# DESARROLLO DE UN METODO PARA RECUPERAR POLEN DE MUESTRAS DE AEROSOL URBANO

**Marco Rodríguez Villa[1], Karla Campos Venegas[2], Myriam Moreno López[2]y Alfredo Campos Trujillo[1]**

[1]Departamento de Medio Ambiente y Energía
[2]Área de Servicios Científicos y Tecnológicos
Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C.
Calle Miguel de Cervantes No. 120
Chihuahua, Chihuahua, 31109
marco.rodriguez@cimav.edu.mx
karla.campos@cimav.edu.mx
myriam.moreno@cimav.edu.mx
alfredo.campos@cimav.edu.mx

**Abstracto:** El objetivo del estudio fue desarrollar una metodología para la extracción de granos de polen colectados en muestras de aerosol urbano y su identificación. Se utilizaron muestras de un trabajo previo realizado en la ciudad de Chihuahua, México. Se modificaron métodos de digestión de muestras de partículas suspendidas y de extracción de polen de muestras geológicas. Se realizó una digestión ácida de las muestras y se filtraron en membranas de policarbonato. Se tomaron micrografías del polen encontrado mediante un microscopio electrónico de barrido (MEB). Las imágenes mostraron que mediante esta metodología se puede recuperar polen preservando su morfología, por lo cual pueden ser identificables por los palinólogos expertos. Esta metodología brinda una alternativa para estudios exploratorios de áreas donde no exista un monitoreo sistemático de polen, pero se realicen muestreos de partículas suspendidas con equipos de alto volumen.
Palabras clave: Polen, partículas PST, microscopio electrónico de barrido

## 1. INTRODUCCIÓN

La problemática de la contaminación ha alcanzado niveles cada vez mas graves, por lo que es fundamental el conocimiento de los contaminantes generados, ya que estos junto con las partículas que se encuentran suspendidas en la atmósfera tales como polvo, material carbonoso y organismos o estructuras de ellos (virus, bacterias, esporas, polen, etc.), alteran la calidad de vida en las ciudades influyendo en aspectos como la visibilidad y la salud del ser humano (González *et al.*, 1999).

La alergia polínical es una de las enfermedades más molestas y persistentes entre las no fatales, estando relacionada, tanto con la presencia en el aire de determinados granos de polen y esporas, como la concentración de los mismos. Debido a la importancia epidemiológica de las polinosis, desde mediados de siglo XX se consideró importante el estudio de los pólenes desde el punto de vista ambiental, diseñándose a lo largo del tiempo diferentes colectores de pólenes con el fin de poder realizar recuentos ambientales (aeropalinología).

Los recuentos de pólenes son de gran utilidad clínica. Diversos estudios han mostrado que los recuentos de pólenes y la anotación de síntomas en cartillas por parte de los pacientes, permiten establecer relaciones entre los cambios en las concentraciones de pólenes y la aparición de síntomas, algo especialmente útil a la hora de establecer qué polen o pólenes son importantes y tienen relevancia clínica en pacientes que muestran (Belmonte y Roure, 2001).

Los pólenes de relevancia alergénica corresponden a plantas adaptadas a un sistema de fecundación mediante transferencia aérea (anemogamia) y se retoma el término Aerobiología, Las plantas anemógamas presentan pólenes pequeños, no adherentes y que flotan fácilmente en el aire. La liviandad del grano de polen le permite volar incluso a varios centenares de km de distancia. Por esta razón, no se encuentran habitualmente diferencias significativas entre los recuentos realizados en zonas urbanas y rurales. Las plantas que emiten dichos pólenes suelen ser malas hierbas, muy difundidas en el medio, de aspecto poco llamativo, con flores poco vistosas y casi sin aroma, a diferencia de las flores de mucho colorido y muy aromáticas, que atraen a los insectos para su fecundación (entomogamia). Los granos de polen de las plantas entomófilas son más grandes, adhesivos y pesados, que los granos de polen dispersados por el viento.

El estudio periódico y sistemático de los granos de polen presentes en la atmósfera ha tomado en los últimos decenios (1980 en adelante) una gran importancia. Además, el cruce de los datos obtenidos en estudios aerobiológicos y en estudios clínicos ha supuesto una enorme mejora en el tratamiento que puede ofrecerse a las personas afectadas de alergias debidas a pólenes.

Muchos investigadores han trabajado en el diseño de aparatos muestreadores de la atmósfera para la recolección de pólenes y su cuantificación atmosférica llamados también captadores. Para llevar a cabo un estudio aerobiológico se tiene que aplicar una técnica de muestreo que permita "capturar" las partículas aerovagantes. A lo largo de la historia se han utilizado muy diversas técnicas, desde los simples portaobjetos untados con una substancia adhesiva expuestos sin ningún soporte específico hasta sofisticadas técnicas moleculares, pasando por aparatos que separan las partículas del aire reteniéndolas en filtros de gasa o succionándolas y depositándolas en superficies adhesivas.

Cuando se habla de muestreadores o de captadores de polen, se refiere a los aparatos que permiten hacer el muestreo, y de metodologías de estudio, para indicar el protocolo que se sigue en cada caso (Belmonte y Roure, 2002). En general, estos monitoreos se realizan en forma continua, obteniendo datos volumétricos de la cantidad de granos de polen por metro cúbicos de aire.

Estos monitoreos se desarrollan en pocos lugares de México, pero estudios de la calidad del aire con relación a las partículas suspendidas, en base a monitoreos de alto volumen son relativamente comunes en muchos centros urbanos. Estas muestras podrían ser útiles en estudios preliminares para observar el tipo y distribución de los pólenes aerotransportados presentes en una determinada área, donde no se hayan establecido monitoreos específicos para este fin.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología para la extracción e identificación de granos de polen capturados en filtros de fibra de vidrio (FV) en muestreos de partículas suspendidas totales (PST) con equipos de alto volumen.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Muestreo

En el desarrollo del método se utilizaron filtros con muestras de partículas suspendidas totales (PST) colectadas en un estudio previo (Campos, 2006), con el fin de trabajar con una matriz que presentará las mismas características e interferencias a la de interés.

La recolección de las muestras se realizó mediante muestreadores de alto volumen (HiVol) marca Graseby Andersen/GMW equipados con cabezal PST, con un flujo de operación entre 1.1 y 1.7 $m^3/h$. Como medio de captura para las muestras de partículas se utilizaron filtros de 8 X 11 pulgadas de fibra de vidrio (Whatman G653).

El procedimiento general seguido para el muestreo y determinación gravimétrica de las concentraciones de partículas fue el contenido en el Método EPA IO.2.1 (USEPA, 1999). Este método proporciona una medida de la concentración de la masa de las partículas suspendidas en el aire ambiente. El proceso de medición es no destructivo, y el tamaño de la muestra recolectada es usualmente adecuado para el subsiguiente análisis químico.

### 2.2 Método de recuperación del polen

Para la recuperación del polen, se realizaron modificaciones a métodos utilizados ampliamente en la digestión de partículas suspendidas captadas en filtros de fibra de vidrio y de extracción de polen de muestras geológicas. Las pruebas realizadas para lograr el procedimiento finalmente propuesto, se describen en el capitulo de Resultados y Discusión.

Las muestras fueron adicionadas con una pequeña cantidad de polen de muestras de flores colectadas en un estudio complementario de éste (Aguirre y Muñoz, 2009). Para evaluar la utilidad del método propuesto, se utilizaron 30 filtros colectados en dos sitios de la ciudad de Chihuahua, a los cuales no se les adicionó polen.

Los reactivos utilizados fueron ácido clorhídrico (HCl) al 37%, ácido nítrico (HNO3) al 10%, ácido fluorhídrico al 40% grado analítico, hidróxido de sodio (NaOH) al 10% , marca J.T. Baker y agua destilada. Las muestras se centrifugaron a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 6 minutos (Fisher Scientific, Maratón 8K). Para el filtrado se utilizó papel filtro (Whatman No. 40), y membranas de policarbonato (PC) de 11 mm de diámetro y una porosidad de 0.4 micrómetros (CUMONICS, K04CP0470).

### 2.3 Obtención de imágenes

Las membranas de PC con el material recuperado fueron colocadas sobre cilindros portamuestras de aluminio de 11 mm de diámetro por 10 mm de alto, recubiertos con cinta de cobre de doble cara (EMS, 77802-22), aun húmedas para facilitar el proceso de fijación y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las muestras fueron preparadas mediante la técnica de *sputtering*, con una película de oro de un espesor de 70 nm mediante una lámpara de recubrimiento (Denton Vacuum, DESK II) durante 30 segundos. Se tomaron micrografías de los

granos de polen encontrados a diferentes magnificaciones con un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca Jeol JSM-5800LV, con un voltaje de aceleración de 10keV, al alto vacío y electrones secundarios.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Primera aproximación

Las primeras pruebas realizadas fueron para adaptar el método para la digestión y análisis de metales pesados en muestras de PST captadas en filtros de FV por el método de alto volumen (Método EPA IO 3.1).

Los filtros fueron cortados en cuadros de 2x2 cm y puestos junto con una pequeña cantidad de polen de una especie conocida en un vaso de precipitados. Se añadieron 75 ml de HCl y 75 ml de agua destilada y se colocó en una parrilla de calentamiento por 2 horas a 50 ºC. Posteriormente se pusieron en baño ultrasónico por 30 minutos para facilitar el desprendimiento de las partículas adheridas al filtro de FV. Los filtros fueron retirados del vaso y enjuagados con agua destilada. La solución de digestión junto con agua de enjuague se filtró en papel filtro.

La muestra obtenida en esta etapa resultó muy gruesa y con una gran cantidad de fibras, producto del deterioro del filtro de FV durante el proceso. Aunque se pudieron obtener imágenes de los granos de polen, y su estructura no fue significativamente dañada (figura 1), su búsqueda se dificultó debido a la gran cantidad de impurezas retenidas en el filtro y al área tan extensa del mismo (2.5 mm de diámetro) lo cual resultó en varias horas de análisis en el MEB para cada muestra. Por otro lado, las ondulaciones en el papel utilizado para filtrar y soportar la muestra, también dificulta la búsqueda del polen y el enfoque adecuado para obtención de las micrografías en el MEB.

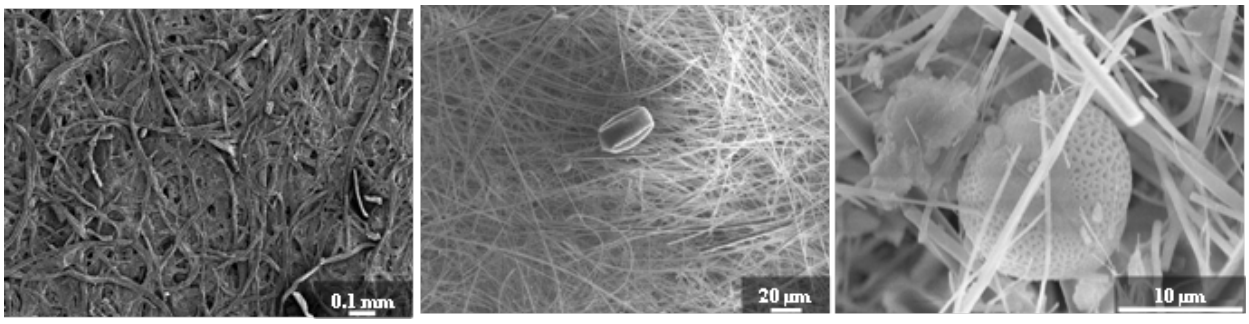

Figura 1. Micrografías de MEB(10 keV) de las muestras obtenidas en el primer acercamiento

### 3.2 Segunda aproximación

En una segunda etapa se opto por cambiar el tipo de filtro, por lo que se utilizaron filtros de PC. Los filtros comunes de tipo membrana profunda contienen poros tortuosos que capturan partículas al azar a través del atrapamiento. El resultado es que una fracción de las partículas queda en el interior (intersticios) del filtro, haciendo imposible su observación en la superficie por MEB. En contraste, los filtros de PC contienen poros uniformes y cilíndricos grabados en la membrana, lo que permite una distribución uniforme de la muestra colectada en un plano a través de toda la superficie de la membrana expuesta. Por lo tanto, todas las muestras se capturan en una superficie plana, lisa, con una superficie con apariencia de cristal.

Al utilizar estas membranas se observaron mejor las muestras en el MEB, sin embargo persistía el problema de las fibras de fibra de vidrio desprendidas del lavado inicial. Por otro lado, debido a la superficie tan lisa de los filtros de PC, la muestra húmeda obtenida se deslizaba sobre la superficie del filtro. Al secarse sobre el filtro, la muestra presentaba cuarteadoras y también se presentaron problemas de fijación, quedando poca muestra sobre el filtro. Este problema se solucionó al utilizar una bomba de vacío para el filtrado y reduciendo el diámetro del filtro (11 mm), lo cual además disminuye el tiempo de análisis en el MEB al tener que barrer una superficie significativamente menor.

Para la eliminación de materia orgánica se adicionaron 40 mL de ácido nítrico ($HNO_3$) a la solución, y 40 mL de HF para eliminar las fibras de fibra de vidrio. Esto disminuyó el grosor de la muestra, sin embargo, se observó que este procedimiento dañaba seriamente la estructura de la mayoría de los granos de polen (figura 2).

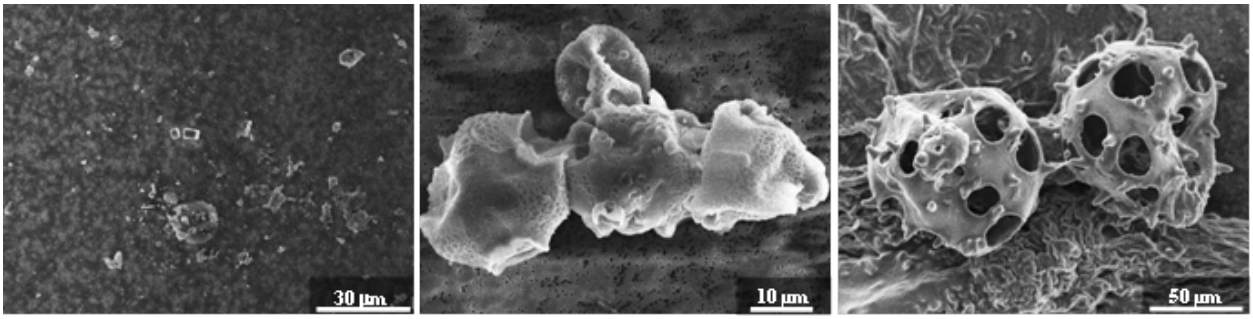

Figura 2. Micrografías de MEB(10 keV) de las muestras obtenidas en el segundo acercamiento

**3.3 Método propuesto**

Para lograr la disolución de los carbonatos y de otras partículas adheridas a los filtros, se agregaron 40 mL de HCl al 37% y se dejó actuar por 10 minutos. Las tiras de filtro se colocaron en un vaso de precipitados de 1 L para lavarlos con 350 mL de agua destilada a una temperatura de 50 a 70 ºC. Se observó que a una temperatura menor a este rango la limpieza de los filtros es menos eficiente. La solución de HCl recuperada y el agua de los lavados fueron mezcladas y centrifugadas a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 6 minutos. El sobrenadante fue desechado y los sólidos acumulados al fondo del vial fueron lavados con 80 mL de agua destilada dos veces para eliminar los residuos de HCl.

Con la finalidad de digerir la materia orgánica presente en las muestras se adicionaron 40 mL de NaOH al 10% y se dejó reaccionar durante 10 minutos. Luego la muestra fue centrifugada nuevamente (3500 rpm por 6 minutos) y lavada por dos ocasiones con 80 mL de agua destilada.

Las muestras fueron filtradas en las membranas de PC de 11 mm de diámetro. Para eliminar las fibras de vidrio residuales, se añadieron lentamente sobre la muestra 10 mL de HF al 40% y posteriormente 20 ml de agua destilada para lavar el HF y evitar que los granos de polen resultaran dañados por el contacto prolongado con el ácido (figura 3).

Mediante esta metodología, se logró eliminar las fibras de vidrio desprendidas de los filtros y una gran parte del material proveniente de la muestra de PST, aunque resulta difícil eliminarlo del todo, sobre todo algunos componentes tales como los silicatos

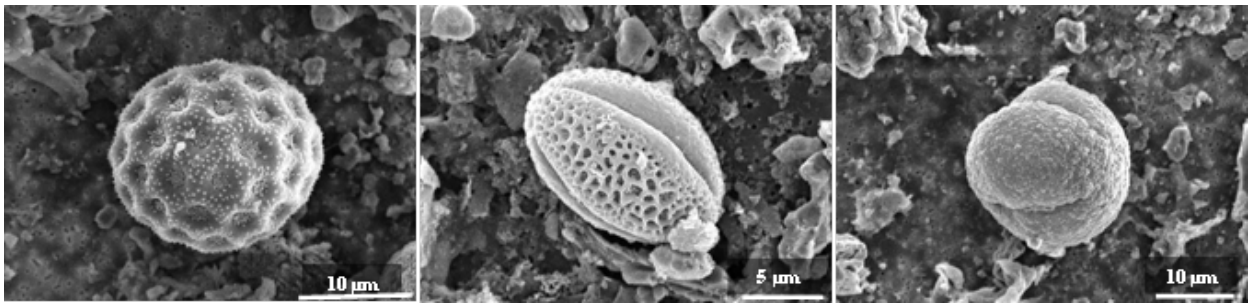

Figura 3. Micrografías de MEB(10 keV) de las muestras obtenidas en método propuesto.

**3.3 Evaluación de la utilidad del método**

Para evaluar la utilidad del método propuesto, se utilizaron 30 filtros de fibra de vidrio con muestras de PST, a los niveles de concentración típicamente encontrados en la Cd. de Chihuahua. La mitad de las muestras fueron colectadas en CIMAV (sitio urbano) y la otra en el Fraccionamiento Universitarios (FU, sitio suburbano). Las fechas de muestreo van del 21 de febrero al 19 de septiembre del 2005. A estas muestras no se les adicionó polen, y se siguió la misma metodología anteriormente descrita. Las figuras 4 a la 8 muestran las micrografías de algunas muestras.

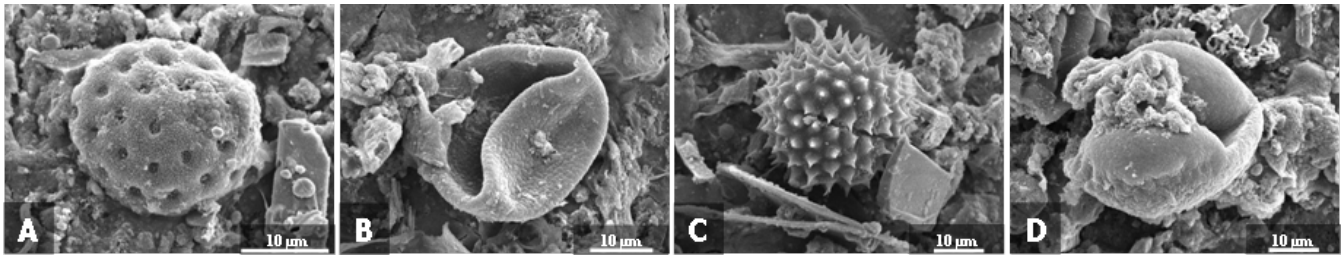


Figura 4. Polen recuperado de muestras del sitio CIMAV el 29 de febrero del 2005
A: *Chenopodiaceae, Chenopodium spp* B: *Poaceae* (zacates) C: *Asteraceae* D: *Pinaceae, Pinus spp*

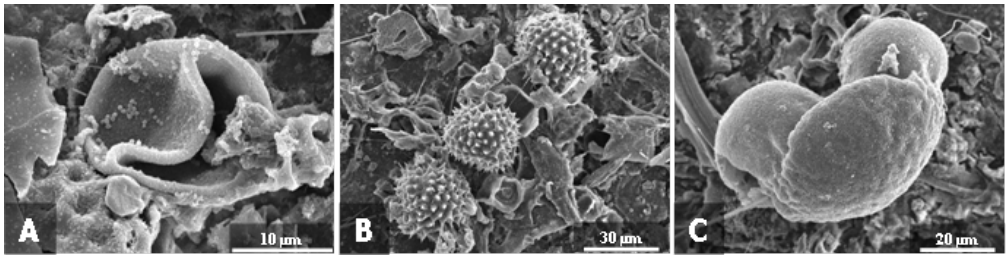


Figura 5. Polen recuperado de muestras del sitio FU el 29 de febrero del 2005
A: *Poaceae(centro), Chenopodiaceae, Salsola iberica (esquina inferior izquierda)* B: *Asteraceae C*: *Pinaceae, Pinus*

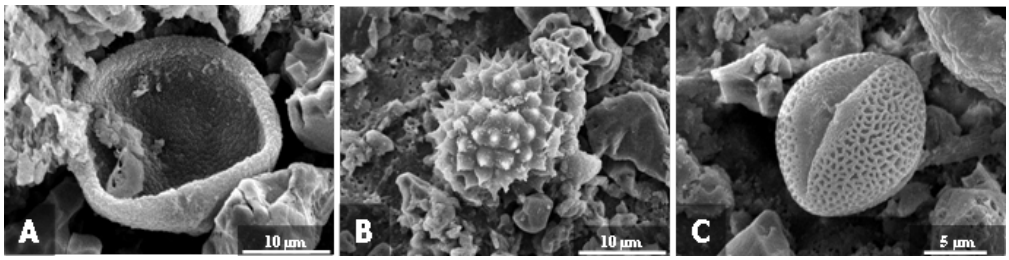


Figura 6. Polen recuperado de muestras del sitio CIMAV el 10 de abril del 2005
*A: Poaceae B: Asteraceae C: Brassicaceae*

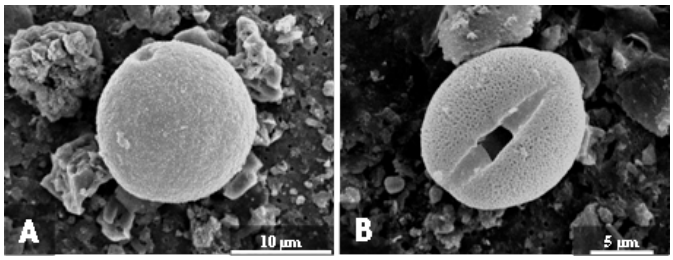


Figura 7. Polen recuperado de muestras del sitio FU el 22 de abril del 2005
*A: Poaceae B: Bignonaceae, Tecoma stans*

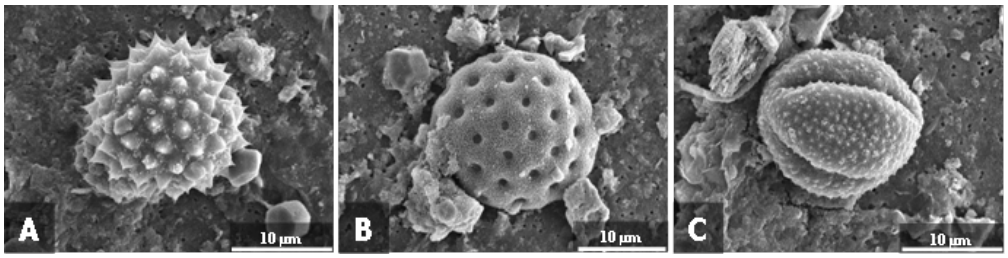

Figura 8. Polen recuperado de muestras del sitio CIMAV el 28 de abril del 2005
*A: Asteraceae B: Chenopodiaceae, Chenopodium spp C: Asteraceae, Artemisa spp*

En todas las muestras se recuperaron granos de polen aerovagante y se obtuvieron micrografías de los mismos, los cuales no sufrieron daños considerables en su morfología. Mediante estas imágenes, los pólenes pueden ser identificables incluso a nivel de especie por los palinólogos expertos.

En la ciudad de Chihuahua las familias predominantes fueron *Poaceae* (gramíneas), *Asteraceae* y *Chenopodiacea*. Los pólenes de estas familias son de tamaño pequeño, lo que les ofrece mayor facilidad para ser transportados por el viento y aumento su potencial alergénico. A este respecto existe una coincidencia de la región de estudio y otros estudios, por ejemplo, el realizado por Carretero *et al.* (2005) los cuales señalan que las gramíneas son los pólenes con más importancia alergológica en la región de Burgos (España).

Esta metodología puede ser aplicada en muestras de lugares que no cuenten con monitoreo especializado y sistemático de polen, pero que si tengan una red manual de monitoreo de PST, como estudios piloto para estudiar la especies presentes y sus épocas de polinización.

El uso de microscopios ópticos puede ser una opción más viable, sin embargo la identificación de los granos representa un mayor reto debido a la menor resolución de los mismos.

Se recomienda llevar a cabo muestreo paralelo con algún monitoreo de polen realizado de acuerdo a los métodos estandarizados de captura y conteo (Durham, 1946; Hirst, 1952; Cour, 1974; Belmonte, 2003), para estudiar la utilidad de esta técnica en el conteo de granos.

## 5. REFERENCIAS

1. Aguirre, A. y Muñoz, G. (2009). Identificación y análisis polínico de la vegetación de ciudad de Chihuahua, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México.
2. Belmonte, J. y Roure J.M. (2001). La polinosis a través del tiempo. Universitat Autònoma de Barcelona.
3. Belmonte, J. y Roure J.M. (2002). Métodos de muestreo En Polinosis. Polen y Alergia (Eds. A.L. Valero y A. Cadahía). MRA ediciones, Barcelona, España.
4. Belmonte, J. (2003). Técnica para la captación e identificación de los pólenes. Alergol. Inmunol. Clín., 18(Extraordinario Núm.3):45-47.
5. Campos, A. (2006). Evaluación de partículas atmosféricas PST y $PM_{10}$ en la Ciudad de Chihuahua, México: niveles de concentración, composición elemental e identificación de fuentes emisoras. Disertación doctoral. Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México.
6. Carretero, P., Juste, S., García, F., Alloza, P., Pérez, R., Blanco, J., Reinares, C., Vicente, J. y Bascones, O. (2005). Pólenes alergénicos y polinosis en la ciudad de Burgos. Alergol. Inmunol. Clín., 20:90-94.
7. Cour, P. (1974). Nouvelles techniques de d´tection des flux et des retombées polliniques: étude de la sédimentation des pollens et des spores à la surface du sol. Pollen et spores, 16(1): 103-141.
8. Durham, O.C. (1946). The volumetric incidence of atmospheric allergens IV. A proposed standard method of gravity sampling, counting and volumetric interpollation of results. J. Allergy, 17(2): 79-86.
9. González, M.C., Cerezo, A., González, M.C. y Salazar, L. (1999). Comportamiento de las partículas suspendidas y polen en la atmósfera de la región norte de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. Revista de la Sociedad Química de México, 43(5): 155-164.
10. Hirst, J.M. (1952). An automatic volumetric spore trap. Ann. Appl. Biol., 39: 257-265.