



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

División De Ciencias Naturales y Exactas

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE
TÓXICOS (EPT’s) EN POBLACIÓN INFANTIL DE SALAMANCA,
GUANAJUATO”**

TESISTA

Q.F.B. Fátima del Carmen Durán Mendoza

Asesor: Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Co-asesor: Dra. Diana Olivia Rocha Amador

Co-asesor: Dr. Gustavo Cruz Jiménez

El jurado evaluador del examen recepcional titulado “**Determinación de elementos potencialmente tóxicos (EPT’s) en población infantil de Salamanca, Guanajuato**” estuvo integrado por:

Dra. Araceli Jacobo Azuara
Presidente

Dr. Rogelio Costilla Salazar
Secretario

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar
Vocal

Dra. Rebeca Yasmín Pérez Rodríguez
Sinodal Suplente

Guanajuato, Guanajuato; Junio del 2020

Dr. Agustín Ramón Uribe Ramírez

Director de la DCNyE

P R E S E N T E

El presente trabajo titulado “**Determinación de elementos potencialmente tóxicos (EPT’s) en población infantil de Salamanca, Guanajuato**” fue desarrollado por la C. FÁTIMA DEL CARMEN DURÁN MENDOZA para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas, y fue realizado en el Departamento de Farmacia y el Departamento de Química de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

Agradeciendo de antemano su atención, me despido de usted.

ATENTAMENTE

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa
Profesor de Tiempo Completo
División de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad de Guanajuato
alma_rce@ugto.mx

AGRADECIMIENTOS

- Proyecto 637/2015, "Evaluación de exposición a benceno e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en niños residentes del municipio de Salamanca, Guanajuato". Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Universidad de Guanajuato.
- Red Nacional de Salud Infantil (RSAI)- CONACYT 2006. Proyecto no. 271626.
- Infraestructura CONACyT 2015. Proyecto no. 255270.
- Infraestructura CONACyT 2016. Proyecto no. 269709.

DEDICATORIAS

A toda mi familia, por su apoyo y amor incondicional, con los cuales hicieron más llevadero todo este proceso.

A mis asesores Diana, Alma y Gus, por la confianza depositada en mí, por su ayuda, su paciencia y por las enseñanzas a lo largo de todo este proceso.

A mi amigo Ricardo, por hacer más llevadero el trabajo con su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio por su compañía y sus enseñanzas

A mis sinodales por enriquecer mi trabajo con sus comentarios.

A todos aquellos que contribuyeron de manera directa o indirecta en la realización de este trabajo.

Gracias a todos por ayudarme a hacer esto posible.

CONTENIDO

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1. ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS.....	8
2.1.1. Presencia en zonas industriales	8
2.1.2. Metodologías de análisis.....	10
2.1.2.1. Espectroscopía de absorción atómica	10
2.1.2.2. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente	12
2.2. FLUORUROS	13
2.2.1. Presencia de fluoruros en suelos y agua.....	14
2.2.2. Metodologías de análisis.....	15
2.2. 8-HIDROXI-2'-DEOXIGUANOSINA	16
2.3.1. Metodologías de análisis.....	17
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. OBJETIVO GENERAL	22
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5. METODOLOGÍA.....	23
5.1. SELECCIÓN DE LA LOCALIDAD Y POBLACIÓN.....	23
5.2. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN	23
5.3. ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO.....	24
5.4. EVALUACIÓN DE FACTORES DE RIESGO	24

5.5.	PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRA	24
5.6.	DETERMINACIÓN DE EPT's	25
5.6.1.	Tratamiento previo del material.....	25
5.6.2.	Digestión	25
5.6.3.	Análisis de las muestras	25
5.7.	DETERMINACIÓN DE FLUORUROS	26
5.7.1.	Preparación de soluciones	26
5.7.2.	Análisis de las muestras	27
5.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO (EPT's Y FLUORUROS).....	27
5.9.	DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE 8-OHdG POR HPLC-ESI-IT-MS/MS.	28
5.9.1.	Establecimiento de parámetros instrumentales para la determinación de 8- OHdG por HPLC-ESI-IT-MS/MS.....	28
5.9.2.	Determinación de 8-OHdG en muestras de orina por HPLC-ESI-IT-MS/MS. 29	
5.9.2.1.	Extracción en fase sólida de 8-OHdG de muestras de orina	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1.	ETAPA 1: DETERMINACIÓN DE EPT'S Y FLUORUROS.....	31
6.2.	ETAPA 2: DETERMINACIÓN DE 8-OHDG.....	47
7.	CONCLUSIONES.....	51
8.	PERSPECTIVAS.....	53
	BIBLIOGRAFÍA	54
	ANEXOS.....	59
	ANEXO I: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	59
	ANEXO II: CUESTIONARIO (ENCUESTA).....	62
	ANEXO III: RESÚMENES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS.....	69

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

(V): Voltios

<: menor que

>: mayor que

°C: Grado Celsius

µg: microgramos

µL: microlitros

°OH: Radical hidroxilo

¹O₂: Oxígeno singlete

2'-dG: 2'-desoxiguanosina

8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

5-OH-mdU: 5-hidroximetil-desoxiuridina.

Å: Armstrong

AAS: Espectrometría de absorción atómica

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ag: Plata

As: Arsénico

ATSDR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades

Ba²⁺/Ba⁺: Relación Bario bivalente/ bario monovalente

CAT: catalasa

Cd: Cadmio

CeO: Óxido de Cesio

CFE: Comisión Federal de Electricidad

COP's: Compuestos Orgánicos Persistentes

COV's: Compuestos Orgánicos Volátiles

Cps: Cuentas por segundo

Cr: Cromo

Cu: Cobre

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

DE: Desviación estándar

ED: Detector electroquímico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EPT's: Elementos potencialmente tóxicos

Fem.: Femenino

F: Flúor

g: gramos

g: gravedad

G: Guanina

GC: Cromatografía de gases

GPx: Enzima glutatión peroxidasa

GST: Enzima Glutatión Transferasa

Gto.: Guanajuato **H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
HAP's: Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HCl: Ácido clorhídrico
Hg: Mercurio
HLB: Balance hidrofílico-lipofílico
HNO₃: Ácido nítrico
HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HPLC-ESI-IT-MS/MS: Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada mediante electronebulización a espectrometría de masas con analizador de masas de tipo trampa de iones en modo tándem MS/MS.
IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ICC: Control de carga de iones
ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
In: Indio
ISE: Electrodo de ion selectivo
L: Litro
Li: Litio
LOO[•]: Radical peroxilo
m/z: Relación masa carga
M: Masculino
mg: miligramos
mL: mililitros
mm: milímetros
mM: milimolar
MRM: Monitoreo de reacciones múltiples
MS: Espectrometría de masas
ms: milisegundos
N: Normalidad
ND: No detectado
ng: nanogramos
Ni: Níquel
ns: nanosegundos
O₂^{•-}: Anión superóxido
OH: Iones hidroxilo
p: para
p: Probabilidad que mide la evidencia en contra de la hipótesis nula
Pb: Plomo
RF: Radiofrecuencia
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SOD: Superóxido dismutasa
SPS: Ajuste de parámetros inteligente
T: Timina
TISAB: Disolución Amortiguadora de la Fuerza Iónica Total

TI: Talio

UV: ultravioleta-visible

v/v: Relación volumen/volumen

V: Vanadio

W: Watts

Y: Yodo

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. Condiciones de trabajo del ICP-MS	26
Tabla 2. Condiciones de trabajo del HPLC-ESI-IT-MS/MS	28
Tabla 3. Características generales de la población y factores de riesgo	34
Tabla 4. Comparación entre diferentes zonas de los elementos evaluados	39
Tabla 5. Comparación de la concentración obtenida de arsénico, vanadio, plomo, cadmio y fluoruros presentes en el estándar certificado	40
Tabla 6. Comparación de diferentes estudios para EPT's y Fluoruros	44
Tabla 7. Comparación de diferentes estudios realizados en población ocupacionalmente expuesta a vanadio	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1. Espectrómetro de absorción atómica a la llama	11
Figura 2. Formación de la 8-OHdG	17
Figura 3. Ubicación de las escuelas con respecto a las principales industrias en Salamanca, Gto.	23
Figura 4. Ubicación de la población con respecto a las industrias y dirección de los vientos	32
Figura 5. Determinación de 8-OHdG por HPLC-ESI-IT-MS/MS	50

RESUMEN

El municipio de Salamanca en el estado de Guanajuato cuenta con distintas empresas de gran impacto económico. Debido a esta industrialización, la cantidad de emisiones contaminantes es elevada, afectando entonces la calidad medioambiental. Los principales contaminantes emitidos son los compuestos orgánicos volátiles (COV's), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), óxidos de nitrógeno, de carbono y azufre, así como partículas finas y elementos/compuestos potencialmente tóxicos (EPT's), los cuales pueden llegar a causar un gran número de afecciones en la salud de las personas expuestas.

Para fines de esta investigación se cuantificaron por medio de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente los niveles de elementos potencialmente tóxicos (EPT's) como arsénico, vanadio, plomo y cadmio, en orina de la población evaluada, además de la cuantificación de fluoruros por medio de un electrodo de ion selectivo. Dicho estudio se realizó en 114 niños de entre 6 y 15 años en la ciudad de Salamanca de los cuales las medias geométricas fueron para el arsénico de $46.6 \mu\text{g L}^{-1}$, para el vanadio $3.1 \mu\text{g L}^{-1}$, para el plomo $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, para el cadmio $0.003 \mu\text{g L}^{-1}$ y finalmente para fluoruros 1.6 mg L^{-1} . Se tomó también una población control de 21 niños de entre 6 y 12 años del municipio de Irapuato de los cuales las medias geométricas fueron para el arsénico $96.6 \mu\text{g L}^{-1}$, para el vanadio $3.1 \mu\text{g L}^{-1}$, para el plomo $9.5 \mu\text{g L}^{-1}$, para el cadmio $0.0009 \mu\text{g L}^{-1}$ y para fluoruros 2.2 mg L^{-1} . Encontrándose entonces que, para arsénico, plomo y fluoruros el grupo control es el que presenta los niveles más altos, lo cual puede deberse a contaminación de agua por dichos elementos, así como el uso de ciertos utensilios para cocinar. Para vanadio y cadmio se encontró que la zona expuesta es la más afectada, lo cual puede ser debido a la industrialización de la zona, sin embargo, es importante mencionar que la población evaluada no sobrepasó los niveles establecidos como normales para cadmio. Por otro lado, se realizaron pruebas con la técnica HPLC-ESI-IT-MS/MS para la determinación del biomarcador de estrés oxidativo 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), ya que las sustancias que emiten las industrias presentes provocan daño oxidativo, sin embargo, no

fue posible la determinación de dicho biomarcador debido a que se presentaban problemas con los interferentes de matriz.

1. INTRODUCCIÓN

Las zonas industriales se definen como un conjunto de empresas o fábricas en un área definida. Por lo general, estas zonas se mantienen alejadas de las zonas pobladas, esto debido al gran ruido y contaminación ambiental que provocan, sin embargo, el crecimiento de la población ha llevado a construir complejos habitacionales cercanos a éstas[1]. Este tipo de zonas traen consigo beneficios importantes, entre ellos, la derrama económica para la ciudad, así como los empleos que se generan. Sin embargo, las zonas industriales no sólo generan ventajas, existen desventajas, como los altos niveles de contaminación y los riesgos que estos representan para la salud[2].

La mayoría de las empresas que se encuentran en las zonas industriales emiten una gran cantidad de compuestos al ambiente, provocando una contaminación de aire, suelo y agua. Dependiendo del tipo de industria son el tipo de sustancias químicas que serán emanadas al ambiente, las cuales podrían ser de naturaleza orgánica o inorgánica.

Las sustancias orgánicas son aquellas que contienen núcleos de carbono y entre las emitidas al ambiente se encuentran los compuestos orgánicos volátiles (COV's), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) y los compuestos orgánicos persistentes (COP's). Los COV's son principalmente alcanos, alquenos, hidrocarburos aromáticos y compuestos oxigenados emitidos por vehículos, así como ciertas industrias entre las que se encuentran refinerías, petroquímicas y aquellas que involucren una combustión incompleta o el uso de ciertos solventes[3]. Los HAP's son un grupo de más de 100 compuestos entre los cuales se encuentran acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno, fluoreno, fenantreno, pireno. La emisión de estos compuestos al ambiente se debe a diversos procesos industriales, principalmente combustión incompleta de basura, carbón, petróleo, entre otros[4]. Finalmente, los COP's están conformados por los pesticidas (DDT, endrin, aldrin, entre otros), productos industriales (bifenilos policlorados, hexaclorobenceno) y otros productos cuya generación

es no intencional (dibenzo-*p*-dioxinas policloradas y dibenzo-*p*-furanos policlorados)[5], estos compuestos se generan como subproductos de procesos en las industrias así como por combustión[6].

Por otro lado, las sustancias inorgánicas emitidas al ambiente, son principalmente óxidos de nitrógeno y de azufre, así como elementos potencialmente tóxicos (EPT's) entre los que se encuentran el vanadio, plomo, cadmio, arsénico, cromo, entre otros[7].

Los óxidos de nitrógeno se producen principalmente por reacciones de tipo fotoquímico que se llevan a cabo en los escapes de los vehículos de motor. Los principales óxidos producidos son óxido nítrico, ozono, dióxido de nitrógeno y nitratos de peroxiacilo[8]. El dióxido de azufre es emitido a la atmósfera debido a la combustión de carbón, petróleo y sus derivados, así como el gas natural. Los EPT's se liberan principalmente por industrias relacionadas a la metalurgia, combustión de carbón en plantas termoeléctricas, combustión de petróleo, conservación de la madera y en la industria del papel, entre otras[9].

Debido a la amplia gama de contaminantes que son emitidos a la atmósfera en sitios industriales, existen diversos riesgos a los que se expone la población que circunda estas zonas. Estos riesgos generalmente se basan en que algunos de estos compuestos están declarados como potencialmente carcinogénicos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés)[10], además de que algunos como los COP's y los EPT's son tóxicos a niveles muy bajos de exposición y son bioacumulables [5, 11]. Adicionalmente, se han considerado estos contaminantes como disruptores endocrinos, capaces de provocar lesiones en el sistema inmune y respiratorio, así como inducir daños hematológicos y/o neuroconductuales. Los principales síntomas debido a la exposición a estos contaminantes son: falta de memoria, irritabilidad, letargo, dolor de cabeza, mareos, irritación en vía gastrointestinal y afecciones en la piel, siendo estos los más relevantes síntomas, además de enfermedades graves como el cáncer [12-17].

Un mecanismo de toxicidad asociado a algunas sustancias orgánicas e inorgánicas genera estrés oxidativo. El término estrés oxidativo es usado para denotar el desbalance

que existe entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) y los mecanismos de defensa antioxidantes del cuerpo (generalmente un incremento de especies oxidantes y el decremento de agentes antioxidantes) [18]. Como consecuencia, se producen ciertas lesiones a los componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Entre las principales ROS encontramos al anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2) y el radical peroxilo (LOO^{\bullet})[19].

Uno de los daños por estrés oxidativo se produce en lípidos y el proceso se conoce como peroxidación lipídica. En este proceso se ven afectadas estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, por la alteración de la permeabilidad de la membrana celular lo que lleva al edema y muerte celular. Por otro lado, se tiene a las proteínas y el daño se debe principalmente a la oxidación de un grupo de aminoácidos, tales como fenilalanina, tirosina, metionina e histidina; también se llega a dar la oxidación debido a entrecruzamientos de cadenas de péptidos así como formación de grupos carbonilos[19]. Finalmente, el estrés oxidativo puede provocar modificaciones al ADN. Los principales cambios que se observan son la oxidación de las bases, así como fragmentaciones, deleciones, reordenamientos cromosómicos, interacciones ADN-proteínas y desmetilación de citosinas que activan genes; además de manera particular, puede ocurrir la alteración en el ácido nucleico de un gen en específico, lo cual desencadena en la pérdida de expresión del gen y/o la síntesis de esa proteína en específico [19].

Por otra parte, la respuesta antioxidante es uno de los mecanismos de defensa celulares más eficientes y también el más vulnerable a ser atacado por compuestos tóxicos. Factores enzimáticos y no enzimáticos participan en este mecanismo de defensa ante la presencia de ROS a nivel celular. Entre los factores enzimáticos involucrados en la respuesta antioxidante encontramos a la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la enzima glutatión peroxidasa (GPx) y la enzima glutatión transferasa (GST). Entre los factores no enzimáticos involucrados en la respuesta antioxidante están la vitamina C y E, los carotenoides, los flavonoides, compuestos de zinc y selenio, los aminoácidos (cisteína, metionina), entre otros. [20].

El estrés oxidativo se relaciona, además con diversas enfermedades como afecciones cardiovasculares (arterosclerosis, el infarto agudo al miocardio y la hipertensión), enfermedades neurológicas (esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y Alzheimer), así como diabetes[21].

La evaluación del riesgo en zonas industriales por la presencia de sustancias químicas requiere de la utilización de biomarcadores (indicadores), que denoten exposición a estas sustancias en los organismos, así como alteraciones en componentes, procesos, estructuras, funciones celulares o bioquímicas inducidas por la exposición a las mismas. Bajo esta premisa, es importante la utilización de biomarcadores de exposición y biomarcadores de efecto. Los primeros son aquellos xenobióticos o sus metabolitos que pueden ser medidos dentro de un organismo o a partir de sustancias excretadas por el cuerpo; mientras que, los biomarcadores de efecto, son cualquier alteración bioquímica, fisiológica o de cualquier otro tipo dentro de un organismo causada por un xenobiótico[22] (en esta categoría entran además los biomarcadores de efecto temprano, que son sustancias que permiten evaluar el desarrollo precoz de alguna enfermedad, incluso antes de que se muestren los signos típicos)[23].

En el caso de zonas industriales, el monitoreo de biomarcadores de exposición y efecto nos permite: 1) determinar qué tan elevada es la exposición ambiental a ciertos xenobióticos y con ello comparar (en el caso de que existan) con índices de exposición biológica o valores biológicos de tolerancia acordados por organizaciones internacionales y gobiernos, así como 2) determinar si se está produciendo una condición anormal debido a dicha exposición y así proveer herramientas adicionales para un manejo clínico.

El monitoreo de biomarcadores para la evaluación de sitios contaminados implica el desarrollo y estandarización de protocolos que tengan en cuenta la adquisición, almacenamiento y tiempo de manejo de la muestra, así como la revisión de procedimientos analíticos disponibles para la cuantificación del marcador y sus limitaciones con respecto a la detección, sensibilidad, precisión y exactitud; además de la estandarización de un protocolo que garantice un adecuado nivel de calidad y control[24].

Como se mencionó inicialmente, las zonas industriales no solo traen consigo cosas positivas, sino también una serie de posibles afectaciones principalmente a los sitios que las circundan y, por ende, a la población que los habita. Dentro de la población que se ve afectada en general, existen grupos que son más vulnerables, entre ellos los niños, los adultos en plenitud, las mujeres embarazadas y las personas que tienen alguna enfermedad crónica-degenerativa. La población infantil, que es la que se estudió durante esta investigación, se encuentra aún más vulnerable debido a que es diferente de manera notoria de la población adulta en cuanto a metabolismo y dieta, entre otros factores; y se ha observado que, por cada kilogramo de peso, un niño consume mayor cantidad de alimento, tiene una frecuencia respiratoria más elevada y beben mayor cantidad de líquidos, por lo que puede concluirse que están mucho más expuestos que un adulto sano. Por otro lado, su sistema biológico aún está en desarrollo, por lo que la exposición a contaminantes puede ocasionar un daño permanente. También es relevante mencionar que a edades tempranas es posible que no se metabolicen los compuestos tóxicos, acumulándose entonces en el niño y provocando posibles enfermedades a causa de dicha acumulación[25].

2. ANTECEDENTES

2.1. ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS

Los metales pesados se definen químicamente como elementos de transición y post-transición, incluyendo a algunos metaloides como el arsénico y el selenio[26], además, tienen una densidad elevada con respecto al agua[9]. Debido a su alta toxicidad se les da el nombre alternativo de elementos potencialmente tóxicos (EPT's). A diferencia de otros compuestos que resultan tóxicos para un organismo, los EPT's no se degradan, sólo se asocian con otros compuestos como las enzimas, sustituyendo otros metales esenciales, siendo la mayoría de las veces acumulados, por lo que su relevancia radica en que a bajas concentraciones pueden ser elevadamente tóxicos[9].

Los EPT's se encuentran de manera natural en el ambiente; como constituyentes de la corteza terrestre, emitidos por erupciones volcánicas y en forma de minerales. Sin embargo, la emisión de EPT's por fuentes antrópicas puede representar un problema de salud pública, al ser liberados al ambiente en cantidades mucho mayores a las producidas por fuentes naturales; emitiéndose como residuos a través de una gran variedad fuentes tales como desechos farmacéuticos, domésticos, agrícolas e industriales.

2.1.1. Presencia en zonas industriales

Como ya se mencionó en el apartado anterior, las fuentes antrópicas tienen el principal impacto en el ambiente en la generación de EPT's. Las industrias que destacan en la producción de este tipo de desechos son la industria metalúrgica, así como plantas termoeléctricas o refinerías[9, 27]. La contaminación ambiental por EPT's también puede darse por una serie de factores como la erosión del suelo, erosión del suelo por iones metálicos y lixiviación de metales pesados [9] .

Las industrias de refinamiento de metales son de gran relevancia ya que muchas veces, a partir de los productos de éstas se elaboran materias primas para otro tipo de fábricas. Por lo general, se caracterizan por tener grandes instalaciones, sin embargo, como

se menciona anteriormente contribuyen en gran medida a la contaminación del ambiente por EPT's. Según Gutiérrez (2003), los principales EPT's liberados por industrias de refinamiento de metales en México son plomo, cadmio, zinc, arsénico, selenio y mercurio [28]. El daño al ambiente se da de la siguiente manera[29]:

1. Agua: Generalmente los desechos se pueden verter de manera intencional o accidental como residuos ácidos y reactivos con altos contenidos de EPT's.
2. Aire: los contaminantes principales son gases, así como partículas, los cuales provienen generalmente de fundiciones.
3. Suelo: esta contaminación se da principalmente por vertido o mal almacenamiento de los desechos.

Por otro lado, las plantas termoeléctricas son instalaciones en las cuales se produce energía a través de calor, el cual es generado a partir de la combustión (usando combustibles fósiles normalmente), a pesar de las ventajas que éstas traen consigo, contribuyen también de gran manera a la contaminación por EPT's, tal como se menciona en párrafos anteriores. Durante el proceso de combustión se emiten al aire una gran cantidad de compuestos. La mayoría de los combustibles fósiles que se utilizan en este tipo de plantas suelen tener impurezas, las cuales también son emitidas al ambiente, entre tales impurezas se encuentran mercurio, arsénico, cadmio, por mencionar algunos EPT's[30].

El proceso de refinación del petróleo consiste en el tratamiento de dicho compuesto para transformarlo en productos que puedan ser más accesibles tanto en uso como económicamente. Este proceso es de gran relevancia en la economía de las naciones, sin embargo, también trae consigo la emisión de una gran cantidad de compuestos, esto se da principalmente debido a que el petróleo contiene una gran cantidad de impurezas, entre ellas algunos metales y metaloides que entran en el grupo de EPT's. El tipo de impurezas y la cantidad de éstas depende de la calidad del petróleo[31].

2.1.2. Metodologías de análisis

Existen diferentes metodologías de análisis para EPT's. Las que tienen mayor uso son la espectrometría de absorción atómica (AAS) que analiza un solo elemento a la vez o la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)[32], que ofrece un análisis multielemental con mayor resolución y rapidez. Esta última es la que se utiliza cuando las concentraciones son a nivel ultratrazas. A continuación, se describen ambas metodologías.

2.1.2.1. Espectroscopía de absorción atómica

La espectroscopía de absorción atómica es una técnica que es usada para la determinación de ciertos elementos, por lo general metales, tanto a niveles traza como mayoritarios. La técnica consiste, como su nombre lo indica, en la absorción de radiación por átomos o iones elementales, los cuales han sido vaporizados de manera previa[33]. La radiación que es absorbida puede ser en la región ultravioleta-visible (UV), de rayos X y de fluorescencia; sin embargo, para el caso de los metales, se utiliza la región UV[32].

La técnica de la espectroscopía de absorción atómica tiene ciertos requerimientos tales como[32]:

- 1) Una fuente de radiación, para hacer posible la incidencia de ésta en los átomos del analito.
- 2) Monocromador, el cual va a aislar las líneas de resonancia.
- 3) Un atomizador, para hacer posible que la muestra pase a un estado de vapor y pueda ser detectado, y finalmente,
- 4) Un detector, por medio del cual se determinarán las intensidades de los flujos incidentes y emergentes.

Existen dos tipos de espectroscopía de absorción atómica: a la llama y de horno de grafito. En ambas se tiene una lámpara de cátodo hueco, que está fabricada con el elemento a analizar, pero a diferencia de la llama, el espectrofotómetro de absorción atómica de horno de grafito utiliza menos muestra y además es más sensible que el espectrofotómetro

de llama. El funcionamiento de este último consiste en la incidencia de un haz de luz por una lámpara de cátodo hueco en una llama hacia un detector, de manera simultánea, la muestra es aspirada hacia el interior de la llama en forma de gotas muy finas que se evaporan en ésta[34], llamándose entonces atomizador de llama. El atomizador de llama se encuentra compuesto por un mechero de flujo laminar, además cuenta con un nebulizador de tubo concéntrico. Un esquema de dicho sistema de atomización se muestra en la Figura 1.

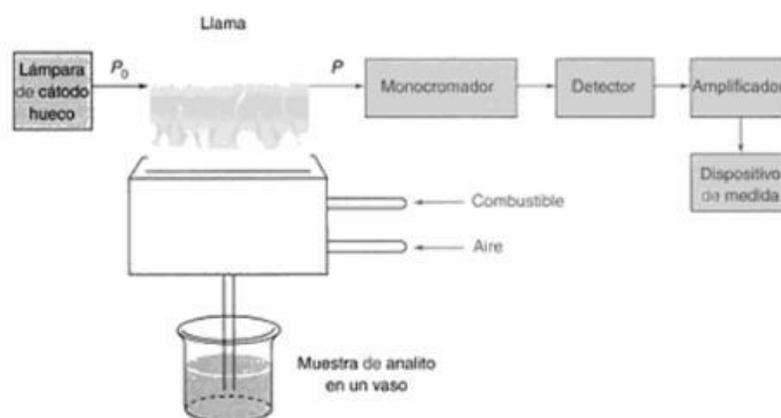


Figura 1. Espectrómetro de absorción atómica a la llama

Por otro lado, el sistema de atomización por horno de grafito o electrotérmico consiste en un sistema donde la atomización se da en un tubo cilíndrico de grafito abierto por ambos extremos, en el cual se introduce la muestra por medio de un pequeño orificio que tiene en la parte central. Es llamada atomización electrotérmica ya que el tubo es ajustable a contactos eléctricos que también son de grafito y los cuales quedan a los extremos del tubo. Los átomos se encuentran dentro del tubo y al hacer incidir un haz de luz, éstos absorben una parte de la energía. Los contactos eléctricos se mantienen dentro de una cavidad metálica, la cual se encuentra refrigerada por agua. Este tipo de atomización cuenta con un flujo de gas externo y un flujo de gas interno, los cuales sirven para prevenir la entrada de aire y para eliminar los vapores que se formaron por la matriz, respectivamente[35].

2.1.2.2. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es una metodología utilizada comúnmente para llevar a cabo la cuantificación de distintos elementos de manera simultánea, en diferentes matrices y con límites de detección muy bajos, además de una buena selectividad, exactitud y precisión[36].

El ICP-MS consiste en un sistema de introducción de la muestra, un sistema de ionización, un analizador de masas, un detector de iones, un procesador de la señal y una bomba para ejercer vacío. La función de cada una de las partes se describe a continuación.

- Sistema de introducción de muestra: la introducción de la muestra al equipo, generalmente se lleva a cabo por medio de un nebulizador, cuando la muestra se encuentra en estado líquido. Por otro lado, si las muestras son sólidas existen otro tipo de sistemas de introducción de muestras, tales como láser o ablación por chispa.
- Sistema de ionización: una vez que la muestra se encuentra dentro del equipo, el plasma (el cual se genera al someter el flujo de gas argón a un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia) provocará la ionización de ésta.
- Analizador de masas: en esta parte del equipo la relación masa/carga (m/z) juega un papel muy importante, ya que cada uno de los iones serán separados de acuerdo con esta propiedad. El analizador utilizado en ICP-MS es un analizador cuadrupolar el cual consiste en cuatro barras metálicas de sección circular o hiperbólica que se encuentran dispuestas con gran precisión sobre una circunferencia, de tal manera que el haz de iones incida sobre el centro del dispositivo, aplicando un potencial constante y un potencial alterno de radiofrecuencia superpuesto[37].
- El detector: En esta parte los iones son detectados. En espectrometría de masas existen diferentes tipos de detectores, sin embargo, para el caso del ICP-MS el más utilizado es el multiplicador de electrones. Este detector consiste en una serie de dinodos que multiplican los electrones antes de llegar al ánodo donde se mide la

corriente. El espectro de masas muestra la corriente del detector en función de la relación m/z seleccionada por el campo magnético[38].

- Finalmente, pasan a través de un procesador de señal, el cual arroja los espectros de masas.

Las ventajas de esta metodología son extensas como ya se mencionó anteriormente, por lo que se prefiere sobre otras, pues aunado a lo anterior, los tiempos de análisis son cortos y además; es capaz de analizar una gran parte de los elementos de la tabla periódica[35].

Cabe mencionar que tanto para AAS e ICP-MS es necesario hacer una dilución si son muestras con una matriz sencilla, o una digestión si éstas son muestras de matriz compleja; esto con el fin de evitar que existan interferencias o que algunas partes del equipo tales como el nebulizador adquieran algún tipo de impureza.

2.2. FLUORUROS

El flúor se encuentra de manera común en la naturaleza, pero raramente en forma elemental. Los principales compuestos de flúor son los fluoruros o compuestos como la fluorita, fluorapatita y criolita, entre otros. Los fluoruros se definen como compuestos binarios o sales de flúor y otro elemento, se encuentran de manera natural en el planeta, principalmente en rocas, carbón, arcillas y suelos; por ende, se encontrarán en cuerpos de agua que tengan contacto con los materiales mencionados anteriormente. En aire, de manera natural, estos compuestos son encontrados debido a las erupciones volcánicas[39].

Además de encontrarse de forma natural, en algunos países como Estados Unidos, Canadá, Brasil, Australia, España, Argentina, Korea del Sur y Nueva Zelanda los fluoruros son adicionados al agua en forma de fluoruro de sodio, el cual se disuelve de manera rápida[40] y son encontrados en diversos productos dentales para prevenir las caries, en los alimentos pueden encontrarse fluoruros debido a suelos contaminados con estos compuestos o por el uso de fertilizantes que contengan fosfatos. Por otro lado, los fluoruros también pueden encontrarse en zonas donde haya industrias que se dediquen a la fabricación de acero, producción de ácido fluorhídrico, elaboración de refrigerantes, etc.,

también es emitido por las plantas termoeléctricas, y algunas otras industrias que llevan a cabo procesos con altas temperaturas ; las principales emisiones que se liberan son gas de fluoruro de hidrógeno o fluoruros particulados.[39].

Es importante mencionar que la exposición ya sea por la ingesta de alimentos o agua contaminada, o por respirar estos compuestos, así como exposición dérmica, en una cantidad elevada, puede dañar al ser humano, provocando estrés oxidativo, fluorosis dental, fluorosis en el esqueleto y neurotoxicidad[41-44].

2.2.1. Presencia de fluoruros en suelos y agua

Los fluoruros en suelos se encuentran a niveles altos, ya que, la lixiviación sólo elimina una pequeña cantidad de estos compuestos. También pueden encontrarse debido a la cercanía a zonas industriales que emitan fluoruros o, como ya se mencionó anteriormente, por el uso de fertilizantes fosfatados, además de la presencia de minerales con alto contenido de fluoruros. Una vez en el suelo, pueden acumularse en las raíces de las plantas o en las hojas cuando el polvo lo deposita en éstas[39], la cantidad de fluoruros que se acumule dependerá en gran parte del tipo de planta, si la planta es ingerida por animales los niveles de fluoruros en éstos aumentarán y se acumularán en la estructura ósea, sin embargo, el consumo de carne no representa un riesgo para el humano.

La contaminación del agua por fluoruros se debe de manera principal al suelo, ya que, como se menciona en párrafos anteriores, existen minerales como criolita, fluorita y fluorapatita, que forman depósitos, y los fluoruros pueden tener contacto con cuerpos de agua, como ríos, lagos y afluentes subterráneos. Debido a que muchas veces la demanda de agua sobrepasa la abundancia de ésta, en algunas poblaciones se toma de depósitos subterráneos, lo cuales comúnmente, contienen altos niveles de fluoruros.

Los niveles promedio de fluoruros en aguas superficiales se encuentran alrededor de 0.2 mg L^{-1} , mientras que en agua potable se encuentra en un intervalo de 0.02 a 1.5 mg L^{-1} . Como se mencionó anteriormente, el flúor no sólo se encuentra de manera natural en el agua, en algunos casos también es agregado al agua como medida preventiva de caries

dental[39, 45]. Según la norma mexicana NOM-127-SSA1-1994 el nivel permitido en agua potable es de 1.5 mg L^{-1} [46] y la NOM-041-SSA1-1993 establece el límite de 0.7 mg L^{-1} [47].

2.2.2. Metodologías de análisis

Existen diversas metodologías de análisis para cuantificar fluoruros en diversas matrices. Las que comúnmente se usan son la cromatografía de gases y el método potenciométrico con un electrodo de ion selectivo, sin embargo, también puede cuantificarse por otros métodos como el espectrofotométrico, el enzimático y fluorométrico. Para fines de ésta investigación, se describirá el potenciométrico[39].

El electrodo de ion selectivo (ISE, ion selective electrode) según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés) es el método más usado para la cuantificación de fluoruros[39].

Un electrodo de ion selectivo es específico para cada ion. El principio de estos electrodos consiste en una membrana semipermeable, que separa dos fases, de tal modo que, el transporte de material entre las fases se modifica o inhibe, de manera diferente a lo que sería si las dos fases estuvieran en contacto directo[48]. Para el caso de fluoruros, esta membrana está formada por fluoruro de lantano y permite el movimiento de los iones fluoruro de un lado del cristal al otro lado. Los iones hidróxido (OH^-) tienen un radio similar al del fluoruro; por lo que pueden sustituirlo en ciertos minerales y pasar a través de la membrana del electrodo; por lo tanto, es recomendable que el electrodo de fluoruro de lantano no se emplee a valores de pH básicos. El electrodo de ion selectivo consiste en un tubo cerrado por una membrana del material anteriormente mencionado, al cual se le añade fluoruro de europio para producir la formación de lagunas reticulares de aniones en el cristal, así los iones fluoruro pueden pasar de un lado a otro de la membrana provocando una diferencia de potencial, la cual es necesaria para el funcionamiento adecuado del electrodo[49]. El tubo contiene una solución de fluoruro de sodio de concentración de 0.1 M además de cloruro de sodio (NaCl), esto con motivo de mantener un potencial estable en el electrodo de referencia el cual está hecho de plata y es recubierto con cloruro de plata. Teniéndose una solución diluida de fluoruros en la cual el electrodo es sumergido, los iones

fluoruro pasan del interior de la membrana al exterior de la membrana, generando una carga negativa en el exterior de ésta. La magnitud de la carga dependerá de la concentración del ion fluoruro en la solución[34]. Actualmente, los electrodos de ion selectivo para fluoruros son capaces de medir concentraciones en el orden de $\mu\text{g L}^{-1}$ con elevada precisión. Para una medición certera de la concentración de los iones fluoruro es necesario el uso de una sustancia que sea capaz de ajustar la fuerza iónica, en este caso se utiliza una disolución amortiguadora de la fuerza iónica total (TISAB, Total Ionic Strong Adjustment Buffer), con el fin de minimizar el error debido a la concentración iónica de los patrones y del analito. El pH de la solución debe mantenerse entre 5.0 y 5.5, ya que a este pH predomina el ion fluoruro[49]. Es importante resaltar que, en muestras biológicas como orina para el caso de este estudio en específico, se le añade ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés) con el fin de acomplejar algunos metales como el aluminio o hierro, que pudieran crear alguna interferencia.

2.2. 8-HIDROXI-2'-DEOXIGUANOSINA

Como ya se mencionó anteriormente, cuando existe un desbalance entre los agentes oxidantes y las defensas contra este tipo de compuestos se produce una situación llamada estrés oxidativo, la cual producirá ciertas moléculas entre las cuales se encuentra la 8-OHdG. Como se muestra en el apartado anterior existen diferentes formas para poder medir el estrés oxidativo, entre los biomarcadores de efecto se encuentran la 8-OHdG o 8-oxo-dG y 5-OH-mdU. El biomarcador 8-OHdG, es uno de los biomarcadores más utilizados, debido a que es el producto oxidativo de mayor abundancia en el ADN y ha sido de gran importancia, pues se ha encontrado que es un marcador sensible y específico de daño oxidativo en el ADN, ya sea cuando un individuo ha estado expuesto a xenobióticos, radiación o debido al padecimiento de ciertas enfermedades. La exposición a los xenobióticos o a la radiación puede contribuir a la formación de radicales libres en exceso y a su vez un estado de estrés oxidativo, por lo que la presencia de 8-OHdG dependerá de la capacidad antioxidante y las actividades enzimáticas reparadoras del ADN. La generación de este biomarcador se presenta en la Figura 2[50]. Cuando el equilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos antioxidantes fisiológicos se descompensa, los radicales libres

pueden llegar a interactuar con el material genético generando diversas lesiones en el ADN. La 8-OHdG es una molécula promutagénica y un marcador biológico de estrés oxidativo producido por la interacción de la 2'-desoxiguanosina (2'-dG) con radicales hidroxilo (OH^\cdot), los cuales reaccionan con la posición 8 de la 2'-dG y son los principales radicales libres implicados en el daño oxidativo. Además, la 8-OHdG es capaz de aparearse con adenosina en vez de citosina durante la replicación, causando la transversión de G a T, entonces la presencia de 8-OHdG puede llevar a la mutagénesis. Sin embargo, el proceso de reparación de 8-OHdG tiene como resultado la escisión del aducto 8-OHdG aumentando su concentración en suero y que puede ser excretado por la orina[51]. Debido a su fácil recolección, el 8-OHdG es un buen marcador para el estrés oxidativo.

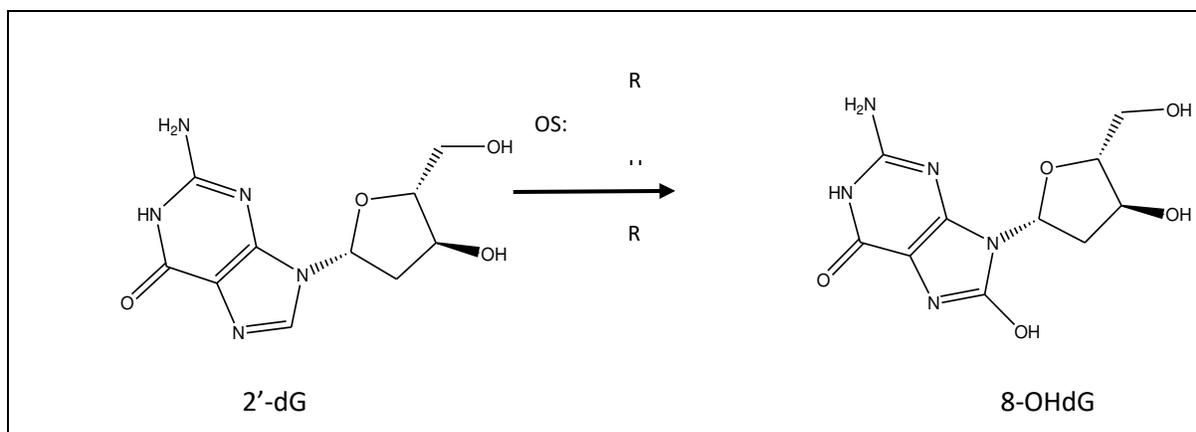


Figura 2. Formación de la 8-OHdG

2.3.1. Metodologías de análisis

Existen diversas metodologías para el análisis de la 8-OHdG, entre las cuales se encuentran GC-MS, HPLC-MS/MS, HPLC-ED y algunos métodos inmunoquímicos. Siendo los 3 primeros los mayormente utilizados[52]. Cada una de estas 3 metodologías, necesita como paso previo la extracción en fase sólida, que permite eliminar interferencias de matriz (orina en este caso), quedando finalmente el analito de interés.

La cromatografía de gases (GC) consiste en la volatilización de la muestra la cual es inyectada en una columna cromatográfica y tiene un arrastre por una fase móvil gaseosa,

la cual es llamada gas portador[53]. El analito debe ser un gas o un líquido volátil, éste es inyectado a través de un septo en un inyector caliente, en el cual se evapora rápidamente. El vapor que se genera es arrastrado por la fase móvil, que es un gas, a través de la columna cromatográfica. Una vez que los analitos se separaron llegan al detector de masas (espectrómetro de masas, MS), la señal aparece en una computadora o un registrador que está conectado al detector. Para que los analitos eluyan de manera correcta, la columna debe de tener una temperatura que provoque que los analitos alcancen una presión de vapor que sea la adecuada para que estos se encuentren en forma gaseosa y puedan ser detectados[54]. Sin embargo, esta técnica en específico tiene la desventaja de que se sobreestimen las cantidades del biomarcador 8-OHdG, ya que, durante el paso de derivatización las bases no oxidadas de ADN se dañan, produciendo entonces la 8-OHdG[55].

Por otro lado, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) es una de las más utilizadas debido a que es ideal para determinaciones cuantitativas con una exactitud elevada, además de que se puede aplicar a un gran número de sustancias que son utilizadas en distintos ramos de la ciencia[56]. Este tipo de cromatografía consiste principalmente en la separación de los componentes de una mezcla basándose en las interacciones químicas que existen entre el analito que se desea analizar (en este caso 8-OHdG) y la columna cromatográfica; usando una fase móvil para el transporte del analito, además de presiones altas para lograr que la fase móvil pase a través de la columna (fase estacionaria) y que los volúmenes que se administren al cromatógrafo sean reducidos. Para la separación de los analitos, se pueden usar dos métodos de elución: el método isocrático y el método en gradiente. Para el caso del biomarcador a analizar, de acuerdo con la literatura consultada, se utiliza el método en gradiente. El método en gradiente consiste en una variación del porcentaje de la fase móvil. [57].

En el caso de la separación por HPLC, existen dos sistemas de detección para la 8-OHdG, el detector electroquímico y el espectrómetro de masas (el cual se utiliza también en la separación por cromatografía de gases). Ambos sistemas se describen a continuación.

- **Detector electroquímico:** La detección electroquímica es una técnica que ofrece una buena sensibilidad, especificidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Cualquier especie que sea capaz de ser reducida u oxidada podrá ser detectada. En el detector electroquímico se emplean 3 electrodos, el electrodo de trabajo; en el cual se lleva a cabo la reducción u oxidación, así como también el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia, los cuales compensan cualquier cambio en la conductividad por la fase móvil. El proceso electroquímico tiene lugar en la superficie del electrodo, la reacción procede de manera muy rápida y casi hasta finalizar. Existen 3 diferentes tipos de detectores electroquímicos: detector amperométrico, detector coulombimétrico y detector voltamperométrico. El detector amperométrico consiste en la aplicación de un determinado potencial al electrodo de trabajo, midiendo entonces la intensidad de la corriente resultante de la reacción electroquímica que ocurre en este electrodo, la superficie del electrodo de trabajo en este tipo de detector es de aproximadamente 0.5 cm². El detector coulombimétrico al igual que el amperométrico se aplica cierto potencial al electrodo de trabajo, sin embargo, el electrodo de trabajo es de una superficie mayor. Por otro lado, el detector amperométrico implica la aplicación de un potencial variable al electrodo de trabajo, seguida de la medida de la intensidad de la corriente resultante de la reacción que se llevó a cabo en el electrodo[58]. El detector que es utilizado para la determinación de 8-OHdG es el detector amperométrico, ya que dicha metodología oxida los aductos del DNA en una gran variedad de matrices. Sin embargo, la metodología tiene la desventaja de que en matrices como orina, un gran número de especies que pueden ser oxidadas o reducidas, causando interferencias de matriz[55]. Por último, el detector voltamperométrico consiste en la aplicación de un potencial sobre una celda electroquímica monitoreando entonces la corriente resultante a través de esta celda. Esta metodología es ampliamente aplicada en HPLC, cabe mencionar que además; es una técnica activa, ya que el potencial aplicado provoca un cambio en la concentración de una especie electroactiva en la superficie del electrodo, esto debido a una reacción de óxido-reducción[59].

- La espectrometría de masas es la otra forma de detección para HPLC y para GC. Es considerada una de las técnicas más sensibles para la detección del biomarcador 8-OHdG. El principio de la espectrometría de masas consiste en la generación de iones a partir de compuestos, ya sea orgánicos o inorgánicos mediante un método adecuado, los iones son separados por su relación m/z y son detectados de manera cualitativa y cuantitativa a partir de esta relación y de su abundancia por medio de un dispositivo adecuado. La espectrometría de masas se diferencia de las técnicas espectroscópicas debido a que no utiliza ningún tipo de radiación, además los procesos que se llevan a cabo en este tipo de técnica son químicos, por lo que se considera una técnica destructiva y la muestra no se puede recuperar como en otro tipo de técnicas[60]. Para poder cumplir con cada una de estas funciones es necesario que un espectrómetro de masas cuente con sistemas de introducción de muestras, sistemas de ionización, analizador para la separación de iones y sistema detector y analizador[61]. En este trabajo, para la determinación de la 8-OHdG en muestras de orina, se realizó una extracción en fase sólida con cartuchos HLB para eliminar algunos interferentes de matriz y la muestra extraída se separó por HPLC utilizando una columna de fase inversa, el eluyente de la columna cromatográfica fue introducido al espectrómetro mediante el dispositivo de electronebulización (ESI) como fuente de ionización y se utilizó el instrumento de trampa de iones como separador de masas. Una característica particular de la trampa de iones es que permite realizar varios ciclos de fragmentación de iones seleccionados, sin embargo, presenta baja resolución.

3. JUSTIFICACIÓN

El municipio de Salamanca se encuentra geográficamente ubicado en la región suroeste del estado de Guanajuato y forma parte del corredor industrial del bajío, esto es debido a la gran cantidad de empresas que se encuentran ubicadas en dicho municipio, entre ellas la refinería “Ing. Antonio Manuel Amor”, la planta Termoeléctrica de la CFE, entre otras.

El hecho de ser una zona altamente industrializada conlleva a la emisión de una gran cantidad de sustancias químicas contaminantes afectando la calidad del ambiente. Las principales emisiones, por el tipo de empresas que se encuentran en este municipio son COV's, HAP's, óxidos de nitrógeno, de carbono y azufre, así como partículas finas y EPT's, representando estos un riesgo para la salud de la población, debido a que algunos de ellos pueden provocar condiciones a nivel celular de estrés oxidativo que a largo plazo puede traer consigo la aparición de diversas enfermedades. Estas enfermedades pueden ser minimizadas si la detección del contaminante, así como del efecto se da en etapas tempranas como la niñez.

Por lo anterior, y con base a diversos estudios realizados previamente, en donde se encuentra la presencia de EPT's en suelos y polvos de la ciudad de Salamanca y la presencia de fluoruros en agua de esta ciudad[62] es necesaria la implementación y validación de métodos analíticos que sirvan para la cuantificación de estos elementos, así como de biomarcadores de estrés oxidativo.

La disponibilidad de métodos precisos y sensibles permitirán definir con mayor precisión las relaciones entre múltiples exposiciones químicas y efectos sobre la salud, de manera tanto cualitativa como cuantitativamente.

Es importante mencionar que la población evaluada fue de niños de entre 6 y 15 años de edad, esto debido a la vulnerabilidad que presentan a ciertas sustancias por su metabolismo, además, el biomonitoreo en niños es un instrumento útil en la formulación de políticas de salud ambiental[63].

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar los niveles EPT's y fluoruros presentes en los niños que viven en zonas circundantes a las principales industrias ubicadas en la ciudad de Salamanca, Gto., además de montar un procedimiento analítico para evaluar estrés oxidativo en esta misma población.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar la población de estudio para el monitoreo biológico
2. Determinar los niveles de EPT's en muestras de orina de la población seleccionada, por medio de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.
3. Cuantificar los fluoruros presentes en la orina de la población elegida por medio de un electrodo de ion selectivo.
4. Desarrollar y aplicar la metodología analítica necesaria para determinar la concentración del biomarcador 8-OHdG presente en orina de niños residentes de Salamanca, Gto., por medio de HPLC-ESI-IT-MS/MS.
5. Determinar la concentración del biomarcador 8-OHdG presente en orina de niños residentes de Salamanca, Gto., por medio de HPLC-ESI-IT-MS/MS.

5. METODOLOGÍA

5.1. SELECCIÓN DE LA LOCALIDAD Y POBLACIÓN

La ciudad de Salamanca en el estado de Guanajuato se destaca por la presencia de una gran cantidad de industrias, las cuales son fuente de emisión de diversos compuestos, dichos compuestos suponen un riesgo a la salud. Por esta razón se eligieron 4 escuelas ubicadas en las localidades que circundaban a las empresas ubicadas en esta ciudad. Se seleccionó además una población control, que no tuviera presencia de industria. La población control se localizó en la localidad de “Lo de Sierra” del municipio de Irapuato, Guanajuato. En la Figura 3 se muestra la ubicación de las escuelas y las industrias.

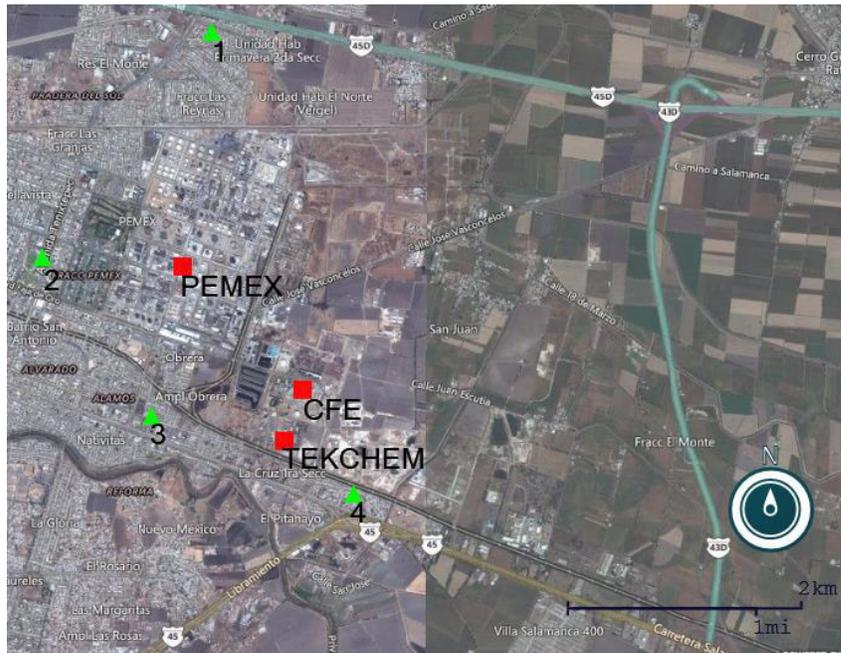


Figura 3. Ubicación de las escuelas con respecto a las principales industrias en Salamanca, Gto.

5.2. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN

La población estudiada fue un total de 114 niños de entre 6 y 15 años asistentes a 4 escuelas cercanas a las principales industrias de la ciudad de Salamanca. Para el caso de la población control se estudiaron 21 niños de entre 6 y 12 años.

5.3. ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO

Para llevar a cabo el estudio, se obtuvo la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Guanajuato, el cual avaló que los procedimientos que se llevaron a cabo se apegan al protocolo establecido. También se solicitó y obtuvo el permiso de las autoridades correspondientes del municipio.

Se llevaron a cabo pláticas informativas para los padres o tutores de los niños que participaron en el estudio, esto con el fin de que conocieran los objetivos del proyecto, así como los posibles riesgos y los beneficios que tiene dicho estudio. Como la edad de la población no sobrepasó los 18 años, fue necesario solicitar la firma del padre o tutor como aceptación de lo establecido en un consentimiento informado.

Los resultados serán informados a los padres o tutores de los niños participantes, una vez concluido el estudio.

Es importante mencionar que no fue obligatoria la permanencia de los participantes, por lo que el padre o tutor tuvo la opción de retirar al niño del estudio realizado en el momento que él lo considerara adecuado.

5.4. EVALUACIÓN DE FACTORES DE RIESGO

Se evaluaron factores como estado de salud general del niño, higiene, ubicación de la vivienda, así como diversos hábitos que indicaran un factor de riesgo. Además, se realizaron mapas en donde se ubicaron cada uno de los participantes en el presente estudio, esto con el fin de saber si existían zonas de riesgo por las empresas que se encontraban cerca de los domicilios.

5.5. PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRA

Las muestras se colectaron en frascos de polipropileno, nuevos y estériles, colectándose la primera orina de la mañana. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4°C durante su traslado y a -20 °C una vez en el laboratorio y hasta su análisis[64].

5.6. DETERMINACIÓN DE EPT's

5.6.1. Tratamiento previo del material

Los tubos cónicos de polipropileno utilizados para la digestión de la muestra fueron lavados previamente y enjuagados con agua destilada. Posteriormente se enjuagaron con ácido nítrico al 2%. Y finalmente con agua grado HPLC.

5.6.2. Digestión

Los tubos cónicos de polipropileno en los cuales se colocaron 500 μL de muestra son pesados previo a la adición de la muestra y de manera posterior. Subsecuentemente, se adicionó 1 mL de HNO_3 concentrado (SIGMA-ALDRICH, Grado HPLC) y 500 μL de una solución de estándar interno (Agilent Technologies, Internal Std. Mix, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de 6-Li, Sc, Ge, Rh, In, Tb, Lu, Bi en una matriz de 10% HNO_3 /PART NUMBER 5188-6525) y la mezcla fue puesta a reflujo durante 3 horas a 105°C (o se mantuvo 8 horas a temperatura ambiente). Transcurrido el tiempo y dejando enfriar (si fue aplicado calor), fueron adicionados 500 μL de H_2O_2 al 30% (J.T. Baker, Grado reactivo) y se colocó nuevamente en reflujo durante 1 hora. Una vez pasado el tiempo, los tubos se destaparon y se dejó evaporar la mezcla hasta un volumen aproximado de 500 μL . El volumen final de la mezcla fue diluido con 5 mL de una solución de HNO_3 al 2%. El tubo fue pesado y el contenido se trasvasó a tubos de polipropileno.

5.6.3. Análisis de las muestras

Inicialmente, se leyó una curva de calibración, de la cual el rango lineal fue de 0.1 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. El estándar interno utilizado fue el indio, encontrado en la mezcla comercial de Agilent mencionada en el párrafo anterior. Las muestras fueron analizadas en un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS 7900, Agilent Technologies) acondicionado previamente. Las condiciones de trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de trabajo del ICP-MS	
Espectrómetro	ICP-MS 7900 Agilent Technologies
Introducción de la muestra	Se introduce por medio de un nebulizador Micro Mist y una cámara de rocío, la cámara de refrigeración tiene efecto Peltier. El sistema de Introducción de las muestras es de bajo caudal.
Velocidad de flujo (mL min ⁻¹)	1
Poder de RF (W)	1550
Número de réplicas	3
Interfase	Conos de Ni
Límites de aceptación para la solución de optimización	Li > 20 000 cps, Y >100 000 cps, Tl > 100 000 cps, CeO/Ce < 3%, Ba ²⁺ /Ba ⁺ < 3%
Modo de escaneo	Altura de pico
Masas analíticas y sus isótopos	⁵¹ V, ⁵² Cr, ⁷⁵ As, ¹¹¹ Cd, ²⁰² Hg, ²⁰⁸ Pb, ¹⁰⁷ Ag, ⁶³ Cu, ¹¹⁵ In (estándar interno)
Velocidad de flujo del gas (L min ⁻¹)	
Gas acarreador	1.2
Lentes iónicos (conjunto de lentes de extracción Omega con x-lentes)	
Lentes de extracción	-160 (V)
Lentes Omega	11.2 (V)
Parámetros del detector	
Tiempo muerto (ns)	40
Analógico (V)	2139
Pulso (V)	1048

Para dicho estudio se analizaron blancos entre cada 10 muestras, además se analizó también un estándar certificado (Control liofilizado de orina para elementos traza, nivel I, ClinChek® RECIPE Chems.), el cual sirvió como control de calidad y contenía los elementos de interés para el presente estudio. El estándar certificado fue resuspendido tal y como indica el proveedor (RECIPE), la solución obtenida junto con los blancos y las muestras estudiadas fueron analizadas empleando el mismo protocolo.

5.7. DETERMINACIÓN DE FLUORUROS

5.7.1. Preparación de soluciones

Para el análisis de las muestras se preparó una solución de TISAB, la cual contiene ácido acético (J.T. Baker®, Grado Reactivo), cloruro de sodio (Fermont, Grado Analítico), citrato de sodio (Karal, Grado Analítico) y se ajustó a un pH entre 5.0 y 5.5. Además, se preparó una solución patrón de 100 mg L⁻¹ de fluoruros, para la cual, se pesaron 0.221 g de

NaF (Jalmex, Grado Analítico) previamente secado en horno durante 2 horas a 105°C Una vez preparada la solución de fluoruros se prepararon soluciones de 1 y 10 mg L⁻¹, para llevar a cabo la calibración del equipo, en la cual, según las especificaciones del equipo (Thermo Scientific Orion Star™), la magnitud de las concentraciones de las soluciones debe de variar en múltiplos de 10.

5.7.2. Análisis de las muestras

24 horas antes del análisis de las muestras se les adicionó 0.01 g de EDTA (Jalmex, Grado Analítico,) por cada 5 mL de muestra y se dejaron a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo, se pasó una alícuota de 1 mL a un vaso de precipitados de polipropileno y se le adicionó la misma cantidad de la solución de TISAB previamente preparada. Las muestras fueron leídas por triplicado con un electrodo de ion selectivo Thermo Sicientific conectado al equipo mencionado en el párrafo anterior, obteniendo los resultados en µg L⁻¹. Previo al análisis de las muestras, se realizó la calibración del equipo, cuidando que la pendiente tuviera un valor de -57±2 mV, la cual indica la sensibilidad del instrumento.

Para el control de calidad en esta determinación, se utilizó el mismo estándar empleado para la determinación de metales y fue tratado de la misma forma que las muestras para la medición de fluoruros.

Los resultados obtenidos fueron corregidos por creatinina, la cual fue determinada por el método colorimétrico de Jaffé [65], empleando un Kit de creatinina SPINREACT®.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO (EPT's Y FLUORUROS)

Se llevó a cabo un análisis estadístico descriptivo y exploratorio (media, desviación estándar, mínimo, máximo, frecuencias y normalidad) de las variables continuas (edad y niveles de cada uno de los elementos analizados (Pb, Cd, As, V y F)). La concentración de cada uno de los analitos que se cuantificaron no cumplió con los criterios de normalidad, por lo que fue necesario realizar un análisis bivariado para muestras no paramétricas (Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney). Para las variables categóricas, como el género y zonas de residencia se llevó a cabo un análisis descriptivo por medio de frecuencias. El análisis se realizó con el programa estadístico IBM SPSS versión 21.

5.9. DESARROLLO DEL PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE 8-OHdG POR HPLC-ESI-IT-MS/MS.

5.9.1. Establecimiento de parámetros instrumentales para la determinación de 8-OHdG por HPLC-ESI-IT-MS/MS.

Se realizaron curvas de calibración con el estándar 8-OHdG (sigma) en fase móvil con un intervalo lineal de 5 a 100 ng·mL⁻¹ e inyectando 10 µL en cada punto de calibración. Se realizó la inyección de tres repeticiones de cada punto de la curva. En la siguiente tabla se muestran los parámetros del equipo y las condiciones de separación.

Tabla 2. Condiciones de trabajo del HPLC-ESI-IT-MS/MS	
Cromatógrafo	HPLC UltiMate 3000 de Dionex Thermo Scientific
Espectrómetro de masas	AmaZon SL de Bruker Daltonics con electronebulizador ESI +
Condiciones de separación	
Columna	C-18 de núcleo sólido (2.6 µm de tamaño de partícula, 30 mm × 2.1 mm diámetro interno, 100 Å)
Fase móvil	A -- Formiato de amonio 5 mM; B – acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1%
Método de elución	Método en gradiente (0 min 3% B, 15 min 30 % de B, 18 min 80% B, 20 min 3% B)
Velocidad de flujo	0.2 mL/min.
Fuente de Ionización por electronebulización	
Voltaje de electronebulización alternado	4000 V
Voltaje de plato	500 V
Gas nebulizador y secado	Nitrógeno (N ₂)
Presión de gas nebulizador	1.8 Bar
Flujo del gas de secado	6 mL min ⁻¹
Temperatura de fuente	200°C
Voltaje de salida del capilar	140 V

Los espectros de masas se adquirieron en modo de operación “UltraScan” para un rango m/z 50-400 con un control de carga de iones (ICC) ajustado a 100,000 con tiempo máximo de acumulación de 100 ms. La trampa fue calibrada de manera externa con una mezcla de *tuning* (“ESI tuning Mix” de baja concentración, Agilent). Se utilizó ajuste de parámetros inteligente (SPS) para una m/z 250. El Helio fue el gas de colisión. La cuantificación se realizó mediante el modo MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples) y el aislamiento de iones se realizó con $\Delta m/z \pm 2$, 100 ms de tiempo de adquisición y amplitud de fragmentación fue de 0.5 V. La adquisición de masas de los iones en modo MRM fue

para MS de 284 m/z y MS/MS de 168 m/z . El software utilizado para la cuantificación de los resultados fue Bruker Quant Analysis calculando las áreas de pico de los iones cuantificadores de sus respectivos cromatogramas de MRM.

5.9.2. Determinación de 8-OHdG en muestras de orina por HPLC-ESI-IT-MS/MS.

5.9.2.1. Extracción en fase sólida de 8-OHdG de muestras de orina

Acondicionamiento de la muestra

Las muestras de orina se acidificaron con HCl 2N para ajustarlas a un pH 4-5 y se mantuvieron almacenados a -20°C hasta el análisis.

Preparación de la muestra y extracción de la 8-OHdG

Las muestras fueron descongeladas a una temperatura de 37°C por 10 min para redissolver el posible precipitado de 8-OHdG que pudo formarse durante el tiempo almacenado. Una vez descongelada se homogenizaron por 1 minuto para después centrifugar a $10\,000 \times g$ por un tiempo de 10 minutos. Posteriormente, se tomaron de 3 a 5 mL del sobrenadante (dependiendo de la cantidad de creatina) y fueron diluidos con agua en proporción 1:1. El cartucho de extracción en fase sólida que contiene un relleno con balance hidrofílico-lipofílico (Oasis HLB cartridge (6cc, 200mg)) se preparó adicionando 5 mL de MeOH (Grado HPLC) y posteriormente 6 mL de agua (Grado HPLC). La muestra diluida fue cargada en el cartucho y una vez que ésta pasó a través del cartucho, se adicionaron 3 mL de agua para el lavado. La muestra fue eluída con 4 mL de agua:acetonitrilo (se varió la relación desde 1:10, 1:5 y 1:1, v/v) y usando un evaporador SpeedVac se evaporó a sequedad. El residuo se resuspendió en 200 μL de la fase móvil inicial (formiato de amonio 5 mM y acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% (v/v)).

Adicionalmente, se realizó la adición de estándar ($50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 8-OHdG, Sigma H5653-5MG) a 5 mL de muestra de orina antes y después del procedimiento de extracción. Antes de la inyección al sistema cromatográfico, las muestras y las soluciones de calibración fueron filtradas (filtros Whatman $0.22 \mu\text{m}$, PTFE).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos durante la realización del trabajo de tesis de acuerdo con el objetivo general planteado que consistió en cuantificar los niveles EPT's y fluoruros presentes en muestras de orina de los niños que viven en zonas circundantes a las principales industrias ubicadas en la ciudad de Salamanca, Gto., además de montar un procedimiento analítico para evaluar estrés oxidativo en esta misma población.

Para alcanzar este objetivo general, se seleccionó una población de niños de entre 6 y 15 años, esto debido a que la exposición al agente tóxico puede ser mayor, ya que en esta edad se realizan una gran cantidad de actividades al aire libre; esto puede implicar contacto cutáneo, ingestión e inhalación del agente tóxico. Es importante considerar que la frecuencia respiratoria de un niño es más elevada (12 a 30 respiraciones por minuto, en rango de edad de 6 a 18 años[66]). Además, es probable que la población de esta edad tenga menos cuidado con el lavado de manos antes de llevarlas a la boca. Por otro lado, la población de esta edad se considera vulnerable ya que los procesos de metabolismo son más rápidos y absorben una mayor cantidad del contaminante (especialmente si este es ingerido), además de que el biomonitoreo en niños puede ser un instrumento útil en la formulación de políticas de salud ambiental. Una vez seleccionada la población se procedió a la evaluación de biomarcadores de exposición (EPT's y fluoruros) y biomarcadores de efecto (8-OHdG) en muestras de orina de la población seleccionada. Por ello, los resultados obtenidos se describen en dos etapas: en la primera etapa se describen las características de la población seleccionada y la población control, así como la determinación de los niveles de EPT's y fluoruros en muestras de orinas de ambas poblaciones. En la segunda etapa, se presentan los resultados obtenidos del desarrollo del procedimiento para la determinación de 8-OHdG en orina por HPLC-ESI-IT-MS/MS como biomarcador de estrés oxidativo.

6.1. ETAPA 1: DETERMINACIÓN DE EPT'S Y FLUORUROS

Como ya se mencionó en apartados anteriores, la ciudad de Salamanca es una región altamente industrializada, lo que puede llevar a hallazgos de elevados niveles de contaminantes en sus habitantes. Tanto los fluoruros como los EPT's representan un riesgo para la salud.

En la Figura 4 se muestra la ubicación de las diferentes escuelas a las que asistía la población estudiada, así como las principales industrias en el municipio de Salamanca y la ubicación de las viviendas. En azul se muestra la zona 1, la zona 2 en amarillo y en rojo se muestra la zona 3. De acuerdo con el Programa de Reordenamiento Ecológico del municipio de Salamanca, la dirección predominante de los vientos es de oriente a sur[67], por lo que se espera que la zona 3, sea la más afectada la dirección del viento; esto debido a que las partículas contaminantes van en esa dirección.

La Tabla 3, describe las características de la población, así como los factores de riesgo de cada una de las zonas, incluyendo la población control. Se observa que el rango de edad es similar en ambas poblaciones (de 6-15 años para el caso de Salamanca y de 6-12 años para el caso de Irapuato). El porcentaje de niños y niñas es estadísticamente diferente, siendo mayor el porcentaje de niñas en la población expuesta (54.5% vs 28.6%; $p=0.03$). En la Tabla 3, también se presentan factores que modifican la exposición a EPT's, como, por ejemplo: 1) cercanía de la vivienda a un sitio de riesgo, 2) cercanía de la vivienda a una avenida, 3) hábito de tener ventanas abiertas, 4) personas fumadoras en el hogar. Al hacer la comparación entre ambos municipios, se observa que factores como la cercanía a un lugar que produce emanaciones de compuestos tóxicos; y, la cercanía a alguna avenida principal, son significativamente diferentes entre sí: 60.5% vs 30.7% y 4.8% vs 95.2% ($p<0.001$), lo anterior tiene su explicación en la diferencia que existe entre la industrialización de Salamanca con respecto a Irapuato. En Salamanca, como se mencionó, se encuentra una refinería, una central termoeléctrica, una empresa dedicada a la fabricación de plaguicidas, además de otro tipo de empresas como refacciones industriales, de reactores, entre otras. Por otro lado, es una ciudad que por dicha industrialización ha crecido en gran medida y, por ende, está mayormente urbanizada, encontrándose entonces que los residentes de esta ciudad tendrán mayor posibilidad de vivir cerca de una avenida.

Otro factor de riesgo en el cual existen diferencias significativas es la permanencia de ventanas abiertas, lo cual puede deberse principalmente a la sensación climática que existe en cada ciudad. En el estudio realizado, se observa que la población de Salamanca es la que abre las ventanas en un 86.8%, siendo significativamente diferente a la población control (47.6%, $p<0.001$)

Finalmente, otro factor de riesgo consiste en que el niño sea o no fumador pasivo. En este factor no se encontraron diferencias significativas entre los municipios, esto puede tener su explicación en que este tipo de hábitos no depende específicamente de la ciudad, a continuación, se muestra el porcentaje de los adultos que fuman cerca del niño en la población expuesta y control, respectivamente (33.3% vs 23.8%; $p=0.47$).

TABLA 3. Características generales de la población y factores de riesgo							
		Salamanca Zona 1 (n=17) (%)	Salamanca Zona 2 (n=37) (%)	Salamanca Zona 3 (n=22) (%)	Salamanca Población Total (n=114) (%)	Control (n=21) (%)	p* Expuestos/Control
Edad (años)		9.8±0.9 (9-12)	10.0±1.1 (7-12)	9.8±2.1 (6-15)	9.9± 1.6 (6 - 15)	8.7±2.0 (6-12)	
Genero	Fem M	53.8 46.2	60.9 39.1	49 51	54.5 45.5	28.6 71.4	0.03
Vive cerca de	Gasolinera	15.4	21.7	19.6	20.2	---	<0.001
	Hojalatería y Pintura	7.7	4.3	3.9	4.4	100	
	Tintorería	15.4	---	2.0	0.9	---	
	Ferretería	---	2.2	3.9	4.4	---	
	Refinería	---	2.2	---	1.8	---	
	Carpintería	---	2.2	---	0.9	---	
	Pipas de combustóleo	---	---	3.9	1.8	---	
	Ninguna	46.2	56.5	45.1	49.1	---	
No contestó	15.4	10.9	21.6	16.7	---		
Vive cerca de avenida	Si	53.8	56.5	62.7	60.5	4.8	<0.001
	No	38.5	41.3	21.6	30.7	95.2	
	No contestó	7.7	2.2	15.7	8.8	---	
Tiene ventanas abiertas	Si	76.9	89.1	88.2	86.8	47.6	<0.001
	No	15.4	8.7	9.8	10.5	52.4	
	No contestó	7.7	2.2	2.0	2.6	---	
Fuma cerca del niño	Si	23.1	39.1	29.4	33.3	23.8	0.47
	No	76.9	58.7	68.6	64.9	76.2	
	No aplica	---	2.2	2.0	1.8	---	

*Prueba de Kruskal-Wallis.

La Tabla 4, muestra las concentraciones de los EPT's y fluoruros en orina de los niños según la zona en la que residían (Zona 1, 2 o 3) y las concentraciones de EPT's y fluoruros de los niños de la zona control.

Para el caso del arsénico, las medias geométricas por zona fueron de 38.9, 45.2 y 51.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ en la zona 1, 2 y 3 respectivamente, para el caso de la zona 4 (población control) se encontró una media geométrica de 96.6 $\mu\text{g L}^{-1}$. Comparando las medias de arsénico entre las 4 zonas (incluyendo Irapuato), se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), presentando los niveles de arsénico más elevados los niños de Irapuato. Comparando los resultados con el valor reportado como normal de arsénico en orina por la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés) de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ [68], menos del 15% de los niños residentes del municipio de Salamanca superaban este valor. Por otro lado, la población control, un 50% presentó valores por encima de los 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Como ya se mencionó anteriormente, ciertas zonas de Irapuato tienen una elevada contaminación por arsénico proveniente de las aguas subterráneas, y siendo estas aguas las que abastecen a estas comunidades, el consumo de este elemento es elevado [69, 70], además de que es bioacumulable, por lo que al integrarse a la cadena trófica, el humano estará expuesto al consumir agua o alimentos contaminados. En estudios realizados previamente en la ciudad de Salamanca por Rodríguez *et al.*, se encontró una media de 59 $\mu\text{g L}^{-1}$ en agua de pozos en el año 2000[71], lo cual explica en gran medida las concentraciones obtenidas en las tres zonas de la ciudad de Salamanca. Para el caso de Irapuato se encontró que para las dos localidades estudiadas el agua de grifo tenía una concentración media de 41.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ [72], comparando con el valor obtenido para la población de Irapuato (96.6 $\mu\text{g L}^{-1}$), se observa que la concentración encontrada en orina es mucho mayor, se puede suponer que estos resultados tienen que ver con la bioacumulación del elemento en plantas, por lo que al momento de ser ingeridas pueden pasar al humano y esto aumenta el valor del elemento.

En la misma tabla se presentan las concentraciones obtenidas para vanadio. Las medias geométricas de vanadio en orina por zona fueron de 3.3, 3.6, 2.9 y 3.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ en la zona 1, 2, 3 e Irapuato, respectivamente. No se observó una diferencia estadísticamente

significativa en los niveles de vanadio entre las 4 zonas ($p=0.89$), sin embargo, se observa que cerca del 90% de los valores encontrados en las 3 zonas así como en la población control sobrepasan los valores normales para este elemento según el ATSDR, los cuales son de $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ [73]. En estudios realizados anteriormente por Castro-Ramírez *et. al* [74] en la ciudad de Salamanca se encontró que los niveles de vanadio en suelos fueron de un máximo de $213.77 \text{ mg Kg}^{-1}$ y para polvos se encontró un máximo de $200.10 \text{ mg Kg}^{-1}$ sobrepasando la norma mexicana NOM-147-SEMARNAT-2004 que marca valores de 78 mg Kg^{-1} para zonas residenciales y las Directrices canadienses establecen un valor de 130 mg Kg^{-1} [75] por lo que las concentraciones encontradas en el suelo de este elemento, podrían explicar los altos niveles en la población del presente estudio. Existen estudios previos que mencionan la presencia de vanadio en los mantos acuíferos de la ciudad de Salamanca, el cual puede encontrarse de forma natural o deberse a actividades antropogénicas; ya que puede filtrarse a los mantos acuíferos por la contaminación de los suelos debido al uso de combustibles que lo contienen[76]. Además, es importante mencionar que el vanadio y sus compuestos se producen principalmente por procesos de combustión, así como en procesos de refinación [77, 78], por lo que en la ciudad de Salamanca es posible encontrar niveles elevados de este elemento. Por otro lado, la zona control puede tener una cantidad elevada de dicho elemento debido a que, como ya se mencionó anteriormente, el agua de este municipio tiene una cantidad $22 \mu\text{g L}^{-1}$ [79] además de que también se genera mediante procesos de combustión.

Para el caso del plomo, las medias geométricas fueron de 0.20, 0.08, 0.02 y $9.50 \mu\text{g L}^{-1}$ en la zona 1, 2, 3 e Irapuato respectivamente. El análisis estadístico muestra que la zona control es diferente de la zona 1, 2 y 3 ($p<0.001$). Cerca del 50% de las muestras en cada una de las zonas de Salamanca supero el valor de $0.677 \mu\text{g L}^{-1}$ [80] (54.5%, 55.5%, 40.6%) reportado como valor normal reportado por el ATSDR, mientras que el 100% lo superó en Irapuato. Es importante mencionar que en Salamanca se encontró un mayor número de muestras no detectables en comparación con Irapuato (27.3%, 34.3%, 45.5% vs 0%). Al igual que el vanadio, el plomo es liberado al ambiente por procesos de combustión, además otras fuentes de este elemento son la industria de la cerámica y del vidrio, pigmentos, insecticidas

y protección contra rayos X, entre otras. La población de la zona 1 y la zona control tienen mayor concentración de este elemento, esto puede ser debido a que se almacenan los alimentos en contenedores de cerámica, así como las emisiones de vehículos o en el caso de la zona 1, la cercanía con la refinería, aunque también el uso de insecticidas comúnmente puede implicar un factor de riesgo. Otros factores, tales como el derrame de hidrocarburos que contengan este elemento pueden llegar a influir a la contaminación por el elemento anteriormente mencionado[71].

El cadmio fue otro de los elementos evaluados, la media geométrica en las zonas fue de 0.0300, 0.0060, 0.0010 y 0.0009 $\mu\text{g L}^{-1}$ en la zona 1, 2, 3 e Irapuato respectivamente. No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p=0.07$). Del 17 al 40% de las muestras analizadas por zona sobrepasan el valor normal reportado por el ATSDR de 0.185 $\mu\text{g L}^{-1}$ [81], el mayor porcentaje de muestras por arriba de este nivel se presentó en la zona 1. La exposición a cadmio puede deberse a diversos factores, entre ellos, humo del cigarro, y su uso en una gran cantidad de actividades como en tintorerías, quema de combustibles fósiles y de basura, entre otras. En el caso de la población de las zonas de Salamanca, las concentraciones por arriba de los valores normales pueden tener su explicación en la quema de combustibles fósiles, ya que como se ha mencionado en apartados anteriores, se encuentra la refinería y la planta termoeléctrica, además de la alta afluencia de vehículos en esta ciudad y como se puede observar en la Tabla 4, un alto porcentaje de la población expuesta vive cerca de una avenida. Para la población de Irapuato, la media de concentración fue de 0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$, la cual no sobrepasa los límites normales, y el porcentaje que sobrepasa estos límites es del 27.8% el cual podría deberse a la exposición al humo de cigarro, ya que según la Tabla 3, un 23.8% fuma cerca del niño.

Finalmente, la Tabla 4 muestra los resultados para los fluoruros, en donde se observa que existe una diferencia significativa ($p<0.001$) entre las zonas 1 y 2 de la zona 3 y control (1.2, 1.4, 1.9 y 2.2 $\mu\text{g L}^{-1}$). La alta concentración de fluoruros en orina se debe principalmente a una elevada ingesta de estos por medio del agua. Es probable entonces, que para el caso de la zona 3, el agua de abastecimiento esté contaminada con este elemento y que la mayoría de los niños beban agua del grifo.

Ya que según datos del INEGI la mayor parte de las localidades que constituyen la zona 3 son zonas rurales con un nivel de marginación entre medio y alto[82]. En el caso de la zona control, como ya se mencionó anteriormente, se observa una mayor concentración de fluoruros, esto por la contaminación de las fuentes de abastecimiento, principalmente pozos[70]. Lo reportado en la literatura coincide con los resultados obtenidos, ya que es en esta zona donde se encuentra un mayor porcentaje de la población que sobrepasa los niveles normales de fluoruros en orina ($2 \mu\text{g L}^{-1}$ [83]; 47.6%).

TABLA 4. Comparación entre diferentes zonas de los elementos evaluados

Elemento	Zona	Media (µg/L)	Mediana (µg/L)	Intervalo (µg/L)	Media Geométrica (µg/L)	Media Geométrica (µg/g creatinina)	%<LC	Percentil		Valores Normales Humanos (VNH)	%>Valor de referencia	p*
								75%	95%			
Arsénico	1	47.6	35.9	16.6 – 102.6	38.9	31.1	0	55.4	99.5	<100 µg L ⁻¹	9.1	<0.001
	2	52.0	46.9	11.7 – 139.9	45.2	38.5	0	62.8	105.4		7.3	
	3	58.1	49.7	19.0 – 141.1	51.8	37.6	0	70.5	112.5		13.0	
	Control ⁺	123.3	91.9	26.8 - 527.5	96.6	102.7	0	135.9	230.0		47.6	
Vanadio	1	4.8	4.6	0.3 – 13.5	3.3	3.4	0	5.2	7.9	0.5 µg L ⁻¹	90.9	0.89
	2	7.3	4.9	0.3 -67.4	3.6	2.7	0	7.1	18.0		94.7	
	3	5.2	4.0	ND – 15.2	2.9	2.4	2.4	7.1	14.4		97.5	
	Control	5.6	3.5	0.56 – 31.9	3.1	3.9	0	5.8	7.8		100	
Plomo	1	7.1	3.1	ND – 27.8	0.2	0.4	27.3	9.8	15.6	No establecido	54.5	<0.001
	2	3.5	1.1	ND – 30.6	0.08	0.05	34.3	2.9	15.7		55.5	
	3	4.0	0.1	ND – 63.4	0.02	0.01	45.5	1.4	12.6		40.6	
	Control ⁺	10.9	11.2	2.3 – 24.6	9.5	9.8	0	13.8	18.7		100	
Cadmio	1	0.45	0.13	ND – 2.0	0.03	0.04	30	0.18	0.99	0.185 µg L ⁻¹ 0.193 µg g ⁻¹ creatinina	40.0	0.07
	2	0.21	0.05	ND – 1.3	0.006	0.004	43.8	0.22	0.93		30.3	
	3	0.09	ND	ND – 1.1	0.001	0.001	66.7	0.15	0.39		17.1	
	Control	0.08	ND	ND – 0.32	0.0009	0.001	72.2	0.24	0.30		27.8	
Flúor	1‡	1.3	1.0	0.7 – 3	1.2	1.1	0	1.3	2.0	2 µg L ⁻¹ 3µg g ⁻¹ creatinina	7.7	<0.001
	2‡	1.6	1.7	0.6 -5.0	1.4	1.2	0	1.8	3.0		11.1	
	3	2.2	2.0	0.7 – 6.0	1.9	1.5	0	2.6	4.1		35.4	
	Control	2.5	2.0	0.62 – 5.5	2.2	2.3 ⁺	0	3.3	4.6		47.6	

*Prueba de Kruskal-Wallis, ⁺Significativamente diferente de Zona 1,2 y 3, ‡ 1 y 2 son significativamente diferentes de 3 y Control

La Tabla 5 muestra las medias de los resultados obtenidos para cada uno de los elementos de interés en el estándar certificado (Control liofilizado de orina para elementos traza, nivel I, ClinChek®). Se puede observar que las medias obtenidas experimentalmente se encuentran dentro del rango de los resultados reportados en el inserto del material certificado. Estos resultados tienen relevancia ya que nos dan la pauta para saber si el procedimiento se llevó a cabo de manera correcta, encontrando en este caso porcentajes de recobro de 104.67% para el arsénico, 105.24% para el vanadio, 98.37% para plomo, 78.86% para el cadmio y 102.3% para los fluoruros.

Tabla 5. Comparación de la concentración obtenida de arsénico, vanadio, plomo, cadmio y fluoruros presentes en el estándar certificado				
Elemento	Unidades	Media de la concentración reportada (min-máx.)	Concentración experimental	% de Recobro
Arsénico	$\mu\text{g L}^{-1}$	43.0 (34.4-51.6)	45.01	104.67
Vanadio	$\mu\text{g L}^{-1}$	20.2 (16.2-24.3)	21.26	105.24
Plomo	$\mu\text{g L}^{-1}$	24.0 (19.2-28.8)	23.61	98.37
Cadmio	$\mu\text{g L}^{-1}$	2.46 (1.97-2.96)	1.95	78.86
Fluoruros	mg L^{-1}	3.91 (3.13-4.69)	4.00	102.30

En la Tabla 6, se muestran diferentes estudios de monitoreo de EPT's y fluoruros en población infantil en diferentes escenarios de riesgo, los cuales sirven para poder comparar los resultados obtenidos durante este estudio; para el arsénico, por ejemplo, la media fue de $53.6 \mu\text{g L}^{-1}$ y de $123.3 \mu\text{g L}^{-1}$ para Salamanca e Irapuato, respectivamente mientras que en estudios realizados por Trejo-Acevedo *et. al* en el 2009[84], en población infantil sin ninguna enfermedad (n=229) de Salamanca, se observa que la media se encuentra en $40.8 \mu\text{g L}^{-1}$, lo cual implica que probablemente exista un incremento en el aporte de As a través del tiempo, desde que se realizó ese estudio a la fecha, esto puede deberse a una mayor contaminación con este elemento, mayor consumo de agua o alimentos contaminados.

En otro estudio realizado para población en general en Estados Unidos por la CDC [85] se observa una media de $6.02 \mu\text{g L}^{-1}$, la cual es mucho menor a la encontrada en el presente estudio lo cual puede tener su explicación en factores como la industrialización de la ciudad de Salamanca, así como la contaminación del agua tanto en Salamanca como Irapuato. Heitland [86], en el 2006 en Alemania encuentra niveles de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ en población infantil residente de una zona industrial, encontrándose en rangos por debajo de los $100 \mu\text{g L}^{-1}$ que son marcados como normales. Sin embargo, tenemos que, para el municipio de Irapuato, los niveles de arsénico sobrepasan los valores normales, esto puede ser debido a que el agua con la que se abastecen ciertas comunidades de este municipio es agua de pozo contaminada con este elemento [69, 70]. En la comunidad del Copal y Valencianita tienen una elevada contaminación por arsénico de las aguas subterráneas, y siendo estas aguas las que abastecen a estas comunidades, el consumo de dicho elemento es elevado [69, 70], además, de que como se mencionaba con anterioridad, este elemento tiene la capacidad de bioacumularse[87].

Para el vanadio, puede observarse en la tabla siguiente que las medias de la concentración encontradas tanto para la zona control ($5.6 \mu\text{g L}^{-1}$) como para Salamanca ($5.9 \mu\text{g L}^{-1}$) están más elevadas que los otros estudios. En el estudio realizado por Heitland la media de concentración encontrada en 72 niños fue menor al límite de cuantificación, mientras que en Roma en un estudio que se llevó a cabo por Alimonti[88] la media fue de $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$, lo cual es indicador de que los niveles de vanadio en el ambiente de la ciudad

de Salamanca es mayor que los niveles presentes en las otras ciudades que se reportan en la tabla. Las altas concentraciones en la ciudad de Salamanca pueden tener su explicación en el tipo de industrias que se encuentran (refinería y termoeléctrica), ya que este elemento se genera por la combustión de productos fósiles[77, 78] y en la zona control (Irapuato), según estudios realizados anteriormente para aguas subterráneas se encontró que los niveles de vanadio se encuentran en $22 \mu\text{g L}^{-1}$ [79].

Para el caso del plomo se observa que las medias para la población de Salamanca e Irapuato son de 4.1 y $10.9 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. En estudios realizados en Alemania por Heitland se encontró una media de concentración de $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$ para niños[86], mientras que en Pakistán en una zona industrial también se encontraron valores de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ [89]. El plomo puede ser, al igual que el vanadio un subproducto de la combustión, por lo que en zonas donde existen empresas relacionadas con este proceso es probable que se encuentren elevados los niveles de este elemento. Además, otro factor importante es la urbanización de la ciudad, pues los vehículos pueden emanar este elemento al ambiente. Por otro lado, puede haber también contaminación debido al uso de algunos utensilios de cerámica, ya que estos pueden estar contaminados por este elemento, pues existe el uso de ciertos esmaltes que lo contienen, y una vez en el recipiente de cerámica puede, fácilmente lixiviarse hacia los alimentos con el calor o acidez[90-92]. Hay que considerar que este metal es un elemento altamente tóxico, por lo que es de relevancia mantener un control de este elemento en zonas altamente industrializadas como lo es la ciudad de Salamanca, así como zonas que pueden estar expuestas por otro tipo de situaciones, tal como la ciudad de Irapuato. Los niveles de plomo en orina en la población de estudio son elevados, como lo muestra la 4. En la actualidad no se ha establecido un valor humano normal en orina para este elemento, pues el plomo, incluso en concentraciones muy bajas causa afecciones severas dentro del organismo[14].

Otro de los elementos que se mencionan en la Tabla 6 es el cadmio, para el cual tanto la población de la zona control como la población expuesta (0.08 y $0.18 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) se encuentran por debajo del valor encontrado en personas no expuestas de manera ocupacional y sanas, según ATSDR ($0.185 \mu\text{g L}^{-1}$)[81]. Para niños residentes de

zonas industriales Heitland reporta una concentración media de $0.16 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que la CDC reporta un valor de $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ para población en general, dichos valores al igual que los valores obtenidos en el presente estudio no sobrepasan el valor límite. Sin embargo, en otros estudios, uno en la misma ciudad de Salamanca se encontraron niveles superiores a los normales ($0.56 \mu\text{g L}^{-1}$)[84], esta diferencia puede deberse a que probablemente en la actualidad exista mayor control de las emisiones que contienen este elemento, además de factores como la exposición al humo de cigarro de la población analizada. Otro estudio realizado en Italia, teniendo como actividad el refinamiento del petróleo se observa una media de $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$, la cual coincide prácticamente con el estudio de Trejo en la ciudad de Salamanca.

Finalmente, la Tabla 6 muestra los valores de fluoruros presentes en la población de Salamanca e Irapuato, en donde se observa que la población control tiene una mayor cantidad que la población de Salamanca, esto es debido a que se tienen registros previos de que el abastecimiento de agua proviene de pozos y el agua subterránea contiene altas concentraciones de este elemento [69, 70]. Aunque según estudios realizados, los pozos de Salamanca también exceden las regulaciones mexicanas para agua[62]. Otros estudios que se han realizado en China nos muestran que los niveles son aún más elevados, teniendo una media de 3.5 mg L^{-1} [93] y en la India se encuentran concentraciones muy similares a las encontradas en Irapuato. Es importante destacar, que la mayor exposición por flúor se da por la exposición a agua contaminada.

Tabla 6. Comparación de diferentes estudios para EPT's y Fluoruros

Elemento	N	Media (µg/L)	Intervalo (µg/L)	Media Geométrica (µg/L)	Media Geométrica (µg/g creatinina)	%<LC	Percentil		País	Actividad	Referencia
							75%	95%			
Arsénico		53.6	11.7-141.1	46.6	37.2	0	70.3	109.8	Salamanca, México	Refinería, Industrial	Presente estudio
	21	123.3	26.8 - 527.5	96.6	102.7	0	135.9	230.0	Irapuato, México	Rural	Presente estudio
	16	40.8					63.3	72.3	Salamanca, México	Refinería, Industrial	Trejo-Acevedo 2009
	399	6.1	5.22-7.12	6.80	8.9		10.5	53	E. U	Población general	NHAN 2015
	72	25	1-260	12	10	0	13	91	Alemania	Industrial	Heitland 2006
Vanadio		5.9	ND – 67.4	3.1	2.6	1.1	7.1	15.1	Salamanca, México	Refinería, Industrial	Presente estudio
	21	5.6	0.56 – 31.9	3.1	3.9	0	5.8	7.8	Irapuato, México	Rural	Presente estudio
	131	0.04			0.072	3			Roma, Italia	Urbana	Alimonti, 2000
	72	<LC	LC-0.16	<LC	<LC	79	<LC	0.1	Alemania	Industrial	Heitland 2006
Plomo		4.12	ND – 63.40	0.05	0.03	38.60	3.80	17.00	Salamanca, México	Refinería, Industrial	Presente estudio
	21	10.9	2.3 – 24.6	9.5	9.8	0	13.8	18.7	Irapuato, México	Rural	Presente estudio
	63	25							Pakistan	Industrial	Shan, 2015
	72	1.3	0.1-4.6	1.0	0.8	0	1.4	3.4	Alemania	Industrial	Heitland 2006
Cadmio		0.180	ND – 2.000	0.003	0.002	53.700	0.180	0.990	Salamanca, México	Refinería, Industrial	Presente estudio
	21	0.0800	ND – 0.3200	0.0009	0.0010	72.200	0.2400	0.3000	Irapuato, México	Rural	Presente estudio
	16	0.56					0.87	0.97	Salamanca, México	Refinería, Industrial	Trejo-Acevedo 2009
	399	0.150	0.130-0.170	0.150	0.180		0.07	0.148	E.U.	Población general	NHANES 2015
	210	0.60			0.55		1.0	1.42	Milazzo, Italia	Refinería	Interdonato, 2014
	72	0.16	0.03-0.48	0.13	0.1	0	0.16	0.36	Alemania	Industrial	Heitland 2006
Flúor		1.8	0.6 – 6.0	1.6	1.3	0	2.0	4.0	Salamanca, México	Refinería, Industrial	Presente estudio
	21	2.5	0.7 – 5.0	2.2	2.3	0	3.3	4.6	Irapuato, México	Rural	Presente estudio
	155	3.5	0.9-12.5						China	Rural	Xiang 2003
	400	2.3	0.9-3.25						India	Urbana	Singh 2006

El vanadio fue el elemento que presentó los niveles más altos, es por ello por lo que se compararon los resultados con concentraciones obtenidas en población ocupacional (Tabla 7). En estudios realizados anteriormente en Italia, en trabajadores de mantenimiento de calderas Todaro *et. al* [94] se encontraron niveles de entre los 20 a los 270 $\mu\text{g L}^{-1}$, los cuales son superiores a los valores que son reportados como normales (0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$), sin embargo, en comparación con el presente estudio, se encuentra que los límites superiores e inferiores del estudio realizado en Italia son mucho más elevados. Otro estudio realizado en República Checa por Kucera en 1994 [95] muestra rangos de 1.05 a 53.4 $\mu\text{g L}^{-1}$, teniendo como actividad la producción de pentóxido de vanadio, observando entonces que los valores encontrados por Kucera se acercan más a los encontrados en la población de presente estudio, lo que puede deberse a que los niveles de vanadio liberados en este tipo de actividad es similar al emitido por las distintas empresas en el municipio de Salamanca. Por otro lado, Kiviluoto[96], también en un estudio realizado en los trabajadores de la producción de pentóxido de vanadio encontró una media de 32.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de creatinina, siendo ésta muy superior a la encontrada en el presente estudio. Finalmente, en un estudio realizado por Kawai[97], se encontró un rango fue de ND-124 $\mu\text{g L}^{-1}$, siendo estos también muy superiores a los del presente estudio. Sin embargo, a pesar de que los estudios mencionados anteriormente muestran concentraciones más elevadas que las encontradas en este estudio, son de relevancia los valores encontrados ya que se tiene que considerar que la población estudiada son niños de entre 6 y 15 años de edad en los cuales no existe exposición ocupacional, lo cual indica, que los niveles presentes de vanadio en la atmósfera de la ciudad de Salamanca están muy elevados, lo cual puede provocar daños en la salud de la población residente de dicho municipio.

Tabla 7. Comparación de diferentes estudios realizados en población ocupacionalmente expuesta a vanadio							
Elemento	Unidades	Media Intervalo	DE	Mediana	País	Actividad	Referencia
Vanadio	$\mu\text{g L}^{-1}$	92 20 – 270	47	----	Italia	Mantenimiento de calderas	Todaro 1991 [94]
	$\mu\text{g L}^{-1}$	3.7 1.05 - 53.4	3.1	2.5	R. Checa	Producción de pentóxido de vanadio	Kucera 1994 [95]
	$\mu\text{g g}^{-1}$ creatinina	32.8	22.5	----	----	Producción de pentóxido de vanadio	Kiviluoto 1981 [96]
	$\mu\text{g L}^{-1}$	ND – 124	----	----	----	Tinción de superficies metálicas con pentóxido de vanadio	Kawai 1989 [97]
	$\mu\text{g L}^{-1}$ $\mu\text{g g}^{-1}$ creatinina	5.80 ND – 67.37 5.60 ND – 64.9	8.4	4.2 2.3	Salamanca México	Industrial Refinería	Presente estudio

6.2. ETAPA 2: DETERMINACIÓN DE 8-OHDG.

Los métodos cromatográficos en la actualidad tienen gran auge debido a que ayudan a la determinación y cuantificación de un sin número de sustancias, las cuales pueden ser dañinas, o pueden ser sustancias que sirven como biomarcadores de exposición o de efecto ciertos de xenobióticos. Como la segunda etapa de este trabajo se intentó realizar el desarrollo de un procedimiento por HPLC- ESI-IT-MS/MS para la determinación de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina en muestras de orina como biomarcador de estrés oxidativo.

En principio HPLC- ESI-IT-MS/MS es un instrumento que permite la determinación y cuantificación de diversos compuestos a niveles trazas y presenta algunas ventajas y desventajas comparados con otros analizadores (analizador de masa tipo trampa lineal-cuadrupolo, orbitrap o triples cuadrupolos). Las ventajas son, por ejemplo: menos costos, menos susceptibles a las variaciones de condiciones instrumentales, relativamente fáciles de operar, sin embargo, un punto débil es que presenta baja resolución (menor 1Da). Esto se puede compensar con la capacidad de la trampa de iones para hacer fragmentaciones sucesivas (en MS/MS) características de cada molécula, este ciclo se puede repetir progresivamente con alguno de los fragmentos subsecuentes (tándem-MSⁿ) dependiendo de la cantidad del ion parental; además el equipo permite el establecimiento de métodos de monitoreo de reacciones múltiples (MRM).

Debido a que las muestras biológicas, como la orina son comúnmente complejas, la matriz de la muestra puede contener moléculas que enmascaran la detección del compuesto buscado, en estas condiciones, una buena alternativa es el análisis de masas en tándem mediante el MRM. Cabe señalar que, en este caso, además la 8-OHdG se encuentra en rangos muy bajos en la orina.

Para el desarrollo del procedimiento, se adoptaron las condiciones desarrolladas previamente por Alcaraz-Magaña (2015) para la determinación de nucleótidos en muestras de ADN de extractos de plantas[98]. En este caso, las condiciones de HPLC fueron seleccionadas en base a los siguientes criterios: a) fase móvil simple y compatible con ESI-MS; b) pH ligeramente ácido para favorecer la formación compuestos protonados en la

fueron ESI; c) lavado/re-equilibrio eficiente de la columna. Mediante un gradiente de elución con formiato de amonio 5 mM y aumentando el acetonitrilo contenido en ácido fórmico al 0.1 %, se logró la separación de la 8-OHdG en el minuto 6.25 cuando se realizó con el estándar disuelto en la fase móvil (fig. 5(a)). La corrida cromatográfica se extendió a 20 min con la finalidad de evitar efectos de memoria e interferencias en la ionización. Se obtuvieron los espectros MS/MS en *full scan* en modo positivo para corroborar la identidad del compuesto y el MRM para la cuantificación consistió en la selección de la transición 284 *m/z* (ion parental) a 168 *m/z* (ion producto). En la figura 5 se presentan los cromatogramas de ion extraído (CIE) del monitoreo de reacciones (MRM) para la transición 284> 168 *m/z* de las muestras del estándar 8-OHdG con concentración de 0, 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparado en la fase móvil y un volumen de inyección de 10 μL al sistema cromatográfico, determinándose que el límite de cuantificación fue de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 8-OHdG cuando se prepara en fase móvil.

Para las muestras de orina, se realizó previamente una purificación mediante la extracción en fase sólida con cartuchos HLB como se describió en materiales y métodos. Antes de la purificación, se llevó a cabo la determinación de creatinina en las muestras de orina. Los resultados de creatinina obtenidos indicaron que la mayoría de los niños se encontraron dentro del rango normal de creatinina (0.3-3.0 g/L). De acuerdo con los datos de creatinina obtenidos y los reportados en la literatura, se realizaron las diluciones necesarias a las muestras de orina necesaria a pasar a través del cartucho, garantizando la cuantificación del metabolito de manera confiable. Esto con la finalidad de que la concentración de la 8-OHdG presente pudiera ser cuantificada utilizando la curva de calibración obtenida.

Una vez realizada la purificación y preconcentración de la 8-OHdG por el cartucho HLB en las muestras de orina, se procedió a realizar la determinación la HPLC-ESI-IT-MS/MS de acuerdo con los parámetros instrumentales establecidos previamente con la 8-OHdG preparada en la fase móvil. En la figura 5(b), se presenta los resultados obtenidos para 4 muestras de orinas después del paso por la columna HLB y una preconcentración (25X) de la muestra resuspendida en la fase móvil. Los iones analizados fueron para la transición

(284 > 168 m/z) establecidas durante MRM. Como puede observarse en estos cromatogramas, aún después de la preconcentración y purificación por medio el cartucho HLB y posterior análisis por MRM, las muestras de orinas analizadas se encuentran por debajo del límite de cuantificación. Se realizaron dos experimentos con la finalidad de determinar qué factores (baja cantidad de 8-OHdG en la muestra, pérdida en del biomarcador durante el proceso de purificación o interferentes presentes) influían en los problemas para la determinación del biomarcador 8-OHdG. Primero se realizó la adición 8-OHdG a una muestra de orina y se procedió a realizar la purificación y preconcentración tal como se hizo en la muestra si adición de estándar, la concentración final de 8-OHdG en esta muestra fue de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por otra parte, se adicionó a una muestra de orina que fue purificada y preconcentrada, una concentración de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ del estándar 8-OHdG. En ambos experimentos, no se observó incremento en la señal del analito (dato no mostrado), indicando con ello que en las muestras obtenidas puede existir la supresión de picos en la trampa de iones debido a la acumulación de iones con carga en el espacio de la trampa por efecto de la matriz, lo que ocasiona mucho ruido de cuantificación y problemas en la determinación, dicho efecto ya ha sido previamente reportado por Rota *et al.*, quien menciona que el análisis de 8-OHdG en orina, por medio de LC-MS/MS, principalmente aquella metodología en la cual se trabaja con trampa de iones, se tenía una elevada interferencia, y esto, podía deberse a interferencias de matriz (orina, en el estudio mencionado y en el presente estudio)[99].

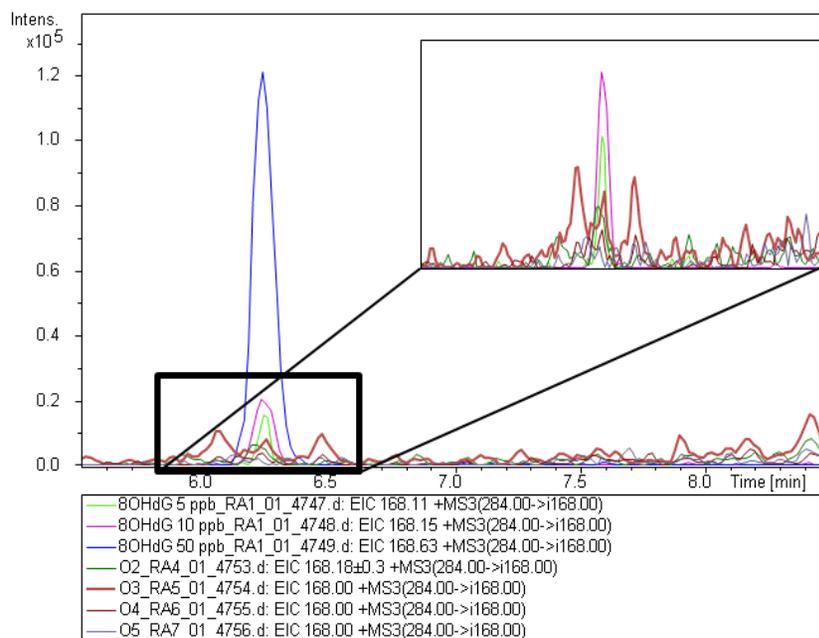
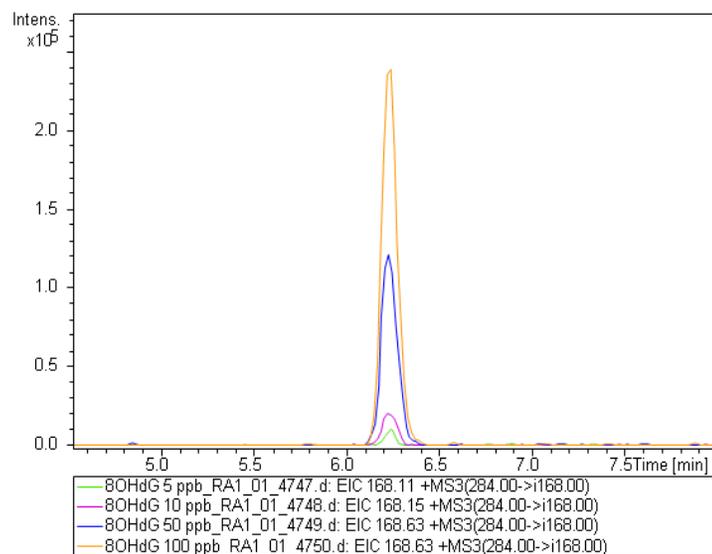


Figura 5. Determinación de 8-OHdG por HPLC-ESI-IT-MS/MS. (a) Cromatograma del ion extraído (CIE) de la transición 284> 168 m/z de las muestras del estándar 8-OHdG con concentración de 5, 10, 50 y 100 µg L⁻¹. (b) Cromatograma del ion extraído (CIE) de la transición 284> 168 m/z de las muestras del estándar 8-OHdG con concentración de 5, 10, y 50 µg L⁻¹ y de 4 muestras de orinas (O2, O3, O4 y O5)

7. CONCLUSIONES

Existen diversos factores que determinan que tanto daño puede causar un xenobiótico o sus metabolitos, entre estos factores se encuentran la edad de la población, la forma de exposición y la cantidad a la que se encuentra expuesto, principalmente. Para fines de esta investigación, la edad elegida de la población fue de entre 6-15 años, esto debido a que los niños de estas edades son más vulnerables ya que, aún existen sistemas biológicos en desarrollo y, por otro lado, la mayoría de las veces se encuentran altamente expuestos porque realizan más actividades al aire libre que la población adulta.

La presencia de EPT's y fluoruros pueden deberse tanto a factores antropogénicos como naturales. Para el caso de vanadio y plomo, generalmente su presencia se asocia a actividades antropogénicas, sin embargo, los fluoruros son encontrados de manera natural en aguas subterráneas y, generalmente, éstas son ampliamente utilizadas en diferentes zonas de las ciudades de Salamanca e Irapuato.

Durante el desarrollo de esta investigación no se encontró un patrón entre las diferentes zonas en las que se dividió la población, con esto se puede concluir que los factores que determinan los niveles de exposición no son dependientes de la cercanía a las empresas o la dirección de los vientos, sino que tiene que ver con factores como el nivel socioeconómico, ciertos hábitos y costumbres.

Con base en los resultados obtenidos durante esta investigación puede concluirse que el análisis de ciertos EPT's, los cuales se han analizado anteriormente en el ambiente, da la pauta para conocer que afecciones a la salud pueden tener las poblaciones elegidas, destacando entonces las relacionadas principalmente con vanadio y plomo, ya que éstos fueron los que sobrepasaron los niveles normales encontrados en humanos. Al igual que para los EPT's, para el caso de fluoruros (los cuales se encontraron elevados en la población control), es necesario tomar medidas adecuadas para la prevención de riesgos.

De acuerdo a los resultados obtenidos para la determinación de la 8-OHdG se puede concluir que el método puede detectar hasta $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de 8-OHdG presente en fase móvil (fig. 5(a)), sin embargo, la determinación en muestra real (orina) presenta interferencia de matriz, por lo que se tendría que buscar otro método de purificación, por ejemplo utilizar dos columnas en fase sólida para la purificación y preconcentración, posiblemente, dos o más columnas durante el proceso de separación en el equipo HPLC, previo a la introducción de muestra en el sistema de trampa de iones.

Por todo lo anterior descrito, desafortunadamente no se puede determinar la concentración de 8-OHdG en las muestras de orina de niños. Por lo que para la determinación de este compuesto en muestras de orina se sugiere la utilización de equipos de espectrometría de masas con mayor resolución como triple cuadrupolo QqQ-TOF, que permitan la resolución del analito en el analizador de masas o bien, por métodos electroquímicos.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar la cuantificación del biomarcador 8-OHdG por medio de HPLC-ED para la población en la cual se detectaron los EPT's y fluoruros, esto con el fin de poder observar si existe una correlación entre el biomarcador de estrés oxidativo y los contaminantes analizados.
- Llevar a cabo un nuevo análisis de EPT's y fluoruros en muestras medioambientales para poder actualizar los datos existentes, así como identificar a la población vulnerable a través de las generaciones.
- Informar a las autoridades pertinentes sobre los resultados obtenidos para que éstas tomen las medidas necesarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stijepovic, V.Z., et al., *Targeting and design of industrial zone waste heat reuse for combined heat and power generation*. Energy, 2012. **47**(1): p. 302-313.
2. Listorti, J.A. and F.M. Doumani, *Environmental Health*. 2001, The World Bank: Washington.
3. Atkinson, R. and J. Arey, *Atmospheric degradation of volatile organic compounds*. Chemical reviews, 2003. **103**(12): p. 4605-4638.
4. ATSDR, *PUBLIC HEALTH STATEMENT POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs)* 1995, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
5. INECC. *Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs)*. 2013; Available from: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/765-sqre-cop>.
6. NIH, *Contaminantes orgánicos persistentes (COP)*. 2016, Environmental Health and Toxicology.
7. SEMARNAT and INE, *Guía de elaboración y usos de inventarios de emisiones*, S. INE, Editor. 2005: México.
8. Spedding, D.J., *Contaminación atmosférica*. 2002, Barcelona: Reverté.
9. Tchounwou, P.B., et al., *Heavy metal toxicity and the environment*, in *Molecular, clinical and environmental toxicology*. 2012, Springer. p. 133-164.
10. Bini, C. and J. Bech, *PHE's, Environment and Human Health*. 2014, Nueva York: Springer.
11. Clark, R.B., *Marine Pollution*, Oxford, Editor. 1992, OXFORD: New York.
12. Valtueña, J.A., *Enciclopedia de la ecología y la salud*. 1a. Edición ed. 2002, España: Safeliz.
13. SEMARNAT, *Genero, ambiente y contaminación por sustancias químicas*. 1a. Edición ed. 2012, México: SEMARNAT.
14. ATSDR, *Toxicological profile for lead*. 2007, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
15. ATSDR, *Toxicological profile for vanadium*. 2012, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
16. ATSDR, *Toxicological profile for arsenic*. 2007, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
17. ATSDR, *Toxicological Profile for Cadmium*. 2012, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
18. Dotan, Y., D. Lichtenberg, and I. Pinchuk, *Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress*. Progress in Lipid Research, 2004. **43**(3): p. 200-227.
19. Venereo Gutiérrez, J.R., *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. Revista Cubana de medicina militar, 2002. **31**(2): p. 126-133.
20. Rosales, A.J., V.D. García, and A.A. Chávez, *El papel del estrés oxidativo en la disfunción endotelial de la aterosclerosis*. CIENCIA ergo-sum, 2010. **17**(3): p. 258-268.
21. Sánchez-Valle, V. and N. Méndez-Sánchez, *Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad*. Rev Invest Med Sur Mex, 2013. **20**(3): p. 161-168.
22. Klaassen, C.D. and J.B.W. III, *Manual de Toxicología*. 5ª ed. 2001, México, D.F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A de C.V. 981.
23. Capó, M. and M.T.F. Moya, *Toxicogenómica: Una nueva rama de la toxicología*. Medicina balear, 2007. **22**(3): p. 25-29.
24. PNUMA and IPCS, *EVALUACIÓN DE RIESGOS QUÍMICOS: EVALUACIÓN DE RIESGOS HUMANOS, EVALUACIÓN DE RIESGOS AMBIENTALES Y EVALUACIÓN DE RIESGOS ECOLÓGICOS*. 1999, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

Organización Internacional del Trabajo

Organización Mundial de la Salud.

25. CCA, *Hacia un medio ambiente más sano: Panorama general de los retos ambientales para la salud de la niñez de América del Norte*. 2002, Montréal: CCA.
26. INEEC. *Metales Pesados*. 2009; Available from: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-agre-metales>.
27. Klaassen, C.D. and M.O. Amdur, *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 6th Edición ed. 2001, New York: McGraw-Hill.
28. Gutiérrez, M. *Minería Unión de Grupos Ambientalistas* 2003.
29. Aguirre, L.A., *Importancia de la producción más limpia en la minería ecuatoriana, in Tecnologías limpias para la Industria Minera*, R.C.V. Boas and M. Sánchez, Editors. 2006, CETEM, CITED: Rio de Janeiro
30. Zuk, M., et al., *Introducción a la evaluación de los impactos de las termoeléctricas de México*. 2006, México: SEMARNAT.
31. Parra, E., *PETRÓLEO Y GAS NATURAL: INDUSTRIA, MERCADOS Y PRECIOS*. 2003, Madrid: AKAL.
32. Santiago-Rivas, S., *Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón*, in *Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología*. 2007, Universidad de Santiago de Compostela.
33. Jenniss, S.W., S.A. Katz, and R.W. Lynch, *Applications of atomic spectrometry to regulatory compliance monitoring*. 2da. Edición ed. 1997, Canadá: Wiley-VCH.
34. Walton, H.F. and J. Reyes, *Análisis Químico e Instrumental Moderno*. 1983, Barcelona: Reverté.
35. Skoog, D., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*. 5a. ed. 2001, Madrid: Mc. Graw Hill.
36. Beauchemin, D., *Inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Analytical chemistry*, 2010. **82**(12): p. 4786-4810.
37. Becker, J.S., *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 2007, Inglaterra: Wiley.
38. C.Harris, D., *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ra ed. 2003: Grupo editorial Iberoamérica.
39. ATSDR, *Toxicological profile for Fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine*. 2003, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
40. Aoun, A., et al., *The Fluoride Debate: The Pros and Cons of Fluoridation*. *Preventive nutrition and food science*, 2018. **23**(3): p. 171-180.
41. Choi, A.L., et al., *Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis*. 2012.
42. Aoba, T. and O. Fejerskov, *Dental fluorosis: chemistry and biology*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2002. **13**(2): p. 155-170.
43. Levy, S.M., *An update on fluorides and fluorosis*. *Journal (Canadian Dental Association)*, 2003. **69**(5): p. 286-291.
44. Shivarajashankara, Y., et al., *Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis*. *Fluoride*, 2001. **34**(2): p. 103-107.
45. EPA, *Fluorides: Exposure and Relative Source Contribution Analysis*. 2010, Environmental Protection Agency.
46. DOF, *NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamiento que debe someterse el agua para su potabilización*, in

- Environmental health, water for human use and consumption. quality permissible limits and potabilization treatment]* DOF. 1994. p. 108-112.
47. DOF, *NOM-041-SSAI-1993, Bienes y Servicios. Agua Purificada Envasada*, in *Diario Oficial de la Federación*, DOF, Editor. 1993. p. 18-24.
 48. Freiser, H., *Ion selective electrodes in analytical chemistry*. Vol. Volumen 1. 1981, Nueva York: Springer.
 49. Gallego-Picó, A., R.M. Garcinuño-Martínez, and M.J.M. Ortega, *Experimentación en Química Analítica*. 2015, Madrid: UNED.
 50. Sova, H., et al., *8-Hydroxydeoxyguanosine: a new potential independent prognostic factor in breast cancer*. *Br J Cancer*, 2010. **102**(6): p. 1018-1023.
 51. Shi, T., et al., *Temporal variation of hydroxyl radical generation and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation by coarse and fine particulate matter*. *Occupational and environmental medicine*, 2003. **60**(5): p. 315-321.
 52. Valavanidis, A., T. Vlachogianni, and C. Fiotakis, *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis*. *Journal of environmental science and health Part C*, 2009. **27**(2): p. 120-139.
 53. McNair, H.M. and J.M. Miller, *BASIC GAS CHROMATOGRAPHY*. 2009, New Jersey: Wiley.
 54. Quirós, M.B., *Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases*. 2006, San José: Editorial Universidad de Costa Rica.
 55. Zhang, C., et al., *Detection and quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Alzheimer's transgenic mouse urine using capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2013. **34**: p. 2268-2274.
 56. Méndez, M.d.C.A., *Desarrollo de Métodos para el Aislamiento y la Detección de Toxinas Marinas en productos de la Pesca y la Acuicultura*, in *Departamento de Farmacología*. 2008, Universidad de Santiago de Compostela: Lugo.
 57. Pérez, J.M.H., *Cromatografía líquida de alta eficacia*. Educación continuada en el laboratorio clínico, 2005. **8**: p. 49-62.
 58. Scott, R.P.W., *Chromatographic detectors*. 1996, New York: MARCEL DEKKER INC.
 59. Bartlett, P., *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experiments Techniques and Applications*. 2008, Inglaterra: Wiley.
 60. Gross, J.H., *Mass Spectrometry*. 2a. Edición ed. 2011, Berlin: Springer.
 61. Arderiu, X.F., M.J.C. Lacambra, and J.M.Q. Compañó, *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. 2a. edición ed. 1998: Editorial Reverté.
 62. Díaz-Barriga, F., *Análisis de la contaminación por compuestos tóxicos en el acuífero que abastece a la ciudad de San Luis Potosí*. Querétaro, México: Sistema de Investigación Miguel Hidalgo, Cuaderno de Trabajo, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 2000.
 63. Louis, G.B. and W.H. Organization, *Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals*. 2006.
 64. Cornelis, R.C., Joe; Crews, Helen; Heumann, Klaus, *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*. 2003, England: Wiley. 635.
 65. SPINREACT, S.A.S.A.U., *CREATININA JAFFÉ COLORIMÉTRICO-CINÉTICO*.
 66. TRAINING, A.M. *NORMAL VALUES IN CHILDREN*. Available from: <https://www.aclsmedicaltraining.com/normal-values-in-children/>.
 67. IEEG, *Programa de Ordenamiento Ecológico Local de Salamanca, Gto. Resumen ejecutivo*, Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato.
 68. ATSDR, *ToxGuide for Arsenic*. 2007, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

69. Bustos G., C.I., *Escenarios de riesgo por acuíferos contaminados: El caso de la contaminación por arsénico y fluoruros en comunidades de Guanajuato*, in *Farmacia*. 2014, Universidad de Guanajuato: Guanajuato.
70. Cabrera, F.E., *Escenario de Riesgo por Contaminación Debido a la Presencia de Arsénico en Aguas Subterráneas de Irapuato, Guanajuato*, in *Ciencias Ambientales*. 2007, Universidad de Guanajuato: Irapuato.
71. Rodriguez, R., et al., *Arsenic and lead pollution of the Salamanca aquifer, Mexico: Origin, mobilization and restoration alternatives*. Groundwater quality: Natural and enhanced restoration of groundwater pollution, 2001(275): p. 561-565.
72. Bustos-Gómez, C.I., et al., *EFFECTOS SOBRE LA SALUD POR HIDROARSENICISMO E HIDROFLUOROSIS EN POBLACIÓN INFANTIL DE 2 COMUNIDADES DE IRAPUATO, GUANAJUATO*. BioCiencias, 2013. **2**.
73. ATSDR, *ToxGuide for Vanadium*. 2012, Agency of Toxic Substances and Disease Registry.
74. Castro-Ramírez, I., *Análisis probabilístico de riesgo a la salud humana por exposición a compuestos orgánicos persistentes (COP's) y elementos potencialmente tóxicos (ETP's) en Salamanca, Gto.*, Universidad de Guanajuato: Irapuato.
75. CCME, *Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health*. 1997.
76. Rodríguez, R., I. Morales-Arredondo, and I. Rodríguez, *Geological Differentiation of Groundwater Threshold Concentrations of Arsenic, Vanadium and Fluorine in El Bajío Guanajuatense, Mexico*. Geofísica internacional, 2015. **55-1**: p. 5-15.
77. Schauer, J.J., et al., *Characterization of metals emitted from motor vehicles*. Research report (Health Effects Institute), 2006(133): p. 1-76; discussion 77-88.
78. Hernandez, H. and R. Rodriguez, *Geochemical evidence for the origin of vanadium in an urban environment*. Environmental monitoring and assessment, 2012. **184**(9): p. 5327-5342.
79. Rodríguez, R., et al., *Evaluación de Vulnerabilidad Acuífera del valle de Irapuato Gto*. JAPAMI, CONCyTEG, IGF UNAM. Reporte Técnico il, 2006.
80. ATSDR, *ToxGuide for Lead*. 2007, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
81. ATSDR, *ToxGuide for Cadmium*. 2012, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
82. SEDESOL, *Catalogo de Localidades*. 2013, Secretaría de Desarrollo Social.
83. ACGIH. *BIOLOGICAL EXPOSURE GUIDELINES (ACGIH BEI AND OSHA EXPANDED STANDARDS ONLY)* 2012; Available from: https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_ii/pdfs/otmii_chpt2_appb.pdf.
84. Trejo-Acevedo, A., et al., *Exposure assessment of persistent organic pollutants and metals in Mexican children*. Chemosphere, 2009. **74**(7): p. 974-980.
85. CDC, *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. 2015, Centers for Disease Control and Prevention.
86. Heitland, P. and H.D. Köster, *Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2006. **20**(4): p. 253-262.
87. Herrera, A., J. Pineda, and M.T. Antonio, *Bioacumulación de arsénico en tejidos animales por consumo de aguas contaminadas experimentalmente*.
88. Alimonti, A., et al., *Reference values for chromium, nickel and vanadium in urine of youngsters from the urban area of Rome*. Journal of Environmental Monitoring, 2000. **2**(4): p. 351-354.
89. Shah, F., et al., *Lead assessment in biological samples of children with different gastrointestinal disorders*. Biological trace element research, 2016. **169**(1): p. 41-45.

90. Caravanos, J., et al., *Blood Lead Levels in Mexico and Pediatric Burden of Disease Implications*. *Annals of Global Health*, 2014. **80**(4): p. 269-277.
91. Weinhold, B., *Lead in Mexican Children: Pottery Use Slows Reductions in Blood*. *Environmental Health Perspectives*, 2004. **112**(10): p. A569-A569.
92. Azcona-cruz, M.I., et al., *Lead-Glazed Ceramic Ware and Blood Lead Levels of Children in the City of Oaxaca, Mexico*. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 2000. **55**(3): p. 217-222.
93. Xiang, Q., et al., *Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence*. *Fluoride*, 2003. **36**(2): p. 84-94.
94. Todaro, A., et al., *[Acute exposure to vanadium-containing dusts: the health effects and biological monitoring in a group of workers employed in boiler maintenance]*. *La Medicina del lavoro*, 1990. **82**(2): p. 142-147.
95. Kučera, J., J. Lener, and J. Mňuková, *Vanadium levels in urine and cystine levels in fingernails and hair of exposed and normal persons*. *Biological trace element research*, 1994. **43**(1): p. 327-334.
96. Kiviluoto, M., L. Pyy, and A. Pakarinen, *Serum and urinary vanadium of workers processing vanadium pentoxide*. *International archives of occupational and environmental health*, 1981. **48**(3): p. 251-256.
97. Kawai, T., et al., *Urinary vanadium as a biological indicator of exposure to vanadium*. *International archives of occupational and environmental health*, 1989. **61**(4): p. 283-287.
98. Alcazar Magana, A., et al., *Application of liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry for the evaluation of global nucleic acids: methylation in garden cress under exposure to CuO nanoparticles*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2016. **30**(1): p. 209-220.
99. Rota, C., et al., *A serially coupled stationary phase method for the determination of urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine by liquid chromatography ion trap tandem mass spectrometry*. *Redox biology*, 2013. **1**(1): p. 492-497.

ANEXOS

ANEXO I: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Carta de Consentimiento Informado

Elaborada con base a la Ley General de Salud
en materia de Investigación para la salud

Nombre del proyecto:

Análisis de exposición a benceno, tolueno, xileno, hidrocarburos aromáticos policíclicos y organoclorados en el municipio de Salamanca, Guanajuato

Responsable: Dra. Diana Oliva Rocha Amador

Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

Después de recibir la información del proyecto, así como los riesgos y beneficios, el participante acepta participar en el mismo sabiendo que:

1) No hay ningún costo de participación.

2) La información que usted nos proporcione, así como los datos resultantes de las muestras se guardará bajo llave y serán manejados confidencialmente. La información sólo será accesible a los investigadores del proyecto y será utilizada para propósitos de estudio. Los investigadores y toda persona que maneje la información se comprometerá a guardar por escrito confidencialidad. La información se almacenará en archivos electrónicos que contendrán la información sobre usted, para ello se le dará un código de identificación. Sólo se tendrá acceso a sus datos con una contraseña confidencial.

3) Es su decisión si quiere o no participar en este estudio. Podrá salirse del mismo en el momento que usted lo desee. Su participación no tendrá ningún efecto en el cuidado médico futuro. Si usted decide abandonar la investigación, sólo avise al coordinador del proyecto.

4) En el caso que el equipo de investigación le diagnostique algún problema, el coordinador del estudio en su localidad le orientará sobre el servicio médico al que podrá asistir para obtener una atención adecuada.

A quién avisar.

Si usted tiene alguna pregunta sobre este estudio, por favor comuníquese con la Dra. Diana Olivia Rocha Amador quien es el coordinador de este estudio, al Departamento de Farmacia de la Universidad de Guanajuato con teléfono 01 473 7320006 ext 8130.

Si tiene alguna pregunta acerca de sus derechos como sujeto de investigación, usted puede llamar a la Dra. Victoria Navarrete Cruz, presidenta del Comité de Bioética de la Universidad de Guanajuato, al teléfono 01(477)7138459.

Si usted está de acuerdo en participar en este estudio, por favor, firme con su nombre abajo. Su firma indica que entiende los riesgos y beneficios de la investigación y que está de acuerdo en participar en los procedimientos descritos en este formato de consentimiento. Incluso, después de firmar este formato de consentimiento, como lo dijimos anteriormente, usted puede elegir no continuar con su participación en cualquier momento sin que esto le afecte de manera alguna.

Nombre:

Firma:

Si el participante es menor de edad, nombre y firma del padre o tutor:

Lugar

y

fecha _____

Testigos

Firma de testigo

1. _____

Firma de testigo

2. _____

ANEXO II: CUESTIONARIO (ENCUESTA)

CUESTIONARIO GENERAL

Folio |__|__|__|__|

Fecha de aplicación |__|__| / |__|__| / |__|__|__|__| (dd/mm/aa)

I. **Datos de Identificación personal**

Nombre: _____

Apellido Paterno

Apellido Materno

Nombre(s)

Fecha de nacimiento: |__|__| / |__|__| / |__|__|__|__| (dd/mm/aaaa)

Grado Escolar: _____

Sexo: Niño

Niña

Peso |__|__| Kg Talla |__|__|__| cms

Lugar de nacimiento

Municipio: _____ Estado: _____

Lugar de Residencia

Calle y Número: _____ Colonia: _____

Localidad: _____ Municipio: _____ Estado: _____

II. **Exposición**

2.1 ¿Cuántos años lleva viviendo en su municipio actual?	Nº años __ __ Nº meses __ __
2.2 ¿Desde cuándo vive en su casa actual? (mes / año)	__ __ / __ __ __ __

2.3 ¿Desde cuándo estudia en su escuela actual? (mes/año)	_ _ / _ _ _ _
2.4 Su vivienda se encuentra cerca de:	Gasolinera.....01 Taller de hojalatería y pintura.....02 Tintorería.....03 Ferretería.....04 Ninguna de las anteriores.....111 No sabe.....666
2.5 ¿Vive cerca o sobre alguna avenida principal actualmente?	Si.....01 En caso de ser “Si” su respuesta, favor de indicar el nombre de la avenida: _____ No.....02 ¿A cuántas calles queda de su casa? _____
2.6 ¿Por lo general mantiene las ventanas abiertas?	Si.....01 No.....02 No sabe.....666
2.7 ¿Qué recurso emplea para cocinar?	Electricidad.....01 Gas propano en cilindro.....02 Gas natural conectado a la red pública.....03 Leña, madera, carbón de leña.....04 Petróleo, gasolina, alcohol.....05 Materiales de desecho.....06 No sabe.....666
2.8 ¿Cuántos vasos de agua “natural” toma el niño al día? (promedio en los últimos 7 días)	Nº _ _ No sabe.....666
2.9 ¿De dónde toman el agua para beber?	De la llave.....01 Embotellada o de garrafón.....02 Marca _____ Otro (especifique): _____ No sabe.....666

2.10 ¿De dónde toman el agua para cocinar?	De la llave.....01 Embotellada o de garrafón.....02 Marca _____ Otro (especifique): _____ No sabe.....666
2.11 ¿Qué tratamiento le da al agua que consume?	Ninguno.....01 Hierve02 Clora03 Hierve y clora04 Otro (especifique): _____ No sabe.....666
2.12 ¿Qué otros líquidos consume su hijo(a) durante el día/semana? (Anote el número de vasos consumidos del producto seleccionado)	Refresco.....01 N° día __ __ N° semana __ __ Té.....02 N° día __ __ N° semana __ __ Leche.....03 N° día __ __ N° semana __ __ Jugos.....04 N° día __ __ N° semana __ __ Otros (especifique): _____ N° día __ __ N° semana __ __ No sabe.....666
2.13 ¿Con qué químico controla plagas y fauna nociva (cucarachas, ratones, moscos, zancudos, etc.)	Fumigación con insecticidas/plaguicidas.....01 Raticidas.....02 Otro (especifique): _____ No sabe.....666
2.14 En caso de usar químicos, ¿Cuál es el uso final que le da a los envases vacíos?	Guardar alimentos y agua.....01 Varios usos en el hogar.....02 Los tira a la basura.....03 Los entierra.....04 Los quema.....05 Otro (especifique): _____ No aplica.....333 No sabe.....666

2.15 ¿Cómo considera el estado de salud del niño?	Excelente.....01 Bueno.....02 Regular.....03 Malo.....04
2.16 ¿Alguien de la familia que vive con el niño fuma?	Si.....01 No02 No sabe.....666
2.17 De las personas que fuman, ¿alguna lo realiza al interior de la casa?	Si.....01 No.....02 No aplica.....333 No sabe.....666
2.18 ¿El niño se encuentra cerca de alguien cuando está fumando?	Si.....01 No.....02 No aplica.....333 No sabe.....666
2.19 De las personas que fuman al interior de la casa, ¿cuántos cigarros al día fuman en promedio?	0-5 cigarros.....01 6-10 cigarros.....02 11 cigarros o más03 No aplica.....333 No sabe.....666
2.20 ¿Durante el embarazo del niño usted fumó?	Si.....01 ¿Cuántos cigarros al día en promedio? N° _ _ _ No02 No sabe.....666
2.21 ¿Durante el embarazo de este niño usted tomó bebidas que contengan alcohol?	Si.....01 ¿Cuántas copas tomaba al día? N° _ _ _ No02 No sabe.....666

2.22 ¿Consume jugos o alimentos procesados? (Sabritas, Gansitos, Galletas, Jugos JUMEX, Refrescos)	Si.....01 No.....02 No sabe.....666							
2.23 En las últimas 24 horas ¿Consumió algún alimento procesado?	Si.....01 ¿Cuáles? _____ No.....02 No sabe.....666							
2.24 El niño ha estado en contacto los últimos meses con los siguientes productos: ANOTAR : Si01 No02 Ocasional03 Frecuentemente04 No sabe.....666	Herbicidas __ __ __ Tiempo aprox. de uso (meses) N° __ __							
	Fertilizantes __ __ __ Tiempo aprox. de uso (meses) N° __ __							
	Solventes __ __ __ Tiempo aprox. de uso (meses) N° __ __ Tipos de solventes: Tinher01 Aguarrás.....02 Gasolina.....03 Petróleo05 Cemento.....06 Tinta fuerte.....08 Otros (especifique): _____.....09							
2.24 Con qué frecuencia realiza el niño las siguientes actividades:								
Actividad	Nunca	Menos de 1 vez al mes	Veces a la semana			Veces al mes		
			1	2 a 4	5 o más	1	2 a 4	5 o mas
Cocinar con leña								
Come carne asada o a la parrilla								
Quema basura fuera de la casa								

2.25 Actividades fuera de la casa:					
Actividad	Nunca	< 30 min	30 min a 2 horas	2 a 4 horas	4 a 6 horas
Caminar					
Jugar con amigos en la calle					
Otra actividad: _____					

III. **Salud y nutrición**

3.1 ¿El niño se encuentra enfermo actualmente? (recuerde las últimas 3 semanas)	Si.....01 ¿Qué enfermedad padece? _____ No.....02 No sabe.....666
3.2 ¿El niño está tomando algún medicamento para curar o controlar su enfermedad?	Si.....01 ¿Qué medicamento(s)? _____ No.....02 _____ No sabe.....666
3.3 ¿A lo largo de su vida el niño ha presentado alguna de las siguientes enfermedades? ANOTE: Si01 No02 No sabe.....666 No contesto....999	Respiratorias (Asma, bronquitis, infecciones, otros) _ _ _ _
	Dermatológicas (piel) _ _ _ _
	Anemia _ _ _ _
	Neurodegenerativas _ _ _ _
	Renales _ _ _ _

	Cardiacas _ _ _
	Cáncer _ _ _
	Problemas de visión _ _ _
	Otras: _____

ANEXO III: RESÚMENES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

3.1. CONGRESO DE LA MUJER EN LA CIENCIA

DETERMINACIÓN DE FLUORUROS EN POBLACIÓN INFANTIL EN SALAMANCA, GTO.

Israel Enciso-Donis¹, Fátima del Carmen Durán-Mendoza¹, Ricardo Omar Fernández-Hernández¹, Gustavo Cruz-Jiménez¹, Diana Olivia Rocha-Amador¹.

¹ División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato

RESUMEN

De acuerdo con estudios previos, en la ciudad de Salamanca, Guanajuato, se ha encontrado que los niveles de flúor en algunos pozos de localidades y aguas embotelladas son superiores a los reportados en las normas NOM-127-SSA1-1994 y NOM-041-SSA1-1993¹, las cuales, indican los valores límite para aguas de uso y consumo humano, y aguas embotelladas, respectivamente. La presencia de estos niveles puede llevar a una ingesta elevada de flúor, por lo que resulta de importancia estudiar los niveles de flúor (en orina) en la población de Salamanca. Actualmente, la normativa existente solo muestra normas de exposición ocupacional.

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que 48.48% de la población se encuentra en el límite establecido por la ACGIH al inicio de la jornada laboral o lo sobrepasa (2 mg/L). Por otro lado, cuando se realiza la corrección por creatinina se obtiene que 8.08% sobrepasa el valor límite de 3 mg/g de creatinina establecido por la NOM-047-SSA1-2011, para antes de la jornada laboral. Por último, las comparaciones con las normas nos muestran que los niveles encontrados son de preocupación, esto debido a que estas no son para la población en general y mucho menos para niños, puesto que para estos no existe un límite de regulación en normas, y los resultados obtenidos muestran que posiblemente por lo menos un 8.08% de la población puede presentar los efectos asociados a este elemento.

1. INTRODUCCIÓN

Los fluoruros se encuentran de manera natural en el ambiente. Pueden encontrarse en pequeñas cantidades en lugares como pueden ser rocas, carbón, tierra y arcilla, además de plantas y animales. Debido a los ciclos naturales, este elemento puede pasar al agua, por lo cual es común encontrarlo en fuentes naturales de agua y a su vez, por los procesos que éste sigue, se puede encontrar en agua de la llave, así como en agua de garrafón. Los fluoruros generalmente pueden adicionarse al agua en cantidades de 1 ppm, sin embargo, muchas veces los niveles de éste compuesto pueden verse aumentados debido a las fuentes de donde se toma el agua² (ATSDR).

En la actualidad, existen normas que regulan las concentraciones máximas permitidas tanto para agua de la llave como para agua embotellada. La NOM-127-SSA1-1994 "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización" hace mención a los límites de fluoruros que deben encontrarse en agua potable y de consumo humano, límite establecido por esta norma es de 1.5 mg L⁻¹ (3 Norma). Por otro lado, la NOM-041-SSA1-1993 "Bienes y servicios. Agua purificada envasada" establece el límite máximo permisibles para el agua embotellada, el cuál es de 0.7 mg L⁻¹ (4 Norma). Sin embargo, éstos límites la mayoría de las veces se ven excedidos y es cuando puede representar un problema de salud para la población, por lo que es de relevancia estudiar los niveles de fluoruros en la población. Los niveles de fluoruros pueden ser determinados en orina y hasta el momento sólo existen normas tanto extranjeras como mexicanas que regulan la cantidad de fluoruros a nivel ocupacional.

Como ya se mencionó anteriormente, en la ciudad de Salamanca, Gto., se han realizado estudios para determinar la cantidad de fluoruros existentes en el agua de los pozos, y debido a los resultados, se considera de importancia el estudio en la población de ésta ciudad, ya que éste compuesto puede causar efectos adversos a la salud. La NOM-047-SSA1-2011 "Salud ambiental-Índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas" (5 Norma) menciona que los niveles máximos de fluoruros al inicio de la jornada laboral deben ser de 3 mg/g de Creatinina y al final de la jornada de 10 mg/ g de Creatinina. Como se menciona anteriormente, existe también una normativa internacional (ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists) la cual establece un límite de 2 mg L⁻¹ 5.

2. PARTE EXPERIMENTAL

a. Selección de la población

La población que estudiada fueron 107 niños de entre 6 y 12 años, asistentes a 4 escuelas cercanas a las principales industrias que se encuentran en la ciudad. Para el caso de la población control se estudiaron 22 niños de diferentes escuelas de zonas rurales.

b. Aspectos éticos del estudio

Para llevar a cabo el estudio, se solicitó y obtuvo la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Guanajuato, el cual avaló que los procedimientos que se llevaron a cabo se apegan al protocolo establecido, también se solicitó y obtuvo el permiso de las autoridades correspondientes del municipio.

Además, se llevaron a cabo pláticas informativas para los padres o tutores de los niños que participaron en el estudio, esto con el fin de que conocieran en que consiste el proyecto, así como los posibles riesgos y los beneficios que tiene dicho estudio. Como la edad de la población no sobrepasó los 18 años, fue necesario solicitar la firma del padre o tutor como aceptación de lo establecido en un consentimiento informado.

Los resultados serán informados a los padres o tutores de los niños participantes, una vez que se ha realizado el estudio.

Es importante mencionar que no es obligatoria la permanencia de los participantes, por lo que el padre o tutor tuvo la opción para retirar al niño del estudio realizado.

c. Protocolo de toma de muestra

Las muestras se colectaron en frascos de polipropileno, nuevos y estériles, siendo la primera orina de la mañana la que se colectó. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4°C durante su traslado y a -20°C una vez en el laboratorio y hasta su análisis.

d. Preparación de soluciones

Para el análisis de las muestras se preparó una solución de TISAB, la cual contiene ácido acético, cloruro de sodio, citrato de sodio y se ajustó a un pH entre 5 y 5.5. Además, se preparó una solución patrón de 100 mg L⁻¹ de fluoruros, para la cual se tuvo que desecar durante 2 horas a 105°C 0.221 g de NaF. Una vez preparada la solución de fluoruros se prepararon soluciones de 1 y 10 mg L⁻¹, para llevar a cabo la calibración del equipo.

e. Análisis de las muestras

24 horas antes del análisis de las muestras se les adicionó 0.2 g de EDTA x 100 mL y se dejan a 4°C. Una vez transcurridas las horas, se pasó una alícuota de 1 mL a un vaso de precipitados y se le adicionó la misma cantidad de la solución de TISAB previamente preparada.

Se realizó la calibración del equipo, cuidando que la pendiente tuviera un valor de -57 ± 2 .

Las muestras fueron leídas obteniendo los resultados en $\mu\text{g L}^{-1}$. El electrodo utilizado fue un electrodo de ion selectivo de fluoruro Thermo Scientific conectado a un medidor Orion Star de la misma marca.

Los resultados obtenidos fueron corregidos por creatinina por el método colorimétrico de Jaffé.

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que la media de fluoruros en la población estudiada fue de 1.62 mg/g de creatinina con una desviación estándar de 1.02, con un mínimo de 0.30 mg/g de creatinina y un máximo de 6.42 mg/g de creatinina.

Un porcentaje del 8.08% excede o está en el límite de la NOM-047-SSA1-2011, la cual establece un límite de 3 mg/g creatinina al inicio de la jornada laboral. Por otro lado, la ACGIH, establece límites de 2 mg/L, un porcentaje del 48.48% del total, excede o se encuentra en éste límite; en donde la media fue de 1.83 mg/L y una desviación estándar de 1.03 mg/L, con un mínimo y un máximo de 0.7 y 5.83 mg/L.

5. CONCLUSIONES

Las fuentes con las que normalmente se abastecen de agua a un gran número de personas no está regulado en el aspecto de contenido de fluoruros, lo cual puede ocasionar que aquellas personas que consuman de esta agua estén expuestas a este elemento. Los resultados encontrados durante esta investigación muestran que los niños tienen un alto grado de exposición, ya que hay que recalcar que las normas que son mencionadas son para gente ocupacionalmente expuesta.

Es de importancia verificar las fuentes de consumo de la población afectada, así como verificar el estado de salud del niño y prevenir o tratar posibles afectaciones debido a la exposición a fluoruros.

BIBLIOGRAFÍA

¹Cervantes González ME, Ortiz Burgos J. Concentración de flúor en ppm de los pozos de agua potable en la Cd. de Salamanca, Gto. Revista Médica de Aguascalientes 1997

²ATSDR FLUORUROS

³ NOM-127-SSA1-1994 "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización"

⁴NOM-041-SSA1-1993 "Bienes y servicios. Agua purificada envasada"

⁵NOM-047-SSA1-2011 "Salud ambiental-Índices biológicos de exposición para el personal ocupacionalmente expuesto a sustancias químicas"

⁶https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_ii/pdfs/otmii_chpt2_appb.pdf