

DETERMINACIÓN DE NIVELES POLÍNICOS EN MUESTRAS DE PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS POR TÉCNICAS COLORIMÉTRICAS

Águeda M. Sánchez Martín, Pablo A. Castro Guijarro, Sabina Rossini Oliva, Antonio J. Fernández Espinosa

Departamento de Química Analítica, Universidad de Sevilla

Introducción

La contaminación del medio ambiente se refiere generalmente a la alteración de la composición normal, ya sea con nuevas sustancias o mediante el aumento de las concentraciones habituales de las sustancias ya presentes en él, a niveles suficientes para causar efectos nocivos. La contaminación del aire por sustancias químicas está desde el último cuarto del siglo XX a la orden del día en riesgo para la salud, así como en los últimos 2 años en las grandes ciudades españolas como Madrid o Barcelona. La polinosis, o alergia al polen, es la primera causa de rinitis alérgica y segunda de asma extrínseca, y el polen se puede considerar como un tipo de contaminante atmosférico vial o biológico. Existe sinergia entre los contaminantes atmosféricos y los granos de polen, sobre todo las partículas que rompen la cubierta exterior de los mismos liberando proteínas que provocan mayor sensibilidad alérgica. La pared del grano de polen es una cubierta protectora formada por una capa interna y otra externa, esta última constituida por proteínas y otros componentes. Estas proteínas desempeñan el papel de sustancia extraña en el cuerpo humano al entrar en contacto con las mucosas, ya que se liberan muy rápidamente y se propagan por el medio acuoso.

La metodología convencional (Figura 1) para capturar y analizar el polen atmosférico consiste en la trampa de esporas Hirst [1], que fue diseñada específicamente para registrar la concentración atmosférica de granos de polen, esporas de hongos y otras partículas biológicas en función del tiempo mediante su identificación morfológica. Se trata esencialmente de un impactador de una sola etapa.



Figura 1

La superficie de recogida puede ser un portaobjetos de microscopio o una cinta adhesiva transparente previamente preparada y escaneada longitudinalmente

bajo el microscopio para contar las partículas y obtener la concentración de las partículas capturadas en función del tiempo. Se debe leer al menos el 10% del portaobjetos. Antes de leer el portaobjetos, se añaden unas gotas de colorante Fuschine [2], un colorante que tiñe las partículas de polen. Es el método oficial que la Asociación Española de Aerobiología (AEA) utiliza en la Red Española de Aerobiología (REA), ubicada en la Universidad de Córdoba.

En este trabajo se ha desarrollado una nueva metodología para la determinación del polen en la atmósfera basada en el colorante utilizado es la pirogalol-sulfonen-ftaleína o 4,5,6-trihidroxi-3-oxo-9-(fenil-o-ácido sulfónico)-xanteno [rojo de pirogalol] (Figura 2).

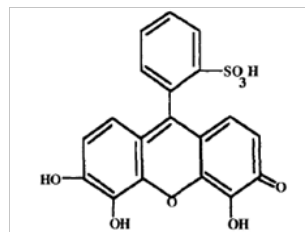


Figura 2

Se trata de un compuesto orgánico miembro de la serie del trifenilmetano usado en Química Analítica como indicador metalocrómico en volumetrías complexométricas, entre otros [3] Esta sustancia roja colorea las proteínas de color azul-violeta y la intensidad de la coloración es proporcional a la concentración. Además de la identificación convencional de los pólenes, este colorante permite por primera vez una evaluación de la actividad alérgica del polen, tiñe selectivamente el citoplasma en los pólenes y el glicocálix. El complejo rojo-molibdeno del pirogalol presenta fuertes reacciones con la lisina, la arginina y la histidina.

Fundamento de la reacción colorimétrica

El colorante Pirogalol-Rojo (PR, A) forma un complejo con el molibdeno (B) dando el complejo Pirogalol-Rojo-Molibdeno (PR-Mo, C) según la reacción de la Figura 3:

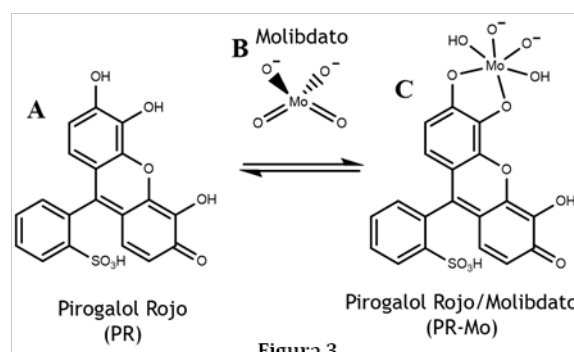
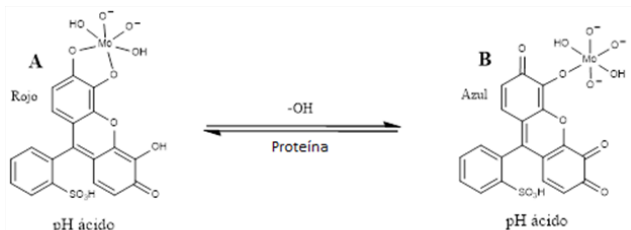


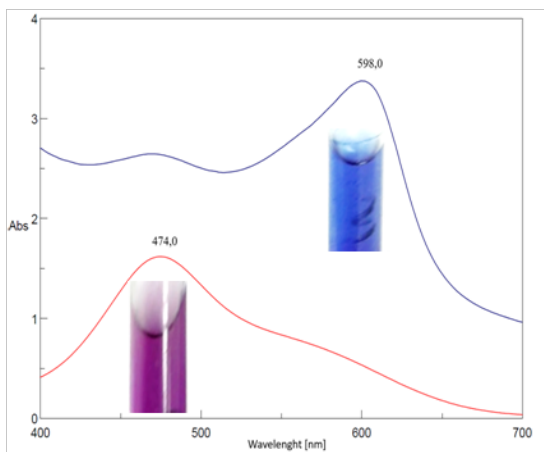
Figura 3

El PR-Mo, de color rojo (476,5 nm), reacciona con aminoácidos de las proteínas dando un complejo estable de color azul (576,5 nm). El complejo PR-Mo (A) está originalmente protonado a pH ácido, manteniendo su color rojo característico. Si se añade sobre proteínas, se produce una desprotonación del complejo (B) debido a la presencia del aminoácido, obteniéndose el color azul gracias a la interacción entre el grupo amino positivamente cargado y el complejo A (Figura 4).



Calidad de las calibraciones analíticas

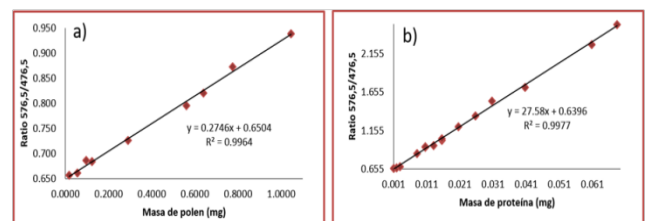
La cuantificación de las proteínas polínicas se realizó por espectrofotometría de absorción molecular en el rango visible usando la proteína pura de albúmina de suero bovino (BSA en inglés) como patrón de referencia en agua ultrapura. Se añadieron siempre 100 microlitros del reactivo colorimétrico Pirogalol-Rojo-Molibdeno a 3 mililitros de la disolución, que es el lixiviado de los filtros de polen con agua ultrapura o bien las disoluciones patrón de BSA. Se midió la señal analítica a dos longitudes de onda, 476,5 nm (rojo) y 576,5 nm (azul) (Figura 5) y se ideó representar [4] la Ratio R como el cociente Abs(576,5)/Abs(476,5).



Previamente se comprobó la linealidad y rango de trabajo de la ratio frente a la concentración de proteína en masa por unidad de volumen de aire, mg m⁻³. Para ello se prepararon muestras sintéticas de granos de polen en filtros de fibra de vidrio para toma de muestras atmosféricas. Se usaron 2 variedades de polen de olivo y otras 2 de gramíneas. Las masas de pólenes se pesaron en una microbalanza y sobre un soporte de muestreo de filtro redondo de 14 mm de diámetro (Figura 6).



Por un lado, se representaron los valores de Ratio frente a la masa creciente de polen soportado en los filtros, obteniéndose su correspondiente recta de calibrado lineal en su rango de trabajo óptimo (Figura 7a). Por otro lado, se interpolaron las diferentes muestras sintéticas de filtros en la recta de calibrado de Ratio frente a masa de proteína patrón BSA (Figura 7b).



Las rectas de calibrado obtenidas dieron buenos parámetros de calidad, buena sensibilidad, buena linealidad y bajos límites de detección (Tabla 1).

Tabla 1

| Proteína | masa (mg) | ratios | b ± Sb | R ² | L(%) | LD (mg) |
|-----------|---------------|-----------|---------------|----------------|------|---------|
| Olivo | 0,0103-1,3187 | 0,62-0,84 | 0,112 ± 0,004 | 0,989 | 96,4 | 0,13 |
| Gramíneas | 0,0071-1,4032 | 0,64-1,15 | 0,431 ± 0,012 | 0,995 | 97,3 | 0,08 |
| BSA | 0,0014-0,0713 | 0,65-2,55 | 27,6 ± 0,4 | 0,998 | 98,7 | 0,003 |

Toma de muestras atmosféricas

Las muestras atmosféricas de granos de polen/partículas en suspensión que se recogen sobre los filtros circulares de fibra de vidrio se aspiran con una bomba de muestreo de aire de rango 0,5 – 5 litros por minuto (Figura 8).



Los filtros de 14 mm, una vez limpiados con agua ultrapura y secados, se pesan (2 mg aprox.) antes de la

toma de muestras y al finalizar las 24 horas de aspiración. La diferencia de masa se refiere al volumen total de aire aspirado (unos 2 m³) y se determina la concentración total de partículas/granos en µg m⁻³. El muestreo se realiza a unos 20 metros de altura (Figura 6, dcha), según el método tradicional de la red de aerobiología, para minimizar la cantidad de partículas en suspensión recogidas y maximizar el número de granos de polen tomados.

Resultados, validación y discusión

Las curvas de calibrado Ratio/mg polen en curvas de calibrado µg proteína/mg polen, obteniéndose que las distintas especies de pólenes ensayadas dieron los siguientes valores de cantidad de proteína (Tabla 2):

| Tipo polen | Especie | µg Prot/mg polen |
|------------|-------------------------------|------------------|
| Olivo | Olea europaea var. manzanilla | 2,7 |
| Olivo | Olea europaea var. Picual | 1,6 |
| Gramínea | Dactylis glomerata | 16,0 |
| Gramínea | Phragmites communis | 9,4 |

Como se aprecia el polen de gramínea es más rico en proteínas que el de olivo.

Por otro lado, el resultado de las concentraciones en el ambiente atmosférico de la ciudad de las muestras de partículas/polen tomadas con la bomba de muestreo sobre los filtros circulares dieron como resultado los datos de la Tabla 3:

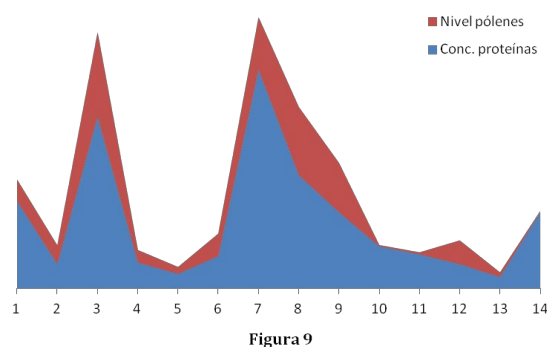
| Muestra | masa partículas | volumen | conc. partículas | color | conc. proteínas |
|---------|-----------------|----------------|--------------------|-------|--------------------|
| | mg | m ³ | µg m ⁻³ | Ratio | µg m ⁻³ |
| F01 | 0.082 | 1.16 | 70 | 0,655 | 0.54 |
| F02 | 0.011 | 0.73 | 15 | 0,630 | 0.15 |
| F03 | 0.086 | 2.02 | 43 | 0,696 | 1.06 |
| F04 | 0.095 | 0.67 | 141 | 0,630 | 0.16 |
| F05 | 0.102 | 0.66 | 154 | 0.612 | 0.09 |
| F06 | 0.077 | 1.54 | 50 | 0.646 | 0.20 |
| F07 | 0.051 | 1.31 | 39 | 0.686 | 1.35 |
| F08 | 0.133 | 1.96 | 68 | 0.675 | 0.70 |
| F09 | 0.182 | 1.90 | 96 | 0.662 | 0.47 |
| F010 | 0.127 | 1.84 | 69 | 0.651 | 0.26 |
| F011 | 0.143 | 1.98 | 72 | 0.649 | 0.21 |
| F012 | 0.140 | 1.95 | 72 | 0.646 | 0.15 |
| F013 | 0.115 | 2.05 | 56 | 0.634 | 0.07 |
| F014 | 0.131 | 1.99 | 66 | 0.663 | 0.47 |

Se puede observar que, para un promedio de unos 2 m³ de aire aspirados se recogen unos 100 microgramos de partículas totales (granos de polen + partículas en suspensión). La concentración total de partículas en el aire es variable (entre 15 y 154 µg m⁻³, promedio de 69), dependiendo del día de muestreo. Lo interesante es observar es que la concentración total de partículas en suspensión en el aire no guarda ninguna relación con la concentración de proteínas polínicas, pues ya se sabe que las primeras son procedentes de las fuentes antropogénicas de contaminación urbana y el polen sigue una tendencia natural y no creciente de presencia en el aire. Así, las muestras F04, F05 y F09 con mayores concentraciones de partículas totales no tienen las

mayores concentraciones de proteína. Lo contrario ocurre con las muestras F03 y F07.

Esta relación negativa entre partículas y pólenes es la prueba de la sinergia existente entre ambos, ya que, como bien se conoce, cuando la concentración de partículas en suspensión en el aire es muy elevada puede degradar la membrana de los granos de polen, liberando antes de tiempo y con mayor incidencia la carga amínica alergógena, provocando mayor incidencia de los síntomas respiratorios (alergia, asma) y en nuestro caso, una disminución de la respuesta analítica a la presencia de proteínas polínicas.

Con el fin de validar los resultados obtenidos para las concentraciones de proteínas polínicas en el aire, se compararon [5] los resultados de la Tabla 3 en µg m⁻³ con los valores oficiales de niveles polínicos en n^o de granos m⁻³ proporcionados por la Asociación Española de Aerobiología y la Red Española de Aerobiología, situando, tomando los valores oficiales de las mismas fechas de los muestreos (Figura 9).



La figura muestra un paralelismo entre las variaciones de los niveles polínicos y las concentraciones de proteínas. La metodología es útil en la determinación de la concentración total de pólenes en el aire, pero no da información sobre el tipo y especie de polen presente en el aire como sí lo sigue haciendo el método tradicional, aunque el método analítico sí es mucho más rápido para la concentración total.

Referencias

1. Mandrioli P., Comtois P., Vincenzo L. (1998) *Methods in aerobiology*. Chapter 3.
2. González Minero F.J., Fernández Mensaque P.C., Morales González J. (1997) El polen en el aire de Huelva. Relación con las alergias y el paisaje vegetal de la provincia. Ediciones de la Diputación provincial de Huelva.
3. Medina Escriche J., Sevillano Cabeza A., Llobat Estelles M. (1986) Aplicaciones analíticas del rojo de pirogalol (Review). *Química Analítica* (Boletín de la Sociedad Española de Química Analítica), vol. 5, núm. 3, pp. 229-244.
4. Sánchez Martín Águeda M^a (2015) Determinación de los niveles polínicos en muestras de partículas atmosféricas en suspensión por métodos químicos. Trabajo fin de Grado. Facultad de Química. Universidad de Sevilla.
5. Shojace N., Patton W., Lim, M.J. Shepro D. (1996) *Electrophoresis*, 17, 687-693.