

IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGANICOS PERSISTENTES EN MUESTRAS DE PLASMA HUMANO

Fernández Hernández Ricardo Omar (1), Rocha Amador Diana Olivia (2)

1 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo | Dirección de correo electrónico: ricardooth@gmail.com

2 Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato
| Dirección de correo electrónico: olivia2000_mx@hotmail.com

Abstract

Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), en su mayoría son productos químicos sintéticos, son altamente tóxicos, persistentes, viajan grandes distancias y se acumulan en los tejidos grasos. El objetivo del presente trabajo es llevar a cabo la implementación de un método analítico que permita evaluar el nivel de exposición a este tipo de contaminantes. El método implementado consiste en una extracción, purificación y posteriormente el análisis de las muestras por CG-MS. Se observa que todos los sujetos analizados se han encontrado expuestos a A-HCH, G-HCH, HC, 2,4 DDD, aldrina y 2,4 DDT y a excepción del sujeto C-002 todos presentaron también exposición al 4,4 DDD, por otro lado, los sujetos C-004 y C-005 fueron los únicos en presentar valores detectables de 4,4 DDT. Los coeficientes de correlación presentan valores que van desde 0.9834 hasta 0.9998. Tomando en cuenta los parámetros analíticos y los datos obtenidos de las concentraciones de COPs en plasma, podemos concluir que el método implementado en este trabajo puede ser usado para la evaluación de la exposición a este tipo de compuestos en población humana.

Palabras Clave

Contaminantes; COPs; Bioacumulables; Estocolmo.

INTRODUCCIÓN

Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), en su mayoría son productos químicos sintéticos, de los cuales, algunos son usados como pesticidas, otros son productos industriales o subproductos no intencionados resultantes de la combustión o de procesos industriales. [1]

Por definición todos estos compuestos tienen las siguientes propiedades: 1) son altamente tóxicos, 2) son persistentes, es decir que permanecen varios años o décadas sin alterarse antes de degradarse, 3) viajan grandes distancias a través de aire y agua y 4) se acumulan en los tejidos grasos de los organismos vivos incluyendo al ser humano, además, una vez dentro de la cadena trófica tienden a biomagnificarse. [2]

Los COPs pueden afectar la salud humana y el ambiente. Los efectos de los COPs pueden ser muy sutiles y desencadenarse a bajas concentraciones, presentándose después de varios años de la exposición y llegando en ocasiones a presentarse en las subsecuentes generaciones. Esto hace que su diagnóstico sea difícil de realizar y dificulta la evaluación de los problemas potenciales de salud pública. Entre los potenciales efectos nocivos de estos contaminantes para la salud se encuentran: cáncer, alteraciones en el comportamiento neuronal, donde se incluye desorden en el aprendizaje, bajo desempeño mental y déficit de atención, alteraciones en el sistema inmune, deficiencias reproductivas, reducción del período de lactancia en madres en edad de lactancia y diabetes, entre otros. [3][4][5]

Como respuesta a la problemática ambiental que representan los COPs en el mundo, en el 2001 fue creado el Convenio de Estocolmo que tiene por objeto proteger la salud humana y el ambiente frente a las Sustancias Persistentes, Tóxicas y Bioacumulable. [6]

México ratificó el convenio en el 2003 comprometiéndose a adoptar una serie de medidas de control sobre la producción,

importación, disposición, uso y eliminación de este tipo de compuestos. [6]

Los compuestos que se encuentran enlistados en el Convenio de Estocolmo son los siguientes: aldrina, alfa y beta hexaclorociclohexano (HCH), beta-clordano, clordecona, dieldrina, endrina, heptacloro (HC), hexabromobifenilo (HBB), éter de hexabromodifenilo (EHXB) y éter de heptabromodifenilo (EHPB), hexaclorobenceno (HCB), lindano, mírex, pentaclorobenceno (PB), bifenilos policlorados (PCB), éter de tetrabromodifenilo (ETBD) y éter de pentabromodifenilo (EPBD), toxafeno, DDT, ácido perfluorooctano sulfónico (APS), dibenzoparadióxinas policloradas y dibenzofuranos policlorados (PCDD/PCDF).[7]

El objetivo del presente trabajo es llevar a cabo la implementación de un método analítico que permita evaluar el nivel de exposición a este tipo de contaminantes en población humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Hexano, Alcohol Isopropílico y Éter Etílico grado HPLC. Acetona, Ácido Sulfúrico concentrado. Acido Fórmico al 85 % y Cloruro de Potasio al 1%. Para la preparación de la curva de calibración se usó el estándar Chlorinated Pesticides Mix (high) 25-260 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en isocianato, marca SUPELCO®. Como estándar interno se usó el 2,2',3,4,5,5'-Hexa CB (PCB-141) (13C12,99%) 40 \pm 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en nonano, de Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Equipos y materiales

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases Perkin Elmer Claurus 500 acoplado a un espectrómetro de masas Perkin Elmer Claurus 560, la columna utilizada es una Perkin Elmer Elite 5-ms de 30 m de longitud con un diámetro interno de 0.32 mm y un espesor de película de 0.25 μm . Cartuchos

para extracción en fase sólida (EFS) Supelclean™ LC-Florisil®, marca SUPELCO.

Obtención de la muestra

Se tomaron muestras sanguíneas, de 6 individuos, recolectadas por punción venosa en tubos de 6 mL con heparina, los individuos C-001, C-002, C-003 y C-004 pertenecen a un grupo control, mientras que C-005 y C-006 son trabajadores que se encuentran frecuentemente expuestos a este tipo de contaminantes.

Pretratamiento

Una vez en el laboratorio las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min para separar el plasma. El plasma fue recuperado en tubos de vidrio con tapa y se le agregaron 25 ppb de estándar interno, los tubos fueron mezclados con ayuda de un Vortex y se dejaron reposar durante dos horas a temperatura ambiente para finalmente ser almacenados a -20 °C durante 24 horas antes de la extracción.

Extracción

Una vez pasadas las 24 horas, el suero se descongeló a temperatura ambiente y se le añadieron 0.5 mL de ácido fórmico y 3 mL de alcohol isopropílico, se agitó el tubo en Vortex durante 3 minutos, se añadieron 3 mL de una mezcla de éter etílico: hexano 1:1, se mezclaron durante 3 min por inversión y se centrifugaron a 3000 rpm por 3 min. Se recuperó la fase superior y se le agregaron 2 mL de KCl al 1% mezclando por inversión durante 3 min, una vez más se centrifugaron los tubos y se recuperó la fase superior. El proceso completo se repitió dos veces más y las tres extracciones se recuperaron en un tubo cónico de vidrio, previamente pesado, para después llevar a sequedad bajo una suave corriente de nitrógeno a 38 °C y pesar nuevamente los tubos. El residuo se disolvió en 3 mL de hexano y se pasó a un tubo de vidrio con tapa para posteriormente añadir 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, se mezclaron por inversión durante 2

min y después se centrifugaron a 3000 rpm por 3 min, se recolectó la fase superior y a la fase inferior se le realizaron dos extracciones más agregando 3 mL de hexano y siguiendo el procedimiento anterior. Las tres extracciones se recolectaron en un tubo cónico de vidrio y se evaporaron a 38 °C bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen de 2 mL.

Con la finalidad de eliminar impurezas se realizó una EFS usando cartuchos Supelclean™ LC-Florisil®, previamente acondicionados. Para el acondicionamiento de los cartuchos se adicionaron 3 mL de acetona y después de tres minutos se dejaron bajar por gravedad cuidando que no se secase, después se añadieron 3 mL de hexano y después de tres minutos se dejaron bajar por gravedad evitando que se secase. Una vez acondicionado el cartucho se le agregaron los 2 mL del concentrado y 3 mL de hexano, se dejó bajar por gravedad y se recuperó la elución en un tubo cónico de vidrio. La elución se concentró a 38 °C bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen de 0.2 mL para después ser llevado a viales. El método de extracción está basado en el descrito por Trejo Acevedo et. A. en 2009, con algunas modificaciones. [8]

En la Tabla 1 se describe el método cromatográfico usado para el análisis de las muestras.

Tabla 1: Condiciones del método cromatográfico

Etapa	Aumento de temperatura °C·min ⁻¹	Temperatura final °C	Tiempo min
Inicio	---	100	2
Rampa 1	20	200	0
Rampa 2	7	270	0
Rampa 3	18	310	6

--- La temperatura se mantiene constante

Como gas portador se utilizó helio con un flujo de $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, la temperatura de inyección fue de $275 \text{ }^\circ\text{C}$, la de la línea de transferencia de $300 \text{ }^\circ\text{C}$ y la temperatura del detector de $225 \text{ }^\circ\text{C}$. El volumen de inyección fue de $1 \mu\text{L}$ y el Split de $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Análisis de las muestras

Los compuestos analizados fueron: heptacloro epóxido, alfa, beta y gamma hexaclorociclohexano, heptacloro, 2,4 DDT, 4,4 DDT, 2,4 DDD, 4,4 DDD, 4,4 DDE, aldrina, dieldrina y endrina y el método usado para el análisis de las muestras es una modificación de Ruiz-Suárez et. al. 2014. Los datos obtenidos fueron corregidos usando el estándar interno y la cantidad de lípidos en cada muestra [9]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se muestran los tiempos de retención (TR), así como los valores de la pendiente (m) y la ordenada al origen (OR) de las curvas de calibración para los compuestos analizados, con respecto a los coeficientes de correlación se observan valores que van desde 0.9834 hasta 0.9998, indicando una muy buena correlación entre los datos.

En la Tabla 3 se muestran los datos de las concentraciones de los diferentes compuestos analizados para los seis participantes, se observa que todos los sujetos se han encontrado expuestos a α -HCH, γ -HCH, HC, 2,4 DDD, aldrina y 2,4 DDT y a excepción del sujeto C-004 todos presentaron también exposición al 4,4 DDD, por otro lado, los sujetos C-005 y C-006 fueron los únicos en presentar valores detectables de 4,4 DDT. Se puede observar que los valores detectados para los sujetos C-005 y C-006 son superiores a los encontrados a los sujetos del grupo control, esto debido a la constante exposición a este tipo de contaminantes.

Tabla 2: Parámetros analíticos de curvas de calibración

COPs	TR min	m	OR	R ²
HCE	9.77	2.6611	-0.53005	0.9998
β -HCH	7.416	0.304803	-1.39495	0.9834
α -HCH	7.115	1.65668	-1.15539	0.9930
γ -HCH	7.539	1.13127	-1.75276	0.9929
HC	8.531	0.934706	-1.23826	0.9947
2,4 DDD	11.719	3.8718	-5.5717	0.9996
4,4 DDE	10.865	9.32151	4.6196	0.9995
Aldrina	9.122	4.93371	-0.900409	0.9954
Dieldrina	10.961	5.44385	2.50612	0.9968
Endrina	11.365	0.245432	-0.0906306	0.9922
4,4 DDD	12.537	3.05302	-11.0112	0.9922
2,4 DDT	11.776	8.27936	-10.2023	0.9987
4,4 DDT	10.998	9.50813	-14.8241	0.9985

Tabla 3: Concentración de COPs en plasma humano

COPs	C-001	C-002	C-003	C-004	C-005	C-006
HCE	ND	ND	ND	ND	ND	ND
β -HCH	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α -HCH	82	17	61	109	303	171
γ -HCH	169	35	164	291	773	430
HC	580	128	300	643	1703	725
2,4 DDD	111	26	122	209	486	293
4,4 DDE	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Aldrina	55	10	40	81	248	126
Dieldrina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Endrina	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4,4 DDD	286	63	301	ND	1242	739
2,4 DDT	95	22	104	178	414	249
4,4 DDT	ND	ND	ND	ND	532	317

Las concentraciones están reportadas en ng g^{-1} de lípidos
ND No detectado.

La presencia de COPs en los sujetos control puede deberse a la exposición a remanentes que aún se encuentren en el ambiente, entre los sujetos control se observa que el sujeto C-002 es el que presenta una mayor concentración y el único que no presenta niveles detectables de 4,4 DDD, la diferencia podría deberse a el lugar de residencia de los sujetos, ya que este sujeto radica en el estado de Durango mientras que los otros tres lo hacen en el estado de Guanajuato. Actualmente existen en México artículos que evalúan la exposición de varias poblaciones a COPs, sin embargo la última observación sobre el lugar de residencia de los sujetos de estudio deja de manifiesto la importancia de realizar estudios complementarios que destaquen zonas de riesgo de exposición a estos contaminantes en nuestro país.

CONCLUSIONES

Tomando en cuenta los parámetros analíticos y los datos obtenidos de las concentraciones de COPs en plasma, podemos concluir que el método implementado en este trabajo puede ser usado para la evaluación de la exposición a este tipo de compuestos en población humana.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos a los recursos otorgados por la Convocatoria Institucional de Investigación Científica 2015 de la DAIP y a la DICIVA campus Irapuato-Salamanca por haber autorizado el uso de sus instalaciones para el desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS

[1] World Health Organization. (2008). PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS (POPs). 13/07/2015, Recuperado de <http://www.who.int/ceh/capacity/POPs.pdf>

[2] Yarto Mario . (2002). Los efectos de la contaminación: el caso de las sustancias tóxicas persistentes. 13/07/2015, Recuperado de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/467/yarto.html>

[3] Díaz-Barriga. Fernando (2005). METALES Y CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES EN NIÑOS Y MUESTRAS AMBIENTALES DE 10 SITIOS CONTAMINADOS DE MÉXICO.

13/07/2015, Recuperado de http://www.inecc.gob.mx/descargas/sqre/inf_final_ninios.pdf

[4] United States Environmental Protection Agency. (2015). Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, A Global Response. 13/07/2015, Recuperado de <http://www2.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response>

[5] INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO. (2013). Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs). 13/07/2015, Recuperado de <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/765-sqre-cop>

[6] SEMARNAT. (2013). Convenio de Estocolmo. 13/07/2015, Recuperado de <http://www.semarnat.gob.mx/temas/agenda-internacional/convenio-de-Estocolmo>

[7] Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) (2009). 13/07/2015, Recuperado de http://www.semarnat.gob.mx/archivosanteriores/temas/internacional/Documents/SAT/convenio_estocolmo.pdf

[8] Ruiz-Suárez, Castro-Chan, Rivero-Pérez, Trejo-Acevedo, Guillén-Navarro, Geissen, Bello-Mendoza. (2014). Levels of organochlorine pesticides in blood plasma from residents of malaria-endemic communities in Chiapas, Mexico. 13/07/2015, Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25310541>

[9] Trejo-Acevedo A., Díaz-Barriga F., Carrizales L., Domínguez G., Costilla R., Ize-Lema I., Yarto-Ramírez M., Gavilán-García A., Mejía-Saavedra J., Pérez-Maldonado I.N. (2009) Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican children. *Chemosphere*.74:974–980.