CENTRO DE INVESTIGACION EN MATERIALES AVANZADOS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DEPARTAMENTO DE MEDIO AMBIENTE Y ENERGÍA

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA RECUPERACIÓN DE PÓLENES DE FILTROS DE FIBRA DE VIDRIO, CAPTADOS POR MUESTREO DE ALTO VOLUMEN

T E S I S

REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL QUE PRESENTA:

MARCO ANTONIO RODRIGUEZ VILLA

Director de Tesis: Dr. Alfredo Campos Trujillo

CHIHUAHUA, CHIHUAHUA SEPTIEMBRE DEL 2009

AGRADECIMIENTOS

Dr. Alfredo Campos Trujillo

M.C. Román Pérez Balam
Dra. Antonia Andrade

Laboratorio de Análisis Químico:
I.Q. Silvia Miranda,
M.C. Myriam Moreno
Ing. Alma Rubio

Laboratorio de Microscopia
M.C. Karla Campos Venegas
Ing. Wilber Antunez Flores
Ing. Joselin Sáenz Hernández

Ing. Alejandro Benavides Montoya
Ing. Roal Torres Sanchez
Ing. Jorge Carrillo Flores
M.C. Mayra Yudirian Luna Porres
M.C. Luis Miguel Rodríguez
Ing. Diana Burciaga Valencia

Laboratorio de Catálisis:
M.C. Manuel Román
Ing. Luis de la Torre

A Toda mi familia y amigos que apoyaron con ideas y comentarios.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS I
ÍNDICE II
ÍNDICE DE TABLAS III
ÍNDICE DE FIGURAS IV
I. INTRODUCCIÓN. 1
II. MARCO TEORICO. 3
2.1. LA POLINOSIS A TRAVÉS DEL TIEMPO. 4
2.2. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y SU INFLUENCIA SOBRE LA POLINOSIS. 7
2.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PÓLENES 8
2.4. CAPTACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PÓLENES 10
2.4.1. Muestreadores de precipitación o gravimétricos 11
2.4.2. Muestreadores de impacto 12
2.4.3. Muestreadores de filtración. 16
2.5. MUESTREADOR DE ALTO VOLUMEN (HV). 18
2.6. TRABAJOS DE CAPTACION DE POLEN. 19
2.6.1. COLECTOR DE POLEN EN LA CORDILLERA DE LOS ANDES 19
2.6.2. METODOLOGÍA PARA EL ANALISIS DE SEDIMENTOS. 20
III. OBJETIVO. 23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS 23
4.1. METODO DE MUESTREO. 23
4.2. EXTRACCION DEL POLEN. 23
4.3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA
DE BARRIDO (MEB) 25
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 26
5.1. DESARROLLO DEL METODO 26
5.1.1. ETAPA 1. 26
5.1.2. ETAPA 2. 27
5.1.3. ETAPA 3. 28
5.2. EVALUACION DE LA UTILIDAD DEL METODO 30
VI. CONCLUSIONES. 41
VII. BIBLIOGRAFÍA. 42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de Captadores 11
Tabla 2. Protocolo para la concentración de granos de polen en sedimentos. 22
Tabla 3. Filtros muestreados con sus características. 31

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. División de la exina 4
Figura 2. Tipos de polen 8
Figura 3. Polaridad 8
Figura 4. Formas y tamaño del polen. 8
Figura 5. Tipos de aberturas 8
Figura 6. Tipos polínicos según el número y disposición de las aberturas 9
Figura 7. Estructura de la esporodermis (pared polínica). 9
Figura 8. Ornamentación de la exina. (A) Visión de la superficie y (B) Sección transversal 10
Figura 9. Portaobjetos. 12
Figura 10. Esquema de captador gravimétrico Durham (A) y modificado por Pla Dalmau 12
Figura 11. Esquema de muestreador Andersen con 6 pisos de recogida de partículas. 13
Figura 12. Muestreador Rotorod. Impacto por rotación mecánica 13
Figura 13. Muestreador ciclónico de Burkard 14
Figura 14. Muestreador Hirst. Impacto por succión. 14
Figura 15. Partes de un Muestreador Hirst. 15
Figura 16. Esquema del captor Cour 16
Figura 17. Muestreador Cour 17
Figura 18. Equipo de Alto Volumen (HV) 18
Figura 19. La Quebrada Benjamín Matienzo cubierta 20
Figura 20. Algunos de los sedimentos obtenidos 21
Figura 21. Muestras de flores utilizadas. 24
Figura 22. Localización de los puntos de muestreo en la ciudad de Chihuahua 25
Figura 23. Micrografías de las muestras obtenidas en el Primer Análisis (10 keV) 26
Figura 24. Superficie del filtro de policarbonato. 27
Figura 25. Filtro de policarbonato después de perder la muestra que se había
filtrado con anterioridad 27
Figura 26. Micrográficas a 10 keV obtenidas del proceso de digestión de HNO3, HCl y HF. . . . 28
Figura 27. Granos de polen con su estructura dañada 29
Figura 28. Polen extraído del método propuesto. 30
Figura 29. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 28/IV/05 32
Figura 30. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 28/IV/05. . 32
Figura 31. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 10/IV/05 32

Figura 32. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 10/IV/05. . 32
Figura 33. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 22/IV/05 33
Figura 34. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 22/IV/05. . 33
Figura 35. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 16/V/05 33
Figura 36. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 16/V/05 . . 34
Figura 37. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 28/V/05 34
Figura 38. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 28/V/05 . . 34
Figura 39. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 9/VI/05 35
Figura 40. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 9/VI/05. . . 35
Figura 41. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 27/VI/05 35
Figura 42. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 27/VI/05. . 36
Figura 43. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 9/VII/05 36
Figura 44. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 9/VII/05 . . 36
Figura 45. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 21/VII/05. 37
Figura 46. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 21/VII/05 . 37
Figura 47. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 8/VIII/05 37
Figura 48. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 8/VIII/05. . 38
Figura 49. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 14/VIII/05 38
Figura 50. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 14/VIII/05. 38
Figura 51. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 21/VIII/05 39
Figura 52. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 21/VIII/05. 39
Figura 53. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 7/IX/05 39
Figura 54. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 7/IX/05. . . 40
Figura 55. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 17/IX/05 40
Figura 56. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 17/IX/05. . 40

I. 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.

La respiración es una función básica para la vida, el aire inhalado penetra en las profundidades del aparato respiratorio. Las partículas que tienen un diámetro mayor a 10 micrómetros son retenidas por las vellosidades de la nariz y los menores a 10 micrómetros pueden depositarse a lo largo de los conductos respiratorios, mientras que otras que permanecen en el aire son exhaladas a través del ciclo de la respiración. Una gran parte de las partículas depositadas en las vías respiratorias son evacuadas y eliminadas del organismo como mecanismo de defensa del cuerpo humano, para reducir el tiempo de residencia de las partículas sobre tejidos potencialmente sensibles.

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, ya 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, es importante que los datos obtenidos se trasmitan a los pacientes polínicos con el fin de que se pueda predecir la intensidad de los síntomas y tomar las medidas de evitación pertinentes.

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

En la actualidad se realizan monitoreos para estudiar la concentración de los granos de polen aerotransportados con la finalidad de predecir las temporadas en que se registran incrementos en las alergias en una determinada población. Estos monitoreos se realizan en forma continua, obteniendo datos volumétricos de la cantidad de granos de polen por metro cúbicos de aire.

Por otro lado, el estudio de la calidad del aire con relación a las partículas suspendidas, en base a monitoreos de alto volumen es relativamente común 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.

II. MARCO TEORICO

Los granos de polen son estructuras reproductoras masculinas de las plantas con semilla o las células sexuales masculinas de las plantas con flores. Se forman en el interior de los estambres y, una vez maduros, son liberados. Su función biológica es alcanzar la parte femenina de una flor de su misma especie y hacer posible la fecundación de la ovocélula (Mogío y Moral, 2001; Pagán et al., 2004).

En algunas especies (plantas autógamas) el polen puede realizar su función en la misma flor o en la misma planta que lo ha formado, pero en la inmensa mayoría de las especies (plantas alógamas) el polen sólo resulta viable si alcanza una ovocélula de otra planta de su misma especie.
,
El traslado del polen desde el órgano donde se ha formado hasta la parte femenina de la flor se conoce con el nombre de polinización y puede efectuarse de maneras diversas, que son características para cada especie (Sáenz,1978; Belmonte y Roure, 2002).

Actualmente la polinosis se ha convertido en la afección alérgica más frecuente entre los habitantes de los países industrializados, pero en el pasado se trataba de una rareza, cuyo origen era poco conocido por la clase médica, siendo etiquetados un gran número de pacientes alérgicos al polen de catarrosos (Pelta, 2001).

Polinosis es la reacción alérgica del cuerpo debida al polen. Esta íntima relación entre polen y polinosis fue descrita por primera vez en 1873 por Blackley. Aunque esta definición de Polinosis no habla de las reacciones alérgicas originadas por esporas de hongos, también hay que incluirlas, como bien demostró Cadham en 1924 y como han seguido evidenciando numerosos estudios.

El proceso de la polinización requiere que los pólenes sean células especialmente resistentes, ya que se ven sometidos a condiciones ambientales adversas que podrían provocar el colapso y desecación de los componentes celulares, alterándolos y haciendo el polen inviable. Como adaptación a ello un grano de polen maduro está rodeado por una cubierta más o menos celulósica llamada intina, muy similar a la pared de una célula vegetal. Por fuera de esta se encuentra otra cubierta de notable resistencia denominada exina, la cual esta constituida por uno de los materiales más inalterables de la naturaleza, la esporopolenina que es muy resistente a ácidos y bases y no es afectada por las variaciones térmicas habituales en la naturaleza (Tormo y Devesa, 1989; Olabuenaga et al., 2007).

La exina se divide en una porción esculpida, llamada sexina, y una porción no esculpida, llamada nexina, la cual cubre la intina (Accorsi et al., 1991).

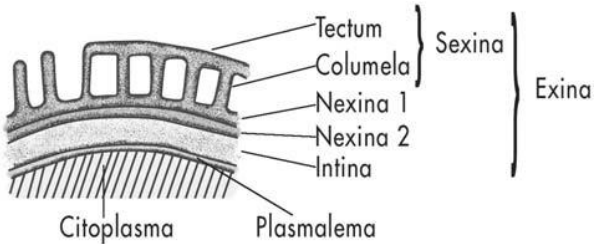


Figura 57. División de la exina

Los pólenes de relevancia alergénica corresponden a plantas adaptadas a un sistema de fecundación mediante transferencia aérea (anemogamia) y se retoma el término Aerobiología, acuñado por Meyer en los años 30 el cual fue plenamente adoptado para referirse a la disciplina que se ocupa del estudio de los organismos vivos aerotransportados, su diversidad, modos de vida, dependencia y, al mismo tiempo, repercusión en el entorno. Las plantas anemógamas presentan pólenes pequeños, no adherentes y que flotan fácilmente en el aire.

Generalmente el polen se emite a primeras horas de la mañana, pero la dispersión y la redistribución por el viento determinan que las concentraciones máximas de los mismos se den habitualmente por la tarde. 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 (Brasó y Jorro, 2003; Miralles, 2008).

Es evidente que los pólenes no tienen el mismo significado para las plantas que para el ser humano pues, mientras que en aquellas constituyen elementos básicos en la reproducción de la especie, para nosotros suponen una fuente de material alergénico de origen natural. Desde que se desprende de la antera del estambre, el grano de polen vuela con la finalidad concreta de llegar al estigma de una flor femenina de su misma especie. Al contactar con el medio húmedo que supone el estigma, se emiten a través de las aperturas de la exina unas glicoproteinas que proceden de la intina y que deberán acoplarse a proteínas receptoras localizadas en la superficie de las células estigmáticas. Si el reconocimiento es satisfactorio, es decir, si el polen y el estigma pertenecen a la misma especie, se procede a la germinación del grano de polen, proceso que culminará con la fecundación (Pagán et al., 2004).

2.1. LA POLINOSIS A TRAVÉS DEL TIEMPO

Aunque habitualmente los trabajos aerobiológicos y médicos que hacen referencia a la historia de la polinosis y/o de la aerobiología restringen sus referencias a Blackley, hubo otros importantes investigadores, algunos previos y otros contemporáneos, que estudiaron la presencia de partículas biológicas en el aire e incluso en algunos casos las relacionaron con manifestaciones

alérgicas y que merecen ser citados. Casi todos ellos fueron médicos (Belmonte y Roure, 2001).

Lázaro Spallanzani (1729-1799) investigó el desarrollo de vida microscópica en medios de cultivo y con ello contrarrestó la teoría de la generación espontánea defendida por Needham (Ariatti y Mandrioli, 1993).

Los estudios de Spallanzani facilitaron las posteriores investigaciones de Louis Pasteur quien demostró la existencia inequívoca de esporas atmosféricas transportadas por el aire y diseminadas desde la fuente (Ariatti y Comtois, 1993) y propuso que debían hacerse estudios de manera regular y comparar diferentes estaciones en un mismo lugar y diferentes lugares en un mismo período. Pasteur, que llamó micrografía a lo que Meier propuso llamar en 1930 aerobiología, descubrió algunos principios considerados hoy en día básicos en aerobiología:

1. La absoluta necesidad del muestreo volumétrico.
2. La heterogeneidad de las esporas en el aire
3. La ruta aerobiológica (arranque, dispersión, deposición).

Los trabajos de Pasteur inspiraron a Pierre Miquel (1850-1922), farmacéutico y médico francés considerado el primer aerobiólogo profesional. Sus investigaciones más importantes en la disciplina que llamaba micrografía atmosférica las hizo usando métodos volumétricos y estaban relacionadas con la influencia del tiempo en los bioaerosoles atmosféricos y su impacto en las enfermedades epidémicas (Comtois, 1997). Sus trabajos incluyen gráficas de concentraciones de partículas a lo largo del tiempo y curvas de temperaturas medias o curvas de muertes y mapas de la ciudad de Paris con referencia al número de partículas por metro cúbico de aire según la dirección del viento (Miquel, 1883).

En este recorrido por la historia de la polinosis y, paralelamente, de la aerobiología debe darse cabida a John Tyndall (1820-1893), un eminente científico formado en ingeniería civil y más conocido por sus investigación no aerobiológica (matemáticas, electromagnetismo, termodinámica, bacteriología...) pero también importante en este campo. Tyndall propuso una metodología para mapear la distribución de la materia invisible flotante del aire y demostró que su distribución tenía una sorprendente similitud con la propagación de epidemias en la población, reforzando su convicción de una directa relación entre aerobiología y enfermedades, y de que los gérmenes eran arrastrados en grupos o “nubes”. Tyndall fue probablemente el primero en poner en mente del público en general la existencia de “la materia flotante del aire” y los problemas que estas partículas pueden causar a la humanidad. Contemporáneo de Pierre Miquel, éste le discutía el uso del término “nubes” para referirse a las esporas atmosféricas (Comtois, 1997; Comtois, 2001).

Más adelante, especialistas en biología, normalmente botánicos y micólogos, irrumpieron también en los estudios aerobiológicos, en algunos casos con estudios destinados a una aplicación médica y otros a estudios de biología de especies, a estudios agronómicos y a interpretaciones paisajísticas. Un importante impulsor de los estudios de la diversidad de agentes alergénicos en

la atmósfera y biólogo de formación fue Philip Herries Gregory (1907-1986) (Hirst, 1992). Su obra *The microbiology of the atmosphere* (Gregory,1961; Gregory, 1973) ha sido un libro de cabecera de muchos aerobiólogos actuales. Gregory trabajó diversos aspectos de la micología, aplicada a la agricultura y a la medicina, especialmente aspectos ligados a la biología y a la producción y la dispersión de esporas de algunas especies fúngicas. Gregory dirigió, entre otros estudiantes, a Jim M. Hirst, quien desarrolló, para resolver algunos de los problemas que se planteaban en el estudio de la epidemiología del mildiu de la patata (*Phytophthora infestans*), el captador de esporas automático y volumétrico que aún hoy se utiliza en los estudios aerobiológicos y que se ha establecido como estándar en las redes españolas y europeas.

Tradicionalmente, los estudios aerobiológicos destinados a una aplicación clínica se proponen catalogar la diversidad de pólenes y/o esporas de hongos alergénicos y cuantificar cada uno de los táxones reconocidos. Los estudios se prolongan a lo largo de uno o más ciclos anuales para así establecer calendarios que evidencien los períodos de presencia en la atmósfera y la sucesión de los diversos alérgenos atmosféricos a lo largo del año.

Una de las hipótesis que promulgan muchos estudios aerobiológicos de las últimas décadas es que se pueden elaborar modelos de previsión del inicio y de la importancia (concentraciones alcanzadas) de la polinización. Estos modelos, cuando establecidos para pólenes y esporas alergogénicos, deben ser de gran utilidad para la prevención de la aparición de las alergias y su tratamiento en el momento preciso. El hecho de que los modelos de previsión incluyen necesariamente parámetros meteorológicos en sus fórmulas y la conocida variabilidad de los mismos explican que la aplicación de los modelos tenga carácter local.

A inicios del siglo XXI y delante la creciente preocupación por el cambio climático y el calentamiento global, algunos estudios aerobiológicos intentan también evidenciar o deducir estos procesos de las series de datos obtenidos en diversos años de estudio y también prever cómo puede afectar a las alergias respiratorias
.
Desde los primeros trabajos hasta los que se desarrollan hoy en día se ha dado distintos nombres (micrografía, aeropalinología, aerobiología) a estudios con los mismos fines. Lo que ciertamente ha facilitado muchísimo las posibilidades de ejecución de estos trabajos son, no sólo la cantidad de especialistas que pueden dedicarse a este tipo de estudios y su diversa formación, sino también los medios técnicos que se han ido desarrollando a lo largo del tiempo. En el campo de la microscopía, los avances en microscopía óptica y la aparición de la microscopía electrónica de barrido o *scanning* permiten la observación de las partículas aerotransportadas en condiciones muy buenas y, por tanto, una identificación más precisa. También se están desarrollado técnicas inmunoquímicas que se han incorporado al reconocimiento de los pólenes y esporas y al diagnóstico de las patologías (Belmonte y Roure, 2001).

2.2. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y SU INFLUENCIA SOBRE LA POLINOSIS

Actualmente se admite que la patogénesis de los procesos alérgicos depende de la interacción entre el tiempo y la intensidad de exposición al alergeno y de la presencia de factores de riesgo en personas genéticamente predispuestas. Sin embargo, muchos estudios en poblaciones pertenecientes al mismo grupo étnico pero que viven en diferentes condiciones han demostrado que la prevalencia de enfermedades alérgicas es mayor en los habitantes en países industrializados que en los que viven en áreas rurales o países subdesarrollados (Lancet, 1998; Nilsson et al., 1999).

La alergia al polen es una enfermedad muy frecuente, y más en zonas urbanas que en rurales, a pesar del hecho que las zonas verdes en las ciudades han ido disminuyendo progresivamente. Este hecho se ha relacionado con la contaminación, caracterizada por elevados niveles de dióxido de nitrógeno, ozono y otras partículas contaminantes que probablemente incrementaría la reactividad bronquial a aeroalérgenos (D'amato, 2000). Sin embargo, en países como China o en Europa del este, con elevadas concentraciones de estos contaminantes, la prevalencia de asma es baja y en otras áreas con bajo grado de contaminación como Nueva Zelanda, la prevalencia de asma es muy elevada, por lo que no habría que descartar otras causas.

Estudios previos han demostrado que los alérgenos del polen pueden interaccionar con componentes de la contaminación. Bien por adhesión a la superficie o por medio de partículas paucimicrónicas, los contaminantes atmosféricos pueden actuar como adyuvantes y aumentar la respuesta alérgica al polen (D'amato, 2000). También son capaces de absorber y transportar aeroalergénos, facilitando la sensibilización alérgica en pacientes predispuestos y el consiguiente desarrollo de enfermedades respiratorias alérgicas. Por otra parte, la liberación de sustancias pro-inflamatorias es significativamente mayor con pólenes que han sido recolectados en los márgenes de las carreteras con mucho tráfico, lo que indicaría que el grano de polen no sería sólo un receptáculo que transporta los alérgenos polínicos, sino que además podría contribuir *per se* a la activación de la mucosa respiratoria y ésta sería capaz a su vez de elevar su alergenicidad.

La alergia al polen de gramíneas es muy frecuente y recientes estudios indican que el 35% de jóvenes de muchos países tiene anticuerpos específicos a estos pólenes, pero sobre todo los pacientes que residen en medios urbanos (Burney et al., 1997; Armentia et al., 2001). Una posible hipótesis que explicara estos resultados podría ser que las gramíneas de las áreas rurales reciben menos daños que las mismas especies en las zonas urbanas, donde el césped está sometido a un ambiente contaminado, siegas repetidas que hacen que muy pocas espigas florezcan y pesticidas aplicados por los ayuntamientos. El continuo daño sobre las plantas puede causar una sobre-expresión de proteínas de estrés en el polen. Ya que parece que estas proteínas son alérgenos principales, parece razonable sugerir que el mismo polen puede ser mas alergénico en zonas contaminadas que en rurales.

Otro dato que diferencia a habitantes de ciudades y de medios rurales o poco industrializados es el tipo de vivienda.

2.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PÓLENES

Como cualquier célula, los pólenes se caracterizan por su tamaño y su forma. Pero en el caso de los granos de polen, hay otras características que los describen, como son la estructura y la escultura (ornamentación) de su exina y las aperturas que pueden presentar, de las que debe observarse el tipo (poros, colpos, la combinación de ambos o su ausencia), el número y la disposición en la superficie del grano. Las siguientes figuras resumen las características generales que permiten diferenciar los granos de polen (Belmonte y Roure, 2002).

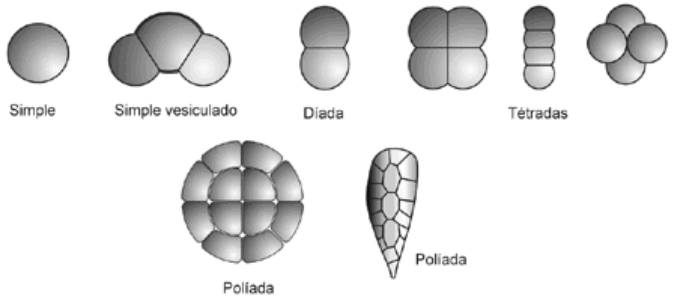


Figura 58. Tipos de polen.

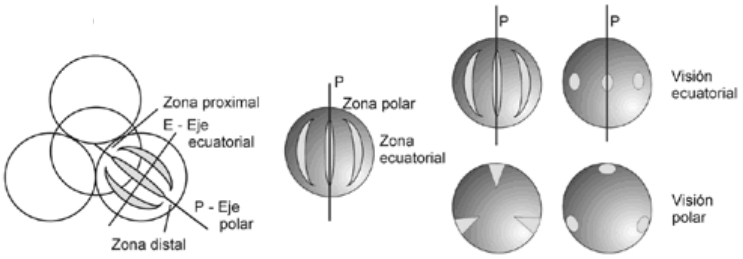


Figura 59. Polaridad.

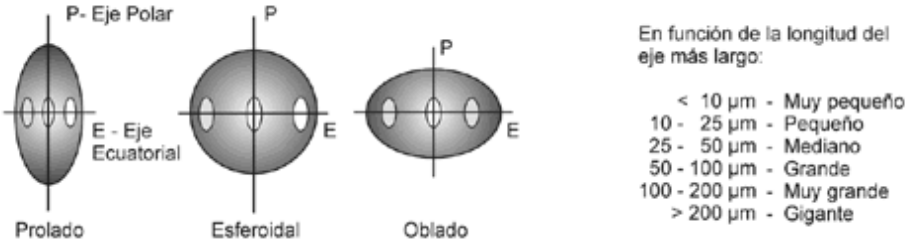


Figura 60. Formas y tamaño del polen.

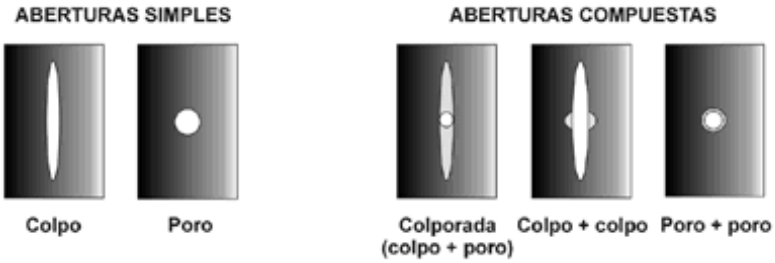


Figura 61. Tipos de aberturas.

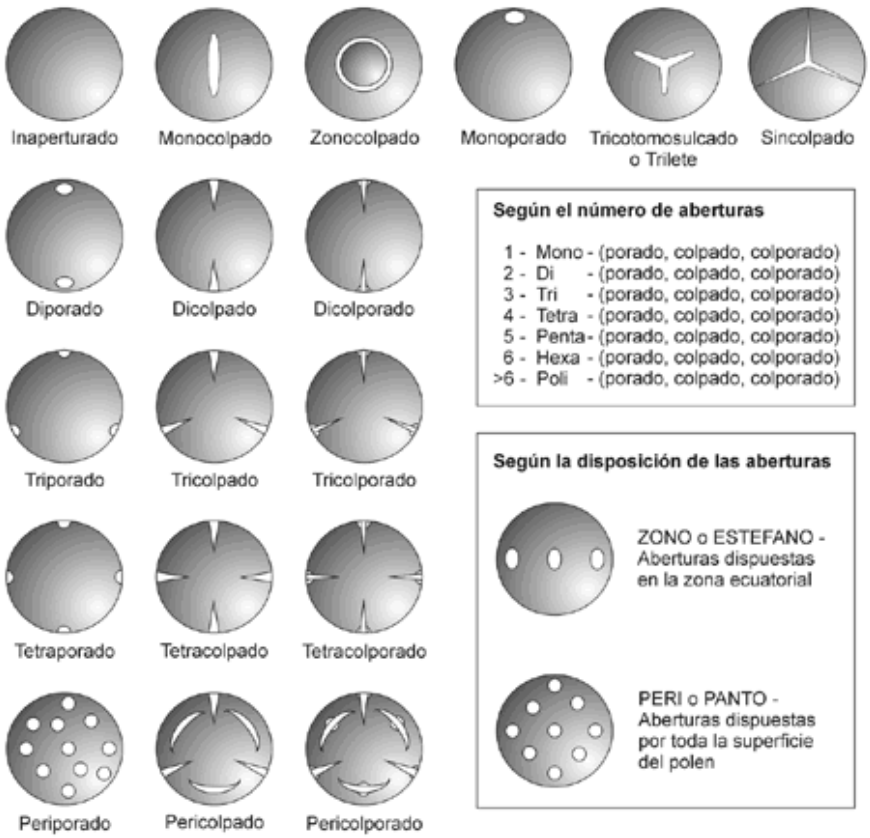


Figura 62. Tipos polínicos según el número y disposición de las aberturas.

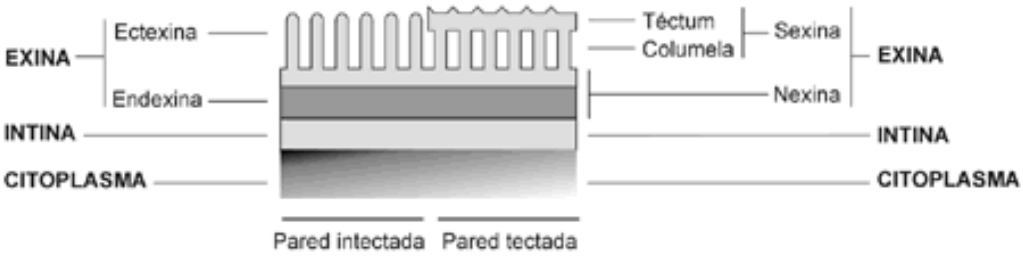


Figura 63. Estructura de la esporodermis (pared polínica).

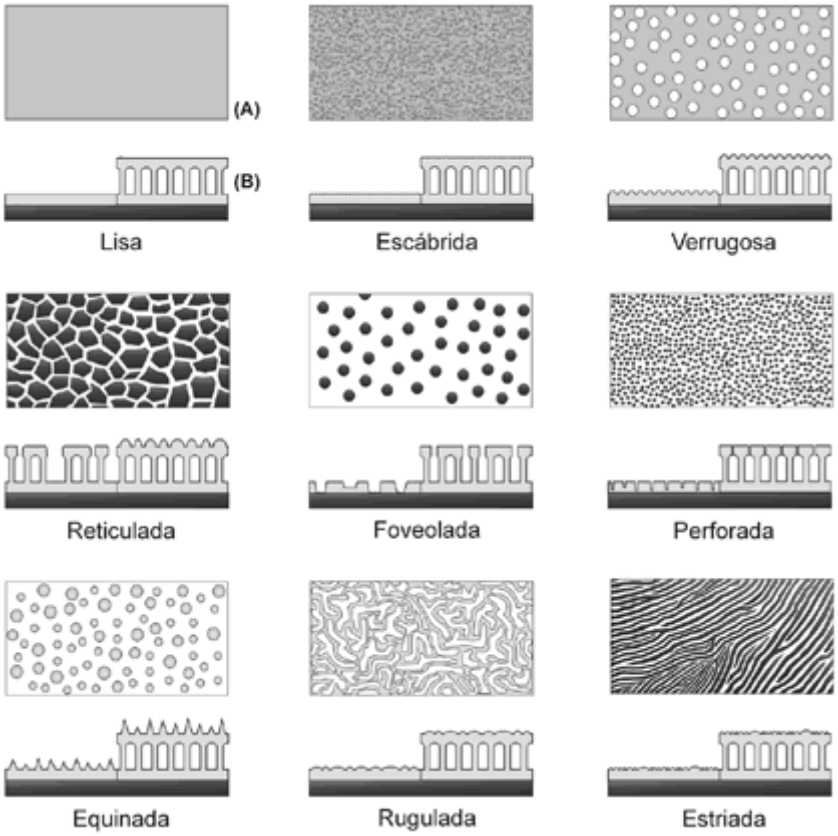


Figura 64. Ornamentación de la exina. (A) Visión de la superficie y (B) Sección transversal.

El conjunto de las características de un polen es constante para cada planta y hace posible identificar con más o menos precisión de qué taxón procede el polen, sin embargo no siempre puede identificarse de que especie procede el polen ya que en bastantes casos la precisión llega sólo al nivel de género, familia o incluso a un grupo de familias o categorías superiores.

2.4. CAPTACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PÓLENES.

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 (Belmonte, 2003).

Muchos investigadores han trabajado en el diseño de aparatos muestreadotes de la atmósfera para la recolección de pólenes y su cuantificación atmosférica llamados también captadores (Belmonte, 1988).

La elaboración de gráficas de concentraciones atmosféricas de pólenes en un área determinada resulta de gran importancia, ya que el proceso de polinización tiene grandes variaciones cualitativas según las diversas zonas evaluadas, dependientes de la vegetación del entorno (Munuera, 2004).

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 (Mandrioli et al., 1988; Belmonte y Roure, 2002), desde los simples portaobjetos untados con una sustancia 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. Se habla de muestreadores o de captadores de polen, para referirse a los aparatos que nos permiten hacer el muestreo, y de metodologías de estudio, para indicar el protocolo que se sigue en cada caso.

Muchos investigadores han trabajado en el diseño de aparatos muestreadores de la atmósfera, llamados también captadores, para fines aerobiológicos. A continuación se hará una breve presentación de los principios en que se basan y de los métodos que más se han utilizado (Belmonte, 1988; Mandrioli et al., 1988) para estudiar los pólenes y las esporas de hongos aerovagantes. La siguiente tabla contiene un esquema de los distintos tipos de captadores.

Tabla 4. Tipos de Captadores.

TIPO DE MUESTREADOR	TIPO DE CAPTACIÓN	NOMBRE DEL EQUIPO
Muestreadores de precipitación	Precipitación gravimétrica Precipitación electrostática Precipitación térmica	Placas de Petri Captador Durham Captador Tauber
Muestreadores de impacto	Impacto por succión Impacto en cascada Muestreadores inerciales y ciclónicos	Captador Hirst Captador Andersen Captador Rotorod Captador ciclónico
Muestreadores de filtración	Filtros sólidos Filtrado en medio líquido	Filtros de fibra Captador Cour Filtros por membrana Filtros por cassettes Captador McLeod MultiStage Liquid Impinger

2.4.1. Muestreadores de precipitación o gravimétricos

Los primeros captadores utilizados se basaban en el principio de la gravedad y consistían en superficies preparadas con substancias adhesivas o retentivas, expuestas horizontalmente como se muestra en la siguiente figura. A principios del siglo XX se usaban placas de Petri (Hesselman, 1919), céspedes compactos de musgos (Firbas, 1931) y portaobjetos (Wodehouse, 1935).

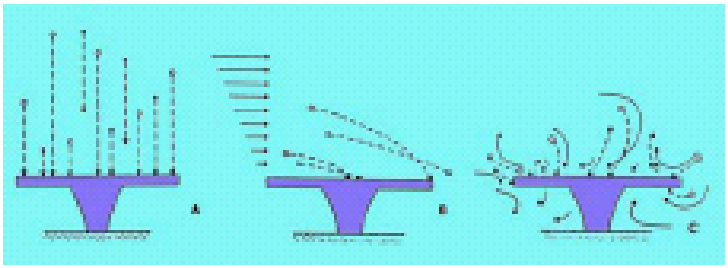


Figura 65. Portaobjetos.

Posteriormente se idearon soportes más adecuados, naciendo así los captadores Durham (Durham, 1946) y Tauber (Tauber, 1974). El prototipo es el Durham sampler, que consta de dos placas paralelas de 23 cm de diámetro, separadas por tres barras verticales de 7.5 cm de largo como se muestra en la siguiente figura. Sobre la placa inferior se coloca un portaobjetos, recubierto de una sustancia adherente y se expone durante 24 horas, para ser estudiada posteriormente al microscopio (Pagán et al., 2004).

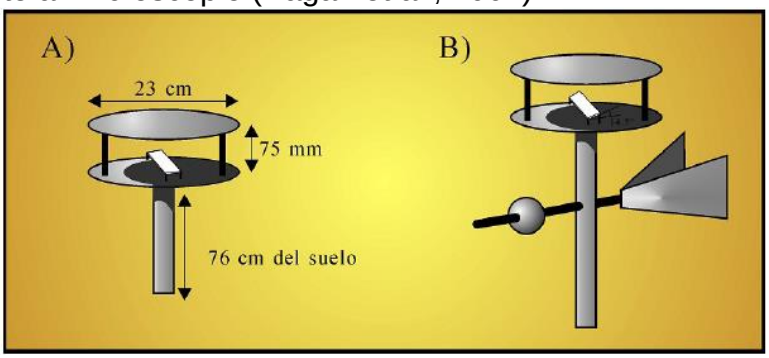


Figura 66. Esquema de captador gravimétrico Durham (A) y modificado por Pla Dalmau.

La medición es planimétrica (granos/cm^2). Este método es anticuado y presenta varios problemas:

- No da cifras por m^3 de aire.
- Es muy dependiente de la velocidad del viento y de la orientación de las muestras hacia la dirección del mismo.
- La turbulencia favorece el depósito de las partículas más pesadas.
- Los pólenes de pequeño tamaño no se captan.

2.4.2. Muestreadores de impacto

Buscando hacer más comprensibles los resultados, se idearon captadores que miden los pólenes por unidad de volumen de aire. Dado que las partículas son transportadas por el aire en trayectorias que pueden considerarse horizontales, se han diseñado captadores que, aprovechando la inercia de las partículas, propician el impacto de éstas en superficies untadas con substancias adhesivas, que las retendrán (Belmonte y Roure, 2002).

Así pues, estos muestreadores se basan en que la captación de las partículas empujadas por el viento es mayor que la que se obtiene mediante el depósito por la gravedad. Se requiere una superficie de impactación muy reducida, de tal forma que a menor superficie mayor grado de impactación. Pueden ser estáticos o rotatorios, conectados a un motor que gira a un número determinado de revoluciones por minuto (Munuera, 2004).

Están muy extendidos los muestreadores que se basan en el principio del impacto por succión mediante una bomba de vacío, que impulsa el aire aspirado contra la superficie receptora.

El captador de este tipo más universalmente utilizado fue el ideado por Hirst, aunque también son muy utilizados una variante de los iniciales captadores por succión que se llaman captadores en cascada (May, 1945) como lo es el captor de Andersen que se muestra en la siguiente figura. En este caso, el aire succionado hacia el interior del captador pasa a través de una o más superficies receptoras que retendrán selectivamente las partículas en función del tamaño de éstas (Belmonte y Roure, 2002).

Figura 67. Esquema de muestreador Andersen con 6 pisos de recogida de partículas.

Hay aún otro tipo de captadores por impacto, los basados en la rotación que son los muestreadores inerciales y ciclónicos. En función de los muestreadores inerciales el más conocido es el Rotorod (Perkins, 1957) que se muestra en la siguiente figura. Este captador, de reducidas dimensiones, dispone de dos brazos en forma de U en los que se insertan las superficies receptoras. Al girar a gran velocidad por acción de un motor, interceptan las partículas; dispone además de un temporizador, que hace que la toma de muestras sea intermitente, evitando así la sobrecarga de las zonas de impactación y presenta los mismos inconvenientes de los métodos gravimétricos. Este tipo de captador es ampliamente usado en América del Norte (Belmonte y Roure, 2002).

Figura 68. Muestreador Rotorod. Impacto por rotación mecánica.

Otros muestreadores de este grupo, menos conocidos, son los ciclónicos que se muestra en la siguiente figura. En ellos, las masas de aire son forzadas a moverse en trayectorias de rotación o en espiral y las partículas resultan discriminadas por la fuerza centrífuga generada. Los captadores basados en impacto por rotación son útiles para recolectar partículas de unos 10 micrómetros de diámetro (Mandrioli et al., 1988).

Figura 69. Muestreador ciclónico de Burkard. Impacto por rotación de la masa de aire.

Y por ultimo un captador Hirst (Hirst, 1945) como se muestran en la figura 15 y 16, es un muestreador de impacto por succión que consiste en un aparato eléctrico que aspira volúmenes constantes y conocidos de aire y los hace impactar contra la superficie receptora. Ésta es una cinta plástica de 19 mm de ancho que se dispone tensada alrededor de una pieza cilíndrica llamada tambor. Para darle la capacidad de adherir y retener las partículas, se deposita sobre la cinta una fina película de aceite de silicona, usando un pincel. La disposición del tambor así preparado en el interior del captador es tal que, impulsado por mecanismo de relojería, gira continuamente a razón de 2mm/hora. Ello hace que las partículas impulsadas contra la superficie receptora queden retenidas de forma secuencial como se muestra en la figura 13. Una vez a la semana se sustituye la superficie receptora. La ya expuesta, es cortada en los fragmentos correspondientes a cada día de la semana. Cada fragmento es montado en una preparación microscópica, teñido y fijado y es analizado al microscopio óptico. El análisis microscópico de las muestras procedentes de un captador Hirst se hace sobre el material tal como se obtiene, es decir, con las partículas bióticas llenas y junto con otras partículas, minerales y orgánicas, cosa que puede dificultar su identificación pero que tiene como muy positivo que no estropea las esporas de hongos. También es interesante en este método que, debido al hecho que las partículas se van depositando secuencialmente sobre una cinta que avanza regularmente, es posible obtener resultados con precisión horaria, aunque el volumen de trabajo añadido que esto comporta hace que no se prodiguen demasiado estos resultados (Belmonte y Roure, 2002).

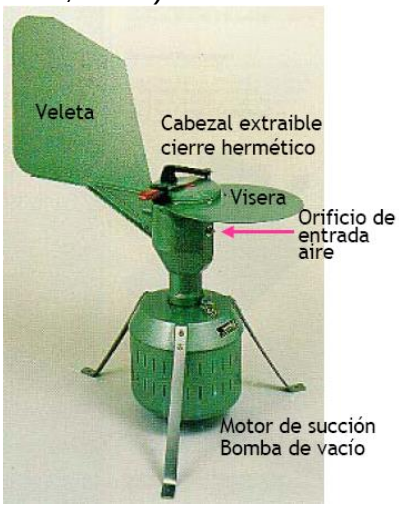


Figura 70. Muestreador Hirst. Impacto por succión.

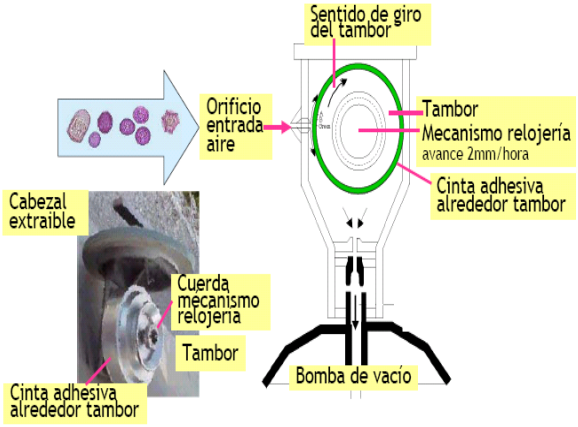


Figura 71. Partes de un Muestreador Hirst.

Los resultados que se obtienen de un captador Hirst son concentraciones medias diarias de pólenes y esporas (pólenes/m^3 y esporas/m^3) (Belmonte, Roure, 2006).

Para obtener estos valores basta realizar un simple cálculo matemático en el que intervienen como factores:

- El número de partículas contadas (n).
- La superficie de muestra analizada. Para calcularla se necesita conocer el número (n) de líneas contadas, su longitud (K2) y anchura (K3) (ambas dependen del microscopio y del objetivo que se use en la lectura). Con estos parámetros se calcula la proporción analizada respecto de toda la superficie útil de la preparación microscópica (K4).
- El volumen de aire que aspira el captador, normalmente 10 L/minuto, que al cabo de un día equivalen a 14,4 m^3 de aire (K5).

Muchos de los parámetros se mantienen constantes (mientras no se cambie de microscopio u objetivo y se siga una rutina de contaje), de manera que es habitual tenerlos establecidos para que la operación de conversión de los datos brutos diarios a concentraciones medias diarias quede reducida a una simple multiplicación entre una constante y el número de partículas detectadas (Belmonte y Roure, 2006).

La fórmula a aplicar es:

$$\text{Concentración media semanal} = K \times N$$

- Donde K es una constante que incorpora todos aquellos valores fijos cuando la metodología se aplica siguiendo siempre la misma rutina (K1 a K5).

El captador Hirst es el que se ha adoptado más universalmente, especialmente en el continente europeo, para el estudio de los pólenes y las esporas atmosféricas desencadenantes de alergias respiratorias (Belmonte y Roure, 2002).

2.4.3. Muestreadores de filtración

Otro grupo de captadores lo constituyen aquellos que funcionan por filtración y se basan en la selección de las partículas contenidas en el aire en función de su tamaño. Para ello, se hace pasar el aire a través de membranas de materiales diversos o a través de una superficie fibrosa o porosa de 400 cm^2, que será o no atravesada dependiendo de su tamaño (Belmonte y Roure, 2002).

El método original, que posteriormente a sufrido numerosas modificaciones, fue ideado por Cour (Cour, 1974) en 1974 como se muestra en la figura 17. En él, el aire atraviesa un cuadrado formado por cinco capas de gasa impregnada en silicona que está montada sobre un bastidor metálico. El sistema está montado sobre un dispositivo móvil dotado de una veleta o timón, que hace que la superficie de la gasa se oriente al viento dominante, capturando el polen aerovagante. Este aparato puede completarse con una gasa horizontal que recoge el polen que se deposita por efecto de la gravedad (Munuera, 2004).

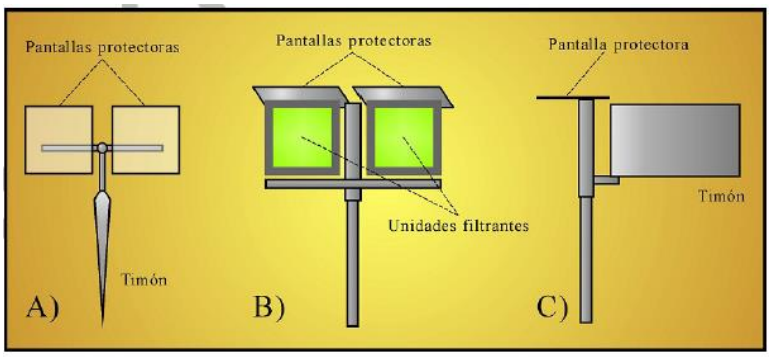


Figura 72. Esquema del captor Cour. (A) Vista superior, (B) Frontal y (C) Lateral.

Ampliando la descripción, un captador Cour (Cour, 1974) como se muestra en la figura 18, es un muestreador por filtración que consiste en un eje perpendicular al suelo, que sostiene, encajado en su extremo superior, un eje perpendicular capaz de girar 360º. En un extremo de este eje hay dos marcos protegidos, cada uno, por una visera y, en el otro, una veleta (que lo orienta siempre según el viento dominante). Levantando las viseras de los marcos se puede encajar la superficie que interceptará las partículas aerotransportadas, un filtro preparado con cinco pliegues de gasa hidrófila untados con una mezcla de aceite de silicona y rodeado por un marco de plástico. Este filtro es cuadrado y mide 20 cm de lado. En el captador se exponen dos filtros: uno se cambia una vez por semana, normalmente los lunes, y el otro se usa como contrapeso y como resumen mensual. El filtro retirado del captador se somete a un tratamiento que combina procesos químicos (ácidos sulfúrico, fluorhídrico...) con físicos (centrifugaciones, decantaciones...) para obtener un sedimento formado, mayoritariamente, por los pólenes y las esporas retenidos. Para poder medir este sedimento con precisión y prepararlo para el análisis al microscopio óptico, se incluye en una matriz semilíquida de glicerogelatina, de la que se estudiará una porción representativa. La consistencia semilíquida del medio en que se encuentran las partículas y el hecho de que el tratamiento incluye la acetolisis (Erdtman, 1960), es decir, la eliminación de las partes blandas de la célula mediante una digestión química, facilita la identificación de los granos de polen. Hay que señalar, en contrapartida, que algunas esporas de hongos se rompen y no pueden ser estudiadas con precisión con esta

metodología, ya que se obtienen valores por debajo de los reales. Si se quiere obtener una lectura representativa de una muestra Cour deben seguirse las indicaciones propuestas al describir la metodología (Cambon, 1981; Gros, 1984).

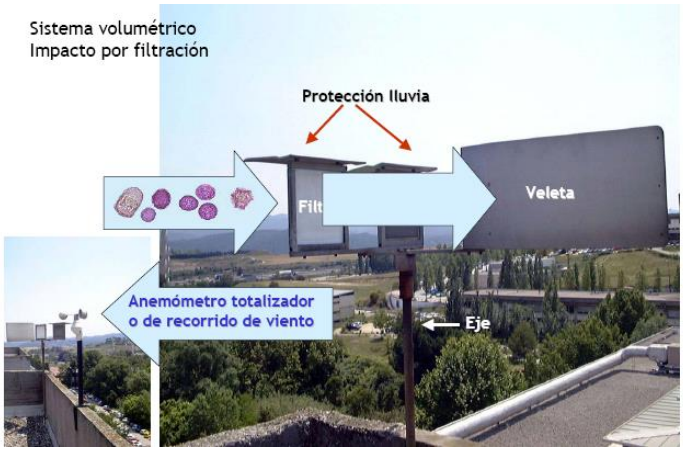


Figura 73. Muestreador Cour.

Cuando se trabaja con un captador Cour, es necesario disponer de un anemómetro totalizador, aparato dotado de unas cazoletas, que giran impulsadas por el viento reinante, conectadas a un cuentakilómetros. Este aparato registra los metros equivalentes al espacio recorrido por el aire que pasa a través de sus cazoletas. La medida del recorrido de viento correspondiente al periodo de exposición de un filtro hace posible interpretar la cantidad de pólenes y esporas contados por unidad de volumen (se considera que los pólenes y esporas estaban en el interior de un prisma que tiene por base el filtro de 20x20 cm^2 y por altura la columna de aire que ha pasado durante la exposición) (Belmonte y Roure, 2002).

Para obtener el valor de la concentración media semanal de partículas debemos hacer cálculos matemáticos en los que intervienen:

- El número de partículas contadas (N).
- La proporción de sedimento analizado [siempre 50 micrólitros (K1)] respecto del volumen total de sedimento semilíquido (V) obtenido al final del tratamiento.
- La proporción de filtro tratado (S) respecto a la superficie total del filtro (400 cm^2), ya que una parte de él se guarda como testimonio por si fuera necesario repetir el tratamiento.
- La superficie de muestra analizada al microscopio óptico. Para calcularla se necesita conocer el número (n) de líneas contadas y su longitud (K2) y anchura (K3) (ambas dependen del microscopio y del objetivo que se use en la lectura). Con estos parámetros se calcula la proporción analizada respecto de toda la superficie útil de la preparación microscópica (K4).
- El recorrido de viento registrado durante el periodo de exposición (Rv).

La combinación de estos factores, multiplicativos y cocientes según los casos, da lugar a una fórmula matemática que, aplicada a los datos brutos correspondientes a cada semana, nos permite obtener el valor de la concentración media semanal.

La fórmula a aplicar (Belmonte, 1988) es:

Concentración media semanal = K x (N x V / n x S x Rv)

- Donde K es una constante que incorpora todos aquellos valores fijos cuando la metodología se aplica siguiendo siempre la misma rutina (K1 a K4).
- Debe tenerse la precaución de utilizar las unidades de medida oportunas (V debe expresarse en micrólitros; S en metros cuadrados y Rv en metros)

Por tanto, los resultados que se obtienen a partir de un captador Cour son concentraciones medias semanales de pólenes y esporas (éstas, como ya se ha indicado, infraestimadas por la inevitable destrucción de parte de ellas durante la preparación de las muestras).

De entre todos los captadores presentados hasta ahora, los más utilizados en Europa en estudios destinados a conocer la composición en pólenes y esporas de la atmósfera son el Cour y, muy especialmente, el Hirst (Belmonte y Roure, 2002).

2.5. MUESTREADOR DE ALTO VOLUMEN (HV)

El muestreador de alto volúmen es uno los equipos más utilizados para el muestreo activo de partículas. Consta básicamente de:

- Una bomba de vacío
- Marco de sujeción del filtro
- Un registrador del flujo (*o un dispositivo de medición del flujo en general*)
- Un controlador del tiempo

Todo esto se halla cubierto con una coraza de protección como se muestra en la siguiente figura (Sbarato et al., 1999).

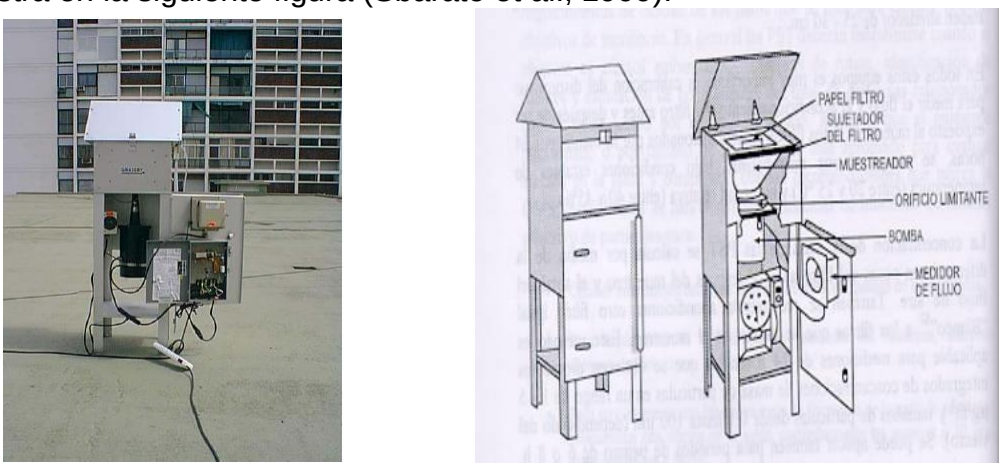


Figura 74. Equipo de Alto Volumen (HV).

En este método de muestreo, el aire es obligado a pasar por un filtro de baja resistencia (generalmente de fibra de vidrio o celulosa) con un flujo de cerca de 1.5 m^3/min (aproximadamente 2000 m^3 /día). La entrada al ducto y el medio de colección miden alrededor de 25 - 30 cm.

En estos equipos es muy importante la calibración del dispositivo para medir el flujo y el acondicionamiento del filtro antes y después de ser expuesto al muestreo. Estos filtros ya acondicionados por lo menos por 24 horas, se pesan en una microbalanza bajo condiciones estables de temperatura (entre 20 y 25 °C) y humedad relativa (entre 40 y 45 %) (Sbarato et al., 1999).

La concentración de la masa de las partículas suspendidas totales (PST) se calcula por medio de la diferencia en pesos del filtro antes y después del muestreo y el total del flujo de aire. Este método es aplicable para mediciones de 24 h. en las que se obtienen promedios integrados de concentraciones de masa de partículas. Se puede aplicar también para periodos de tiempo de 6 o 8 h. cuando se presentan altas concentraciones de partículas.
Otro factor que se tiene que tomar en cuenta en el muestreo de partículas, es la selección del filtro. La selección del tipo de filtro que debe utilizarse depende del tipo de muestreo que se está llevando a cabo y de sus subsecuentes análisis químicos y físicos.

Para ésta medición se aplica el método de muestreo de Alto Volumen (HV), establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-035-SEMARNAT-1993. En este método, un muestreador de aire succiona a través de un filtro, una cantidad determinada de aire ambiente hacia el interior de una caseta o coraza de protección, durante un periodo de muestreo de 24 horas. El flujo de aire y la geometría del muestreador deben ser tales que favorezcan la recolección de partículas.
El volumen total de aire muestreado, corregido a condiciones de referencia, se determina a partir del aire medido y del tiempo de muestreo. La concentración de partículas suspendidas en el aire se calcula dividiendo la masa de las partículas recolectadas entre el volumen de aire muestreado y se expresa en microgramos por metro cúbico (Sbarato et al., 1999).

2.6. TRABAJOS DE CAPTACION DE POLEN

2.6.1. COLECTOR DE POLEN EN LA CORDILLERA DE LOS ANDES

Para interpretar los registros polínicos presentes y pasados es útil conocer las variaciones estaciónales e interanuales en la concentración del polen ambiental. Las interpretaciones polínicas pueden ser aun más precisas, si cotidianamente se puede establecer la procedencia (dirección) predominante del polen.
Tradicionalmente, en estas regiones la captación del polen ambiental se realiza mediante pantallas captadoras (Cour, 1974). Este procedimiento constituye una difícil tarea cuando la determinación de la concentración del polen ambiental debe realizarse en lugares muy remotos y de difícil acceso como lo son los parajes de la alta Cordillera de Los Andes como se muestra en la siguiente figura (Suarez, 2002).

Figura 75. La Quebrada Benjamín Matienzo cubierta. En primer plano, anemógrafo y captador de polen instalados en las nacientes del Río de Las Cuevas, a 4.500 m sobre el nivel del mar.

Por las razones anteriormente expuestas se diseñó un instrumento captador del polen ambiental. Dadas las condiciones climáticas imperantes en la Alta Cordillera y el difícil acceso a la misma, el aparato fue diseñado para tener una autonomía de 30 días. Tiene además resistencia frente a los fuertes vientos y tormentas cordilleranas, así como a temperaturas bajas y granizadas.
El colector de polen consta de un conjunto selector de la dirección del viento, con un núcleo central de captación que posee 8 canales o entradas, abarcando un ángulo de 15° en cada dirección. La circulación del aire en el sistema selector se realiza en una sola dirección, mientras que las entradas y salidas restantes se mantienen cerradas. De este modo se evita la contaminación de los restantes canales. El sistema de captación consta de treinta plaquetas. Cada plaqueta tiene 8 ventanas de 70 mm^2. En cada una de las ventanas se coloca un porta-vidrio recubierto con una fina película de grasa siliconada. La grasa actúa como agente de retención del polen, las esporas y otras micropartículas dispersadas por el viento. Las plaquetas son automáticamente reemplazadas cada 24 horas. El sistema de carga y depósito de las plaquetas es cerrado y elimina toda posibilidad de contaminación. Es recomendable instalar un anemógrafo sincronizado en tiempo y dirección con el Colector de Polen. De este modo es posible correlacionar la concentración y procedencia del polen ambiental con las direcciones y velocidades de los vientos (Suarez,2002).

2.6.2. METODOLOGÍA PARA EL ANALISIS DE SEDIMENTOS

El objetivo ha sido el estudio detallado de los 21.86 m de un sondeo realizado en las cercanías de la Laguna Permanente del Parque Nacional de las Tablas de Daimiel (Andrade y Gomez, 2007).
Las muestras que se obtuvieron como se muestra en la figura 21 fueron tratadas químicamente en el Laboratorio de Palinología de La Universidad de Alcalá, mediante un protocolo obtenido tras sucesivas modificaciones del inicialmente propuesto por Sittler (1955).

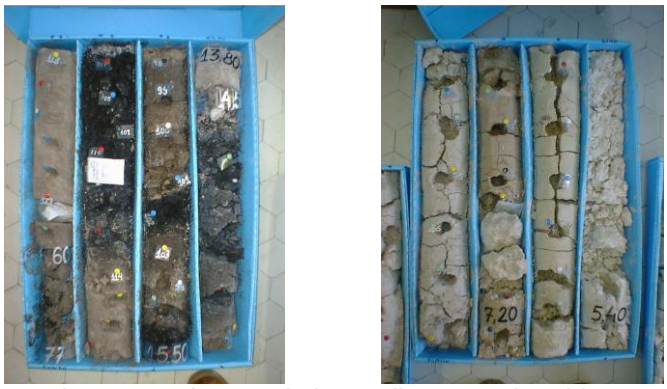


Figura 76. Algunos de los sedimentos obtenidos.

Este protocolo se basa en el tratamiento de los sedimentos por medio de ácidos y álcalis para la extracción de los granos de polen; posteriormente, se ha sometido al residuo a técnicas de enriquecimiento. La concentración de los granos de polen se realiza mediante la flotación de éstos en un líquido de alta densidad. El licor denso utilizado ha sido el licor de Thoulet preparado según Girard y Renault-Miskovsky (1969), con una densidad mayor de 2. El protocolo de aislamiento y concentración de los granos de polen en sedimentos que se ha utilizado es el mostrado en la tabla 2 (Andrade y Gomez, 2007).

Tabla 5. Protocolo para la concentración de granos de polen en sedimentos.

PROCESOS	OBJETIVOS
Pesar 10 a 20 g de sedimento, según el contenido en detríticos.	
Añadir HCl al 35% hasta cubrir la muestra y agitar hasta que pare la reacción	Disolución de los carbonatos que compactan la muestra para una mejor disgregación de la misma.
Filtrar por una malla de 250 µm.	Eliminación de material detrítico de tamaño de grano >250 µm
Centrifugar a 2.500 r.p.m. durante 5' y eliminar el sobrenadante	
Lavar con agua destilada y volver a centrifugar. Este proceso junto al anterior lo abreviaremos como "Centrifugar y lavar".	
Añadir 30-40 ml de NaOH al 10 %. Dejar reaccionar 10-15'.	Digestión de la materia orgánica.
Lavado con agua destilada caliente y centrifugar. Se repite tantas veces como sea necesario hasta que el sobrenadante quede limpio.	
Añadir 35 ml de licor denso (Thoulet) y agitar la muestra mediante agitador eléctrico durante 30'.	Disgregación de la muestra y separación de los granos de polen de los restos de sedimentos a los que estén adheridos.
Centrifugación durante 4' a 2,000 revoluciones por minuto (r.p.m.).	En el licor denso (densidad > 2) los granos de polen, libres en la muestra, son capaces de flotar.
Filtración del sobrenadante a través de filtros de fibra de vidrio, mediante Bomba de Vacío.	Separación de los granos de polen y recuperación del Thoulet para su reutilización.
Añadir FH al 48% y dejarlo actuar 4 horas.	Disolución de los filtros de fibra de vidrio y eliminación de los silicatos que puedan quedar en el residuo.
Centrifugar y lavar.	
Añadir ClH al 35%. Dejarlo actuar durante 15'.	Disolución de los fluorosilicatos formados en el paso anterior.
Centrifugar (3500 r.p.m.) y lavar con agua destilada caliente.	
Lavado con alcohol de 96°.	Deshidratación de los granos de polen.
Añadir glicerina, un volumen igual al residuo obtenido.	Conservación y relleno artificial de los granos de polen.

III. OBJETIVO

Desarrollar una metodología para la extracción de granos de polen, captados en filtros de fibra de vidrio por el método de muestreo de alto volumen.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. METODO DE MUESTREO

En el desarrollo del método se utilizaron muestras de partículas ambientales colectadas en un estudio previo (Campos, 2006). 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 2.2 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 USEPA IO.2.1 (USEPA, 1999) y la Norma Mexicana NOM-035-SEMARNAT-1993 (SEDESOL-INE, 1993). 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.

4.2. EXTRACCION DEL POLEN

Para la obtención de la metodología propuesta, 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 que se realizaron para lograr el procedimiento finalmente propuesto, se describen ampliamente en el capitulo de Resultados y Discusión.

Para asegurar la presencia de polen en las muestras, se adicionó una pequeña cantidad de muestras de flores de *Gomphrena sonorae* (familia Amaranthaceae), *Verbesina enceliodes* (familia Astreracea), *Ibiscus hibridus* (familia Malvaceae), *Tagetes hibridus* (familia Asteraceae) y *Paulawnia tomentosa* (Familia Bignoniaceae), colectadas en un estudio paralelo a éste (Aguirre y Muñoz, 2009).

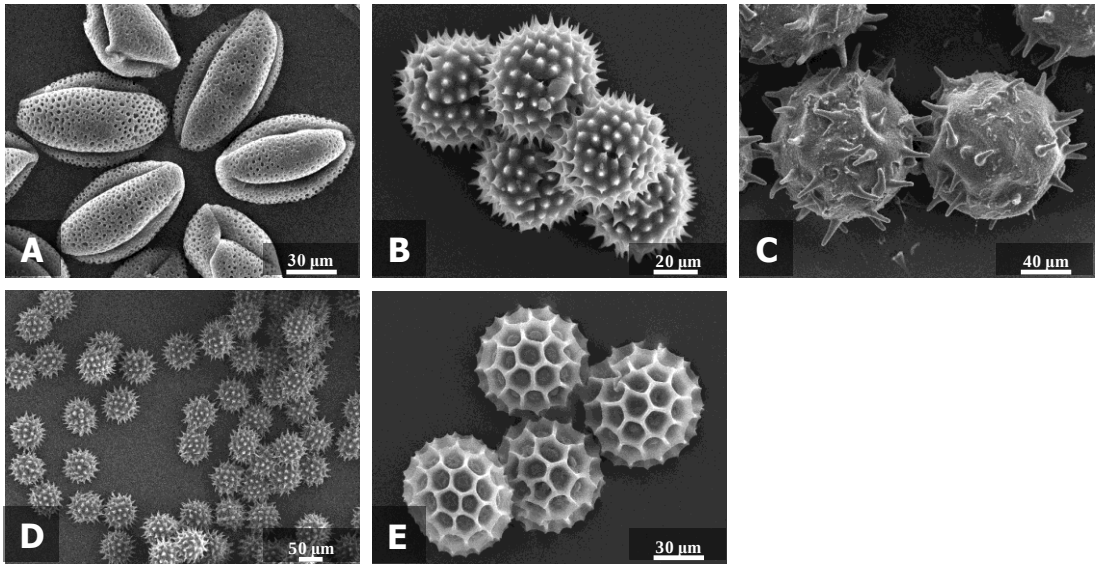


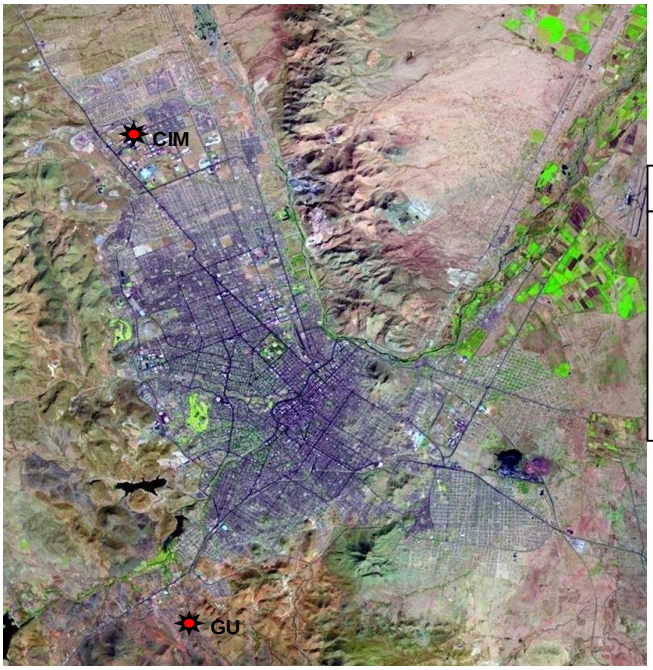
Figura 77. Muestras de flores utilizadas. A. *Gomphrena sonorae*, B. *Verbesina enceliodes*, C. *Ibiscus hibridus*, D. *Tagetes hibridus* E. *Paulawnia tomentosa*,

Los reactivos utilizados fueron ácido clorhídrico (HCl) al 37%, ácido nítrico (HNO_3) al 10%, ácido fluorhídrico al 40% grado analítico (J.T. Baker), hidróxido de sodio (NaOH) al 10% (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).

Para evaluar la utilidad del método propuesto, se utilizaron 30 filtros colectados en dos sitios de la ciudad (Figura 23), a los cuales no se les adicionó polen, y se siguió la misma metodología.



Sitio	Localización	Característica
CIM	Av. Miguel de Cervantes Complejo Industrial Chihuahua	Parque Industrial, zona residencial aledaña
GU	Al Suroeste de la ciudad	Zona suburbana, con baja densidad poblacional

Figura 78. Localización de los puntos de muestreo en la ciudad de Chihuahua.

4.3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (MEB)

Las membranas de PC 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 y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las muestras fueron recubiertas mediante la técnica de “sputtering”, con una lámpara de recubrimiento (Denton Vacuum, DESK II) durante 30 segundos con una película de oro de un espesor de 70 nm.

Se tomaron micrografías de los granos de polen encontrados a diferentes magnificaciones con un MEB (Jeol JSM-5800LV), con un voltaje de aceleración de 10keV, al alto vacío y electrones secundarios.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. DESARROLLO DEL METODO

5.1.1. ETAPA 1

La primera prueba realizada fue la adaptación del 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 SEMARNAT IO 2.1).

Los filtros fueron cortados en cuadros de 2x2 cm aproximadamente 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 ^{o}C. Posteriormente se puso el vaso 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 de esta manera 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 24), 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 por muestra.

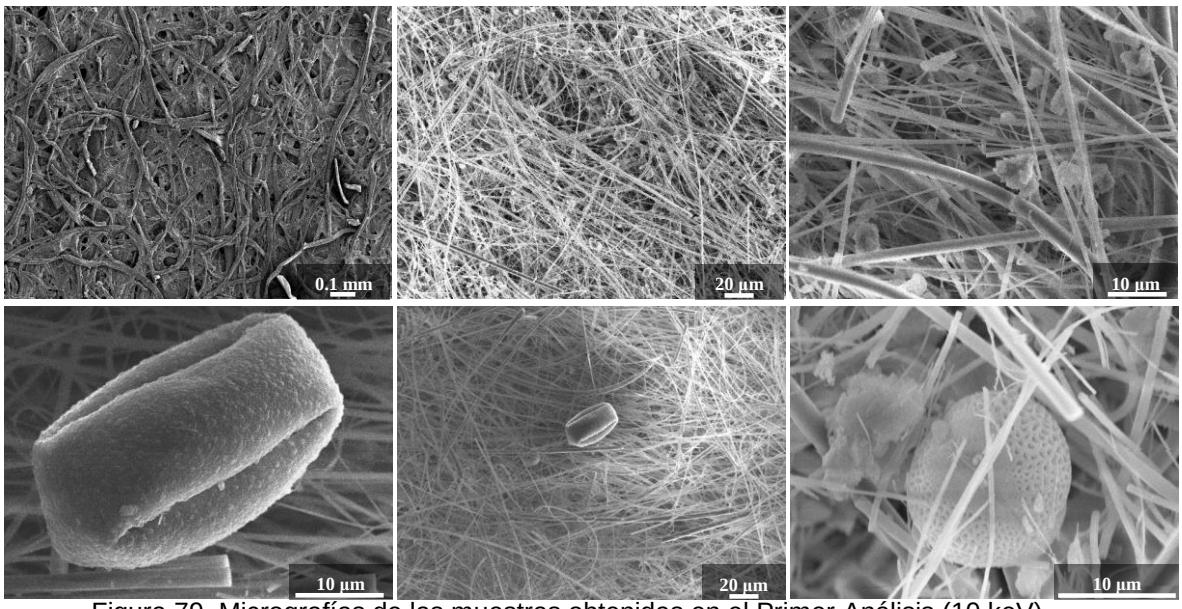


Figura 79. Micrografías de las muestras obtenidas en el Primer Análisis (10 keV).

Por otro lado, se pudieron observar en el MEB ondulaciones en papel utilizado para filtrar y soportar la muestra, lo cual también dificulta la búsqueda del polen y el enfoque adecuado para obtención de las micrografías.

5.1.2. ETAPA 2

En una etapa posterior se opto por cambiar el tipo de filtro, por lo que se utilizaron filtros de policarbonato. 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 policarbonato contienen poros uniformes, preferentemente 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.

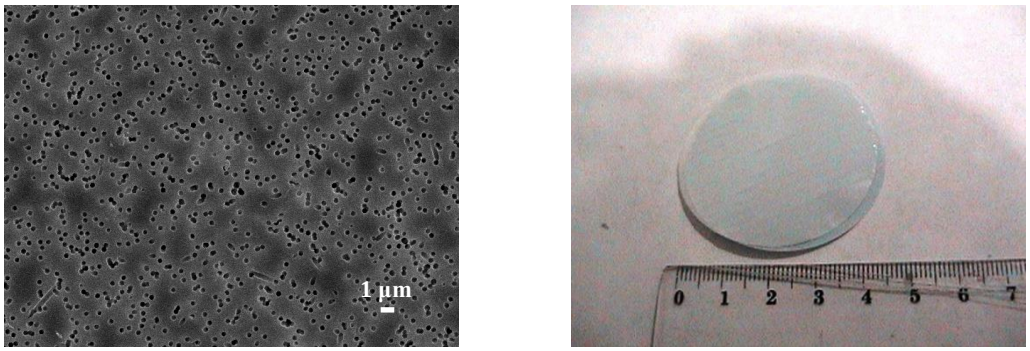


Figura 80. Superficie del filtro de policarbonato.

De esta manera se observaron de mejor manera 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 (figura 27).

Este problema se solucionó al utilizar una bomba de vacío para el filtrado y reduciendo el diámetro del filtro (11 mm), lo cual aparte disminuye el tiempo de análisis en el MEB al tener que barrer una superficie significativamente menor.

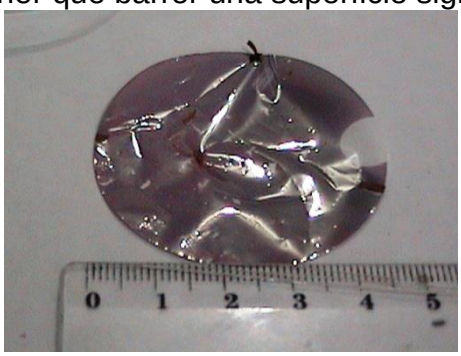


Figura 81. Filtro de policarbonato después de perder la muestra que se había filtrado con anterioridad.

También se adicionaron 40 mL de ácido nítrico (HNO_3) a la solución para ayudar a la eliminación de materia orgánica, y 40 mL de HF para eliminar las fibras de fibra de vidrio. Esto ayudo a disminuir el grosor de la muestra y poder ver con más claridad las imágenes. Sin embargo, se observó que este procedimiento dañaba seriamente la estructura de la mayoría de los granos de polen (figura 31).

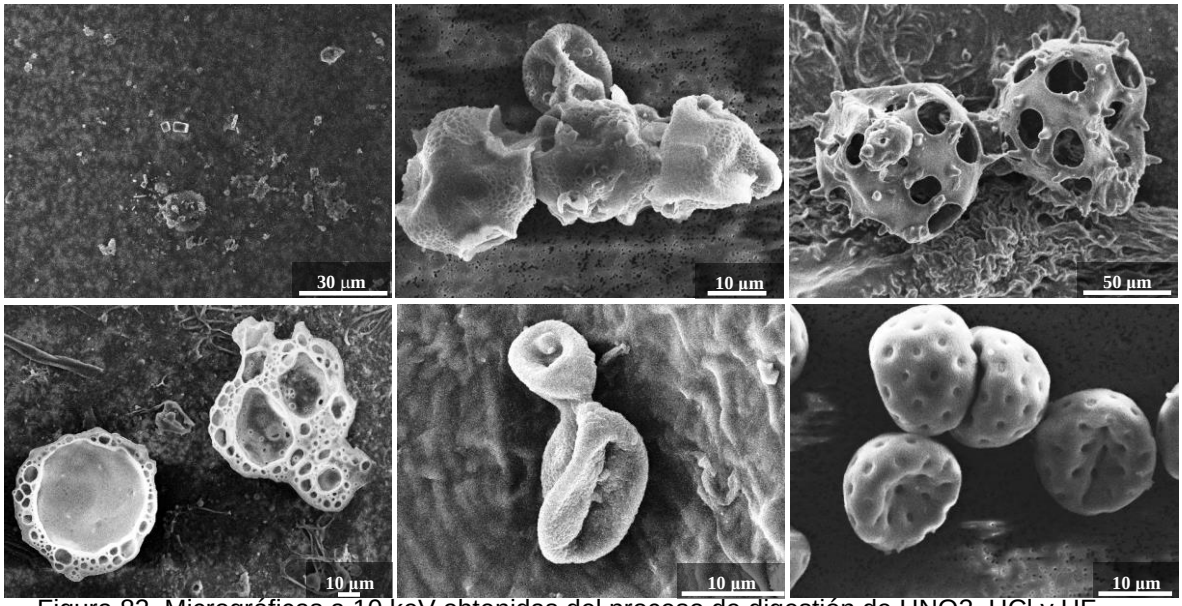


Figura 82. Micrográficas a 10 keV obtenidas del proceso de digestión de HNO3, HCl y HF.

5.1.3. ETAPA 3

Se tomó la mitad de cada uno de los filtros de FV y se cortó en tiras de 1 cm aproximadamente. Estas tiras fueron introducidas a viales de polipropileno de 40 mL y se adicionó una pequeña cantidad el polen de las muestras de flores.

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, mientras que a temperaturas mayores los granos de polen sufren daños en su estructura (figura 27).

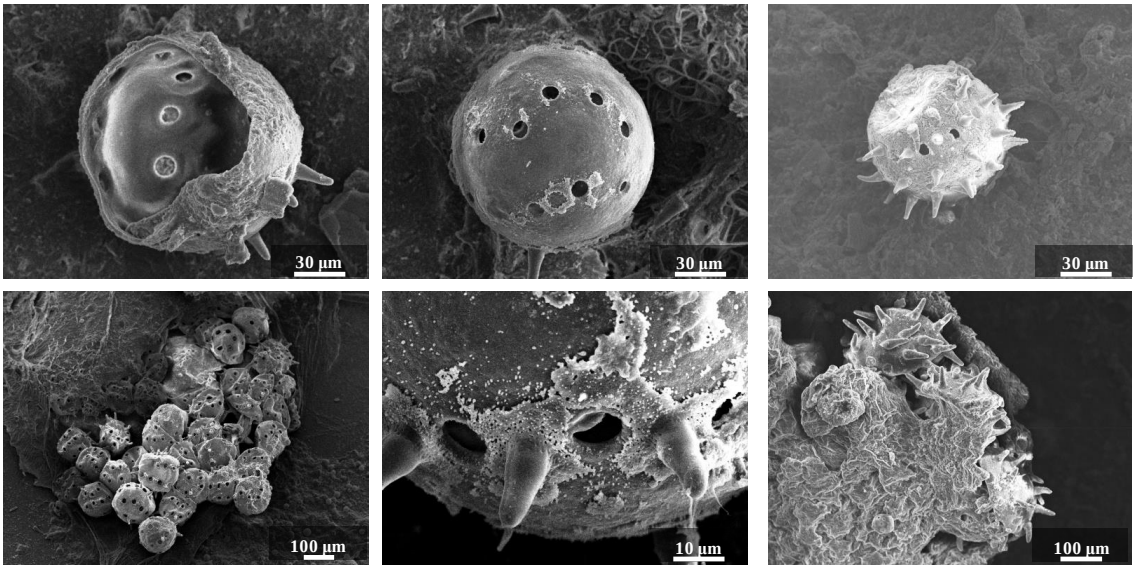


Figura 83. Granos de polen con su estructura dañada.

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 (pastilla) fueron lavados con 80 mL de agua destilada por dos ocasiones para eliminar los residuos de HCl. El sobrenadante fue decantado nuevamente.

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

La muestra fue filtrada en las membranas de PC de 11 mm de diámetro. Para eliminar las fibras de vidrio residuales, se añadieron lentamente sobre la membrana y 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.

La figura 28 muestra el resultado obtenido con esta metodología en filtros adicionados con polen.

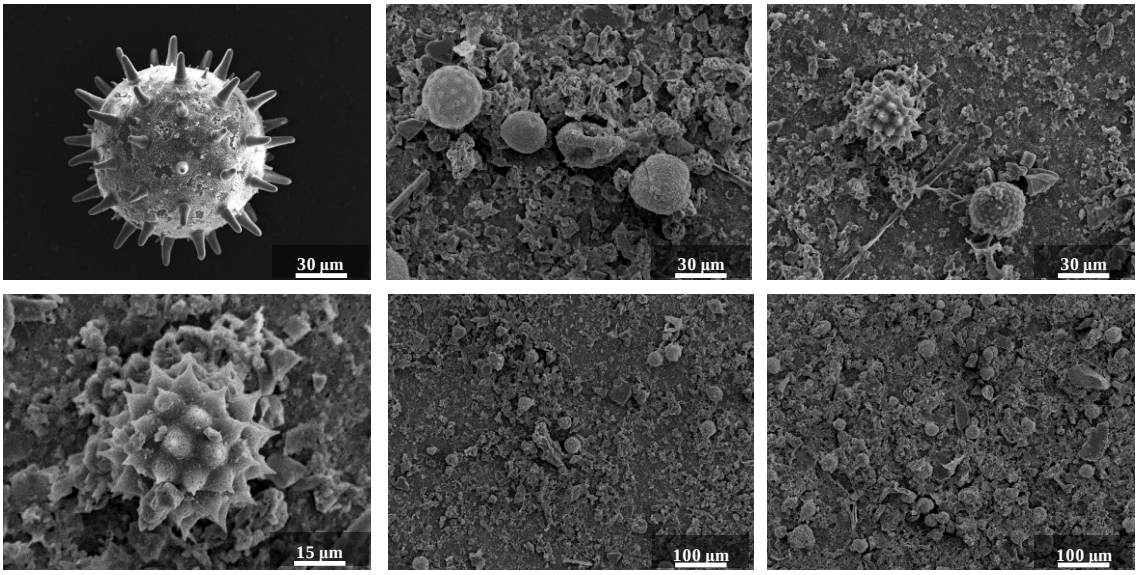


Figura 84. Polen extraído del método propuesto.

5.2. EVALUACION DE LA UTILIDAD DEL METODO

Para evaluar la utilidad del método propuesto, se utilizaron filtros de fibra de vidrio con muestras de PST a los niveles de concentración usualmente encontrados, colectadas en la ciudad de Chihuahua. A estas muestras no se les adicionó polen, y se siguió la misma metodología anteriormente descrita.

La extracción de polen de estas muestras dio buenos resultados. Se lograron obtener micrografías de los pólenes aerovagantes capturados en los filtros, los cuales además no sufrieron daños considerables en su morfología. Mediante estas imágenes, los pólenes pueden ser fácilmente identificables por los palinólogos expertos.

En la tabla 3 se muestran los filtros a los cuales se les extrajeron los granos de polen.

Tabla 6. Filtros muestreados con sus características.

Número de filtro	Etiqueta del filtro	Ubicación del filtro Muestreado	Tipo de partícula	Fecha de muestreo
1	391	CIMAV	PST	21/Febrero/05
2	403	GU	PST	21/Febrero/05
3	481	CIMAV	PST	28/Abril/05
4	493	GU	PST	28/Abril/05
5	439	CIMAV	PST	10/Abril/05
6	450	GU	PST	10/Abril/05
7	466	CIMAV	PST	22/Abril/05
8	478	GU	PST	22/Abril/05
9	425	CIMAV	PST	16/Mayo/05
10	521	GU	PST	16/Mayo/05
11	548	CIMAV	PST	28/Mayo/05
12	558	GU	PST	28/Mayo/05
13	566	CIMAV	PST	9/Junio/05
14	576	GU	PST	9/Junio/05
15	601	CIMAV	PST	27/Junio/05
16	613	GU	PST	27/Junio/05
17	631	CIMAV	PST	9/Julio/05
18	642	GU	PST	9/Julio/05
19	661	CIMAV	PST	21/Julio/05
20	671	GU	PST	21/Julio/05
21	703	CIMAV	PST	8/Agosto/05
22	713	GU	PST	8/Agosto/05
23	715	CIMAV	PST	14/Agosto/05
24	727	GU	PST	14/Agosto/05
25	743	CIMAV	PST	26/Agosto/05
26	755	GU	PST	26/Agosto/05
27	773	CIMAV	PST	7/Septiembre/05
28	782	GU	PST	7/Septiembre/05
29	802	CIMAV	PST	19/Septiembre/05
30	811	GU	PST	19/Septiembre/05

De las extracciones realizadas para obtener polen, de cada filtro se obtuvieron las siguientes micrografías:

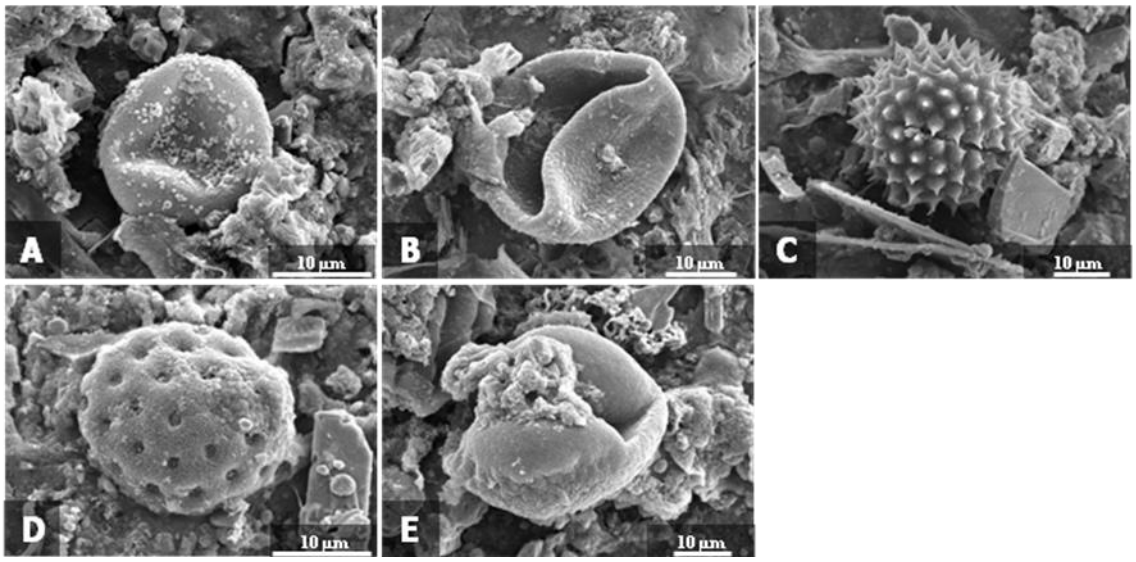


Figura 85. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 28/IV/05

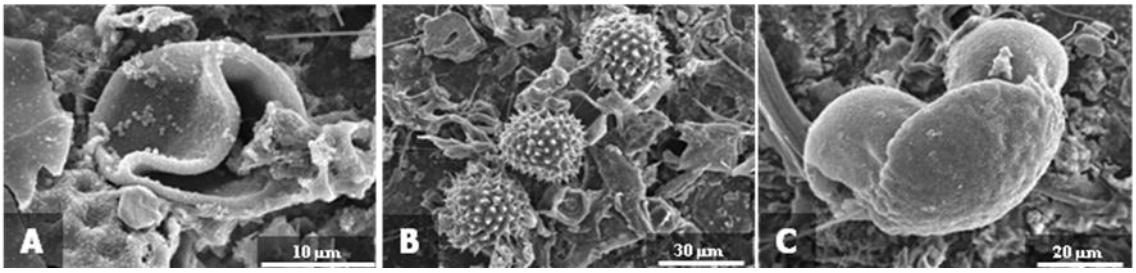


Figura 86. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 28/IV/05.

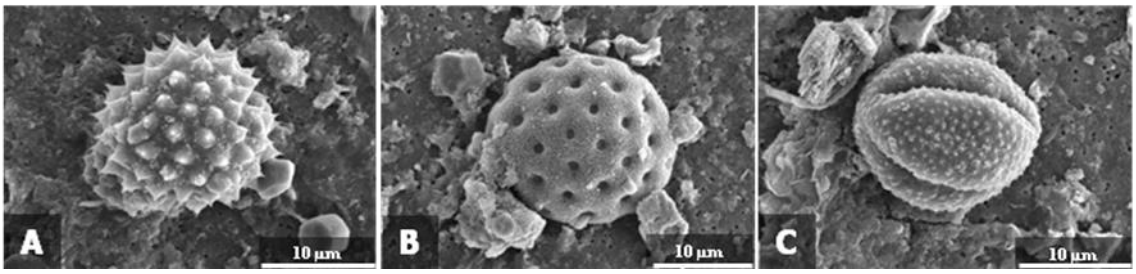


Figura 87. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 10/IV/05

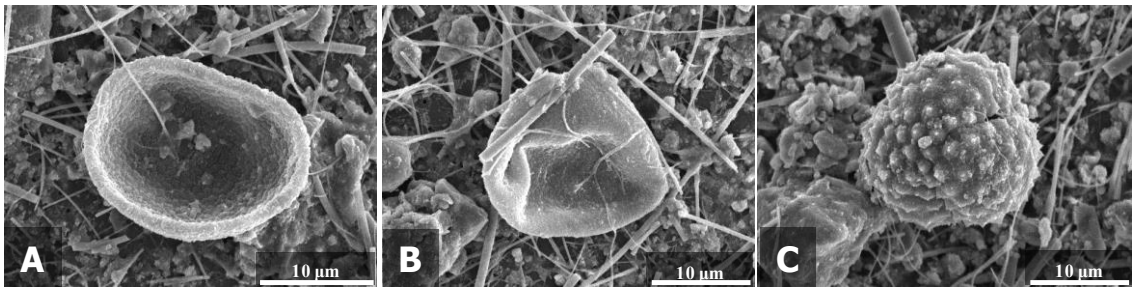


Figura 88. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 10/IV/05.

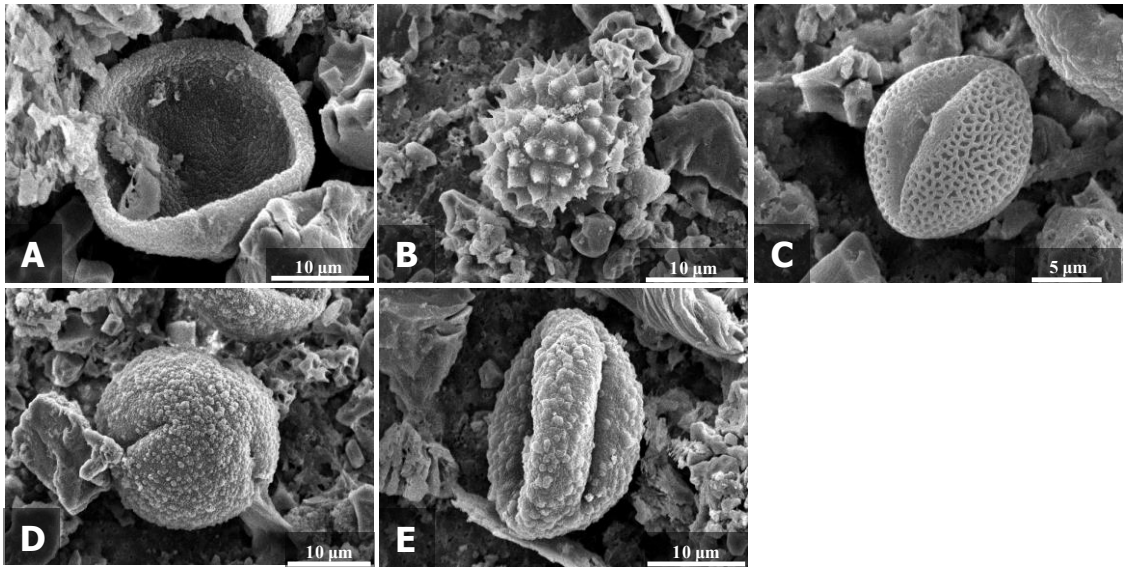


Figura 89. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 22/IV/05.

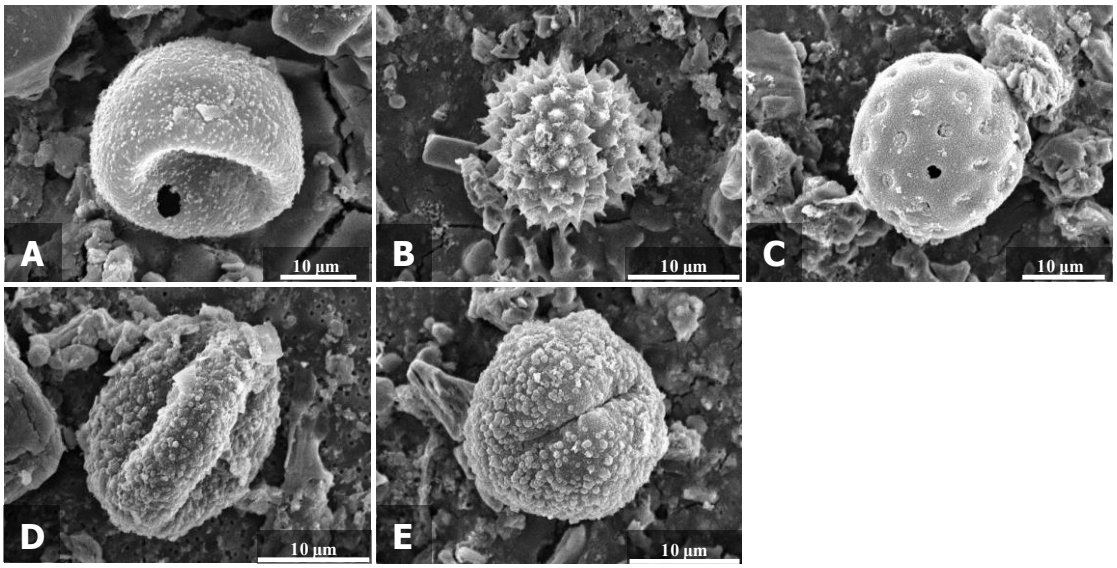


Figura 90. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 22/IV/05.

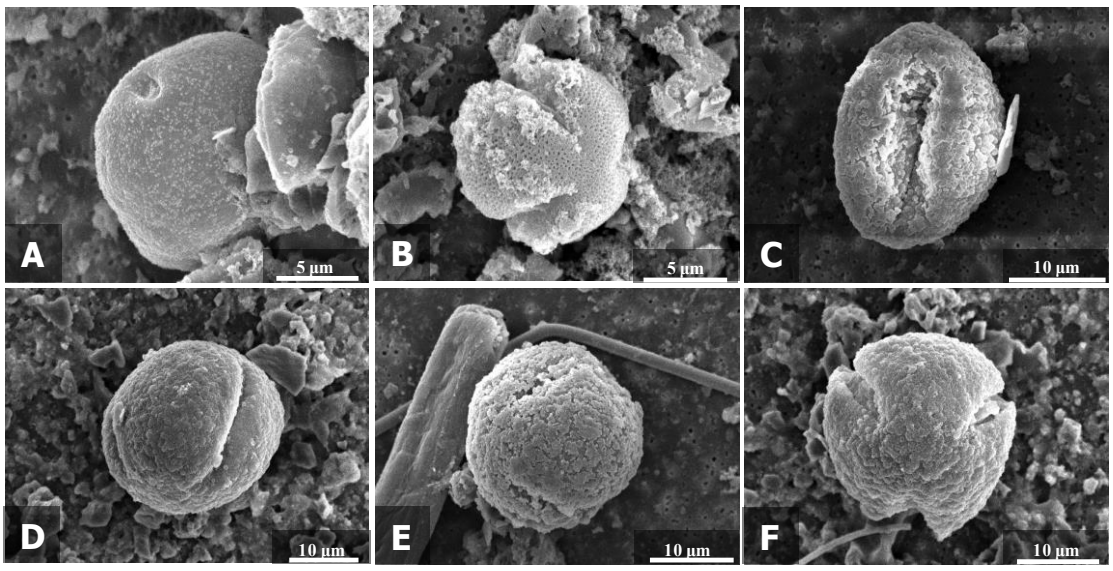


Figura 91. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 16/V/05.

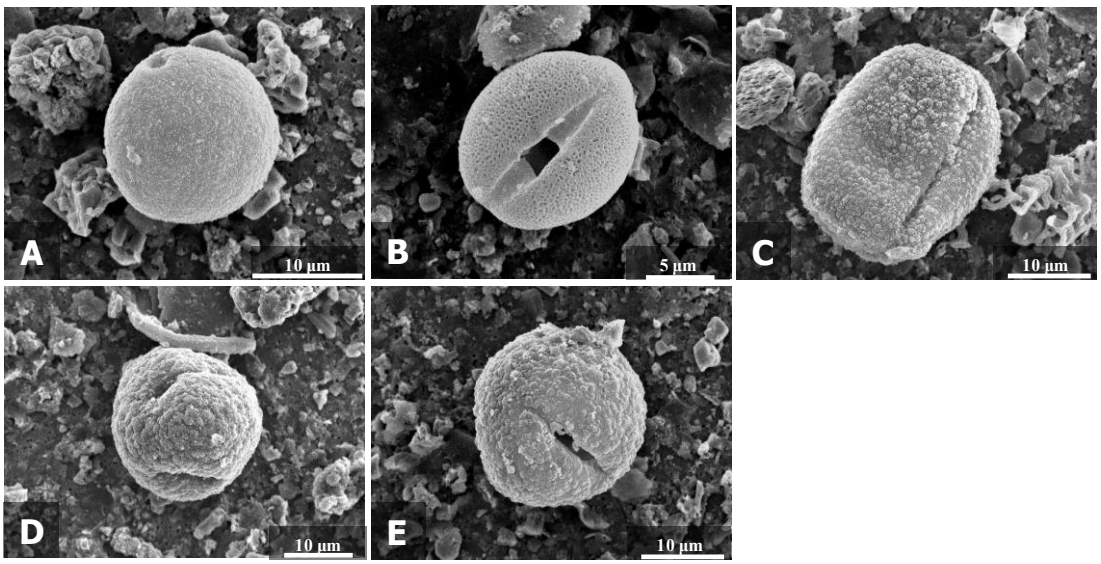


Figura 92. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 16/V/05.

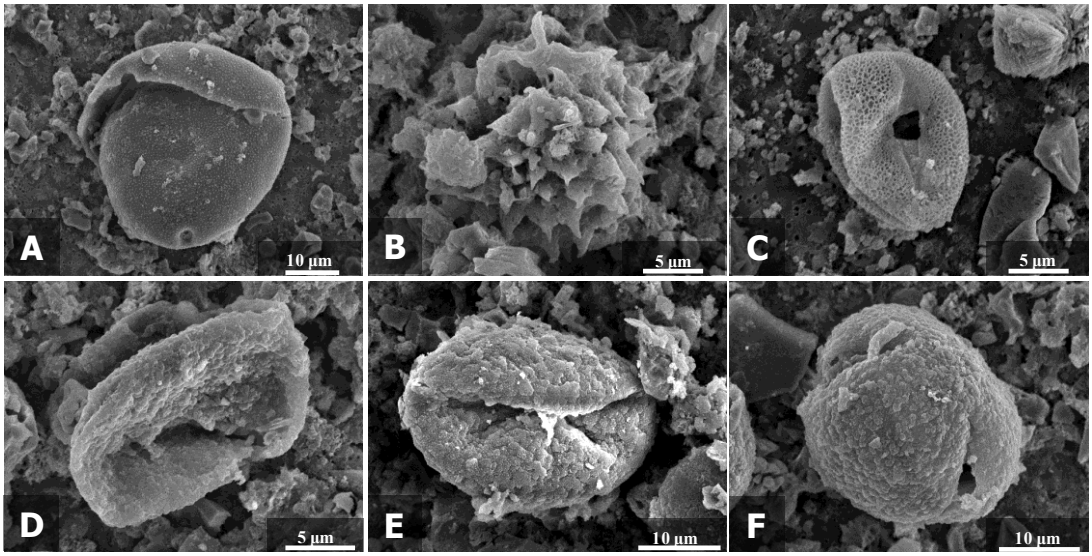


Figura 93. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 28/V/05.

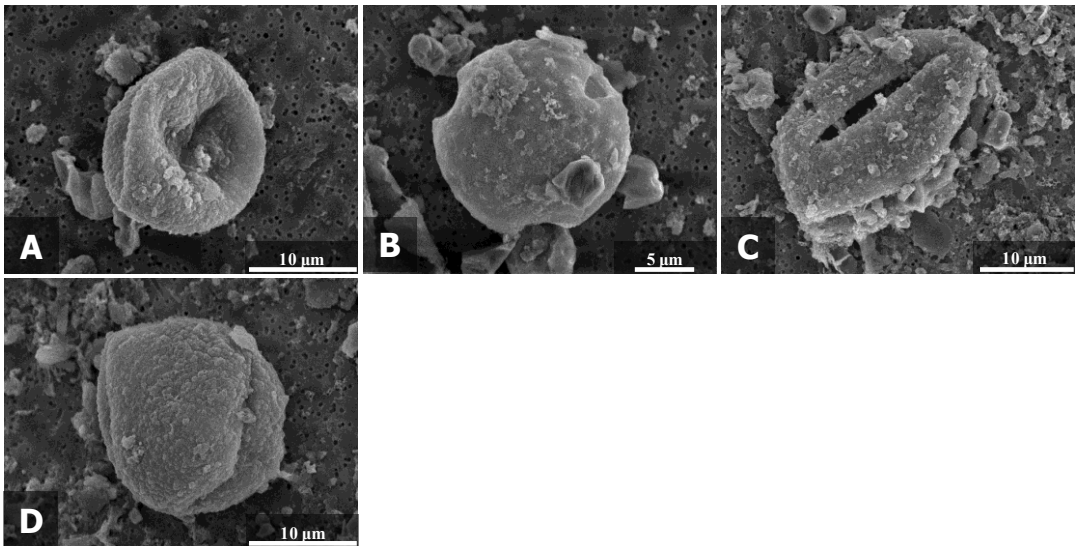


Figura 94. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 28/V/05.

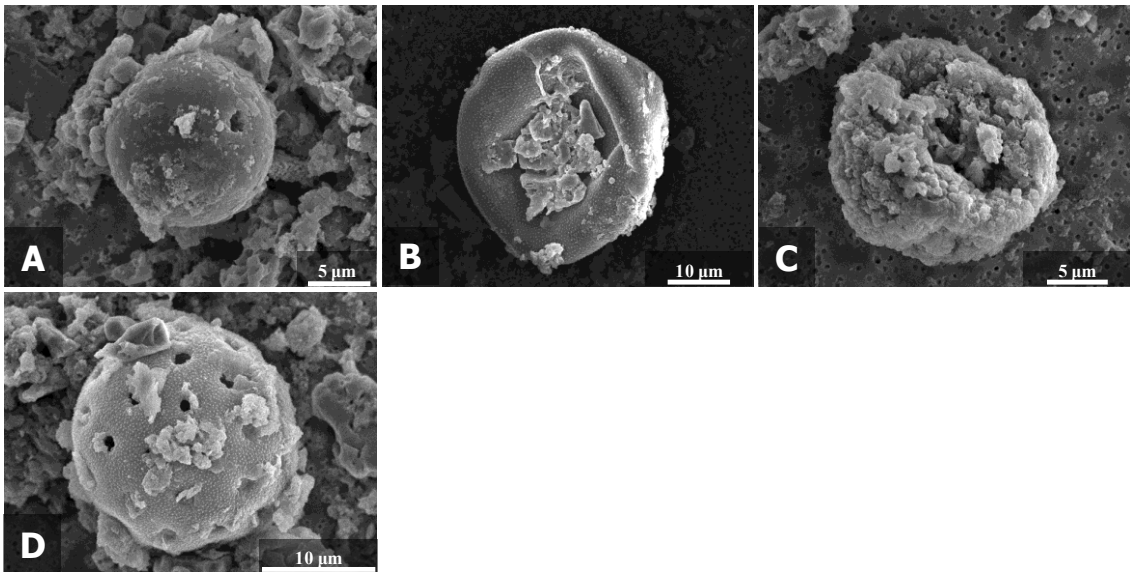


Figura 95. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 9/VI/05.

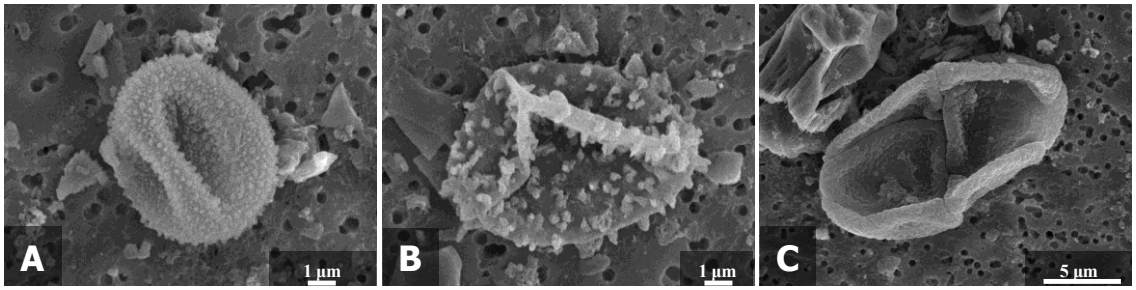


Figura 96. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 9/VI/05.

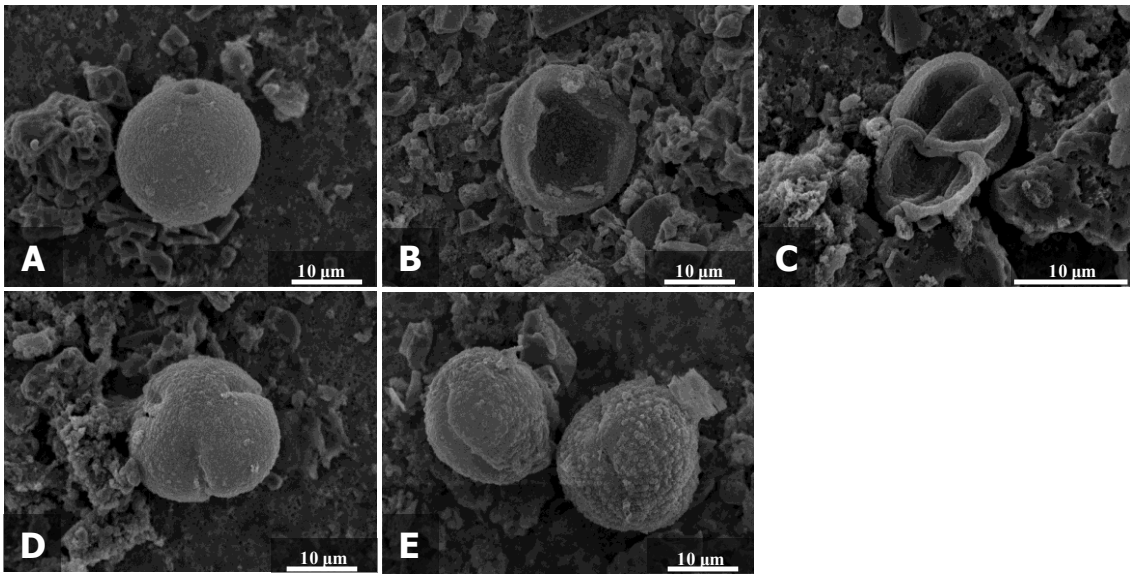


Figura 97. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 27/VI/05.

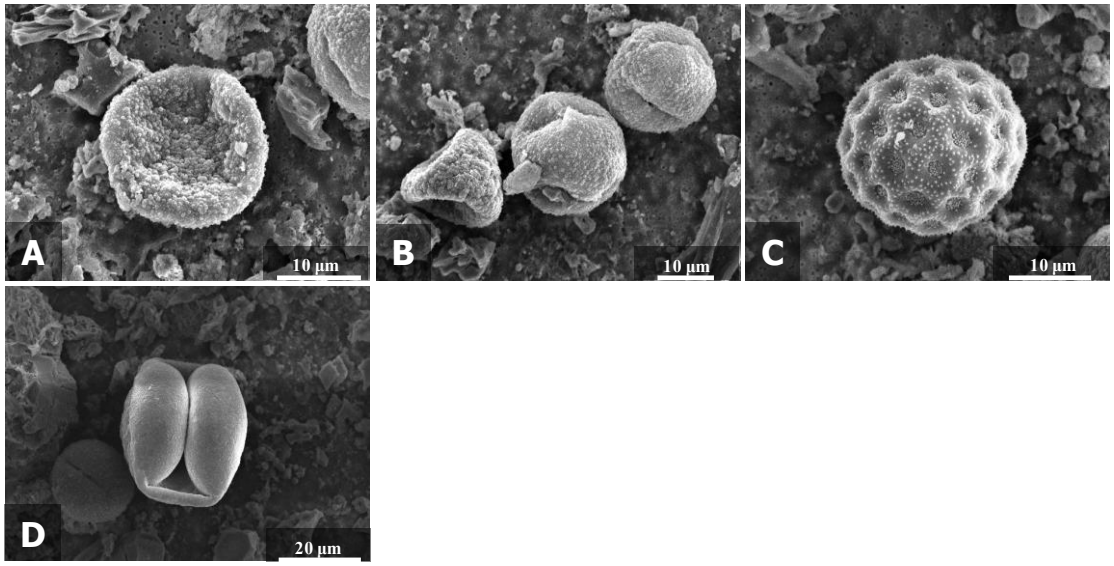


Figura 98. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 27/VI/05.

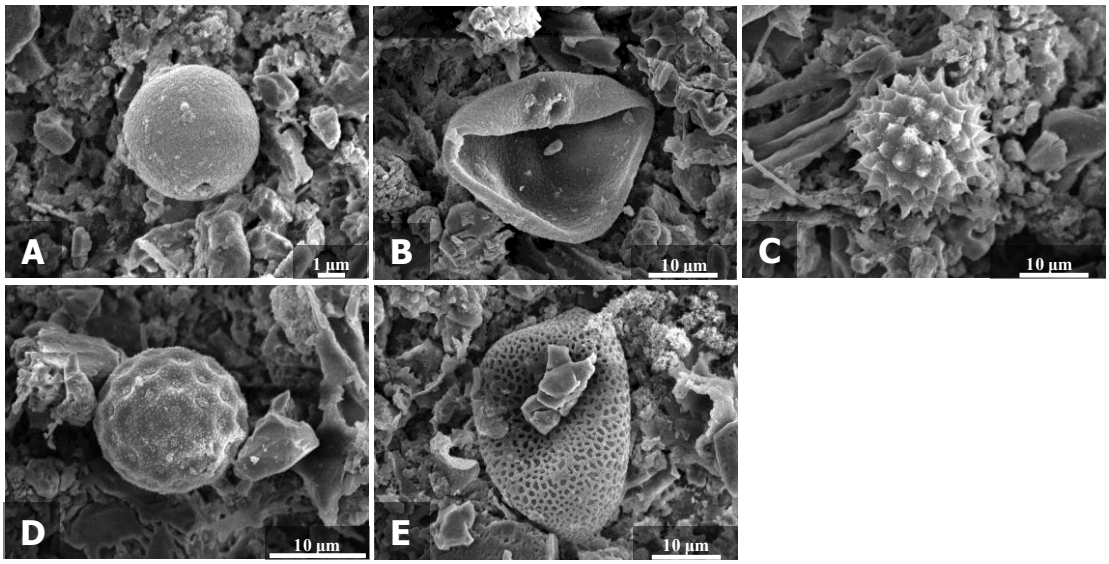


Figura 99. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 9/VII/05.

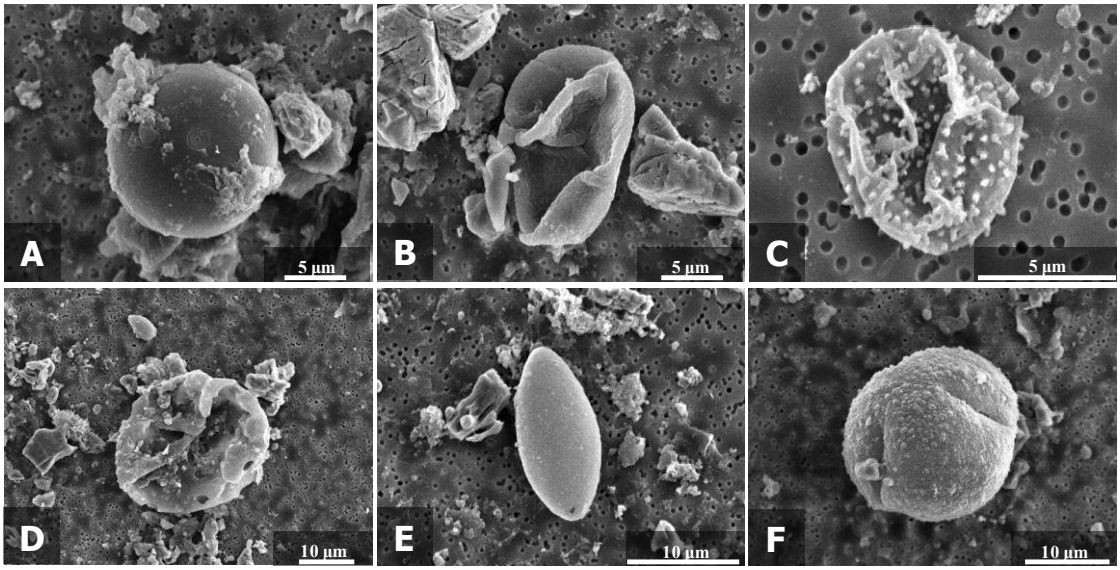


Figura 100. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 9/VII/05.

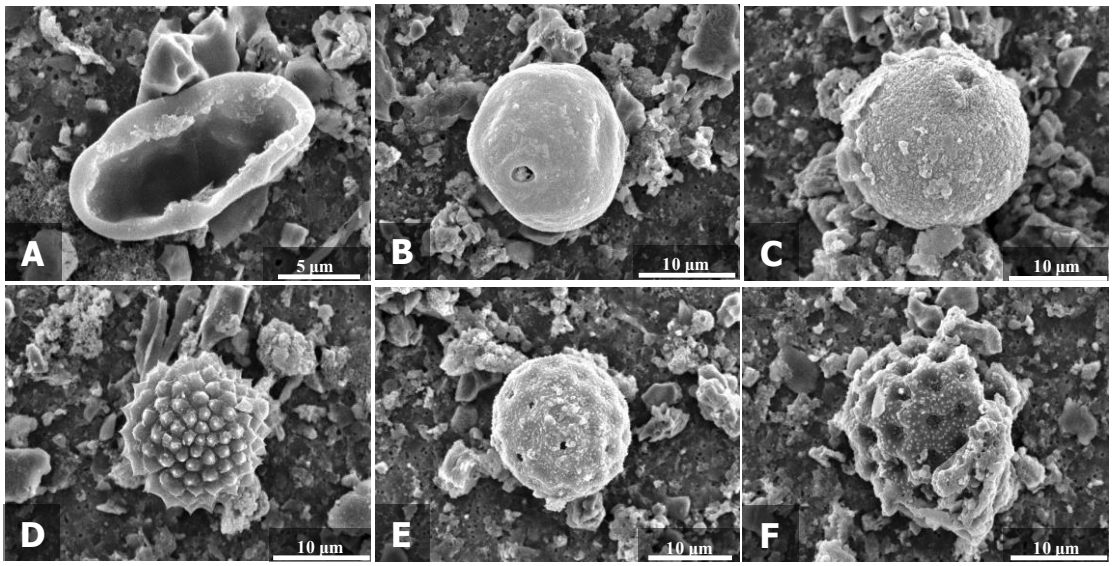


Figura 101. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 21/VII/05.

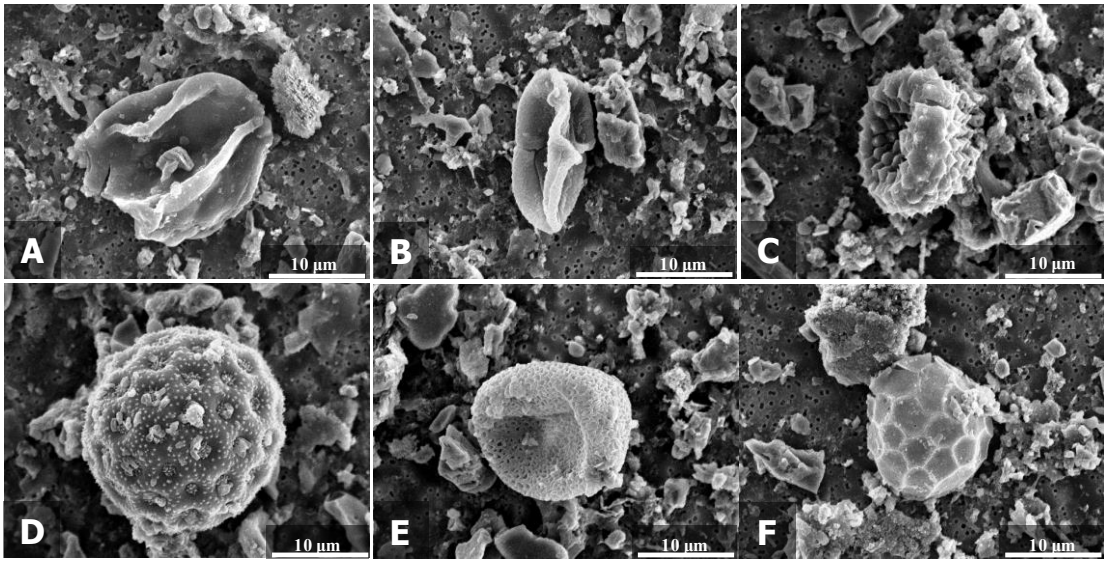


Figura 102. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 21/VII/05.

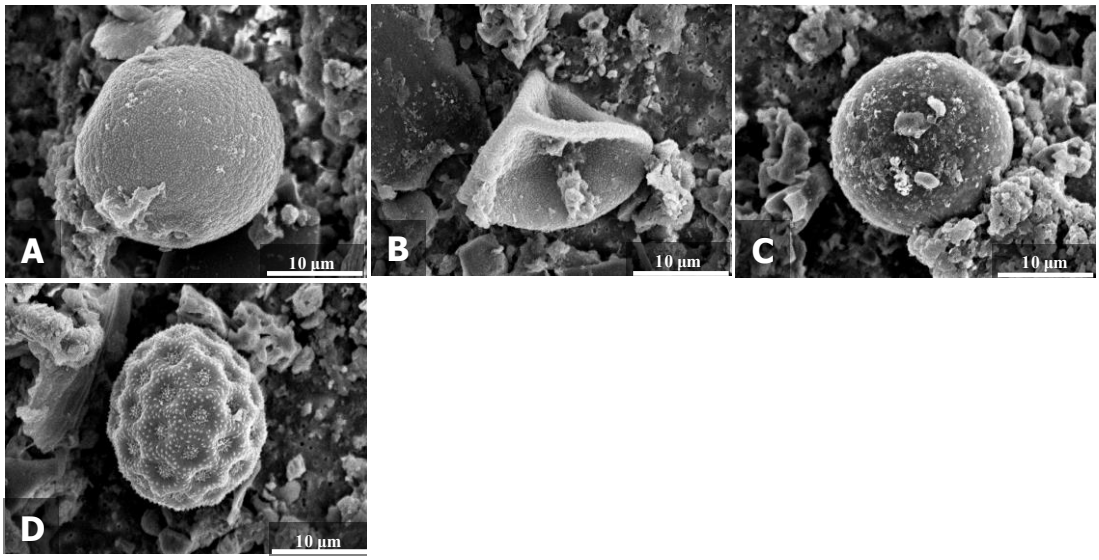


Figura 103. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 8/VIII/05.

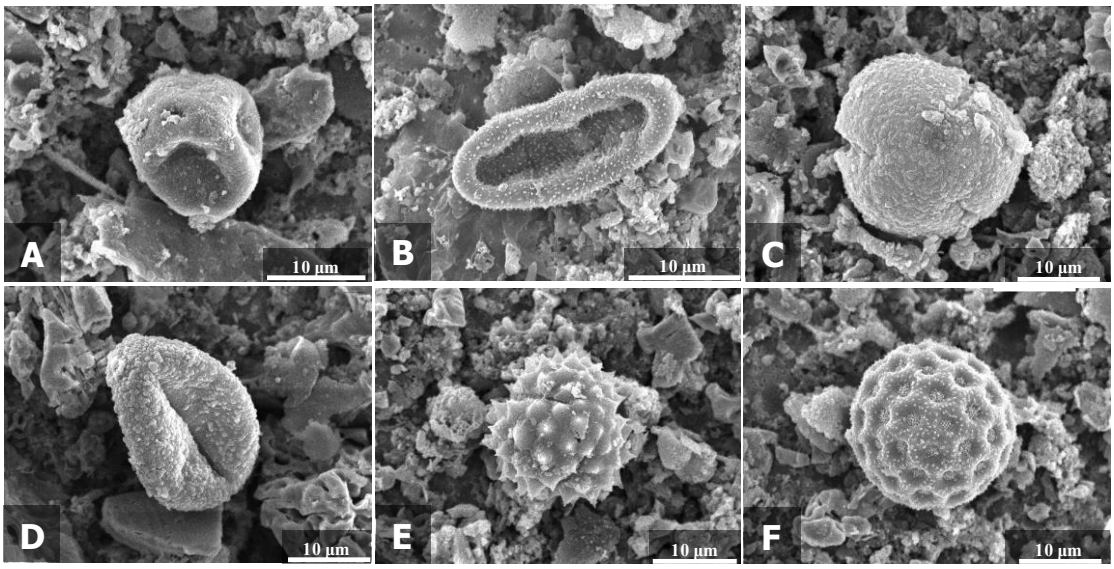


Figura 104. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 8/VIII/05.

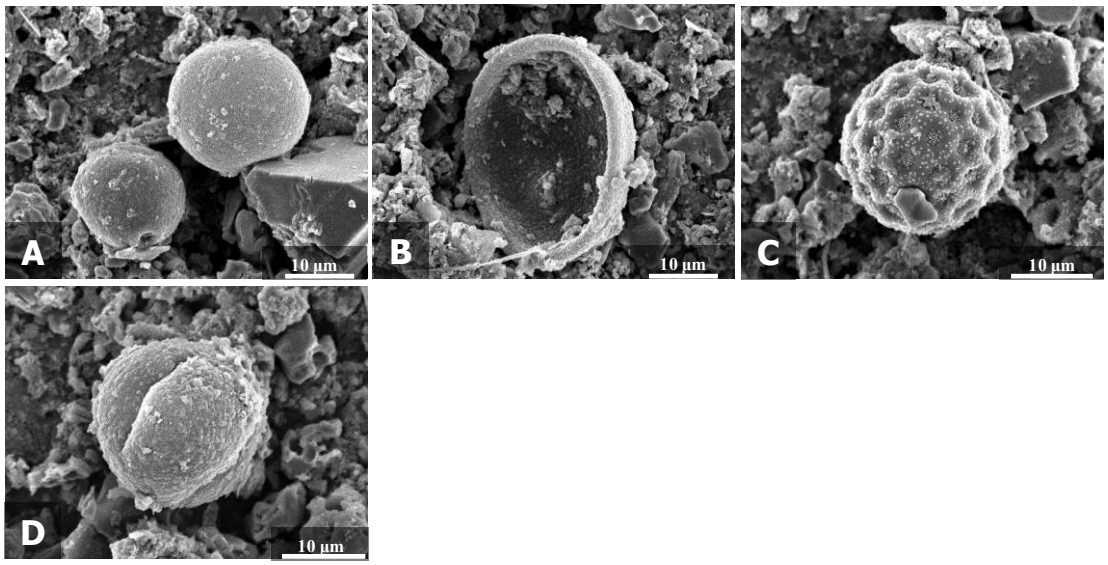


Figura 105. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 14/VIII/05.

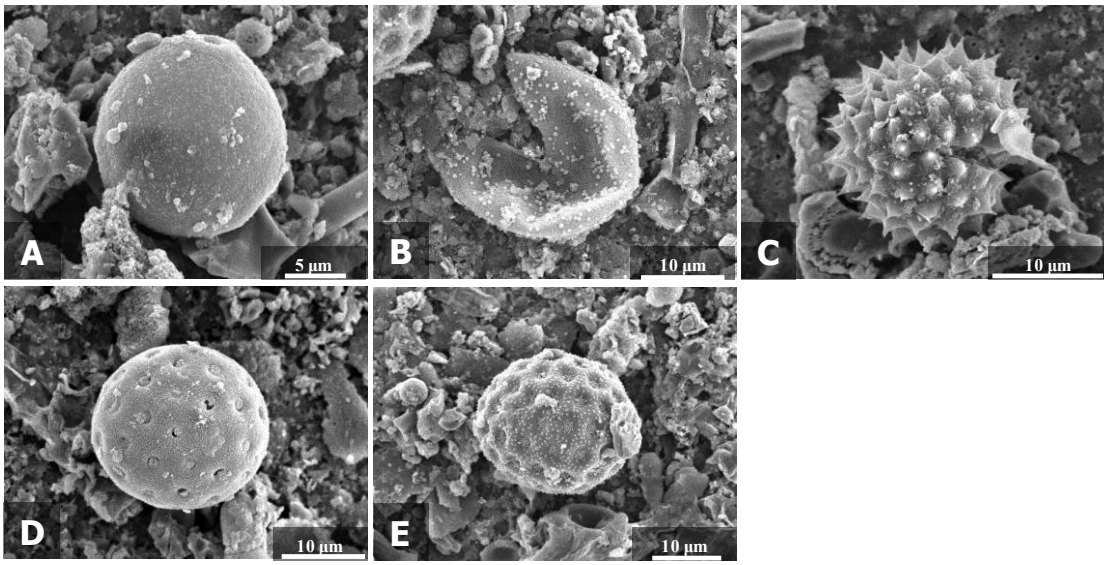


Figura 106. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 14/VIII/05.

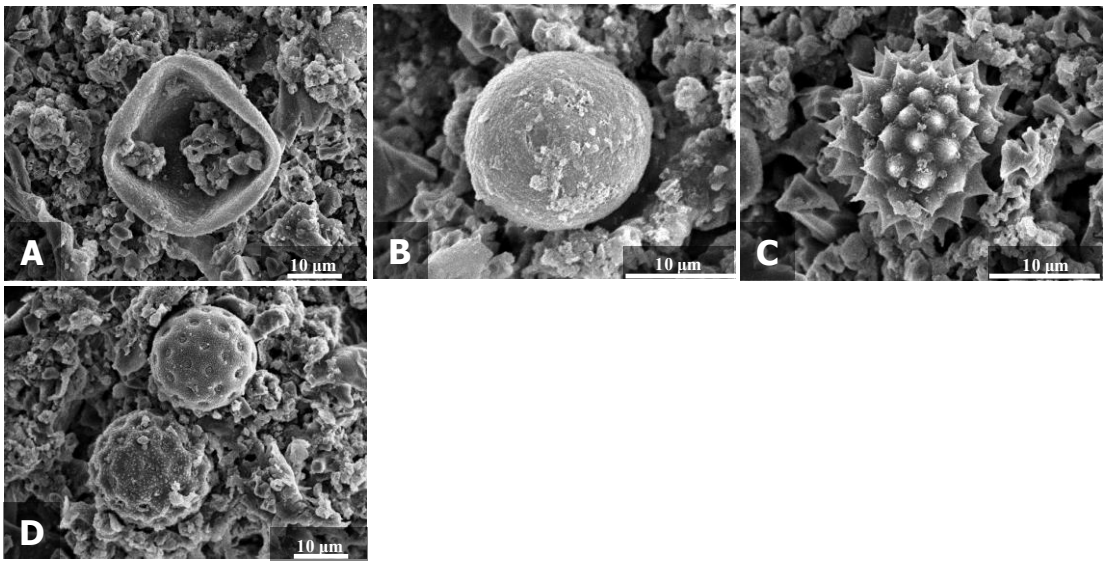


Figura 107. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 21/VIII/05.

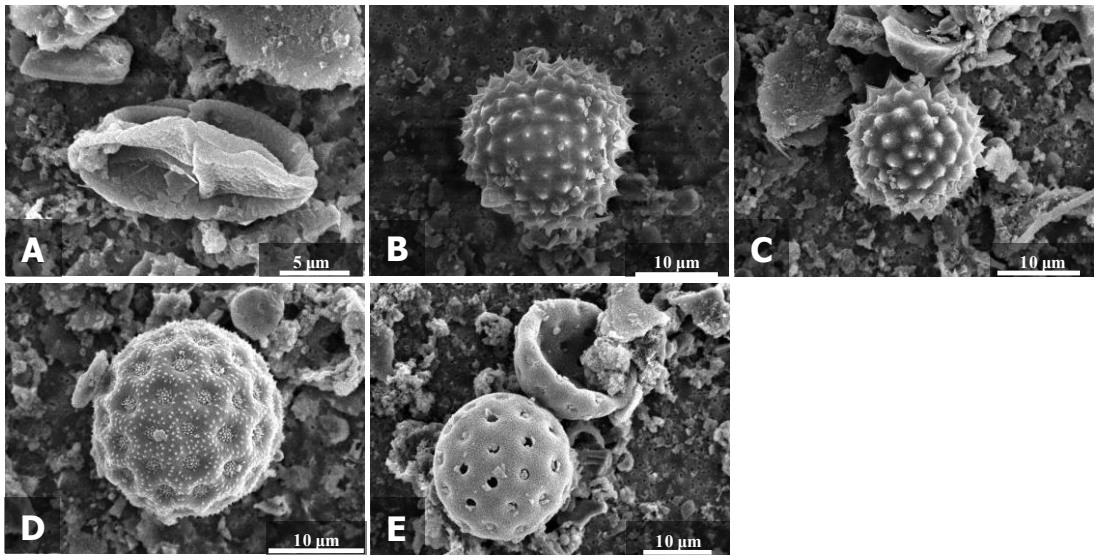


Figura 108. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 21/VIII/05.

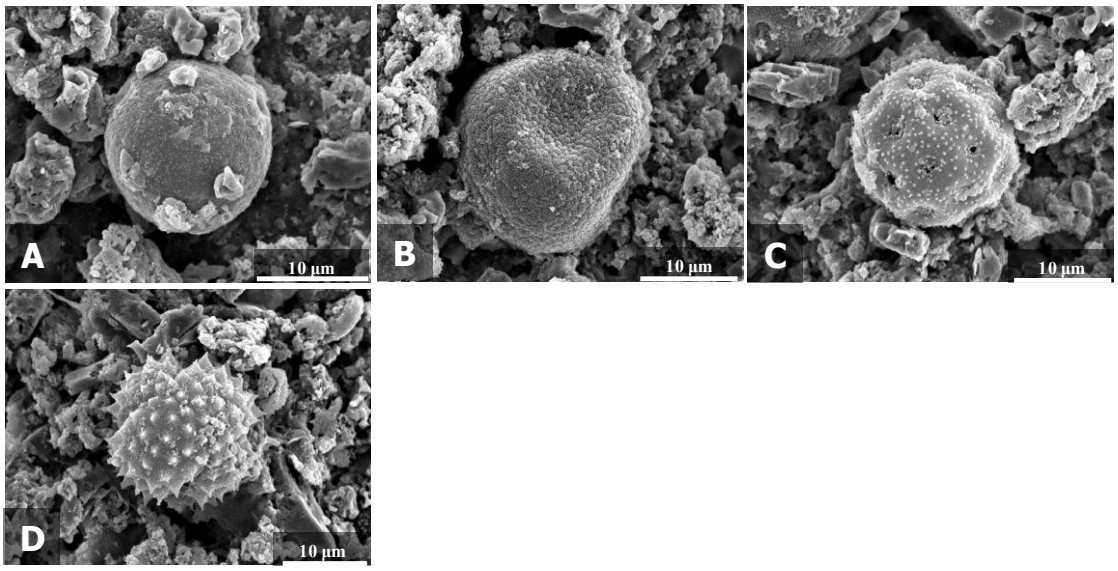


Figura 109. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 7/IX/05.

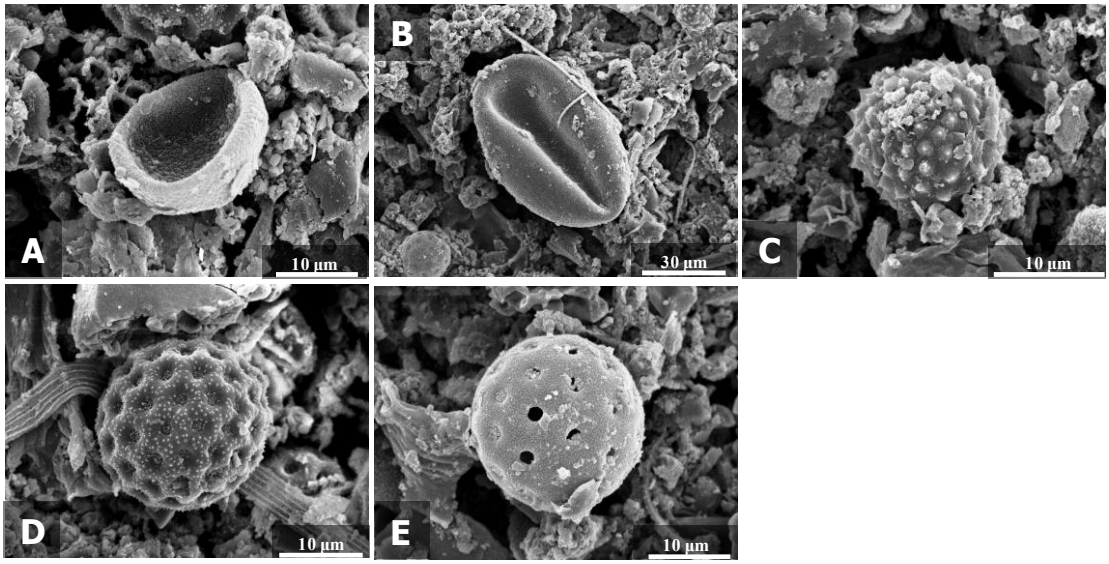


Figura 110. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 7/IX/05.

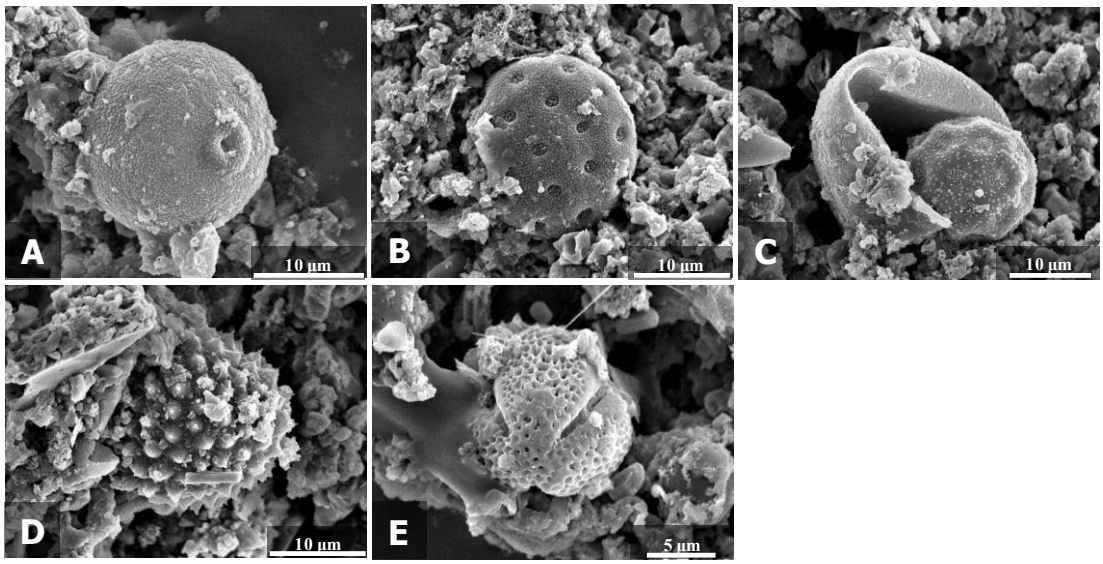


Figura 111. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV en el CIMAV 17/IX/05.

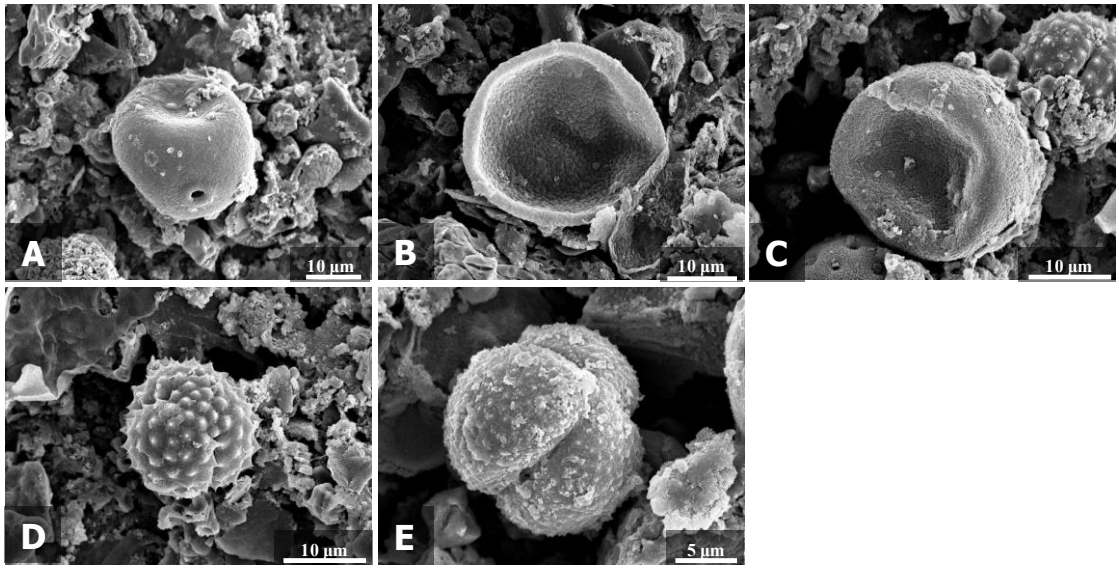


Figura 112. Polen obtenido de la extracción del filtro de FV al Suroeste de la ciudad 17/IX/05.

VI. CONCLUSIONES

- La metodología propuesta es adecuada para la extracción de polen de muestras de aerosoles urbanos colectadas por el método de alto volumen.
- Los pólenes recuperados mediante la metodología desarrollada no sufrieron daños considerables en su morfología por lo que pueden ser identificados por los palinólogos expertos.
- El alcance de esta metodología en cuanto a determinar concentración de pólenes en el aire ambiente puede ser semicuantitativa.
- La identificación y semicuantificación de los granos de polen se puede llevar a cabo en trabajos futuros, sin embargo, deben tenerse en el tiempo requerido para desarrollar este trabajo en cada muestra puede llegar a ser muy extenso.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Accorsi CA, Bandini M, Romano B. Allergenic pollen: Morphology and Microscopic photographs. En: D'Amato G, Spieksma FThM, Bonini S, eds. Allergenic pollen and pollinosis in Europe. London: Blackwell Scientific Publications; 1991. p. 24-35.
2. Aguirre, A., y G. Muñoz. 2009. Identificación y análisis polínico de la vegetación de la Ciudad de Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, México.
3. Andrade A., Gomez C., Secuancias sedimentarias analizadas, Tesis Doctoral, 2007.
4. Ariatti A., Mandrioli P. Lazzaro Spallanzani: a blow against spontaneous generation. Aerobiologia, 1993; 9: 101-107.
5. Armentia A, Bañuelos C, Arranz M, del Villar V, Martín Santos 5. Brasó J, Jorro Gemma, Alergia Clinica, 2003.
6. Belmonte J., Técnica para la captación e identificación de los pólenes, Unitat de Botanica. Universitat Autonoma de Barcelona, 2003; 18 (Extraordinario Núm.3):45-47
7. Belmonte J., Identificació, estudi i evolució anual del contingut pol·línic a l'atmosfera de Catalunya i Balears. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, 1988; 1: 11-14.
8. Belmonte J, Roure J. Introducción (Métodos de muestreo). En Valero AL, Cadahía A, eds. Polinosis. Polen y Alergia. MRA ediciones SL- Laboratorios Menarini SA, Barcelona. 2002: 7-16.
9. Belmonte J, Roure J, La polinosis a través del tiempo. Universitat Autònoma de Barcelona, 2001.
10. Burney P, Malmberg , Chinn S, Jarvis D, Lucynska C, Lai E. The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. J Allergy Clin Immunol 1997; 99: 314-22.
11. Cambon G. Rélations entre le contenu pollinique de l'atmosphère et le couvert vegetal en Méditerranée occidentale à Montpellier (France), Valencia (Espagne) et Oran (Algerie). Tesi doctoral. Université Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier, 1981.
12. Campos, 2006).
13. Comtois P. John Tyndall and the floating matter of the air. Aerobiologia, 2001; 17: 193-202.
14. Comtois P. Historical biography. Pierre Miquel: the first professional aerobiologist. Aerobiologia, 1997; 13: 75-82.
15. Cour P. 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, 1974; 16(1): 103-141.
16. Durham OC. The volumetric incidence of atmospheric allergens IV. A proposed standard method of gravity sampling, counting and volumetric interpollation of results. J. Allergy, 1946; 17(2): 79-86.
17. G. D'amato. Urban pollution and plant-derived respiratory allergy. Clin Exp Allergy 2000; 30: 628-36.
18. Erdtman G. The acetolysis method. A revised description. Sv. Bot. Tidskr., 1960; 54: 561-564.
19. Firbas F. über die Bestimmung der Walddichte und der Vegetation Waldloser Gebiete mit Hilfe der Pollenanalyse. Planta, 1931; 22: 109-145.
20. GREGORY PH. The microbiology of the atmosphere. 2ond edition. Leonard Hill, Aylesbury, 1973: XIX+277 pp.
21. GREGORY PH. The microbiology of the atmosphere. Leonard Hill, London, 1961: XV+251 pp.

22. Gros R. Contrôle de validité des analysis sporo-polliniques. Rev. Paléobiol., 1984; vol. special: 85-95.
23. Hesselman H. Über die Verbreitungsfähigkeit des Waldbaumpollens. Medd. Skogsförsöksanst., 1919; 16: 27-60.
24. Hirst J. Biography f an aerobiologist. P.H. Gregory 24.7.1907-9.2.1986. Aerobiologia, 1992; 8: 209-218.
25. Hirst J. An automatic volumetric spore trap. Ann. Appl. Biol., 1952; 39: 257-265.
26. Lancet 1998, The international study of asthma and allergies in childhood (isaac) steering committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma. Allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema ISAAC. 351: 1255-32.
27. Nilsson L., Castor O., Löfman O., Magnusson A., Kjellman N.I.M. Allergic disease in teenagers in relation to urban residence at various stages of childhood. Allergy 1999; 54: 716-721.
28. Mandrioli P, Comtois P, Dominguez E, Galan C, Syzdek LD, Isard SA. Sampling: Principals and Techniques. In: Mandrioli P, Comtois P & Levizzani L eds. Methods in Aerobiology, Bologna: Pitagora Editrice, 1998: 47-68.
29. May KR. The cascade impactor: an instrument for sampling coarse aerosols. J. Sci. Instrum., 1945; 22:187-195.
30. 16. MIQUEL P. Les organismes vivants dans l'atmosphère. Gauthier-Villars, Paris, 1883: 310 pp.
31. Miralles C., Inmunoterapia Especifica, 2008.
32. Mogío G, Moral de G, Neumoalergenos de interés en patología alérgica, 2001
33. Munuera M., Captación y cuantificación de pólenes, Universidad Politécnica de Cartagena. Murcia (España), 2004.
34. Olabuenaga S, Bianchi M, Vacchino M, Colino C y Fainstein B, Polen y polinosis en San Carlos de Bariloche, 2007.
35. Pagán J, Félix R, Martínez J, García F, Ferrer A, Martos M, Munuera M, Contreras L, Carreño A, Alergenos, 2004.
36. Pelta F, Guía de alergia para residentes y atención primaria . 2001.
37. Perkins WA. The Rotorod sampler. Second Semiannual CML 186, Aerosol Laboratory, Standford University, California, 1957.
38. Sáenz C. (1978). Poleny esporas. Ed. Blume. Madrid.
39. Sbarato, V.; et. al.; Análisis y Caracterización del Material Particulado Atmosférico. Maestría en Gestión para la Integración Regional y Centro de Información y Documentación Regional, Universidad Nacional de Córdoba.
40. Suarez J., Videla V., Colector de polen, 2002.
41. Tormo R, Devesa A, Palinología, 1989.
42. Tauber H. A static non-overload pollen collector. New Phytol., 1974; 73: 359-369.
43. Valero y Picado, 2006
44. Wodehouse RP. Pollen grains. Mc. Graw-Hill Book Co. Inc., New York and London, 1935: 1-574.