) and hospital waste satisfactorily, obtaining recoveries between 89 – 111%, suggesting that the developed method is proper to perform in hospitals, improving the surveillance of the ^{131}I environmental entrance.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1. Radionúclidos

Los radionúclidos son átomos inestables cuyos núcleos son capaces de transformarse o desintegrarse espontáneamente (decaimiento radiactivo), emitiendo partículas como las emisiones alfa y beta, o radiaciones electromagnéticas como las emisiones gamma. Estas emisiones son también denominadas radiaciones ionizantes, ya que poseen energía suficiente para ionizar la materia, extrayendo los electrones de los átomos (Consejo de Seguridad Nuclear, 2004).

Al número de núcleos que se desintegran en un periodo de tiempo se le conoce como *actividad*, mientras que al tiempo que tarda en reducirse la cantidad de núcleos a la mitad, se le llama *periodo de semidesintegración* ($T_{1/2}$). La actividad comúnmente se expresa en bequerelios (Bq) y curios (Ci). Un bequerelio se define como una desintegración por segundo (dps), mientras que un curio representa 3.7×10^{10} dps.

El origen de los radionúclidos puede ser natural, tanto los que provienen de la corteza terrestre, como de la radiación cósmica, y también artificial, producidos principalmente en reactores nucleares y en ciclotrones. Existen alrededor de 1800 radionúclidos, de los cuales aproximadamente 200 son creados por el hombre (World Nuclear Association, 2016).

El uso de los radionúclidos se ha incrementado debido a la gran utilidad que tienen en la industria, la medicina y en la investigación. Particularmente, en el área de Medicina Nuclear, unos 50 radionúclidos son utilizados como radiofármacos para diagnóstico y terapia. Dentro de la gran variedad de radiofármacos, los emisores alfa y beta son comúnmente usados para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Mientras que los emisores gamma son usados para pruebas diagnósticas, ya que su elevado poder de penetración permite obtener una imagen del interior del cuerpo. Generalmente, el periodo de semidesintegración de los radionúclidos utilizados en medicina, oscila entre días y minutos (International Atomic Energy Agency, 2014).

Algunos ejemplos de radionúclidos utilizados en medicina, tanto en diagnóstico como en tratamiento, son: ^{18}F , ^{60}Co , ^{192}Ir , ^{103}Pd , ^{89}Sr , ^{82}Rb , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{131}I , entre otros. La elección del radionúclido se basa en la selectividad de los radiofármacos administrados hacia los diferentes órganos o tejidos, por ejemplo, el yodo tiene preferencia por la glándula tiroides.

1.2. Radioisótopos de yodo

Existen treinta y cinco isótopos de yodo, de los cuales, sólo uno es un isótopo estable (^{127}I), siendo el resto isótopos radioactivos. Los radioisótopos de yodo pueden ser de origen natural o artificial. Los que se generan de manera natural son producidos bien por la interacción entre los rayos cósmicos con el xenón, en la capa superior de la atmósfera, o bien mediante la fisión espontánea del ^{238}U en la geósfera (Atwood, 2010). Entre las fuentes antropogénicas se encuentran las pruebas con armas nucleares realizadas entre 1945 y 1980, así como las plantas de energía nuclear y las plantas de combustible nuclear que generan ^{131}I (UNSCEAR, 2000).

Entre los radioisótopos de yodo, ^{123}I , ^{124}I y ^{125}I son utilizados para formar imágenes en la etapa de diagnóstico, mientras que el ^{131}I es usado para el tratamiento de desórdenes de tiroides, generalmente para tratar el hipertiroidismo, así como para el tratamiento de cáncer de tiroides. De ellos, el ^{123}I y ^{131}I son los más utilizados en Medicina Nuclear, y dado que el ^{131}I tiene un modo de desintegración beta y gamma, puede utilizarse tanto para la radioterapia como para la obtención de imágenes. En cambio, el ^{123}I , que no tiene actividad beta, es más adecuado para obtención de imágenes de rutina de tiroides y otros procesos médicos ya que es menos dañino internamente para el paciente.

El ^{123}I tiene un período de semidesintegración de 13.22 h, y se desintegra a ^{123}Te mediante captura de electrones emitiendo radiación gamma con una energía predominante de 159 keV. Se usa en tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT).

Introducción

El ^{131}I tiene un período de semidesintegración de 8.02 días. Las emisiones primarias de la desintegración del ^{131}I son electrones, de los cuales el 89% tiene una energía máxima de 606 keV y una radiación gamma de 364 keV con una abundancia del 81%. Como se puede observar en la Figura 1, el ^{131}I se desintegra a ^{131}Xe estable (Dirección General de Medio Ambiente, Seguridad Nuclear y Protección Civil, 1998).

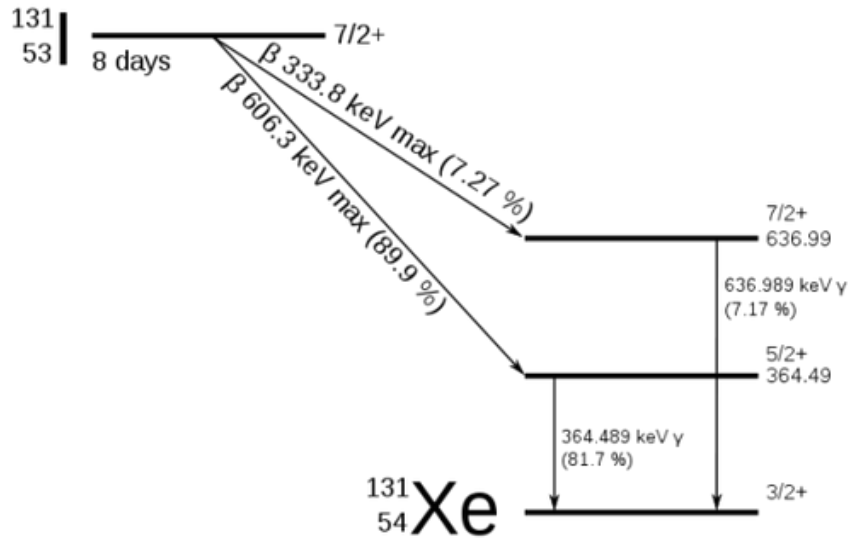


Figura 1.- Esquema de desintegración del ^{131}I .

La exposición ambiental a altas dosis de yodo radioactivo puede dañar la tiroides, provocando una disminución en la producción de hormonas. Además, se puede desencadenar la formación de nódulos tiroideos o incluso cáncer. En este sentido, la radiación beta de alta energía (606 keV) del ^{131}I hace que sea el más carcinógeno de los isótopos de yodo. Se cree que ha causado la mayoría de los cánceres de tiroides vistos después de la contaminación radioactiva por accidentes graves de reactores nucleares, como el de Chernóbil.

1.3. Uso de ^{131}I en Medicina Nuclear

El uso de ^{131}I representa el 90% de las terapias de Medicina Nuclear (UNSCEAR, 2000). Se estima que aproximadamente por cada millón de personas, 150 son tratadas de hipertiroidismo y 38 reciben un tratamiento para cáncer de tiroides (Rose et al., 2013).

Para destruir el tejido de la glándula tiroides se administra una dosis promedio de 4.4 GBq de ^{131}I , y hasta una dosis de 11 GBq en pacientes con metástasis (World Nuclear Association, 2016). De acuerdo con las normas regulatorias de EEUU sobre ^{131}I , un paciente puede salir del hospital si su actividad es menor de 1.2 GBq o menor a 0.07 mSv/h a un metro de distancia (World Nuclear Association, 2016), de lo contrario debe permanecer hasta que el radionúclido decaiga.

Sin embargo, de acuerdo con la Agencia de Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés), las dosis administradas de ^{131}I durante la etapa de diagnóstico (vía oral o intravenosa) deben oscilar entre 0.2 y 0.4 MBq. El rango de dosis durante la etapa de tratamiento con ^{131}I varía entre 0.4 y 1.1 MBq, mientras que si el objetivo es llevar a cabo una ablación completa de la tiroides, el rango de la dosis estará comprendido entre 3.7 y 9.2 MBq (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004).

Según sea la vía de administración oral o intravenosa, el yodo se absorbe por vía digestiva primero, y luego pasa a la corriente sanguínea, o bien se inyecta directamente en sangre, y finalmente es captado por el tejido tiroideo funcional. La captación tiroidea puede ser de hasta el 70% aproximadamente, siendo el resto excretado. Así, los radiofármacos que contienen ^{131}I son absorbidos por la glándula tiroides, así como por los tejidos cercanos a ésta. Sin embargo, hay otros tejidos y glándulas que también absorben los radiofármacos en menor proporción, entre los que se encuentran las glándulas salivares, la mucosa gástrica, los plexos coroideos, las glándulas mamarias, la placenta y las glándulas sudoríparas (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2004).

Introducción

Aproximadamente un 70% del ^{131}I suministrado a pacientes es excretado por vía urinaria (Smith et al., 2008). La segunda vía de eliminación en orden de importancia es la saliva. Otras vías de menor importancia son el sudor y las heces (en especial cuando se utiliza el material radiactivo en forma de cápsula). La proporción en que se encuentra la radiactividad en cada vía de contaminación (aparte de la orina) puede variar considerablemente, por lo tanto, lo mejor es asumir su presencia en todas las vías, mientras no se pruebe lo contrario. La fase de excreción puede no haberse completado antes del alta, o no haber comenzado si el paciente sale inmediatamente después de habersele administrado el radiofármaco (International Atomic Energy Agency, 2013).

Mientras los pacientes se encuentran en el hospital, la orina y las heces se recogen en depósitos, que son almacenados hasta que transcurra el tiempo necesario para que el ^{131}I decaiga hasta el valor permitido por la administración competente. El contenido de los depósitos se vierte al sistema público de alcantarillado, siendo su destino final las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas. Si los pacientes son ambulatorios, sus excreciones van directamente al alcantarillado público.

Los porcentajes que se liberan al drenaje público pueden variar según la dosis administrada en cada tratamiento (Carolan et al., 2011). Tan sólo en el año 2014, se estima que se vertieron 18 TBq de ^{131}I al drenaje, y aunque este radionúclido tiene un tiempo de semidesintegración corto, no deja de tratarse de una gran cantidad de radionúclido liberado. Esta cantidad de actividad es similar a la cantidad de emisores beta y gamma emitidas por el sector nuclear (OSPAR, 2016).

Considerando que en la actualidad, las actividades de los tanques de almacenaje de los residuos hospitalarios de las áreas de Medicina Nuclear se estiman de manera teórica, para saber cuándo se alcanza el Límite Derivado de Concentración de Agua en función del ^{131}I (por ser el radionúclido de mayor energía empleado normalmente en los radiofármacos) antes de descargarlos al drenaje público, resulta de interés desarrollar metodologías que permitan su rápida cuantificación y conseguir así una vigilancia más completa y eficiente de la entrada de este analito al medioambiente.

1.4. Resina “CL Resin”

La resina CL-Resin se trata de una resina de intercambio aniónico que se utiliza para la separación de cloruros y yoduros, su retención es selectiva para los haluros, cuando ésta es cargada con plata.(Triskem, 2010)

1.5. Técnicas de análisis por inyección en flujo

Las técnicas de análisis por inyección en flujo permiten una fácil automatización de los protocolos analíticos y ofrecen diversas ventajas sobre los protocolos de análisis clásicos llevados a cabo de forma manual, entre las cuales se pueden destacar: una elevada precisión, la reducción del consumo de muestra y de reactivos, lo que conlleva a una disminución en la generación de residuos, una mayor frecuencia de análisis, y una minimización de la manipulación de muestras y de reactivos (Cerdà et al., 2014).

1.5.1. Lab-on-valve (LOV)

La técnica de análisis Lab-on-valve (LOV) ha sido desarrollada por Hansen en el año 2000 (Wang y Hansen, 2003), y se basa en una pieza monolítica que contiene canales que sirven de microcolumna, celda de detección o de conducción, que se monta sobre una válvula de selección típica de los sistemas de Inyección en Flujo Secuencial (SIA). El LOV facilita la integración de diferentes métodos analíticos en la válvula y ofrece un gran potencial de miniaturización de la instrumentación. Su principal característica es que permite la manipulación de disoluciones heterogéneas, como una suspensión de perlas de resinas (*bead injection*, BI), lo que facilita los protocolos de extracción en fase sólida, permitiendo el empaquetamiento automático de la microcolumna cada vez que hay que renovar la resina (Cerdà et al., 2014).

Introducción

En la Figura 2 pueden observarse las piezas fijas y rotatorias de una válvula de selección, que consisten en tres discos, dos de ellos son fijos, con un orificio en la parte central y varios orificios laterales; el tercer disco es un disco rotatorio, que tiene un canal que al girar conecta el puerto central con cada uno de los puertos laterales.

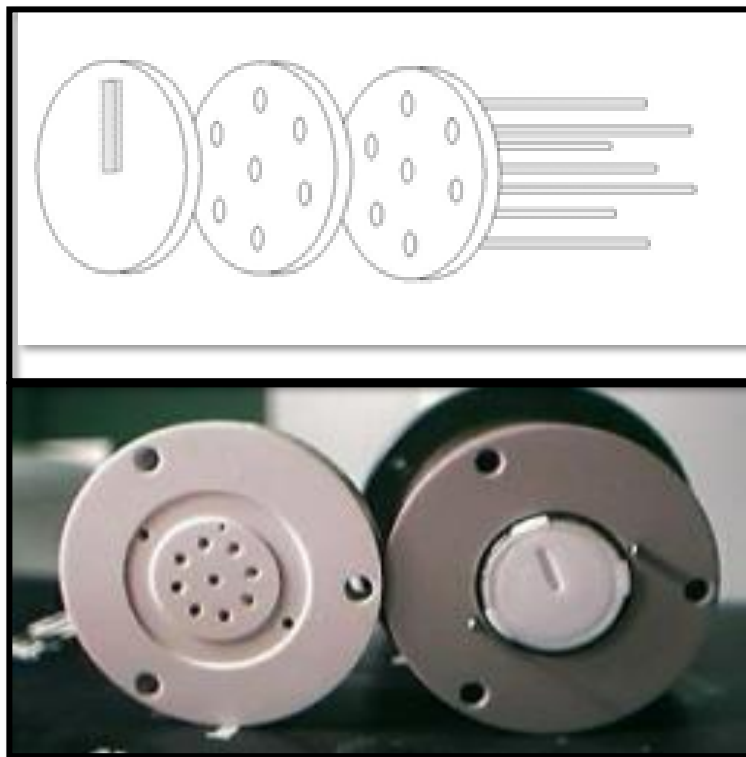


Figura 2.- Discos rotatorios de las válvulas de selección.

Los materiales poliméricos con que se construye la pieza monolítica pueden variar según los disolventes utilizados en los protocolos de análisis, siendo el más comúnmente usado el metacrilato (polimetilmetacrilato, PMMA). En la Figura 3 se muestra una pieza de LOV, fabricada con este material.

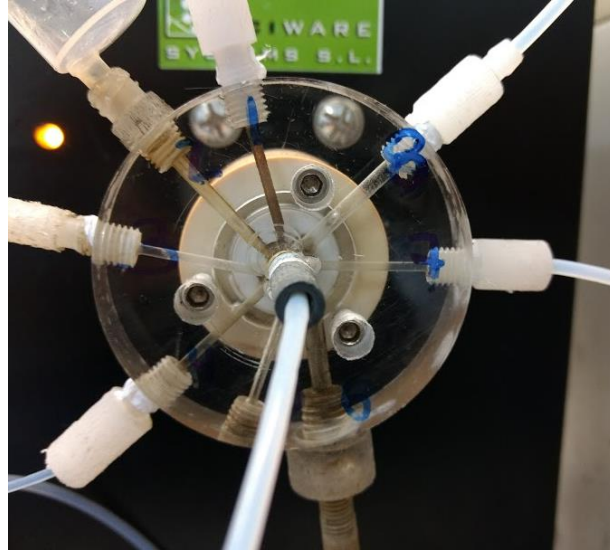


Figura 3.- Pieza de LOV fabricada con polimetilmetacrilato (PMMA).

Como ventajas caben destacar, no sólo la compactibilidad que alcanza el sistema y la automatización de todas las etapas del método analítico, sino también la integración de todos los componentes en una estructura rígida, lo que mejora la repetitividad del método (Cerdà et al., 2014).

1.6. Contador de Centelleo Líquido

El contador de centello líquido (LSC, por sus siglas en inglés) es un detector radiométrico que se puede utilizar para la detección de diferentes emisores, entre los cuales se encuentran las partículas beta. Se trata de una técnica que mide la actividad de los radionúclidos de acuerdo con el rango de fotones emitidos por una muestra líquida. Mediante estos destellos se detecta y se cuantifica la actividad (L'Annunziata, 1998).

Al mezclar una muestra radioactiva con el líquido de centelleo, las emisiones excitan al cóctel de centelleo, provocando una emisión lumínica, la cual será amplificada, para finalmente ser medida (Figura 4).

Introducción

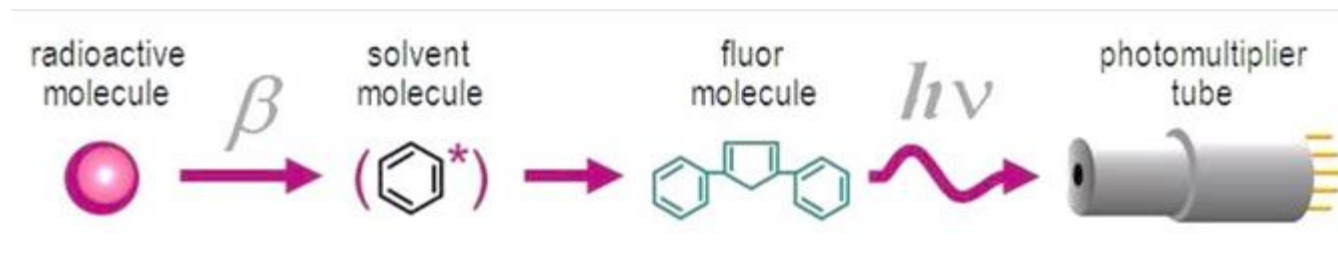


Figura 4.- Interacción entre una muestra radioactiva y el líquido de centelleo (Perkin Elmer, 2017)

El contador de centelleo líquido está compuesto por dos tubos fotomultiplicadores (PMT), un circuito de coincidencia, un circuito de adición y un convertidor de señal analógica a digital (Figura 5) (L'Annunziata, 1998).

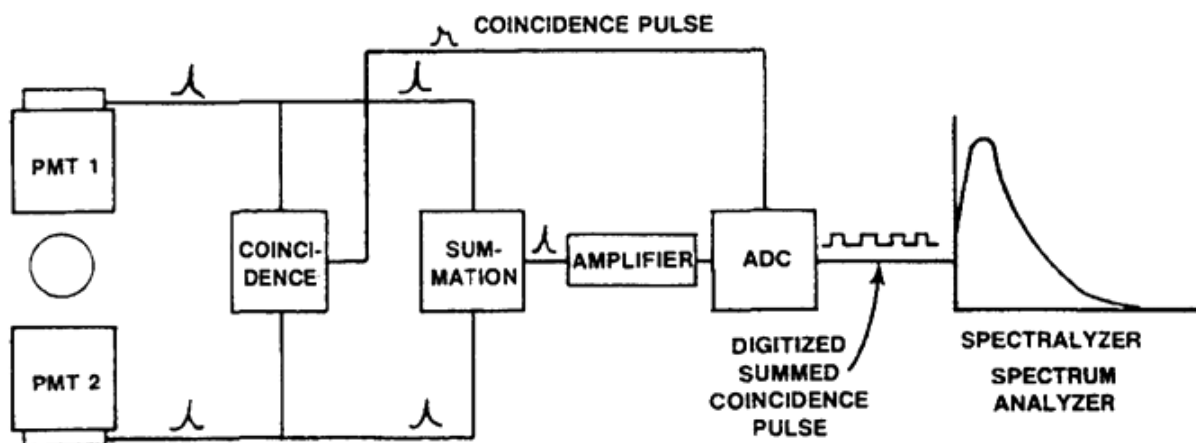


Figura 5.- Componentes de un contador de centelleo líquido (L'Annunziata, 1998).

Cuando la muestra es introducida al contador, éste comienza a contar las emisiones lumínicas. Si sólo uno de los PMT detecta un pulso, esa señal es rechazada, pues se considera que es una señal de fondo, pero si ambos lo detectan, se considera una señal emitida por la muestra. Esta diferenciación se lleva a cabo por el circuito de coincidencia y el rango de tiempo en el que se lleva a cabo (18 ns). Una vez pasado el circuito de coincidencia, las intensidades de ambas señales se suman en una señal analógica individual, la cual entra al convertidor analógico-digital. Esto es, convertir el pulso lumínico a un número que representa la intensidad.

1.6.1. Disminución de la eficiencia de contaje

La disminución en la eficiencia de contaje que puede presentarse en el contador de centelleo líquido puede ser debida a: quenching, quimioluminiscencia, muestras heterogéneas, ruido aleatorio y de fondo, entre otras (Perkin Elmer, 2015). De ellas, la quimioluminiscencia se evita dejando en oscuridad los viales (más de 1 hora) antes de comenzar el contaje. El fondo y el ruido aleatorio, propios de cada instrumento, se tendrán en cuenta en el blanco que se realiza antes de cada análisis de muestra, y luego será considerado en la cuantificación. La heterogeneidad de las muestras depende de su composición (acidez, salinidad) y de la proporción entre el líquido de centelleo y la muestra, que afectan a la homogeneidad de la disolución contenida en el vial. El efecto *quenching* se da cuando la disolución contenida dentro del vial de centelleo afecta la eficiencia de contaje, reduciendo la cantidad de fotones emitidos por la muestra, dando como resultado un número menor de cuentas.

1.7. Optimización de variables

La optimización de las variables que afectan al sistema se ha llevado a cabo mediante un enfoque multivariante, con el fin de obtener la máxima señal analítica y una elevada precisión, realizando un menor número de ensayos.

Para variar simultáneamente diferentes factores, se aplica el Diseño Estadístico de Experimentos, que proporciona un marco matemático para cambiar varios factores a la vez y así obtener un valor óptimo, pero con una menor cantidad de experimentos y por lo tanto con una mayor eficiencia (Ferré y Rius, 2002). Para llevarlo a cabo, se deben seleccionar aquellas variables independientes que solas o combinadas puedan afectar la respuesta del sistema que se está optimizando (Ferré y Rius, 2002; Almeida et al., 2008).

1.7.1. Ensayos de cribado o *screening*

Para realizar los ensayos de cribado o *screening*, se ha utilizado el diseño factorial 2^k , siendo k el número de factores a optimizar, siempre en dos niveles. Esto es, si se analizan tres variables, entonces el diseño factorial será 2^3 , dando como resultado ocho experimentos. El nivel de los factores está dado por un nivel alto (+) y un nivel mínimo (-), así como un nivel cero, el cual es considerado como punto central (Tabla 1). Para cada diseño factorial debe haber al menos tres o cuatro puntos centrales, para así identificar relaciones no lineales en los intervalos y además obtener los intervalos de confianza, es decir, para estimar el error (Lundstedt et al., 1998).

Tabla 1.- Diseño factorial 2^k , donde k=3, resultando así 8 experimentos y tres puntos centrales.

No. experimento	Variables		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9 Punto Central	0	0	0
10 Punto Central	0	0	0
11 Punto Central	0	0	0

A partir de las respuestas obtenidas se lleva cabo un análisis de la varianza (Tabla de ANOVA), y se obtiene el gráfico de Pareto, que permitirá establecer que variables o sus interacciones afectan significativamente al sistema que se está optimizando, y además indicará si se debe modificar el dominio experimental.

1.7.2. Método de superficie de respuesta

El método de superficie de respuesta (MSR) está conformado por un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas, que se basan en el ajuste de modelos empíricos con respecto a los datos obtenidos mediante la experimentación. Para explicar el sistema estudiado, se emplean funciones lineales y cuadráticas, y así poder modelar y desplazar las condiciones experimentales, hasta obtener un valor óptimo (Almeida et al., 2008).

Si previamente se ha realizado un ensayo de cribado o *screening*, ya se conocen las variables que afectan significativamente al sistema en desarrollo y sus rangos experimentales.

1.7.3. Matriz de Doehlert

La matriz de Doehlert solo puede ser aplicada al estudio de superficie de respuesta de dos variables y puede efectuarse para diferentes niveles. Su diseño consta de un punto central y de otros seis puntos experimentales, los cuales dan como resultado un hexágono regular, con un punto situado en el centro (Figura 6) (Ferreira et al., 2004; Almeida et al., 2008).

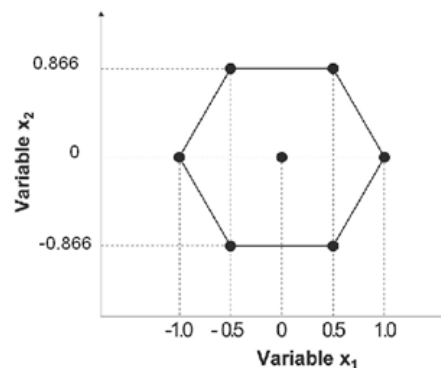


Figura 6.- Diseño esquemático para la matriz de Doehlert para dos variables.

Introducción

El número de experimentos (N) que se realiza está dado por la fórmula $N = k^2 + k + c_p$, donde k es el número de variables y c_p es el número de réplicas del punto central (Ferreira et al., 2004; Almeida et al., 2008). La Tabla 2 muestra un ejemplo de la matriz de Doehlert, para dos variables y un punto central.

Tabla 2.- Matriz de Doehlert para dos variables y un punto central con tres réplicas.

No. de experimento	Variables	
	X_1	X_2
1	-0.5	-0.866
2	-1	0
3	1	0
4	0.5	0.866
5	-0.5	0.866
6	0.5	-0.866
7 Punto central	0	0
8 Punto central	0	0
9 Punto central	0	0

El uso de este tipo de matrices permite estimar las variables mediante un modelo cuadrático, pudiendo detectar la pérdida de ajuste para el modelo. Además de efectuar pocos experimentos con una alta eficiencia, es una alternativa práctica y económica (Almeida et al., 2008).

CAPÍTULO 2 HIPÓTESIS

2.1. Hipótesis

Es posible desarrollar un método automático para la extracción y preconcentración del ^{131}I mediante la implementación de la técnica de análisis por inyección en flujo Lab-on-valve (LOV) con extracción selectiva usando la resina CL-Resin, lo que permitirá ofrecer ventajas sobre los métodos manuales clásicos de análisis.

Se espera que la automatización del protocolo de análisis de ^{131}I en muestras con matriz compleja (muestras de orina, saliva y residuos hospitalarios), tenga características tales como una alta sensibilidad, una frecuencia de análisis mucho mayor que la de los métodos manuales, una reducción del volumen de reactivos y muestras, lo que conllevará a una disminución de los residuos generados, minimización de la manipulación de muestras y reactivos, y una gran versatilidad, permitiendo el análisis de muestras con un amplio rango de actividades.

CAPÍTULO 3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar, validar e implementar un nuevo método automático basado en la técnica de análisis por inyección en flujo Lab-on-valve (LOV), para la separación y preconcentración de ^{131}I y su posterior detección por centelleo líquido, aplicado a muestras biológicas (saliva y orina) y a residuos hospitalarios.

3.2. Objetivos específicos

1. Construir un sistema automático basado en la técnica de análisis por inyección en flujo Lab-on-valve (LOV) para la separación y preconcentración de ^{131}I .
2. Optimizar el sistema a través de ensayos para encontrar los valores óptimos (en términos de sensibilidad y reproducibilidad) de cada una de las variables que influyen en el mismo.
3. Validar el método propuesto, determinando sus parámetros analíticos: actividad mínima detectable, precisión, frecuencia de análisis, exactitud mediante ensayos de adición/recuperación de un estándar certificado, entre otros.
4. Aplicar la metodología desarrollada al análisis de muestras biológicas y residuos hospitalarios.

CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA

4.1. Equipos e instrumentación utilizada

Para impulsar los líquidos en el sistema propuesto se utiliza un módulo multijeringa Multi-Burette 4S (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España). El módulo multijeringa está compuesto hasta por cuatro jeringas que se desplazan de manera vertical y conjunta (Figura 7). En el sistema propuesto se ha utilizado solo una jeringa de vidrio de 10 mL (Hamilton, Suiza), que se mueve a un caudal programable, ejerciendo la función de una bomba tipo pistón para la propulsión de los líquidos en el sistema. El émbolo de la jeringa está colocado sobre una barra, cuyo desplazamiento hasta 40000 pasos viene regido mediante un motor paso-a-paso.



Figura 7.- Módulo multijeringa CRISON de 40 000 pasos, constituido por un motor paso a paso y una jeringa de 10 mL.

En la parte superior de la jeringa se encuentra una válvula solenoide de tres vías. Cuando el solenoide se encuentra activado o abierto (posición ON), la jeringa está conectada al sistema (manifold). Si el solenoide se encuentra desactivado o cerrado (posición OFF), la jeringa está conectada al reservorio de reactivos o de muestra (Figura 8).

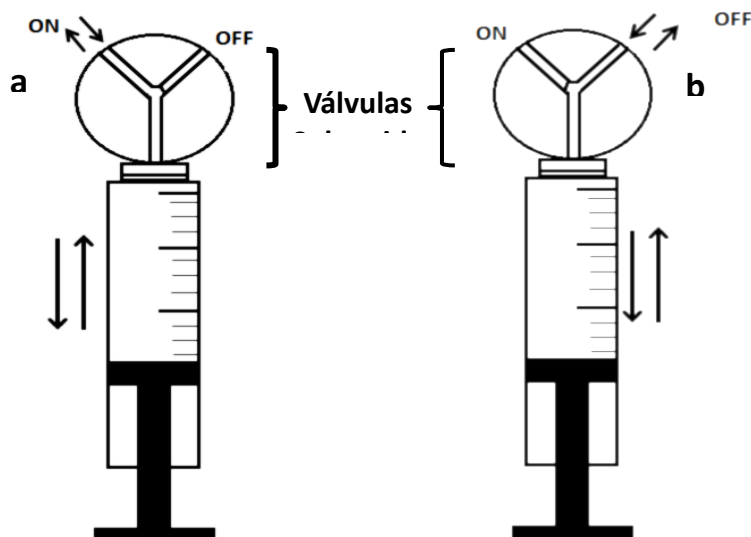


Figura 8.-Válvula solenoide ubicada en el cabezal de la jeringa. a) posición de la válvula en ON: la jeringa está conectada al sistema. b) posición de la válvula en OFF: la jeringa está conectada al reservorio.

En la parte trasera del módulo multijeringa se encuentra un panel con cuatro salidas, en las que se pueden conectar hasta cuatro válvulas solenoides adicionales. Cada válvula lleva un circuito electrónico adicional para evitar su sobrecalentamiento (Figura 9).

La válvula de selección (Sciware Systems, Bunyola, España) donde se monta la pieza de LOV cuenta con ocho puertos laterales y uno central. El puerto central se conecta por medio de un bucle de carga a la jeringa. Los puertos laterales se conectan a diferentes recipientes, ya sea de reactivos, de muestra, de residuos y/o a otros dispositivos. De modo que la pieza de LOV está constituida por ocho canales de 16 mm de longitud y 1.5 mm de diámetro interno, a excepción del canal que actúa como microcolumna que tiene 3.2 mm de diámetro interno.

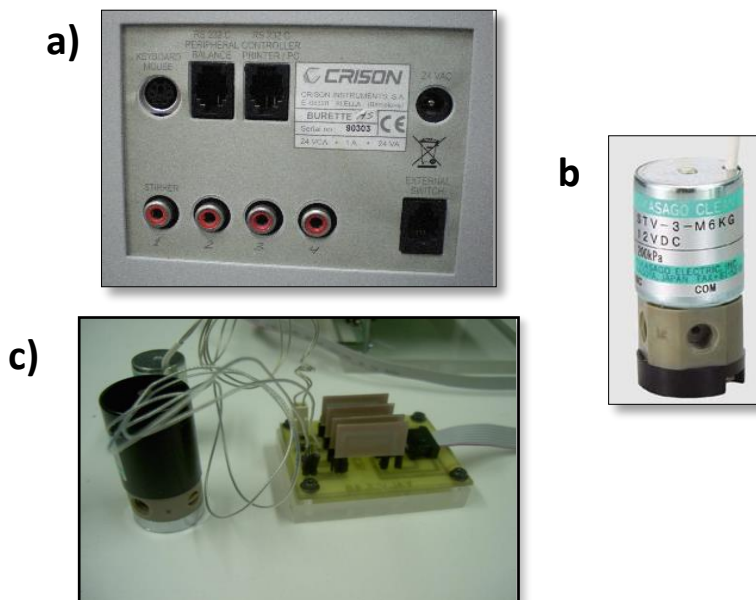


Figura 9.- Complementos y conexiones del módulo multijeringa CRISON: a) panel de cuatro salidas, ubicado en la parte posterior del módulo multijeringa. b) Válvulas solenoides externas. c) Circuito electrónico para evitar el sobrecalentamiento de las válvulas.

Así, el sistema LOV construido consiste en una pieza monolítica de PMMA (Sciware Systems) montada sobre un módulo de válvula de selección, un módulo multijeringa para la impulsión de los líquidos y un conjunto de tuberías o *manifold* (Figura 10).

Ambos módulos se conectan a un ordenador, y el control instrumental se realiza a través del software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems). En la Figura 11 se muestra un esquema del sistema propuesto. La tubería de teflón utilizada para la toma de los reactivos tiene un diámetro interno de 1.5 mm, mientras que el resto de tubería de teflón tiene un diámetro interno de 0.8 mm. El bucle de carga es de 6.2 m de longitud y 1.5 mm de diámetro interno, con un volumen aproximado de 11 mL.

El contador de centelleo líquido empleado es un Tricarb 2810 TR de Perkin Elmer, cuyas condiciones de recuento fueron de 1-600 canales, tiempo de recuento de 7200 s y contaje en modo normal. En la Figura 12 se presentan dos espectros beta de patrones de ^{131}I , de 0.5 y 5 Bq, utilizando Na_2S como medio y una proporción 1:3 (muestra: líquido de centelleo). También se ha utilizado un medidor de pH Lab-instruments modelo 80, para ajustar el pH de las disoluciones de trabajo.



Figura 10.- Sistema LOV montado sobre una válvula de selección de ocho puertos laterales, y módulo multijeringa para la propulsión de los líquidos.

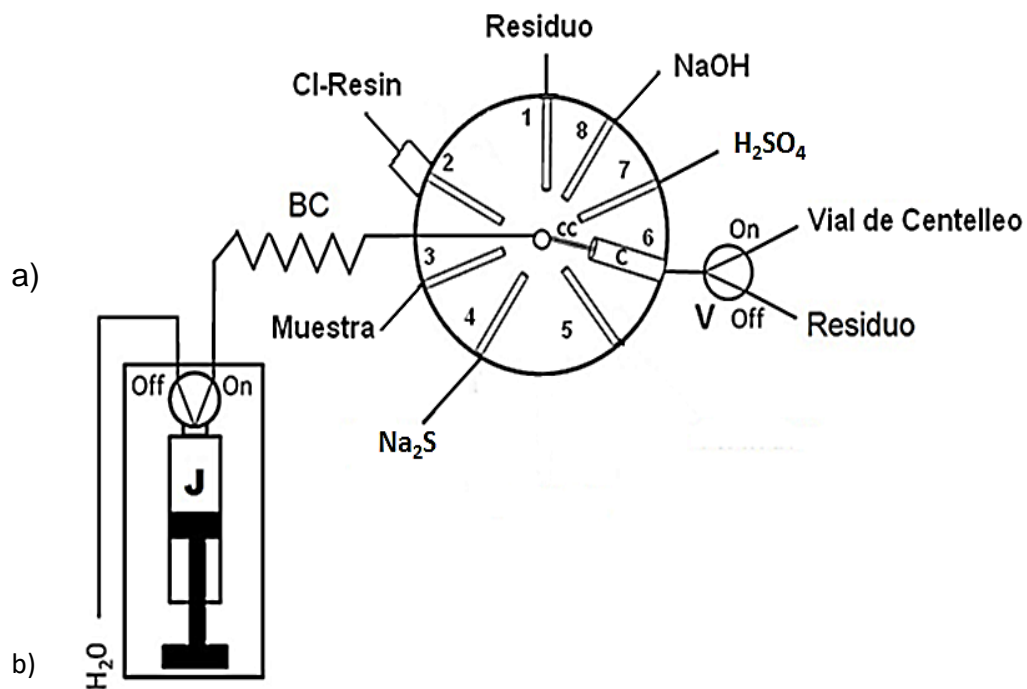


Figura 11.- Sistema Lab-On-Valve (LOV) para la extracción y preconcentración de ^{131}I : jeringa (J); bucle de carga (BC); conducto central (CC); microcolumna(C); válvula solenoide (V).

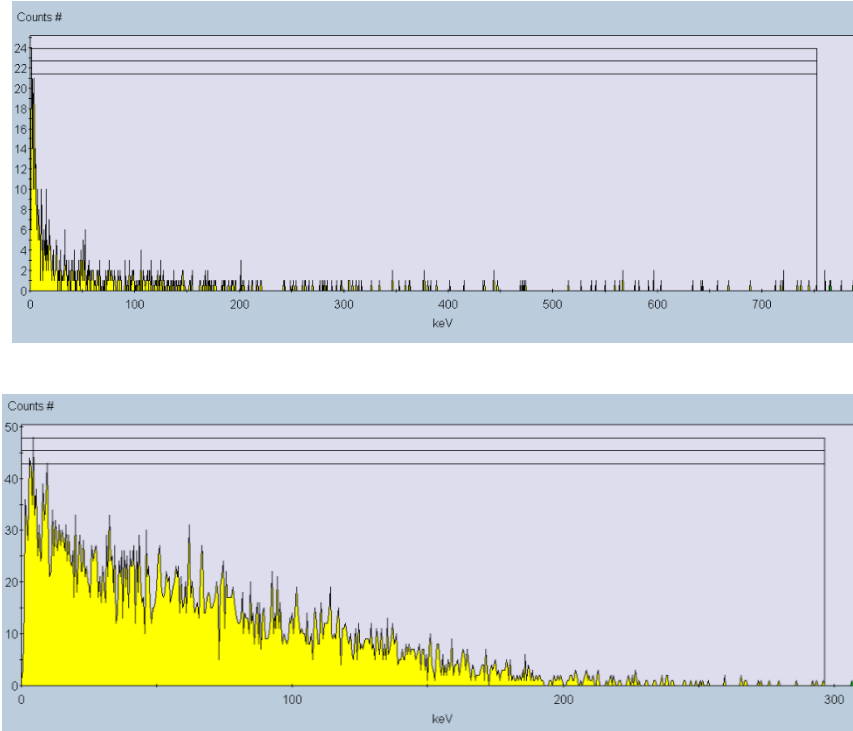


Figura 12.- Espectros beta de dos patrones de ^{131}I . a) 0.5 Bq y b) 5 Bq.

4.2. Software AutoAnalysis

Por medio del software AutoAnaylisis 5.0 se controla el sistema automático, lo que implica el control de los volúmenes y caudales, las posiciones de la válvula de la jeringa, de la válvula de selección y de la válvula solenoide adicional. AutoAnalysis está constituido por un programa principal y una variedad de bibliotecas de enlaces dinámicos (DLLs) que facilitan la conexión y manipulación de los instrumentos que conforman el sistema automático.

El programa permite utilizar la misma interfaz de usuario para cualquier tipo de instrumento utilizado. De tal manera que él o los instrumentos se encuentran conectados a un canal de comunicación que puede utilizarse al mismo tiempo por distintos equipos que compartan el mismo canal de comunicación.

4.2.1. Configuración del hardware

Dentro de la ventana desplegable “hardware” (Figura 13) se encuentran dos apartados generales: las configuraciones disponibles y la configuración actual, que a su vez se divide en tres ventanas: la del lado izquierdo (Figura 13 a) muestra los canales de comunicación y los instrumentos conectados a cada uno de ellos; en la parte superior derecha (Figura 13 b) se muestra el listado de los canales disponibles y en la parte inferior derecha (Figura 13 c), se ven los instrumentos disponibles. Para este sistema, los canales utilizados fueron: Serial CRISON Channel y VICI Channel, con su respectiva instrumentación: Automatic MutiSyringe Crison y Valve VICI Multi Position Module.

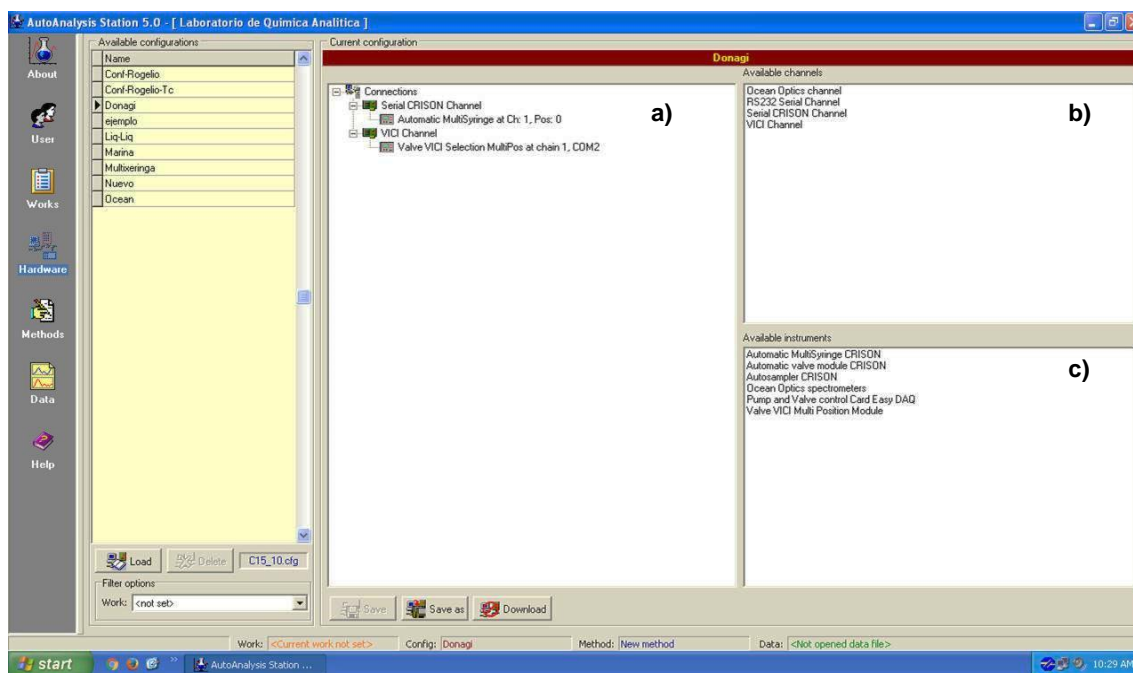


Figura 13.- Ventana de “hardware”. A la izquierda se muestran las configuraciones existentes y del lado derecho se encuentra el apartado de Configuración actual.

4.2.2. Desarrollo del método analítico

El desarrollo del método analítico dentro del programa AutoAnalysis se realiza en la ventana “Methods”. Cada fila (Figura 14) tiene una opción desplegable, en la cual se muestran los instrumentos conectados previamente y las diferentes funciones disponibles (wait, call procedure, loop, comment, etc.). La opción seleccionada dependerá del tipo de instrucción que se desee ejecutar.

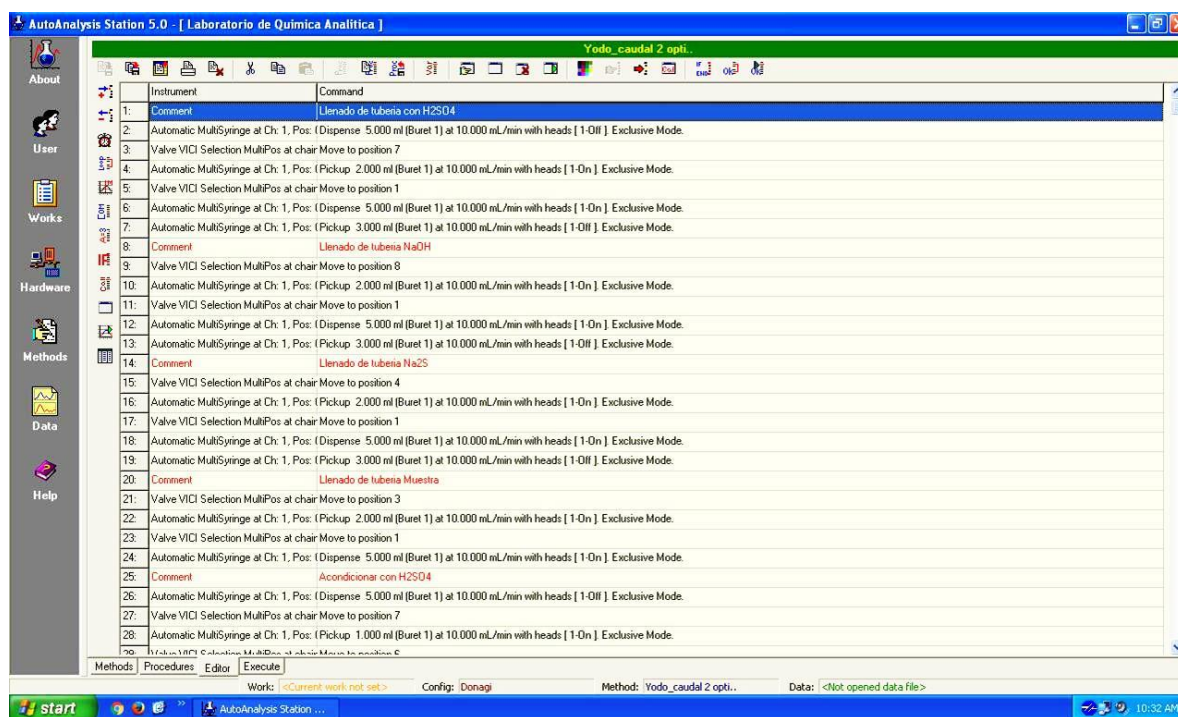


Figura 14.- Ventana del método seleccionado, dentro de la opción “Methods”

Una vez establecido el conjunto de instrucciones, se puede realizar una simulación del método, para así corroborar que éste se ejecutará sin errores. Para llevar a cabo esta simulación, se selecciona el botón “ok”, localizado en el lado derecho de la barra de herramientas que se encuentra en la parte superior de la ventana (último botón del lado derecho de la barra de herramientas).

4.2.3. Ejecución del método

Una vez creado el método, y habiendo hecho la simulación virtual del mismo, se procede a su ejecución. Al ejecutarse el método se abre una nueva ventana, la cual cuenta con una barra de herramientas y una barra de estado. La barra de herramientas muestra los parámetros del área del dibujo (zoom, escalas, etc.) y a través de esta barra, se puede controlar la ejecución. Por otro lado, la barra de estado muestra la información sobre el estado de ejecución de las funciones establecidas en el método.

4.3. Reactivos y materiales

Todas las disoluciones empleadas se prepararon con agua desionizada. Los patrones de trabajo de ^{131}I fueron preparados a partir de patrones certificados suministrados por el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) de España (ref. FRC-2017-00494, $2.024 \pm 0.030 \text{ kBq g}^{-1}$; ref. FRC-2017-00497/a, $0.4565 \pm 0.0091 \text{ kBq g}^{-1}$; ref. FRC-2017-00497/b, $2.378 \pm 0.048 \text{ kBq g}^{-1}$), en una disolución final de ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} .

El resto de los materiales utilizados se listan a continuación:

- Nitrato de plata (Scharlau, Barcelona, España)
- Ácido sulfúrico (96%, Panreac, Barcelona, España)
- Sulfuro de sodio nona-hidratado, (Acros organics, NJ, USA)
- Ácido nítrico (60%, Scharlau, Barcelona, España)
- Hidróxido de sodio (Scharlau, Barcelona, España)
- Ácido ascórbico (Scharlau, Barcelona, España)
- Cloruro de sodio (Scharlau, Barcelona, España)
- Resina CL, 50-100 μm de diámetro (Triskem Industries, Francia)
- Cóctel de Centelleo Líquido 'HISAFE' 3 (Perkin Elmer)
- Viales de centelleo de cristal bajo en ^{40}K , de 20 mL de capacidad (Perkin Elmer).
- Filtros de membrana de 0.45 μm de tamaño de poro.

4.3.1. Pre-acondicionamiento de la resina “Cl-resin”

Se pesaron 5 g de resina Cl y se mezclaron con 50 mL de H_2SO_4 1 mol L^{-1} , agitándose durante 2 h. Luego se agregaron 78 mg de AgNO_3 y se continuó agitando por 4 h.

4.3.2. Muestras

Se analizaron muestras biológicas de saliva y orina, y residuos hospitalarios (obtenidos de los tanques de almacenamiento de residuos del Servicio de Radiofarmacia del Área de Medicina Nuclear del Hospital Universitario de Son Espases, en Palma de Mallorca, España). Todas las muestras se prepararon con una concentración final de ácido sulfúrico 1 mol L^{-1} antes de ser analizadas. Las muestras de residuos hospitalarios se filtraron por filtros de 0.45 μm de tamaño de poro, antes de ser analizadas.

4.4. Procedimiento analítico

El procedimiento automático de análisis comienza con la carga de la resina en la microcolumna (puerto 6), desde el reservorio de la resina (jeringa de plástico, puerto 2). Para ello, se toman 2 mL de suspensión (resina en ácido sulfúrico 1 mol L^{-1}), a un caudal de 10 mL min^{-1} y se dispensa el mismo volumen a la microcolumna a un caudal de 0.8 mL min^{-1} . De esta manera la resina queda empaquetada en la microcolumna, en cuyo extremo inferior tiene una pequeña cantidad de lana de vidrio, con la finalidad de que el líquido fluya a través de la microcolumna, y que las perlas de la resina queden retenidas.

A continuación, se realiza el llenado de las tuberías con las disoluciones correspondientes. Para ello, se aspiran y dispensan 2 mL de cada reactivo y de la muestra por la tubería correspondiente (puertos 3, 4, 7 y 8) a un caudal de 5 mL min^{-1} , enviando el líquido contenido en ellas (agua) al residuo (puerto 1).

Posteriormente, se toma 1 mL de ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹ (puerto 7) a 5 mL min⁻¹, y se dispensa a 0.8 mL min⁻¹ sobre la microcolumna, para acondicionar la resina.

Luego, se carga el volumen de muestra que se desea analizar al bucle de carga (BC) y se dispensa sobre la microcolumna a un caudal de 0.8 mL min⁻¹. Una vez cargada la muestra, se procede a realizar diferentes enjuagues que mejoran la elución del ¹³¹I. El primer enjuague se realiza con 3 mL de agua desionizada que se dispensa sobre la microcolumna a un caudal de 0.8 mL min⁻¹. El segundo enjuague se lleva a cabo con 3 mL de hidróxido de sodio 1% (puerto 8) a 0.8 mL min⁻¹. De acuerdo con Zulauf et al., (2010), la realización de ambos enjuagues es para mejorar la etapa de elución del yoduro.

Posteriormente, se eluye el ¹³¹I retenido en la resina usando 4.5 mL de sulfuro de sodio 0.2 mol L⁻¹ (puerto 4) que pasa por la microcolumna a un caudal de 2 mL min⁻¹. El eluato se recoge en el vial de centello, accionando la válvula solenoide en posición "ON".

Cabe destacar que, independientemente del tipo y volumen de muestra analizada, dentro del vial de centelleo únicamente habrá el analito de interés (¹³¹I) y el eluyente utilizado (Na₂S), sin restos de la matriz de la muestra, puesto que dentro de la microcolumna se lleva a cabo el "clean-up" de la muestra (sólo se retiene el ¹³¹I), eliminando así cualquier interferencia de matriz sobre la detección.

Como último paso, se desecha la resina usada contenida en la microcolumna, se vuelve a empaquetar con resina nueva (dado que no se pudo reutilizarla), y se lleva a cabo el acondicionamiento de la misma. Así, el sistema queda preparado para la próxima extracción.

La Tabla 3 resume el procedimiento analítico que se utilizó para separar y pre-concentrar el ¹³¹I.

| Metodología

Tabla 3.- Procedimiento analítico del sistema automático para la extracción y preconcentración de ^{131}I .

Etapa	Instrucción	Posición LOV	Caudal (mL min ⁻¹)	V
Empaquetamiento de la resina en la microcolumna	Cargar 2 mL disolución de resina Cl	2	10	Off
	Dispensar 2 mL disolución de resina Cl	6	0.8	Off
Carga de tuberías	Cargar 2 mL H ₂ SO ₄ 1 mol L ⁻¹	7	10	Off
	Dispensar 3 mL	1	10	Off
	Cargar 2 mL NaOH 1%	8	10	Off
	Dispensar 3 mL	1	10	Off
	Cargar 2 mL Na ₂ S 0.2 mol L ⁻¹	4	10	Off
	Dispensar 3 mL	1	10	Off
	Cargar 2 mL muestra	3	10	Off
	Dispensar 3 mL	1	10	Off
Acondicionamiento de la resina	Cargar 1 mL H ₂ SO ₄ 1 mol L ⁻¹	7	10	Off
	Dispensar 1 mL H ₂ SO ₄ 1 mol L ⁻¹	6	0.8	Off
Carga de muestra	Cargar X mL de muestra*	3	10	Off
	Dispensar X mL de muestra	6	0.8	Off
Enjuague con agua desionizada	Cargar 3 mL agua desionizada		10	Off
	Dispensar 3 mL agua desionizada	6	0.8	Off
Enjuague con NaOH 1%	Cargar 3 mL NaOH 1%	8	10	Off
	Dispensar 3 mL NaOH 1%	6	0.8	Off
Elución de muestra	Cargar 4.5 mL Na ₂ S 0.2 mol L ⁻¹	4	10	Off
	Dispensar 4.5 mL Na ₂ S 0.2 mol L ⁻¹	6	2	On
Reemplazo de la resina Cl	Cargar 3 mL agua desionizada	6	10	Off
	Dispensar 3 mL agua desionizada	1	10	Off
Limpieza del bucle de carga	Cargar 10 mL agua desionizada		10	Off
	Dispensar 10 mL agua desionizada	1	10	Off

*dependiendo del volumen a pre-concentrar

4.5. Cálculos

4.5.1. Eficiencias

La eficiencia de detección (ED), expresada en porcentaje, para el contador de centelleo líquido empleado, se presenta en la Ecuación 1.

Ecuación 1

$$ED = \frac{cpm_m - cpm_b}{dpm} * 100$$

Donde:

cpm_m = cuentas por minuto de la muestra

cpm_b = cuentas por minuto del blanco

dpm = desintegraciones por minuto (actividad del patrón de referencia)

La eficiencia de extracción (EE), expresada en porcentaje, para la metodología propuesta, y utilizando la ED calculada bajo las mismas condiciones (igual proporción muestra¹: líquido de centelleo e igual composición de la muestra¹) se ha calculado según se muestra en la Ecuación 2.

Ecuación 2

$$EE = \frac{cpm_m - cpm_b}{dpm * ED} * 100$$

Donde:

cpm_m = cuentas por minuto de la muestra

cpm_b = cuentas por minuto del blanco

dpm = desintegraciones por minuto (actividad del patrón de referencia)

ED= Eficiencia de detección

¹ Nótese que, en este contexto, la “muestra” es realmente la fracción eluida (4.5 mL Na₂S 0.2 mol L⁻¹).

4.5.2. Actividad

Para el cálculo de la actividad (A_c), expresada en Bq, se tomaron en cuenta las señales registradas en el detector, en cuentas por minuto (cpm_m), para el blanco de reactivos (cpm_b), la ED y la EE (Ecuación 3).

Ecuación 3

$$A_c = \frac{cpm_m - cpm_b}{60 * ED * EE}$$

Donde:

cpm_m = cuentas por minuto de la muestra

cpm_b = cuentas por minuto del blanco de reactivos

ED= Eficiencia de detección

EE= Eficiencia de extracción

Debido al corto periodo de semidesintegración del ^{131}I , se aplicó una corrección para tener en cuenta el decaimiento producido entre el día de tratamiento (protocolo de extracción automático) de la muestra y el día de lectura (Ecuación 4).

Ecuación 4

$$A_c = A_{c_0} e^{-\lambda dT}$$

Donde:

A_{c_0} = Actividad inicial, expresada en Bq

λ = constante de desintegración, igual a $\frac{\ln 2}{T_{1/2}}$ (expresada en segundos)

dT = Diferencia de tiempo entre la extracción y la lectura de ^{131}I , expresada en segundos.

4.5.3. Actividad mínima detectable

La actividad mínima detectable (AMD) se trata de la cantidad mínima de actividad que es posible medir con el método analítico empleado y el detector utilizado. El cálculo de la AMD se llevó a cabo analizando diez réplicas del blanco, para posteriormente determinar la señal en el LSC. El cálculo de la AMD se lleva a cabo según la norma ISO 11929 (Ecuación 5).

Ecuación 5

$$AMD = (2.71 + 4.66\sqrt{x * t}) / (60 * ED * EE * t)$$

Donde:

x= contaje medio de blancos de reactivos, en cpm

t= tiempo de contaje, expresado en minutos

ED= Eficiencia de detección

EE= Eficiencia de extracción

CAPÍTULO 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Optimización

El proceso de optimización se ha llevado a cabo por medio de métodos multivariados. Como primer paso, se realizó un *screening* mediante diseño factorial, para evaluar de manera preliminar las variables independientes y sus interacciones, que afectan al sistema. Como variables independientes se tomaron en cuenta el volumen de elución, la concentración del eluyente y el caudal al que se dispensa el eluyente. Como variable dependiente o de respuesta, se consideró la señal analítica (cpm) registrada en el contador de centelleo líquido. El procesamiento de los datos se realizó con el software Statistica (Data Analysis Software System versión 8.0, StatSoft Inc. 2007, Tulsa, USA).

Se realizó un *screening* de las tres variables anteriormente mencionadas, utilizando un diseño factorial 2^3 más 3 puntos centrales (en total 11 experimentos). Se evaluó la curvatura y el error puro del modelo. Los rangos experimentales, la matriz del diseño, y las respuestas obtenidas se muestran en la Tabla 4.

Los resultados indican que, dentro de los rangos estudiados, las variables “volumen” y “concentración del eluyente”, afectan significativamente al método propuesto para un nivel de confianza del 95%. Por el contrario, el caudal no tuvo efectos estadísticamente significativos dentro del dominio experimental considerado. En la Tabla 5, se muestra la tabla ANOVA generada por el programa y en la Figura 15 se observa el diagrama de Pareto.

Tabla 4.- Matriz experimental para el diseño factorial (*screening*) 2^k , donde $k=3$, con tres puntos centrales. Para cada una de las variables independientes (concentración del eluyente, volumen y caudal), se muestran sus respectivos rangos.

Variables								
Concentración Na_2S (mol L^{-1})			Volumen (mL)			Caudal (mL m^{-1})		
Bajo (-)	Punto Central (0)	Alto (+)	Bajo (-)	Punto Central (0)	Alto (+)	Bajo (-)	Punto Central (0)	Alto (+)
0.05	0.2	0.35	1	3	5	0.8	1.4	2.0

Ensayo	Variables Independientes			Variable Dependiente
	Concentración	Volumen	Caudal	cpm
1	+	-	-	190
2	-	-	-	863
3	-	-	+	778
4	+	-	+	762
5	-	+	-	1061
6	-	+	+	902
7	+	+	-	891
8	+	+	+	863
9	0	0	0	920
10	0	0	0	838
11	0	0	0	898

Podemos observar tanto en la tabla de ANOVA (Tabla 5) y en el diagrama de Pareto (Figura 15), que existe un efecto significativo positivo dentro del rango a estudiar, para la variable volumen del eluyente, es decir que cuanto mayor sea el volumen, mejor será la señal, mientras que el rango analizado para la concentración del Na_2S presenta un efecto significativo negativo, por lo que a menor concentración se encuentre el eluyente, mejor será el contaje. También se puede ver que la variable “caudal” no es significativa para este sistema dentro del rango estudiado, por lo que se estableció un caudal de elución de 2 mL min^{-1} para los siguientes ensayos.

Resultados y Discusión

Tabla 5.- Tabla ANOVA de los resultados del screening de las tres variables consideradas. Los valores indicados con un asterisco y en negrita, son los valores que se consideran significativos ($p=0.05$).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatura	20352.7	1	20352.7	11.29871	0.078257
Concentración (1)	100800.5*	1*	100800.5*	55.95883*	0.017405*
Volumen (2)	157922.0*	1*	157922.0*	87.66950*	0.011215*
Caudal (3)	11250.0	1	11250.0	6.24537	0.129690
(1) * (2)	28800.0	1	28800.0	15.98816	0.057230
(1) * (3)	77618.0*	1*	77618.0*	43.08919*	0.022430*
(1) * (3)	56784.5*	1*	56784.5*	31.52359*	0.030288*
(1) * (2) * (3)	34584.5*	1*	34584.5*	19.19939*	0.048340*
Error puro	3602.7	2	1801.3		
SS Total	491714.9	10			

SS: Suma Cuadrática; df: Grados de Libertad; MS: Media Cuadrática; F: Pruebas de Fisher; p: Nivel de Probabilidad ($p=0.05$), $r^2=.99267$. Los valores indicados en negritas y con un asterisco son lo que se consideran significativos.

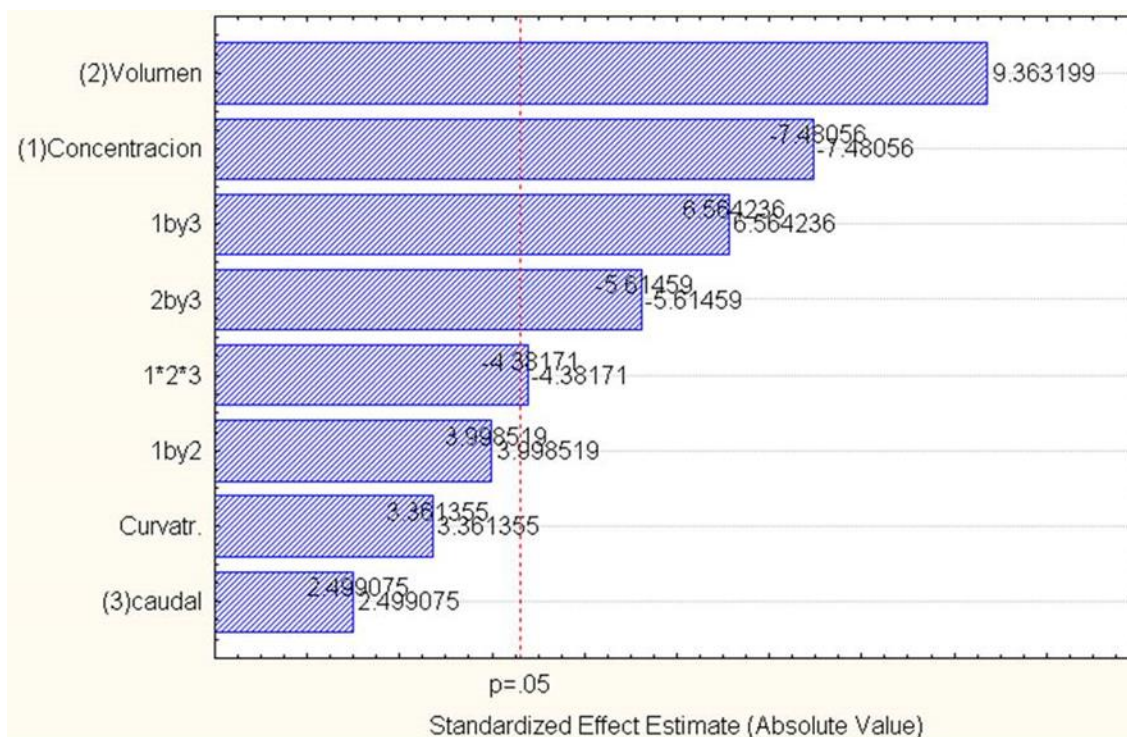


Figura 15.- Diagrama de Pareto para los resultados del screening (datos de la Tabla 4). Mostrando las variables "volumen" del eluyente y "concentración" del eluyente como variables significativas ($p=0.05$).

El modelo presenta un buen ajuste y un valor de r^2 cercano a 1 y aunque no muestra una curvatura significativa (indicando que no existe un máximo o un mínimo dentro del dominio experimental estudiado), se consideró conveniente realizar un ensayo de superficie de respuesta para encontrar los valores óptimos dentro del rango estudiado.

Por lo tanto, una vez seleccionadas las dos variables significativas, se procedió a realizar una superficie de respuesta empleando una matriz de Doehlert, para encontrar las condiciones óptimas para la extracción y preconcentración de ^{131}I .

En la Tabla 6 se presentan las variables, sus niveles y la matriz de Doehlert con sus respuestas. Se evaluaron los datos obtenidos mediante una tabla de ANOVA (Tabla 7), y un gráfico de superficie de respuesta (Figura 16).

Tabla 6.- Matriz experimental para el diseño de Doehlert, con tres puntos centrales. Para cada una de las variables significativas (concentración del eluyente y volumen), se muestran sus respectivos rangos de estudio.

Variables								
Volumen (mL)					Concentración Na_2S (mol L^{-1})			
Rango					Rango			
-1	-0.5	0	0.5	1	-0.866	0	0.866	
4.5	5	5.5	6	6.5	0.02	0.11	0.2	
Ensayo	Variables Independientes			Variable Dependiente				
	Volumen	Concentración	cpm					
1	-0.5	-0.866	505					
2	-1	0	806					
3	1	0	705					
4	0.5	0.866	736					
5	-0.5	0.866	821					
6	0.5	-0.866	640					
7	0	0	695					
8	0	0	721					
9	0	0	752					

Resultados y Discusión

Tabla 7.- Tabla de ANOVA de los resultados de la superficie de respuesta (datos de la Tabla 7) de las dos variables significativas. Los valores indicados con un asterisco y en negrita, son los valores que se consideran como significativos ($p=0.05$).

Factor	SS	df	MS	F	P
Volumen (L)	1925.33	1	1925.33	2.36431	0.263972
Volumen (Q)	1293.63	1	1293.63	1.58858	0.334661
Concentración (L)	42436.00*	1*	42436.00*	52.11134*	0.018654*
Concentración (Q)	6541.63	1	6541.63	8.03312	0.105204
Volumen (L) * Concentración (L)	12100.00	1	12100.00	14.85878	0.061188
Falta de ajuste	3800.17	1	3800.17	4.66660	0.163342
Error Puro	1628.67	2	814.33		
SS Total	71264.00	8			

(L): Lineal; (Q): Cuadrático; SS: Suma Cuadrática; df: Grados de Libertad; MS: Media Cuadrática; F: Pruebas de Fisher; p: Nivel de Probabilidad ($p=0.05$), $r^2=.92382$. Los valores indicados en negritas y con asterisco son lo que se consideran significativos.

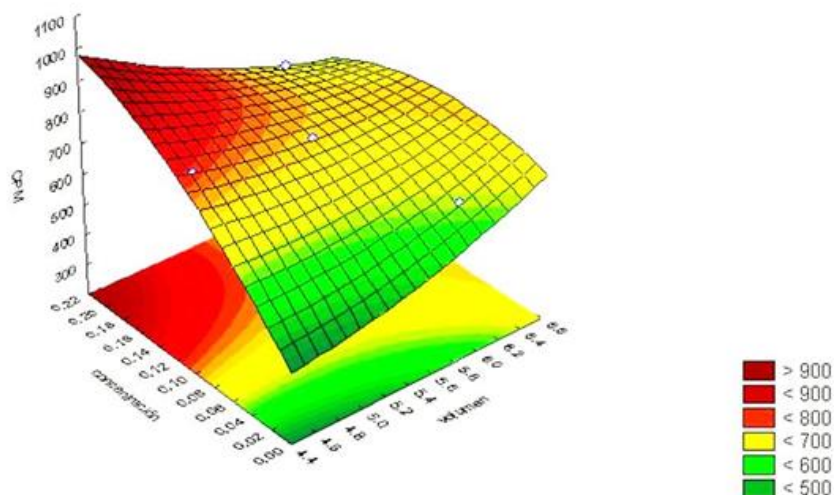


Figura 16.- Superficie de respuesta de la matriz Doehlert, en el que se representa el volumen de eluyente en mL, la concentración de eluyente en mol L⁻¹ y la respuesta del detector en cpm.

En la Figura 16 se puede observar que la región de máxima respuesta se encuentra en un extremo de la superficie, a un volumen de 4.5 mL y a una concentración del sulfuro de sodio igual a 0.2 mol L⁻¹. Si bien se podría haber realizado nuevamente el experimento moviendo los rangos de cada variable, se consideró oportuno establecer estos valores como óptimos, ya que la señal analítica es suficientemente elevada, y se alcanzan las ventajas de reducción de volumen y de concentración respecto al método

manual. Asimismo, debido a que el volumen del eluyente luego se mezcla con el cóctel de centelleo líquido en una proporción 1:3 (eluyente: cóctel) según las recomendaciones del fabricante, y considerando que los viales de centelleo tienen una capacidad de 20 mL, el volumen de elución nunca podría ser mayor que 5 mL.

Una vez obtenidos los valores óptimos de las variables, se llevó a cabo una prueba de robustez, para comprobar la tolerancia del método a pequeñas oscilaciones, ensayando en un rango del $\pm 5\%$ respecto de los valores óptimos.

Para realizar el ensayo de robustez, se llevó a cabo un diseño factorial 2^2 con 3 puntos centrales (en total 7 ensayos). Las variables y sus niveles, junto con la matriz elaborada para este diseño factorial se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8.- Variables, niveles y matriz experimental para el diseño factorial para la prueba de robustez. Para cada una de las variables significativas (concentración del eluyente y volumen).

Variables						
Volumen (mL)			Concentración Na ₂ S (mol L ⁻¹)			
Rango			Rango			
+5%	0%	-5%	+5%	0%	-5%	
4.72	4.5	4.27	0.21	0.2	0.19	
Ensayo	Variables Independientes		Variables Dependientes			
	Volumen	Concentración	cpm			
1	4.72	0.21	791			
2	4.27	0.19	770			
3	4.27	0.21	760			
4	4.72	0.19	744			
5	4.5	0.20	764			
6	4.5	0.20	760			
7	4.5	0.20	700			

Como puede verse en el diagrama de Pareto de la Figura 17, los datos obtenidos muestran un sistema robusto para una oscilación del 5% sobre el valor óptimo de las variables, trabajando con un 95% de confianza ($p=0.05$).

Resultados y Discusión

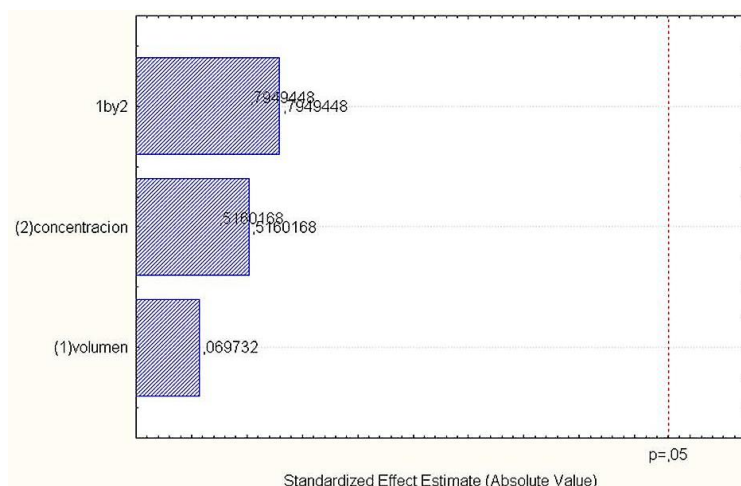


Figura 17.- Diagrama de Pareto para la prueba de robustez.

5.2. Parámetros analíticos

Una vez optimizado el sistema automático, se procedió a llevar a cabo la determinación de los parámetros analíticos que caracterizan al sistema propuesto.

5.2.1. Eficiencia de detección

La eficiencia de detección fue calculada preparando una actividad de 27.5 Bq de ^{131}I a partir del patrón certificado, en 4.5 mL del eluyente ($0.2 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}$) y en 4.5 mL de agua desionizada, con el objetivo de verificar si la concentración usada de eluyente causa *quenching* en la detección. En todos los casos, los viales se prepararon manualmente (sin pasar por el sistema propuesto), agregando 15 mL de cóctel de centelleo líquido (Tabla 9).

Tabla 9.- Eficiencia de detección de ^{131}I usando un contador de centelleo líquido, con un tiempo de conteo de 7200 s. Los resultados se expresan como la actividad media \pm la desviación estándar con $k=2$ ($n=2$).

Medio	^{131}I (Bq)	Actividad encontrada (Bq)	Eficiencia de detección (%)
H ₂ O	27.5	27.4 \pm 1.4	99
Na ₂ S	27.5	27.3 \pm 1.4	99

Como puede observarse, no se encontraron diferencias entre los resultados de ambos ensayos, calculándose una eficiencia de detección de 99%.

Al tratarse de un sistema automático de extracción, todas las muestras mantendrán una composición constante, es decir 4.5 mL de 0.2 mol L⁻¹ Na₂S (la matriz real de la muestra se elimina en el tratamiento), al igual que la proporción de mezcla con el líquido de centelleo, es decir 1:3 (muestra: líquido de centelleo), que sumado a una muy buena reproducibilidad (como se verá más adelante), permite trabajar con un quenching constante (ED = 99%), por lo que no fue necesario obtener las curvas de *quenching*.

5.2.2. Volumen de preconcentración y eficiencia de extracción

El sistema propuesto permite pre-concentrar diferentes volúmenes de muestra, dándole una gran versatilidad para analizar muestras que contengan ¹³¹I en un amplio rango de concentraciones de actividad. Para evaluar el volumen de preconcentración, se prepararon patrones con diferentes concentraciones de ¹³¹I a partir de un patrón certificado, con el fin de aumentar el volumen de muestra pre-concentrada manteniendo siempre la misma actividad final en el vial (5 Bq).

Como puede observarse en la Figura 18, la microcolumna del sistema soporta hasta 20 mL de muestra, presentando una eficiencia promedio de extracción de 85 ± 5%; considerando los diferentes volúmenes de preconcentración de muestra. Sin embargo, por encima de los 20 mL de volumen de preconcentración, el porcentaje de extracción disminuye abruptamente, cayendo hasta el 12 % de extracción para un volumen de 30 mL

Resultados y Discusión

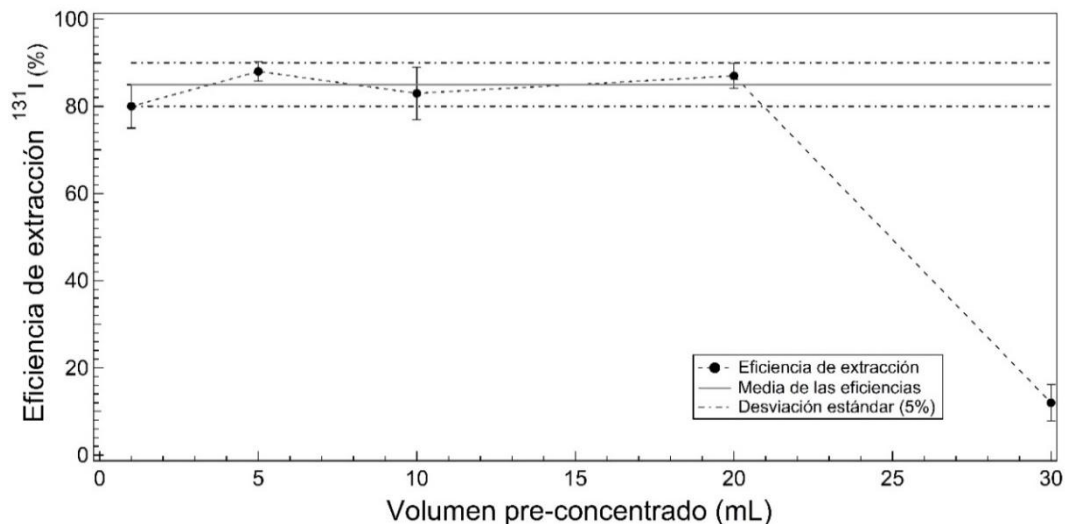


Figura 18.- Porcentaje de extracción con respecto a los diferentes volúmenes pre-concentrados en el sistema (1 -30 mL). Los resultados se expresan como la actividad promedio \pm desviación estándar (n=3).

5.2.3. Actividad Mínima Detectable

Para calcular la Actividad Mínima Detectable (AMD) se realizaron 10 ensayos de blancos de reactivos, dando como resultado una AMD de 0.05 Bq de ^{131}I , trabajando con un nivel de confianza del 95%. En la Tabla 10 se muestran los resultados de los ensayos que se realizaron para el cálculo del AMD.

Tabla 10.- Resultados de los ensayos de blanco de reactivos para el cálculo de la Actividad Mínima Detectable (AMD) alcanzada con el método propuesto. Tiempo de contaje: 7200 s.

Ensayo	cpm
1	25
2	26
3	25
4	24
5	24
6	25
7	24
8	24
9	24
10	23
Promedio	24.40 \pm 0.03
desviación	
estándar	
(k=2)	

5.2.4. Reproducibilidad

Para calcular la precisión del método propuesto, se analizó 1 mL de patrón de ^{131}I con una actividad de 4.6 Bq, preparado a partir de un patrón certificado. El ensayo se repitió 5 veces, calculando la reproducibilidad en términos de desviación estándar relativa (RSD) (Tabla 11).

Tabla 11.- Reproducibilidad del método propuesto, calculada para 1 mL de muestra. Los resultados se calcularon a partir de las actividades encontradas (n=5).

Ensayo	^{131}I (Bq mL ⁻¹)	Actividad encontrada (Bq mL ⁻¹)
1	4.6	3.8
2	4.6	3.5
3	4.6	3.9
4	4.6	3.4
5	4.6	3.9
Promedio ± desviación estándar		3.7 ± 0.3
RSD (%)		7.3

En la Tabla 12 se resumen los parámetros analíticos del método propuesto para la extracción y preconcentración automática de ^{131}I previa a la detección con contador de centelleo líquido.

Tabla 12.- Parámetros analíticos del sistema propuesto para la extracción y preconcentración de ^{131}I .

Parámetro Analítico	
Actividad Mínima Detectable (AMD)	0.05 Bq
Eficiencia de detección	99%
Eficiencia de extracción (para 1 a 20 mL)	85 ± 5%
Reproducibilidad (RSD, n=5)	7.3%
Volumen de preconcentración	Hasta 20 mL
Cantidad de resina	135 mg
Frecuencia de extracción*	1.4 – 4 h ⁻¹

* Dependiendo de la cantidad de volumen de muestra pre-concentrado

Resultados y Discusión

Cabe destacar que el método propuesto consume 0.135 g de resina-Cl por análisis, con lo que se ha conseguido una extraordinaria reducción en el consumo de resina, 74% menor respecto a un método manual reportado, que utiliza 10 g de resina por análisis. Además, se ha conseguido un menor consumo de Na₂S en términos de masa, ya que el método manual utiliza 5 mL de Na₂S 0.35 mol L⁻¹ (Zulauf et al., 2010).

El tiempo de extracción también ha sido reducido con respecto al método manual, ya que, dependiendo del volumen de muestra introducido al sistema, se llevan a cabo 1.4 – 4 inyecciones h⁻¹. Así, el método propuesto consigue analizar una muestra, considerando que se hacen 3 réplicas, entre 45 min y 2 h de extracción automática según el volumen pre-concentrado, más 2 h de lectura de cada vial, obteniendo los valores de actividad el mismo día del análisis.

5.3. Análisis de interferencias

Una vez establecidos los parámetros analíticos del método propuesto, se procedió a realizar un análisis de interferencias. Debido a que la resina empleada (resina Cl) puede extraer yoduros y cloruros, se llevó a cabo un ensayo considerando a los cloruros una de las potenciales interferencias del método propuesto que podría disminuir la retención de yoduros en la resina, teniendo en cuenta que los cloruros pueden estar presentes tanto en las muestras biológicas como en los residuos hospitalarios.

Las concentraciones de cloruros reportadas en muestras biológicas, varían en un orden de magnitud, siendo las más elevadas las encontradas en orina, 102 ± 47 mmol L⁻¹ de Cl⁻ (Kirschbaum et al., 1999), mientras que la concentración reportada de Cl⁻ en saliva fue de 11.8 ± 4.92 mmol L⁻¹ (Zhuofan et al., 2015).

Así, se llevaron a cabo ensayos de adición/recuperación sobre patrones con una actividad de 2.5 Bq de ¹³¹I, con concentraciones crecientes de cloruros (50 y 100 mmol L⁻¹). Cada ensayo se realizó por triplicado (Tabla 13).

Tabla 13.- Ensayo de evaluación de interferencias de cloruros. Los resultados se indican como la media de la actividad \pm la desviación estándar para $k=2$ ($n=3$)

Concentración de Cl^- (mmol L^{-1})	^{131}I Añadido (Bq)	Encontrado (Bq)	Recuperación (%)
0	2.3	2.3 ± 0.2	102
50	2.3	2.2 ± 0.2	94
100	2.3	2.1 ± 0.2	93

Se puede observar que los porcentajes de recuperación apenas se ven afectados por las concentraciones añadidas de cloruros a la muestra patrón, teniendo en cuenta que se consideraría una interferencia si la recuperación variara por encima de $\pm 10\%$. De modo que, el método propuesto puede aplicarse al análisis de muestras que contengan hasta unos 100 mmol L^{-1} de cloruros.

5.4. Prevención del proceso de oxidación

Debido a que la retención sobre la resina Cl , se lleva a cabo cuando el yodo está en forma de yoduro, se realizó un ensayo para estudiar la necesidad de agregar a la muestra un antioxidante, que prevenga la oxidación del ion yoduro.

Así, para evitar que el ^{131}I presente en las muestras como yoduro se oxide, se analizó un patrón de ^{131}I y una muestra de residuo hospitalario que contenía ^{131}I , con y sin adición de 0.1 mol L^{-1} de ácido ascórbico. Esta concentración ha sido utilizada previamente como antioxidante con resultados satisfactorios (Barril et al., 2012; Gong y Zhang, 2013; Kim et al., 2015) (Tabla 14).

Tabla 14.- Ensayos para estudiar la oxidación del yoduro a retenerse en la resina Cl . Los resultados se expresan como la media de la actividad \pm la desviación estándar para $k=2$ ($n=3$)

Concentración de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (mol L^{-1})	^{131}I Añadido (Bq)	Encontrado (Bq)	Recuperación (%)
0	2.3	2.05 ± 0.12	89
0.1	2.3	2.1 ± 0.3	91

Resultados y Discusión

Como puede observarse, los resultados indican que no es necesaria la adición de un antioxidante, puesto que las recuperaciones obtenidas son similares entre ellas, y ambas pueden considerarse satisfactorias.

5.5. Comparación con un método alternativo

Con el objetivo de validar el método propuesto, se contrastaron los resultados obtenidos analizando una misma muestra de residuo hospitalario mediante espectrometría gamma utilizando un detector de Germanio intrínseco Canberra – GR5023 – 7500 SL con blindaje de hierro. La muestra se analizó mediante espectrometría gamma sin tratamiento previo, y por el método propuesto de extracción de ^{131}I (Tabla 15).

Tabla 15.- Comparación del análisis de una muestra de residuo hospitalario, mediante espectrometría gamma y por el método propuesto. Los resultados se expresan como la media de la actividad \pm la desviación estándar para $k=2$ ($n=3$).

	Actividad (Bq mL^{-1})	Volumen analizado (mL)	Tiempo de conteo (s)
Espectrometría gamma	998 ± 52	50	86400
Método propuesto	890 ± 66	5	7200

Los resultados se compararon mediante la prueba t de Student (previa prueba sobre homocedasticidad de las varianzas), y no se encontraron diferencias significativas para un nivel de confianza del 95 % ($p=0.05$).

5.6. Análisis de muestras

Se analizaron muestras biológicas (saliva y orina), así como residuos hospitalarios provenientes del Servicio de Radiofarmacia del Hospital de Son Espases. Se realizaron también ensayos de adición/recuperación para cada muestra analizada, con diferentes niveles de actividad de ^{131}I .

El método propuesto resulta satisfactorio para el análisis de las muestras de saliva, orina y residuos hospitalarios, obteniéndose recuperaciones entre el 89% y el 111% (Tabla 16).

Tabla 16.- Análisis de muestras reales y ensayos de adición/recuperación en muestras biológicas y residuos hospitalarios. Los resultados se expresan como la actividad media \pm la desviación estándar para $k=2$ ($n=3$). AMD: actividad mínima detectable.

Muestra	^{131}I Añadido (Bq)	^{131}I Encontrado (Bq)	Recuperación (%)
Orina	0	<AMD	
	0.8	0.74 ± 0.03	92
	2.3	2.2 ± 0.4	97
	4.6	5.09 ± 0.02	111
Saliva	0	<AMD	
	0.9	1.0 ± 0.6	103
	2.3	2.1 ± 0.3	90
	4.6	4.5 ± 0.6	89
Residuo Hospitalario 1	0	0.21 ± 0.14	
	2.3	2.1 ± 0.3	89
Residuo Hospitalario 2	0	< AMD	
	0.72	0.73 ± 0.10	101
	1.3	1.22 ± 0.16	94
Residuo Hospitalario 3	0	8.7 ± 1.4	
	2.3	11.11 ± 0.15	101
Residuo Hospitalario 4	0	2.8 ± 0.8	
	1.8	4.74 ± 0.15	103

CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES

| Conclusiones

Se ha diseñado, construido, optimizado, validado y aplicado un método automático basado en la técnica de análisis por inyección en flujo Lab-On-Valve (LOV) para la extracción y preconcentración de ^{131}I en muestras biológicas, saliva y orina, y en residuos hospitalarios, con detección mediante contador de centelleo líquido.

El método propuesto presenta una eficiencia de extracción de $85 \pm 5\%$, y permite preconcentrar diferentes volúmenes de muestra, hasta 20 mL. Esto le aporta gran versatilidad, ya que puede analizar muestras que contengan ^{131}I en un amplio rango de actividades, manteniendo la eficiencia de extracción.

El método LOV propuesto presenta ventajas respecto a una metodología manual reportada, en términos de reducción de volumen y concentración del eluyente, reducción del consumo de resina (74% menos), aumento en la frecuencia de análisis y disminución de la manipulación de muestras y reactivos.

Otra ventaja de este método es que no tiene efecto matriz, dado que la columna únicamente retiene el analito de interés, por lo que el vial de centelleo que va al detector únicamente contiene el analito y el eluyente (independientemente de la matriz de la muestra analizada).

Los resultados del análisis de una muestra de residuo hospitalario, obtenidos mediante el método propuesto fueron comparados con los obtenidos mediante espectrometría gamma, sin mostrar diferencias significativas entre las medias de las actividades de ^{131}I , para un nivel de confianza del 95%.

El sistema propuesto mostró recuperaciones entre 89 – 111% en muestras biológicas (saliva y orina) y en residuos hospitalarios, indicando que resulta satisfactorio para el monitoreo de ^{131}I , ya que permite un análisis rápido y eficiente usando como detector un contador de centelleo líquido comúnmente usado en los hospitales, siendo así accesible para los mismos.

RECOMENDACIONES

Entre los radioisótopos de yodo, el ^{123}I y el ^{131}I son los más utilizados en Medicina Nuclear. Debido a que ambos podrían ser detectados mediante un contador de centelleo líquido, deberían establecerse las ventanas adecuadas para cada uno, que en el caso del ^{123}I estaría ubicada en energías bajas (por debajo de unos 30 keV), mientras que para el ^{131}I la ventana se ubica en energías más elevadas (por debajo de los 606 keV y con una máxima probabilidad de emisión alrededor de los 200 keV). En el caso de que uno o ambos radioyodos se encuentren presentes en actividades muy elevadas, podría presentarse un solapamiento parcial de los espectros en bajas energías, en cuyo caso deberían ser cuantificados mediante algoritmos de cálculo ya establecidos (por ej., métodos de inclusión o exclusión) (L'Annunziata, 1998).

Referencias bibliográficas

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2004). *Toxicological Profile for Iodine* (p. 508). E.E.U.U: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Almeida, M., Erthal, R., Padua, E., Silveira, L., & Amélia, L. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 78, 965–977.
- Atwood, D. A. (2010). *Radionuclides in the Environment*. USA: WILEY.
- Barril, C., Clark, A. ., & Scollary, G. . (2012). Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. *Analytica Chimia Acta*, 732, 186–193.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.011>
- Carolan, J. V., Hughes, C. E., & Hoffman, E. L. (2011). Dose assessment for marine biota and humans from discharge of ¹³¹I to the marine environment and uptake by algae in Sydney, Australia. *Journal of Environmental Radioactivity*, 102, 953–963.
- Cerdà, V., Ferrer, L., Avivar, J., & Cerdà, A. (2014). *Flow Analysis: A practical guide* (Primera Edición). Neatherlands: Elsevier.
- Consejo de Seguridad Nuclear. (2004). La protección radiológica en la industria, la agricultura, la docencia o la investigación. Consejo de Seguridad Nuclear. Retrieved from https://www.csn.es/images/stories/publicaciones/otras_publicaciones/serie_divulgativa/prindustria.pdf

- Dirección General de Medio Ambiente, Seguridad Nuclear y Protección Civil. (1998). Protección radiológica después de una terapia con yodo 131. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas.
- Ferreira, S., dos Santos, W., Quintella, C., Neto, B., & Bosque-Sendra, J. (2004). Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. *Talanta*, *63*, 1061–1067.
- Ferré, J., & Rius, F. . (2002). Introducción al diseño estadístico de experimentos. *Universitat Rovira y Virgili*, *274*, 648–653.
- Gong, T., & Zhang, X. (2013). Determination of iodide, iodate and organo-iodine in waters with new total organic iodine measurement approach. *Water Research*, *47*, 6660–6669. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.039>
- International Atomic Energy Agency. (2014). *Radiation Medicine and Technology: Diagnoses and Treatments* (p. 44). Austria: Interanational Atomic Energy Agency. Retrieved from <https://www.iaea.org/publications/magazines/bulletin/55-4>
- International Atomic Energy Agency (IAEA). (2013). Empleo de yodo-131 para cáncer de tiroides. Retrieved from https://rpop.iaea.org/RPOP/RPoP/Contentes/InformationFor/HealthProfessionals/3_NuclearMedicine/TherapeuticNuclearMedicine/Therapeutic_nuclear_medicine_-_specific_therapies.htm
- Kim, J. ., Kim, M. ., Yi, B., Oh, S., & Lee, J. (2015). Antioxidant properties of ascorbic acid in bulk oils at different relative humidity. *Food Chemistry*, *176*, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.079>
- Kirschbaum, B., Sica, D., & Anderson, P. (1999). Urine electrolytes and the urine anion and osmolar gaps. *J Lab Cli Med*, *133*(6), 597–604.

L'Annunziata, M. . (1998). *Handbook of Radioactivity Analysis* (Primera Edición). Neatherlands: Academic Press.

Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pettersen, J., & Bergman, R. (1998). Experimental desing and optimization. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 42, 3–40.

OSPAR. (2016). Annual report on discharge of radioactive substance from the non-nuclear sector 2014. OSPAR Commission. Retrieved from <https://www.ospar.org/documents?v=35380>

PerkinElmer. (2015). *Liquid Scintillation Analysis, Science and Tehnology*. EE.UU. Retrieved from www.perkinelmer.com

Perkin Elmer. (2017). Liquid scintillatio counting. Retrieved from https://www.perkinelmer.com.cn/Resources/TechnicalResources/ApplicationSupportKnowledgebase/radiometric/liquid_scint.xhtml#Liquidscintillationcounting-Liquidscintillationcountingtheory

Rose, P. S., Smith, J. P., Cochran, J. K., Aller, R. C., & Swanson, R. L. (2013). Behavior of medically-derived 131-I in the tidal Potonac River. *Science of the Total Environment*, 452, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.055>

Smith, J. P., Oktay, S. D., Kada, J., & Olsen, C. R. (2008). Iodine-131: a potential short-lived wastewater-specific particle tracer in an urbanized estuarine system. *Enviromental Science & Technology*, 42, 5435–5440.

Triskem. (2010). Cl-Resin. Retrieved from http://www.triskeminternational.com/iso_album/ft_resinecl_en_151210.pdf

- UNSCEAR. (2000). *Source and effect of ionizing radiation*. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Retrieved from www.unscear.org/docs/publications/2000/UNSCEAR_2000_Report_Vol.I.pdf
- Wang, J., & Hansen, E. H. (2003). Sequential lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 225–231. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00401-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00401-1)
- World Nuclear Association. (2016). Radioisotopes in Medicine. Retrieved from <http://www.world-nuclear.org/information-library/non-power-nuclear-applications/radioisotopes-research/radioisotopes-in-medicine.aspx>
- Zhuofan, C., Shunqing, F., Pow, E. H. ., Lam, O. L. ., Mai, S., & Wang, H. (2015). Organic anion composition of human whole saliva as determined by ion chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 438, 231–235. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.027>
- Zulauf, A., Happel, S., Mokili, M. ., Bombard, A., & Jungclas, H. (2010). Characterization of an extraction chromatographic resin for the separation and determination of ³⁶Cl and ¹²⁹I. *J Radioanal Nucl Chem*, 286, 539–546. <https://doi.org/10.1007/s10967-010-0772-5>