

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. POBLACIÓN

La parte experimental de la presente investigación se realizó en la localidad de Carapongo, distrito de Lurigancho - Chosica, departamento de Lima - Perú.

Según lo indicado por los dirigentes la población cuenta con aproximadamente 1000 individuos, todos ellos dedicados a la agricultura y de un bajo nivel socio – cultural y con pocos recursos económicos, lo cual se pudo constatar por observación y previa encuesta a los agricultores incluidos en el estudio.

Entre los indicadores observados en los agricultores y sus familias se pueden mencionar:

- El bajo nivel cultural de los pobladores, quienes se ven obligados a trabajar a temprana edad descuidando su educación. La mayoría de ellos sólo tiene estudios primarios.
- Precariedad de las viviendas en las que viven que apenas cuentan con servicio de luz en algunos casos, no existiendo servicios de agua y desagüe.

2.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA

De acuerdo al teorema del Limite Central e Intervalos Confiables se determino un tamaño de muestra de 106 de acuerdo a la siguiente formula: ^{(2), (39)}

$$n = (Z)^2 \times (P) \times (1-P) / (D)^2$$

Donde: n : Tamaño de la muestra

Z : Factor para un nivel de confianza del 95%, valor: 1,96.

P : Proporción poblacional de individuos con niveles de actividad de la colinesterasa sérica disminuidos. Como no se tiene valores anteriormente determinados para la población en estudio se tomara el valor de 0,5 para obtener el mayor tamaño de muestra posible.

(1-P) : Proporción poblacional de individuos con niveles de actividad de colinesterasa sérica normales. El valor sería de 0,5.

D : Precisión elegida para el cálculo es de 0,09 (9 %).

Aplicando la fórmula con los valores anteriores tendremos que $n = 119$.

Luego aplicamos el factor de corrección poblacional para la muestra con la siguiente fórmula:

$$n' = n / (1 + (n/N))$$

Donde: n' : Tamaño de muestra a considerar.

n : Tamaño de muestra sin corrección.

N : Tamaño de la población.

Aplicando la fórmula con los valores anteriores tendremos que $n' = 106$.

Se tomaron al azar 109 muestras (3 más que el tamaño de muestra óptimo calculado) de agricultores de ambos sexos para lo cual se tuvo en cuenta los siguientes criterios de selección:

- Individuos mayores de 17 años que declararon haber trabajado con plaguicidas en un periodo no mayor de 14 días antes de la toma de la muestra ⁽³¹⁾.
- No se considero mujeres gestantes o en periodo menstrual ni individuos que seguían algún tratamiento farmacológico ⁽⁷⁾.

Para el grupo de control se tomo 25 muestras de sangre de individuos de ambos sexos mayores de 17 años aparentemente sanos no expuestas a los plaguicidas con labores diferentes a las agrícolas (amas de casa, conductores, obreros, entre otros) de una zona cercana a la zona de estudios (Vitarte).

Se tomaron al azar 300 muestras de productos agrícolas, (coliflor, tomate, apio, lechuga y maracuyá) 150 muestras antes de la cosecha (30 de cada espécimen antes mencionado) y 150 después de la cosecha y antes de su distribución a los mercados (30 de cada espécimen antes mencionado).

2.3. METODOLOGÍA EMPLEADA

2.3.1. Toma de muestras biológicas en agricultores

Las muestras sanguíneas del grupo de 109 agricultores expuestos a los plaguicidas y del grupo no expuesto (grupo control) fueron obtenidas mediante punción venosa del antebrazo entre los meses de abril y mayo del 2001; Las muestras del grupo en estudio fueron tomadas en 5 sesiones (días) y las del grupo de control en una sola sesión. De cada persona se extrajo 5 mililitros de sangre sin anticoagulante previa asepsia. Todas las muestras recolectadas fueron rotuladas y trasladadas en condiciones de temperatura controlada para una mejor conservación de la enzima (Temperatura de 2 a 5 °C en un envase de tecnopor) al laboratorio del Centro de Información, Control Toxicológico y Apoyo a la Gestión Ambiental de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, para ser centrifugadas a 2500 revoluciones por minuto (r.p.m.) por 10 minutos, así se obtuvo el suero, el cual se etiquetó y refrigeró de 2 a 5 °C para su posterior análisis. Las lecturas espectrofotométricas y determinación del nivel de actividad de la colinesterasa de las muestras de suero se llevaron a cabo en un plazo no mayor a las 48 horas posteriores a la toma de la muestra.

2.3.2. Recolección de muestras de hortalizas y frutas

Se tomaron muestras de maracuyá, apio, coliflor, tomate y lechuga provenientes de los campos de cultivo de la Localidad de Carapongo entre los meses de mayo y junio del 2001, en varias sesiones (días). Las muestras, tanto antes de la cosecha (al día siguiente de la última fumigación antes de la cosecha) como después de la cosecha y antes de la distribución a los mercados, fueron obtenidas en forma aleatoria.

Aunque la mayoría de agricultores usan combinaciones de plaguicidas para la fumigación de sus sembríos, para la recolección de muestras se tuvo en cuenta que estos hubiesen sido fumigados por lo menos con uno de los plaguicidas inhibidores de la colinesterasa elegidos para el estudio, para lo cual se consultó previamente a

los agricultores, encontrándose que el plaguicida más usado, ya sea solo o en combinación, fue el metamidofos (Tamaron 600 SL).

Las muestras pesaban de ½ a 1 kg. aproximadamente, se colectaron de las zonas de cultivo, se colocaron en bolsas de polietileno, se etiquetaron y se transportaron al laboratorio toxicológico donde se refrigeraron a una temperatura de 2 a 5 °C para su posterior análisis en cromatografía de capa fina. Las muestras fueron analizadas en un periodo no mayor a 72 horas después de su recolección.

2.4. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA SÉRICA - MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO (TÉCNICA DE ELLMAN MODIFICADO).

2.4.1. Fundamento ^{(10), (27)}.

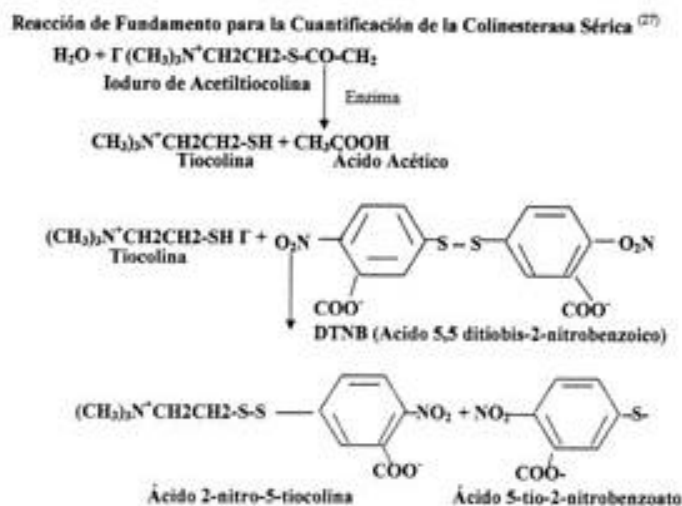
La enzima colinesterasa cataliza la hidrólisis de ésteres de colina, tal como la s-butiltiocolina, con máxima actividad a pH 7,7. Como sustrato se emplea el yoduro de acetiltiocolina que es escindido muy fácilmente por acción de la colinesterasa del plasma a tiocolina. La tiocolina liberada reacciona con el ácido 5,5 ditiobis - 2 - nitrobenzoico (DTNB) produciendo un compuesto de color amarillo, el ditiobisnitrobenzoato, el cual en medio alcalino genera compuestos resonantes de color amarillo (FIGURA N° 03).

Hay que señalar que la acetilcolinesterasa de los eritrocitos, que es liberada ya en una hemólisis ligera, en este caso no interfiere.

La velocidad de aparición de la coloración es proporcional a la actividad enzimática y se mide a 405 nm a una temperatura fija de 25 °C.

Figura N° 03

Reacción de Fundamento para la Cuantificación de la Colinesterasa Sérica⁽²⁷⁾



2.4.2. Materiales:

- Agujas descartables de # 20 x 1 ½
- Balanza analítica digital OHAUS.
- Baño Maria.
- Beaker de 10 mL, marca PYREX.
- Botella de vidrio 200 mL con tapón atornillable.
- Caja Tecnopor.
- Centrifuga Clay Adams, modelo DYNAC, N° serie: 148185.
- Celdas de plástico cuadradas de 10mm de longitud de paso de luz (ancho), Glass Quartz, marca Cole Parmer, capacidad 3,5 mL.
- Cronómetro.
- Erlenmeyer de 10 y 200 mL, marca PYREX.
- Espectrofotómetro Milton Rey Spectronic 601 – 220V, N° serie: 3M15039003.
- Etanol 98°.
- Fiolas de 10, 100, 200 mL, marca PYREX.

- Gradillas para tubos de ensayo.
- Micropipetas automáticas de 20 y 50 mL.
- Ligaduras de goma.
- Papel absorbente.
- Pipetas de 5 mL.
- Puntas amarillas para micropipetas.
- Refrigerador.
- Termómetro.
- Tubos de ensayo, marca PYREX.
- Viales aproximadamente de 5 mL.

2.4.3. Reactivos:

- ácido ditiobisnitrobenzoico DTNB 0,25 mM, pH final 7,7. (5,5 Dithiobis (2 - Nitrobenzoil acid)) SIGMA, lote 29H0951, fw. 396,3.
- Ioduro de acetiltiocolina 0,075 M, SIGMA, lote 1941067, fw. 286,2.
- Na₂HPO₄. 2 H₂O al 99,5%, M=177,99 g/mol., Merck,
- KH₂PO₄ al 99,7%, Fisher Chemicals.

2.4.4. Preparación de los reactivos:

a. Buffer fosfato 0.1 M. pH 8.0:

- Tomar 55,85 mL de solución Na₂HPO₄. 2 H₂O (17.800 g ‰ p/v en agua).
- Tomar 44,15 mL de solución KH₂PO₄ (9.073 g ‰ p/v en agua).
- Mezclar ambas soluciones.

b. Buffer fosfato 0.1 M. pH 7.0:

- Tomar 61,2 mL de solución Na₂HPO₄.2 H₂O (17.800 g ‰ p/v en agua).
- Tomar 38,8 mL de solución KH₂PO₄ (9.073 g ‰ p/v en agua).
- Mezclar ambas soluciones.

c. Sustrato yoduro de acetiltiocolina 0,075 M:

- Yoduro de acetiltiocolina 217 mg.
- Agua destilada 10 mL.
- Estable a 4 °C durante 15 días.

d. Solución madre de DTNB 10 mM:

- Ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB) 39,6 mg.
- Buffer fosfato 0,1 M. pH 7,0 10 mL.
- Bicarbonato de sodio 15 mg.
- Estable 1 mes a 4 °C.

e. Solución hija de DTNB 0,25 mM:

- Por dilución de la anterior en buffer fosfatos 0,1 M. pH 8,0:
- Solución madre de DTNB 0,2 mL.
- Buffer fosfatos 0,1 M. pH 8,0 c.s.p. 8,0 mL.

2.4.5. *Técnica Operatoria* ⁽²⁷⁾.

Se procede en 2 tubos de ensayo, uno para la muestra y otro para el blanco, sometidos a baño María para mantener la temperatura a 25 °C:

	PRUEBA	BLANCO
Reactivo DTNB (reactivo e)	3 mL	3 mL
Suero	50 µL	----
Sustrato (reactivo c)	20 µL	20 µL

Se ajusta la absorbancia del espectrofotómetro a cero (automático).

Se mezcla bien por inversión el contenido de los tubos de ensayo.

Se determina la absorbancia a 405 nm cada minuto durante 3 minutos. Se calcula el promedio de los cambios de absorbancia por minuto de la muestra (ΔA_{pm}), es decir hallamos el promedio de las diferencias entre la segunda y primera lectura, y la tercera y segunda lectura, previa corrección de estas (restar la absorbancia de la muestra de la del blanco).

2.4.6. *Cálculos* ^{(27), (40)}:

Tenemos:

$$A_{cm} = (A_m - A_b)$$

ΔA_{pm} = Promedio de los cambios de absorbancia por minuto (promedio de las diferencias de A_{cm}).

Donde:

A_m : Absorbancia de muestra.

A_b : Absorbancia del blanco.

A_{cm} : Absorbancia corregida de la muestra.

Además la formula para el cálculo de la actividad de la colinesterasa sérica en miliunidades por mililitro de muestra ($ActCoSe$ (mU/mL)) es:

$$ActCoSe \text{ (mU/mL)} = \frac{\Delta A_{pm} \times VT \times 10^3}{\epsilon \times LCO \times VM}$$

Donde:

U : Representa la cantidad de enzima que convierte un micromol de sustrato por minuto en condiciones estándares.

ϵ : Absortividad milimolar del 5 - tio - 2 - nitrobenzoato. Factor calculado para cubetas de sección cuadrada de un cm de paso de luz y cuyo valor a 405 nm es de 13,162.

10^3 : Factor de corrección para pasar de milimol a micromol.

VT : Volumen total de la reacción en mL.

VM : Volumen de muestra sin diluir en mL.

LCO : Longitud de camino óptico (1 cm).

Realizando los cálculos en la formula anterior obtenemos:

$$\text{ActCoSe (mU/mL)} = \Delta\text{Apm} \times 4665$$

Donde:

4665 : Es el factor hallado y con el cual se trabajara para el cálculo de la actividad de la colinesterasa sérica en las muestras tomadas.

2.4.7. *Análisis de resultados.*

Los resultados se expresaran en términos de media y desviación estándar. Se compararan las medias del grupo de agricultores expuesto a los plaguicidas y del grupo de control, se considerara un nivel de significancia de $p < 0,05$ para la prueba t – Student realizada ⁽²⁷⁾.

2.5. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE RESIDUOS DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS Y CARBÁMICOS EN VEGETALES - MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

2.5.1. *Fundamento:*

Los organofosforados a separar se desplazan en una dirección predeterminada por medio de un material sólido insoluble inorgánico: Silicagel G 60 (fase estacionaria) y la fase móvil (metanol - acetona - alcohol isopropílico) que migra a través de la superficie de la placa.

La fase móvil arrastra los organofosforados por un proceso de reparto múltiple o uno continuo de absorción - desorción que se da en toda sustancia de mediana o baja polaridad (como el caso de los organofosforados) ⁽³⁾.

2.5.2. **Materiales:**

- Atomizador.
- Balanza analítica sensibilidad 0,1 mg, OHAHUS.
- Bagueta.

- Beaker de 250 mL, marca de PYREX.
- Campana extractora.
- Cámara cromatográfica.
- Capilares de vidrio.
- Embudo de vidrio.
- Fiolas de 25 mL.
- Matraz de vidrio de 250 mL.
- Papel filtro Wathman N1 de 10 x 10 cm.
- Pera de bromo de 250 mL, marca de PYREX.
- Pipetas de 1 y 10 mL.
- Placas cromatográficas de vidrio 20 x 20 cm y 2,5 mm de espesor, revestidas con Silicagel G, MERCK.
- Placas cromatográficas de silicagel G 60 de 20x20cm y 0,25mm de espesor, MERCK.
- Mortero y Pilón.

2.5.3. **Reactivos:**

- Acetona QP, MERCK.
- Ácido Clorhídrico al 37%, MERCK.
- Alcohol isopropílico al 99%, MERCK.
- Azul de bromofenol, SIGMA.
- Dicloruro de paladio al 59%, BDH Laboratorios Reagenst.
- Éter etílico QP, SIGMA.
- Nitrato de plata al 99%, SIGMA.
- N – hexano al 95%, M= 86,18 g/mol., Riedel de Haen
- Metanol, M= 32,04 g/mol., Fisher Chemicals.
- Ácido p - dimetil Aminobenzaldehido QP, MERCK.
- Ácido sulfúrico al 95,97%, M=98,08 g/mol., MERCK.

2.5.4. **Estándares de plaguicidas inhibidores de la colinesterasa.**

- **Metamidofos** (Tamaron 600SL): Concentrado soluble, concentración 600 g/L, importado por Bayer (Alemania), Uso común 800 mL / 200 L de agua.

- **Clorpirifos** (Lorsban): Concentrado emulsionable, concentración 480 g/L, importado por Bayer (Colombia), Uso común 500 mL / 20 L de agua.
- **Dimetoato** (Perfektion): Concentrado soluble, concentración 500 g/L, importado por Basf (Alemania), Uso común 250 – 400 mL / 200 L de agua.
- **Metomilo** (Lannate): Líquido soluble, concentración 240 g/L, importado por Farmagro (U.S.A.), Uso común 550 mL / 100 L de agua.

2.5.5. *Preparación de reveladores*⁽³⁾.

a. *Dicloruro de paladio:*

Pesar 250 miligramos de cloruro de paladio, colocar dicho peso en una fiola de 50 mL y enrasarlo con agua destilada. Agregar II - III gotas de HCl concentrado, agitar y disolverlo a fuego lento.

b. *Azul de bromofenol:*

Pesar 0,05 gramos de azul de bromofenol, disolverlo con 10 mL de acetona llevar a un volumen de 100 mL con una solución de nitrato de plata 1 % p/v en una mezcla de agua:acetona (3:1).

c. *PABA:*

Pesar 1 gramo de ácido p - dimetil Aminobenzaldehído y llevar a un volumen de 100 mL con una dilución de ácido Sulfúrico (4,2 mL de ácido sulfúrico en 100 mL de agua destilada).

2.5.6. *Preparación de estándares de plaguicidas inhibidores de la colinesterasa*

Medir 1 mL del estándar de plaguicidas inhibidores de la colinesterasa, colocar en un matraz y llevar a 100 mL con metanol. Esta concentración se determino de un aproximado de la cantidad de plaguicidas usados por los agricultores sometidos al presente estudio.

2.5.7. *Método operatorio*^{(3), (41)}.

- ##### a. *Preparación de la muestra:* Pesar aproximadamente 150 gramos de la muestra del vegetal a analizar, colocar en el mortero y triturar con ayuda del pilón. Luego pesar aproximadamente 50 gramos de muestra pulverizada y

colocar en un matraz de 250 mL. Adicionar al matraz una mezcla de 50 mL de N-hexano : Acetona (1:1) agitar por 30 minutos. Dejar reposar por 15 minutos. Filtrar en un beaker con la ayuda de un embudo de vidrio y papel filtro.

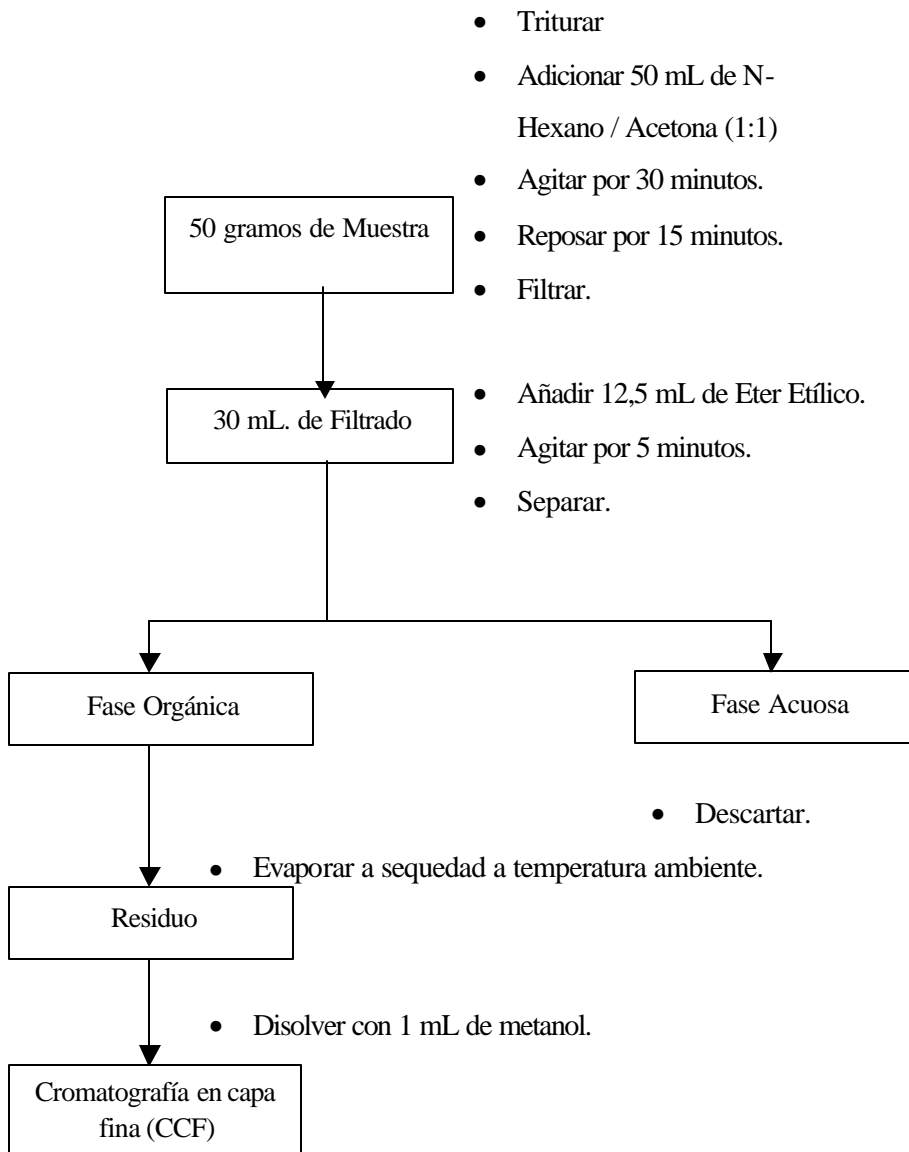
- b. Extracción y concentración de la muestra:** Tomar 30 mL del filtrado, colocarlo en una pera de bromo de 250 mL, agregar 12,5 mL de éter etílico, agitar por 5 minutos y descartar la fase acuosa. Colocar la fase orgánica en un vial y evaporar a sequedad a medio ambiente o dentro de la cámara extractora. El residuo obtenido será disuelto en 0,5 - 1 mL de metanol para realizar el análisis de identificación de plaguicidas por cromatografía de capa fina (FIGURA N° 04).
- c. Realización de cromatografía:** Utilizar placas de silicagel G60 Merck y placas cromatográficas de vidrio revestidas con Silicagel G como fase estacionaria y 100 mL de una mezcla de alcohol isopropílico : acetona : metanol (5:3:2) como fase móvil.

Aplicar, con ayuda de capilares de vidrio, las 4 muestras y las 4 diluciones de los estándares (metamidfos, clorpirifos, dimetoato y metomilo, en ese orden) haciendo un total de 8 puntos de aplicación sobre la placa, todos espaciados aproximadamente 2 cm entre sí. Para las muestra realizar 8 aplicaciones, y para las diluciones de los estándares 5 aplicaciones.

Colocar la placa dentro de la cámara cromatográfica de manera inclinada y dejar correr hasta un frente de solvente aproximadamente de 3/4 partes (15 cm) de la placa cromatográfica.

Luego retirar la placa de la cámara cromatográfica y atomizar sobre ella los reactivos reveladores, se observaran claramente manchas, diferenciadas tanto para los diferentes estándares, como para las muestras sembradas (en caso de ser positivas) (CUADRO N° 04).

Figura N° 04
Flujograma de Método Operatorio



Fuente: Directa.

Cuadro N° 04
Cuadro de resultados Cromatográficos ^{(3), (41)}

<i>Plaguicida</i>	<i>Forma</i>	<i>Coloración con Revelador</i>		
		<i>Azul de Bromo Fenol</i>	<i>Dicloruro de Paladio</i>	<i>Ácido p - dimetil Aminobenzaldehido</i>
Clorpirifos	Redonda	<ul style="list-style-type: none"> • Amarillo limón fosforescente. • Amarillo verdoso. • Verde fosforescente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Amarillo tenue o blanco. 	
Dimetoato	Redonda	<ul style="list-style-type: none"> • Azul. 	<ul style="list-style-type: none"> • Amarillo. 	
Metamidofos	Redonda	<ul style="list-style-type: none"> • Amarillo anaranjado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Amarillo anaranjado. 	
Metomilo	Redonda			<ul style="list-style-type: none"> • Azul oscuro.

2.5.8. *Análisis de resultados.*

Los resultados se expresaran en términos de presencia o ausencia de los residuos de plaguicidas en las muestras de vegetales analizados. Se compararan las manchas obtenidas para las muestras con las obtenidas para los estándares de plaguicidas usados (metamidofos, clorpirifos, dimetoato y metomilo).