

DONACION

No Reg 028706

Catalogador *[Signature]*

Fecha 17/2/10



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA**

**“EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN DE COMPUESTOS BROMADOS (PBDEs)
EN NIÑOS DE CD. JUAREZ CHIHUAHUA Y NIÑOS DE DOS POBLACIONES
DEL ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ”**

**TÉSIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

PRESENTA:

I.BQ. LAURA PATRICIA MARTÍNEZ ARÉVALO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IVÁN NELINHO PÉREZ MALDONADO

COMITÉ TUTELAR:

DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ

DRA. MARÍA DEOGRACIAS ORTIZ PÉREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA

"EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN DE COMPUESTOS BROMADOS (PBDEs)
EN NIÑOS DE CD. JUAREZ CHIHUAHUA Y NIÑOS DE DOS POBLACIONES
DEL ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ"

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS

PRESENTA:

I.BQ. LAURA PATRICIA MARTÍNEZ ARÉVALO



FACULTAD DE MEDICINA
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS BÁSICAS

SINODALES:

DR. IVÁN NELINHO PÉREZ MALDONADO

DR. FERNANDO DÍAZ-BARRIGA MARTÍNEZ

DRA. MARÍA DEOGRACIAS ORTIZ PÉREZ

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Este proyecto a cargo del Dr. Iván Nelinho Pérez Maldonado se llevó a cabo haciendo uso de la infraestructura técnica del laboratorio dentro del departamento de Toxicología Ambiental de la facultad de medicina, Para su realización se obtuvieron recursos de FOMIX SLP/ CONACYT 2005 con el número de proyecto FMSLP_2005_C0139.

La alumna Laura Patricia Martínez Arévalo hace su agradecimiento expreso a CONACYT por haber sido becaria con número de registro 191589.

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi hijo Diego Arturo que con tan solo 1 año ocho meses de edad me dio mucha fortaleza para salir adelante, también a mi nuevo bebé de 3 meses de gestación que aunque no sé todavía si es un niño o una niña, es mi regalo que me manda Dios por haber terminado este proyecto, de la misma forma le dedico este trabajo a mi esposo Jorge Chiprés por estar siempre conmigo, por todo su apoyo, cariño y consejos, por último también quiero dedicar este esfuerzo a mi madre, ya que siempre que la necesité conté con su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios por la oportunidad de vivir, de regalarme una familia maravillosa y de haberme permitido concluir una nueva etapa en mi vida.

- ❖ A mi hijo Diego Arturo a mi esposo Jorge y a mi bebé de tan solo 3 meses de gestación, por estar siempre conmigo apoyándome y brindándome todo su amor.

- ❖ A mi madre por haberme dado la vida y apoyarme siempre en todo momento que la necesito.

- ❖ A mis hermanos Jorge, Silvia y Gerardo muchas gracias por compartir siempre momentos muy lindos conmigo.

- ❖ A las señoras María Esperanza de la Fuente y Felicitas González muchas gracias por su ayuda.

- ❖ A mi compañera y amiga Olga Edith por compartir conmigo momentos difíciles y por su apoyo moral.

- ❖ A mi Director de Tesis el Dr. Iván Pérez Maldonado y mis asesores los Doctores Fernando Díaz-Barriga y María Deogracias Ortiz por sus consejos, por compartir conmigo sus experiencias y por haber creído en mí.

- ❖ A Dania por haberme apoyado con el desarrollo del método y por ser una gran compañera y amiga.

- ❖ A Rebe e Izanami por apoyarme en el laboratorio a demás de ser mis amigas.

- ❖ A Edna y Lety Carrizales por su apoyo con Cd. Juárez, Chihuahua.

- ❖ A Norma y a Toño por su ayuda en El Refugio, SLP.

- ❖ A Claudia y a Don Ángel por ayudarme con el lavado a tiempo del material.

- ❖ Por último, a todos los profesores y compañeros del Laboratorio de Toxicología que en algún momento me brindaron su amistad y conocimientos muchas gracias.



RESUMEN

Los retardantes de flama también llamados ignífugos, son un grupo de compuestos químicos que se incorporan a distintos tipos de materiales con la finalidad de retardar o inhibir la fase inicial del fuego. Por sus propiedades los retardantes de flama han sido considerados durante mucho tiempo como altamente benéficos. Sin embargo, recientemente estos compuestos han recibido especial atención, ya que varias investigaciones han comenzado a advertir sus efectos tóxicos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el nivel de exposición a un grupo de compuestos retardantes de flama, los Bromados Difenil Éteres (PBDEs) en niños, de dos localidades en el Estado de San Luis Potosí (El Refugio y San Luis Potosí) y una en el Estado de Chihuahua (Cd. Juárez). La cuantificación de PBDEs en suero fue realizada mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), los congéneres analizados fueron: BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-154, BDE-153, BDE-209. Los resultados muestran que en todas las comunidades estudiadas se encontró exposición infantil a por lo menos uno de los 6 congéneres de PBDEs evaluados, destacando las poblaciones de Cd. Juárez, Chih. (Mediana = 9.5 ng/g lípido) y El Refugio, S.L.P. (Mediana = 6.98 ng/g lípido) con los niveles más altos de PBDEs totales en comparación con San Luis Potosí, S.L.P. (Mediana = 3.09 ng/g lípido). El presente trabajo demuestra la presencia de PBDEs en niños de México, lo cual debe ser motivo de atención y base de investigaciones futuras.

Palabras clave: Difenil éter polibromados, PBDEs, exposición en niños, retardantes de flama.

INTRODUCCIÓN

El concepto de compuestos retardantes de flama, también llamados ignífugos, se aplica a una diversidad de compuestos o mezclas de compuestos químicos, diseñados para reducir la inflamabilidad de un material o para demorar la propagación de las flamas a lo largo y a través de su superficie (WHO, 1994). Al reducir la inflamabilidad de muchos productos, los retardantes han abatido la tasa de incendios minimizando así los costos económicos y la pérdida de vidas. Debido a estas características, dichos compuestos han sido usados por varias décadas en diversos sectores urbanos e industriales. Sin embargo, recientemente han recibido una atención diferente, ya que varias investigaciones han comenzado a advertir sus efectos tóxicos (Barrera-Cordero y cols., 2004).

Hasta ahora, han sido usados como retardantes de flama 175 químicos distintos (inorgánicos y orgánicos) (WHO, 1997; Birnbaum y Staskal, 2004). Entre ellos los compuestos orgánicos más utilizados en la actualidad son los polibromados difenil éteres (PBDEs).

Los PBDEs en general se aplican como aditivos, es decir, no se incorporan a la estructura polimérica del material, característica que les permite liberarse gradualmente con facilidad a lo largo del ciclo de vida de los artículos a los cuales son añadidos, aunque este proceso aún no es bien conocido (Barrera-Cordero y cols., 2004).



La producción comercial de PBDEs comenzó en la década de los 60's (Sjödin y cols., 1999) y a partir de entonces se encuentran en el mercado tres formulaciones comerciales: penta-, octa- y decaBDE que son conocidas por sus nombres en el mercado: Bromkal, Tardex y Saytex respectivamente (ATSDR, 2002). Es importante mencionar que las formulaciones comerciales son mezcla de diferentes congéneres, así la pentaBDE contiene (TetraPBDE, PentaBDE y HexaBDE), la OctaBDE se conforma por (HexaBDE, HeptaBDE, OctaBDE y NonaBDE) y la DecaBDE por (NonaBDE y DecaBDE).

En los años 80's, los PBDEs fueron reportados por primera vez como contaminantes ambientales en el río Viskan en Suecia (Andersson y Blomkvist, 1981), y desde entonces han sido encontrados en la mayoría de los compartimentos ambientales incluyendo ecosistemas acuáticos y terrestres (Sjödin y cols., 1999). Se han encontrado en aire asociados con partículas de polvo y en cuerpos de agua en los sedimentos (Jones-Otazo y cols., 2005). Por otro lado, se ha reportado que los PBDEs viajan grandes distancias, se bioacumulan y biomagnifican en el ambiente (Darnerud y cols., 2001), lo cual les ha permitido ser detectados incluso en regiones remotas como el Ártico. En general, los PBDEs han sido encontrados en tejido de ballenas, focas, osos polares, aves, huevos de aves, ratones, renos, anguilas, peces, así como en cabello, tejido graso, sangre y leche humana (Darnerud y cols. 2001; Palm y cols., 2002; Christensen y cols., 2002; Frode, 2005; Verreault y cols., 2005). En los últimos años, los PBDEs se han unido a los PCBs, DDT y Dioxinas en la lista de químicos persistentes que dañan principalmente a animales y humanos

en cualquier lugar sobre el planeta (Webster y cols., 2005). Aún más, los PBDEs por sus características de liposolubilidad, persistencia y bioacumulación, en los últimos años han ido incrementando sus niveles en el ambiente, la biota y los humanos siendo esto causa de preocupación (Hites, 2004).

En México se carece de información detallada sobre la cantidad en la que son usados los PBDEs, tanto para la fabricación de diversos artículos de consumo, como por la entrada de productos terminados que tienen un alto contenido de estos materiales. Asimismo, también se desconoce la forma en que los productos que los contienen se reciclan, incineran o disponen.

Sin embargo, existe un reporte en Coatzacoalcos Veracruz en donde se ha demostrado y cuantificado la presencia de 5 congéneres (BDE-47, BDE-99, BDE-153, BDE-183, BDE-209 en una concentración total de 30.8 ng/g lípido) en huevos de gallina de áreas cercanas a donde se incineran desechos municipales (DiGangi, 2005).

Por otro lado, también se tiene un estudio piloto en humanos realizado por López y cols., 2006, el cual consistió en la cuantificación de PBDEs en sangre y leche de 5 mujeres de la Ciudad de San Luis Potosí y 7 mujeres indígenas de la Huasteca Potosina. Todas las muestras analizadas resultaron ser positivas para los 6 congéneres de PBDEs monitoreados (BDE-47, 99, 100, 153, 154 y 209). Éste fue el primer estudio que demuestra la exposición a estos compuestos en humanos en nuestro país. No obstante, al igual que la mayoría



de los estudios en otras partes del mundo, éste se enfocó en una población adulta por lo que ahora se consideró de vital importancia realizar un estudio en población infantil para evaluar los niveles de PBDEs, ya que los niños son más vulnerables que los adultos a la contaminación y sustancias químicas en general. Además existe la evidencia que los infantes están siendo expuestos a PBDEs desde edades tempranas de su vida (incluso en la gestación), seguida de etapas postnatales inmediatas (lactancia), así como a lo largo de su crecimiento (Schechter y cols., 2003; Meironyté y cols, 2003; Bocio y cols., 2004; Schechter y cols., 2006), lo cual puede repercutir en la limitación de su potencial de desarrollo. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la exposición a PBDEs en niños de dos comunidades dentro del Estado de San Luis Potosí (El Refugio y San Luis Potosí) y una en el Estado de Chihuahua (Cd, Juárez).

MATERIALES y MÉTODOS.

Selección de la Población. Los niños de entre 6 y 12 años seleccionados al azar para este estudio, fueron voluntarios que han vivido desde su nacimiento en cada una de las tres poblaciones seleccionadas (El Refugio, SLP; San Luis Potosí, SLP y Cd. Juárez Chih.) (Figura 1). Éstas áreas de estudio fueron escogidas de tal forma que se pudieran obtener datos de los niveles de PBDEs en una zona industrial (Cd. Juárez, n = 31); en una urbana (San Luis Potosí, n = 34) y en una rural agrícola (El Refugio, n = 35). Una vez ubicados los niños, les fue aplicado un cuestionario que registró características tales como:

edad, peso, estatura, hábitos alimenticios, hábitos de juego, entre otros. Finalmente, fue extraída cada muestra de sangre periférica (10 mL), la cual se resguardó a 4°C durante su transporte al laboratorio (caso de San Luis Potosí y El Refugio) en donde el suero fue separado por centrifugación y transferido a viales de vidrio con tapón de rosca y septa de teflón, en lo que respecta a Cd. Juárez las muestras obtenidas fueron centrifugadas en el laboratorio de Servicios Médicos de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chih. y el suero obtenido se transportó a 4°C en viales ámbar previamente etiquetados. De esta manera, las muestras de suero de las tres poblaciones fueron almacenadas para su análisis a – 20 °C.

Determinación de lípidos totales. Para esto se empleó un kit colorimétrico de laboratorios RANDOX, esta evaluación consiste en hacer reaccionar los lípidos en la muestra de suero con ácido sulfúrico concentrado, ácido fosfórico y vanilina para formar un complejo de color rosado, cuya intensidad es proporcional al contenido de lípidos en suero y se mide colorimétricamente a una λ de 540 nm.

Tratamiento previo al proceso de extracción de las muestras. En cada etapa de análisis se seleccionaron cuatro muestras al azar de cada población y se descongelaron a temperatura ambiente, se mezclaron en vortex durante 10 segundos y luego se vaciaron a un tubo de 18 mL. En seguida se les adicionaron 40 μ L del estándar interno (BDE-77) a una concentración de 2 ppb. Lo mismo se hizo para el punto control (mezcla de los seis congéneres de



estudio a 3 ppb) que se incluyó en cada ocasión, todo se dejó durante un día en el refrigerador (2°C) previamente etiquetado, tapado y envuelto en aluminio.

Determinación de PBDEs en Suero. La extracción de PBDEs en suero sanguíneo fue adaptada del método desarrollado por Hovander y cols., 2000. Primero se realizó un proceso de desnaturalización de proteínas con 6 mL de isopropanol y 1 mL de HCl 6M, se centrifugó y separó el sobrenadante para llevar a cabo una extracción líquido-líquido con 6 mL de una mezcla metil-terbutil-éter y hexano (1:1). De la misma forma se volvió a separar el sobrenadante y se transfirió a un tubo que contiene KCl 1%. Nuevamente una operación de centrifugado permitió identificar la fase orgánica para extraerla con 3 mL de hexano. En este punto los lípidos presentes en esta fase los cuales están asociados con los analitos, fueron sometidos a una corriente suave de nitrógeno a 37°C y llevados a sequedad para después ser hidrolizados con H₂SO₄ concentrado (2 mL). Después de centrifugar se obtuvo el sobrenadante libre de lípidos que se re-extrajo con 4 mL de hexano y finalmente éste fue concentrado a 0.5 mL con corriente de nitrógeno. El extracto fue limpiado mediante una columna empacada con 0.1g sílica activada y 1g de SiO₂activada - H₂SO₄ (2:1), la cual previamente fue lavada con 6 mL de una mezcla de cloruro de metileno:hexano (2:1), y que tiene en la parte superior sulfato de sodio anhidro para absorber la humedad que pueda tener la muestra. Enseguida, se eluyó con 8 mL de una mezcla de cloruro de metileno:hexano (2:1). Finalmente el eluato fue concentrado mediante una corriente de nitrógeno y llevado con hexano a un volumen final de 50 µL.



En relación al análisis cromatográfico, se emplearon soluciones estándares con las que se obtuvo el espectro de masas y el tiempo de retención de los PBDEs por modo SCAN y luego SIM, con lo que se determinaron los iones más abundantes (404, 484, 486) característicos de cada compuesto los cuales fueron utilizados para la cuantificación de las muestras empleando un monitoreo selectivo de iones (SIM). Se empleó un cromatógrafo de gases HP-6890 acoplado a un espectrómetro de masas HP-5730. La columna utilizada fue una capilar DB5-HT (15 m*0.25 mm id, 0.1 μ m espesor de película), se empleó Helio como gas acarreador. La temperatura del inyector fue de 250 °C usando splitless pulsado (a 20 psi) y manteniendo la válvula cerrada por un tiempo de 1.5 min. La temperatura de trabajo del detector fue de 300 °C. Se trabajó un programa de temperatura en el horno que inicia a 80°C y se mantiene 1 minuto, seguido de un incremento de 10 °C/min hasta 270 °C aumentando nuevamente de 30°C/min hasta 300 °C y sosteniendo por 5 minutos. El volumen de inyección fue de 1 μ L.

Análisis estadístico. Los datos no presentaron distribución normal para ninguna de las tres poblaciones, por lo que se aplicaron pruebas no paramétricas para el análisis posterior de los resultados. De tal manera que para comparar dos poblaciones se empleó la prueba de Mann Whitney, para el caso de comparaciones múltiples (tres o más poblaciones) se empleó la prueba de Kruskal Wallis, seguida de la prueba de Dunn para identificar diferencias entre los grupos, todas las pruebas estadísticas se evaluaron a una $P < 0.05$.

Los análisis utilizaron los programas: STATISTICA versión 6.0 y GRAPH PAD PRISM versión 4.0.

RESULTADOS

Comparación de PBDEs totales entre las poblaciones

La Figura 2 muestra las concentraciones de PBDEs totales correspondientes a las tres poblaciones estudiadas. Podemos observar que los niños de Cd. Juárez, Chih., presentaron las más altas concentraciones de PBDEs (mediana=9.55 ng/g lípido), seguidos de los del El Refugio, S.L.P. (mediana=6.98 ng/g lípido) y finalmente los de San Luis Potosí, S.L.P. (mediana= 3.09 ng/g lípido). Es importante mencionar que las concentraciones encontradas en los niños de Cd. Juárez, Chih. y El Refugio, S.L.P. no son significativamente diferentes entre si, pero sí son estadísticamente distintas a las obtenidas en los niños que viven en la ciudad de San Luis Potosí.

Comparación de las concentraciones de congéneres entre las poblaciones

Las concentraciones de cada uno de los congéneres estudiados en las tres poblaciones se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 3. Nuevamente, puede observarse que la población de Cd. Juárez, Chih., presenta los más altos niveles de concentración y el orden es (BDE-47>BDE-153>BDE-99>BDE-100); seguido de El Refugio, S.L.P., (BDE-153>BDE-99>BDE-47>BDE-100), ambas



poblaciones no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre los congéneres a excepción del BDE-47. Por su parte, San Luis Potosí, S.L.P. presentó las menores concentraciones para los congéneres antes mencionados, donde el orden es (BDE-153>BDE-47>BDE-100>BDE-99). Así mismo, en todas las poblaciones el BDE-154 y BDE-209 no fueron detectados (LD= 0.15 y 0.11 ppb respectivamente).

Comparación del porcentaje de congéneres presentes en las muestras de cada población

En el caso de Cd. Juárez los congéneres BDE-47 y BDE-153 estuvieron presentes en un 96% del total de las muestras, seguido por el BDE-100 (93%) y el BDE-99 (67%). En cuanto a El Refugio, S.L.P es importante mencionar que a diferencia de lo observado en Cd. Juárez, Chih., los cuatro congéneres (BDE-47, BDE-99, BDE-153 y BDE-100) estuvieron presentes en el 100% de las muestras analizadas. En lo que respecta a San Luis Potosí, SLP el BDE-47 estuvo presente en el 100% de los niños, seguido por el BDE-100 (70%), BDE-153 (61%) y por último BDE-99 (44%) (Figura 4)

DISCUSIÓN

Análisis de la exposición a PBDEs Totales entre poblaciones

En este estudio se demostró que los niños mexicanos que viven en las áreas estudiadas están expuestos a PBDEs. Las concentraciones totales obtenidas para cada población van de 3.00 a 61.4 ng/g lípido para Cd. Juárez, Chih., de



3.07 a 52.77 ng/g lípido para el Refugio, S.L.P.; y 1.66 a 19.46 ng/g lípido para San Luis Potosí, SLP. Los resultados obtenidos para Cd. Juárez, Chih., concuerdan con lo esperado, ya que además de ser un área urbana, cuenta con 18 parques industriales, de los cuales el conocido como "Antonio J. Bermudez" se encuentra muy próximo (500 m) de la escuela de donde fueron tomadas las muestras. Éste parque incluye un importante número de industrias maquiladoras (textiles, químicas, electrónicas), en donde es posible la existencia de una mayor producción y tráfico de artículos que contengan PBDEs. También cabe mencionar que Cd. Juárez es una localidad fronteriza con El Paso, Texas, en Estados Unidos. Ambas ciudades conforman el núcleo fronterizo más grande del mundo (conocido como "El Paso-Juárez, la maquila capital del mundo"), por lo que existe un importante número de industrias que pueden estar utilizando PBDEs en la manufactura de sus artículos. Ya ha sido reportado que éste importante conjunto bi-nacional de industrias repercute sobre toda la región, debido a que El Paso y Cd. Juárez forman parte de la misma cuenca atmosférica, y los contaminantes emitidos en los procesos industriales (partículas suspendidas, compuestos orgánicos, etc.) se mueven libremente a lo largo de ella (INE, 2005). Este fenómeno es relevante ya que se ha reportado que el polvo acumulado en interiores es una importante ruta de exposición a PBDEs, incluso mayor que los alimentos (Schechter y cols., 2006). A esta situación se añade que las aguas residuales municipales sin tratar son destinadas a la agricultura local, debido a la insuficiencia de agua para el riego agrícola (Garza, 2000), lo que implica una problemática debido a que estudios recientes han indicado la presencia de PBDEs (prioritariamente congéneres



con menos de 6 átomos de bromo) en sedimentos de aguas residuales municipales de ciudades industriales (2.4 mg/kg peso seco)(He y cols., 2006), los cuales después de secarse en los suelos irrigados también pueden ser dispersados en partículas de polvo. Además cabe mencionar que 48% de las vialidades en Cd. Juárez no poseen asfalto (INE, 2005), por lo que el movimiento continuo de vehículos mantiene un flujo constante de material particulado que pudiera contener PBDEs en el ambiente y que puede ingresar a los hogares. Otro factor a considerar es la presencia de ladrilleras en la región (325 hornos aproximadamente), distribuidas en 13 sitios alrededor de la mancha urbana de Cd. Juárez (Romo-Aguilar y cols., 2004). De hecho, el sitio ladrillero más grande de la zona (México 68 con 127 hornos) se encuentra a aproximadamente 6 km de la escuela muestreada, y se ha reportado el uso de plásticos como combustible, los cuales pudieran contener PBDEs (Romo-Aguilar y cols., 2004).

La situación de El Refugio, S.L.P. es más complicada de explicar con la información obtenida, pero no podemos dejar de mencionar que en esta comunidad existe la presencia de tiraderos de basura a cielo abierto, la quema común de ésta en patios de hogares y la presencia de ladrilleras que pudieran estar quemando desechos que contengan PBDEs, ya que se ha demostrado y cuantificado la presencia de PBDEs en áreas cercanas a donde se incineran desechos municipales (DiGangi, 2005) y en áreas donde se tira la basura sin un control sanitario (Fäldt y cols., 2005). Finalmente con respecto a San Luis Potosí, S.L.P., las concentraciones encontradas son bajas comparadas con las

obtenidas en las otras dos comunidades estudiadas (Cd. Juárez, Chih. y El Refugio, S.L.P.). Para esta población aparentemente no se presentan factores relevantes que pudieran estar incrementando las concentraciones de PBDEs en los niños, siendo las únicas probables fuentes de exposición los aparatos electrónicos con los que cotidianamente tiene contacto un niño viviendo en zonas urbanas como lo son: computadoras, televisiones, electrodomésticos, etc. En este estudio se suprimió influencia de factores como edad y peso; orden de nacimientos; periodo de lactancia; tiempo de residencia; consumo de alimentos como: huevo, leche de vaca, derivados lácteos (crema, queso, etc), carnes, pescado y atún enlatado con respecto a los niveles de PBDEs obtenidos ya que no se encontraron asociaciones, lo cual concuerda con otros estudios desarrollados por Thomsen y cols. 2002; Petreas y cols. 2003; Bradman y cols. 2007; Lee y cols. 2007 que tampoco observaron un patrón de tendencia o asociación de estos factores con relación a las concentraciones de PBDEs encontradas.

Otro detalle a resaltar fue que dos de los valores más altos de PBDEs en Cd. Juárez y tres de El Refugio correspondieron a hermanos, lo cual abre la posibilidad de que hábitos particulares o una fuente específica sean los causantes de sus niveles de exposición.

Por otro lado, los niveles de PBDEs totales encontrados en el suero de los niños en nuestro estudio se encuentran por debajo de los niveles encontrados en infantes de otras investigaciones hechas en Norteamérica. Por ejemplo, un estudio realizado por Douglas y cols., (2006), en un área urbana de California

(Estados Unidos) donde se tomaron muestras de suero sanguíneo de una familia, mostró que los niños (18 meses y 5 años) fueron los que tuvieron las sumatorias totales de PBDEs (BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154, BDE-209) más altas, las cuales estuvieron en 651 ng/g lípido y 390 ng/g lípido para cada uno respectivamente, estando estos valores muy próximos a los reportados por McDonald (2005), los cuales son asociados principalmente con daños adversos en la reproducción (230 ng/g lípido) y neurodesarrollo (660 ng/g lípido) evaluados en animales de laboratorio.

La diferencia en los resultados obtenidos en estas poblaciones mexicanas con respecto a poblaciones en Estados Unidos es atribuida a que en México el periodo de tiempo en que se han usado artículos que contienen PBDEs ha sido menor, ya que en Estados Unidos el uso de computadoras, juegos de video y otros equipos electrónicos, que contengan estos compuestos como retardantes de flama, se desarrolló y extendió antes y con mayor rapidez que en nuestro país. Por ejemplo, en Estados Unidos el porcentaje de hogares con computadora en el 2006 fue del 74%, mientras que en México fue tan solo del 20.5% (INEGI, 2006; Nielsen y NetRatings, 2006). Además es necesario considerar que en México se desconoce si los artículos (industrias textiles, muebleras, etc.) hechos por el país incorporan PBDEs, lo cual puede también influir en los resultados de concentración obtenidos para estos compuestos. Por otra parte, en Estados Unidos existen industrias que elaboran las mezclas comerciales de PBDEs (penta y octaBDE) desde hace casi 30 años, en cambio en México este tipo de industria son inexistentes (Birnbaum y Staskal, 2004).



Al comparar nuestro estudio con los valores reportados por países europeos, se observaron valores muy similares dentro del mismo orden de magnitud con los de los niños mexicanos. Tal es el caso de un estudio realizado en las Islas Faroe en Dinamarca (niños de 7 años, mediana = 5.5 ng/g lípido; Fångström y cols., 2005) y otro en Noruega (niños en un rango de edad de 0-14 años mediana = 5 ng/g lípido; Thomsen y cols., 2002). Sin embargo, para el caso de Europa estos niveles encontrados son entendibles ya que desde el 2004 la Unión Europea prohibió la producción, uso e importación de productos que contuvieran las mezclas comerciales (penta y octaBDE) (Petreas y cols., 2003; Hites, 2004). No obstante en México al no existir una regulación y mucho menos una prohibición de PBDEs, los valores por lo pronto obtenidos pueden bioacumularse e ir cada día en aumento.

Análisis de la exposición de congéneres entre poblaciones

Se pudo observar en las tres poblaciones que de los seis congéneres estudiados, en la mayor parte de las muestras se cuantificaron solo cuatro congéneres (BDE-47, BDE-99, BDE-100 y BDE-153). Esto concuerda con estudios en donde se ha observado que el BDE-47 es el principal congener encontrado en la mayoría de las muestras humanas y ambientales (Eriksson y cols, 2001), siendo también predominantes el BDE-99 (Kuriyama y cols., 2005) y BDE-153 (Fångström y cols., 2005) seguidos por el BDE-100 (Meironyté y cols., 2003). Además, es importante recordar que precisamente los congéneres BDE-47, BDE-99, BDE-153 y BDE-100 son los mayores constituyentes de la mezcla comercial penta-BDE (Meironyté y cols., 2003), la cual es adicionada

principalmente en la espuma de poliuretano, siendo esta muy usada para la elaboración de muebles como: sofás, sillas, relleno de colchones, almohadas, asientos de automóviles, autobuses, aviones, trenes, alfombras, imitaciones de madera, etc. (WHO, 1994), Además ésta fue la más empleada en el 2001 por Norteamérica (Petreas y cols., 2003; Hites, 2004) .

También es importante mencionar que a pesar de que el BDE-99 es el congénere más abundante de la mezcla comercial penta-BDE, en la literatura no se han descrito las razones que justifiquen la presencia dominante del BDE-47 en biota, humanos, sedimentos, etc. Se han sugerido algunas hipótesis para explicar este comportamiento siendo la más aceptada la siguiente: el metabolismo del BDE-99 es más rápido que el del BDE-47, lo que nos llevaría a una menor eliminación del congénere BDE-47 y por lo tanto una mayor persistencia en los diferentes medios (Staskal y cols., 2005), sin embargo esto es algo que aún necesita ser demostrado. Debemos hacer notar que en la comunidad de El Refugio, S.L.P. el BDE-99 fue el congénere en mayor concentración en el suero sanguíneo de los niños y además presente en el 100% de las muestras, sin embargo, en esta población la fuente de exposición es desconocida y por lo tanto es difícil el poder inferir la razón de porque el BDE-99 tuvo este patrón de comportamiento en la población.

Por último, es importante mencionar que no fueron detectados en las muestras de las tres poblaciones estudiadas el BDE-154 y BDE-209. Para el caso del BDE-154, es importante mencionar que este congénere se encuentra en la mezcla comercial penta en la más baja proporción (4%), siendo ésta una razón

probable para explicar el porque no haya sido cuantificado en los niños estudiados (Darnerud, y cols., 2001; Environmental working group, 2006; La Guardia y cols., 2006). Aunque en otros estudios sí ha sido cuantificado el BDE-154 (Douglas, y cols., 2006; Thomsen, y cols., 2002; Fångström y cols., 2005), se ha mencionado que este congénere probablemente co-eluya con el PBB-153 (2,2',4,4',5,5'-hexabromobifenil), por lo cual se cree que por este hecho se esté posiblemente arrojando un valor incierto del BDE-154, por lo que su concentración puede ser aún menor de lo que se esté estimando.

En cuanto al BDE-209, la ausencia puede ser explicada en base a que algunos investigadores sugieren que este congénere tiene baja biodisponibilidad (La Guardia, y cols., 2006), además de que un estudio desarrollado por He y cols., (2006) demuestra que el BDE-209 puede perder bromos y dar origen a congéneres menos bromados debido a exposición a la luz del sol, debrominación enzimática en peces y por bacterias anaeróbicas. Sin embargo en algunos casos, como en el análisis desarrollado por Douglas y cols., (2006), se ha observado la presencia del BDE-209 en suero de niños, lo cual se atribuye principalmente a la existencia de éste en el polvo dentro de los hogares. No obstante, existe la posibilidad de que realmente éste congénere estuviera ausente en nuestras muestras analizadas, ya que en base a lo reportado por Thuresson (2004) y La Guardia y cols., (2006) se usó una columna cromatográfica de 15 m para evitar la debrominación. Asimismo, el modo de inyección fue splitless pulsado, el cual se ha reportado que también reduce la probabilidad de debrominación de los compuestos con alto peso

molecular como el BDE-209 (PM = 960 g/mol) (Thomsen y cols., 2002; Mazdai y cols., 2003; Thuresson 2004; La Guardia y cols., 2006).

Por otro lado, los estudios sobre la toxicidad de PBDEs en humanos son escasos, sin embargo, en la investigación desarrollada por Bahn y cols., 1980 al evaluar trabajadores después de una exposición ocupacional tanto a PBDEs como PBBs, se observó hipotiroidismo primario y reducción en las velocidades de conducción nerviosas, pero nunca mostraron una asociación entre los efectos vistos y la exposición a polibromados difenil éteres. Por lo que respecta a estudios desarrollados en animales, se ha observado que los congéneres menos bromados (BDE-47 y BDE-99) han sido ligados principalmente al desarrollo de daños neurológicos (Eriksson y cols., 2001; Branchi y cols., 2002; Siddiqi y cols., 2003,) el cual parece ser el efecto tóxico más común producido por estos compuestos (Kuriyama y cols., 2005). Incluso en un estudio desarrollado en ratas por Eriksson y cols., 2001, se mostró que BDE-99 resultó ser más potente para causar efectos neurotóxicos en comparación al BDE-47, lo que sugiere probablemente la existencia de diferencias en neurotoxicidad entre congéneres. Así mismo, Kuriyama y cols., 2005, han reportado que el BDE-99 a bajas dosis en ratas (60 µg/kg) afecta principalmente la actividad motora, dañando además la espermatogénesis en la etapa adulta. De igual forma Birnbaum y Cohen 2006, han mostrado que los congéneres BDE-47, BDE-99, BDE-153 así como BDE-209 son neurotóxicos a una dosis de 0.6 a 0.8 mg/kg dañando principalmente los transmisores colinérgicos y causando efectos negativos sobre aprendizaje y memoria. De igual forma se ha visto que

el BDE-47 así como su metabolito hidroxilado a una dosis de 100 mg/kg compiten con tiroxina (T4) por el sitio de unión en Transtiretina (TTR) la cual es una proteína que transporta las hormonas tiroideas (importantes para el crecimiento normal y el desarrollo del cerebro en los niños), esto hecho podría afectar la regulación de los niveles de estas hormonas reduciendo su producción o incrementando el aclaramiento (Boas, y cols., 2006). Algunos autores también sugieren que los PBDEs pueden producir cambios físicos en la glándula tiroidea afectándola directamente generando hiperplasias tiroideas a dosis de 10 mg/kg e incluso presentar tumores cancerígenos a dosis de 1200 mg/kg (Ferne y cols., 2005).

Debido a la escasez de información sobre efectos tóxicos en humanos y sobre todo en niños, los niveles de PBDEs encontrados en nuestro estudio no pueden compararse con un valor de referencia para indicar riesgos de efectos adversos en la salud. Sin embargo, la sola presencia de estos compuestos en los niños es motivo suficiente de atención, ya que por sus características lipofílicas, persistentes y bioacumulables, los niveles en las poblaciones estudiadas pueden ir en aumento y representar un riesgo potencial a la salud (Birbaum y Cohen, 2006).

Finalmente, creemos que es de vital importancia realizar más estudios en las comunidades estudiadas con el fin de conocer las fuentes de exposición a PBDEs y así poder definir de manera específica cuales son las poblaciones de mayor riesgo en cada comunidad.



BIBLIOGRAFÍA.

Andersson O., Blomkvist G. (1981) Polybrominated aromatic pollutants found in fish in Sweden. *Chemosphere*. 10: 1051–1060.

ATSDR. Toxicological profile for Polybrominated biphenyls and Polybrominated diphenyl ethers. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. US Public Health Service, Atlanta, Georgia. 2002.

Barrera-Cordero J., Castro-Díaz J., Gavilán-García A. (2004). Los retardantes de flama polibromados ¿Nuevas sustancias de prioridad ambiental?. *Gaceta Ecológica*. 072: 45-52.

Bahn AK., Mills JL., Snyder PJ., GannPH., Houten L., Bialik O., Hollmann L., Utiger RD. (1980). Health assessment of occupational exposure to polybrominated biphenyl (PBB) and polybrominated biphenyl oxide (PBBO). *N Engl J Med* 302: 31-33.

Birnbaum LS., Staskal DF. (2004). Brominated Flame Retardants: Cause for Concern?. *Environ. Health Perspect*. 112: 9-17.

Birnbaum LS. and Cohen HAA. (2006). Polybrominated Diphenyl Ethers: A case study for using biomonitoring data to address risk assessment questions. *Environ. Health Perspect*. 114:1770-1775.

Boas M., Feldt-Rasmussen U., Skakkebæk N., and Main K., (2006) Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology* 154: 599–611.

Bocio A., Falcó G., Llobet J., Domingo J. L., Müller L. (2004) Dietary intake of organic pollutants in children from Catalonia, Spain. *Organohalogen Compounds*. 66: 2542 – 2546.

Branchi I., Alleva E., Costa LG. (2002). Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. *Neurotoxicology*. 23: 375-384.

Bradman A., Fenster L., Sjödin A., Jones R., Patterson Jr., Eskenazi B. (2007) Polybrominated Diphenyl Ether Levels in the Blood of Pregnant Women Living in an Agricultural Community in California. *Environ. Health Perspect*. 115: 71-74.

Christensen JH., Glasius M., Pecseli M., Platz J., and Pritzl G. (2002). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine fish and blue mussels from southern Greenland, *Chemosphere*. 47: 631-638.



Darnerud PO., Eriksen GS., Johannesson T., Larsen PB., Viluksela M. (2001). Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ. Health Perspect.* 109: 49–68.

DiGangi J. (2005). Egg Studies Reveal Global Contamination. *Global Pesticide Campaigner* (15) disponible en línea:
http://www.panna.org/resources/gpc/gpc_200508.15.2.10.dv.html

Douglas F., Hooper K., Athanasiadou M., Athanassiadis I., Bergman A. (2006). Children Show Highest Levels of Polybrominated Diphenyl Ethers in a California Family of Four: A Case Study. *Environ. Health Perspect.* 114: 1581-1584.

El Paso information and links , disponible en: <http://www.elpasoinfo.com/>

Environment Working Group. (2006). In the Dust. Toxic fire retardants in American homes. Disponible en:
<http://www.ewg.org/reports/inthedust/index.php>

Eriksson P., Jakobsson E., Fredriksson A. (2001) Brominated flame retardants: a novel class of developmental neurotoxicants in our environment? *Environ. Health Perspect.* 109: 903–908.

Fäldt E., Steven NC., Athanasiadou M., Bergman A., Jakobsson K. (2005). PBDEs en suero de jóvenes que trabajan en un tiradero de basura y mujeres con alto consumo de peces en Nicaragua. Disponible en:
http://www.ymed.lu.se/papers/dissertations/Steven_Cuadra_lic.pdf

Fängström B., Hovander L., Bignert A., Athanassiadis I., Linderholm L., Grandjean P., Weihe P., (2005). Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and polychlorobiphenyls in serum from pregnant Faroese women and their children 7 years later. *Environ Sci Technol.* 24: 9457-9463.

Fernie K., Shutt J., Mayne G., Hoffman D., Letcher R., Drouillard K., Ritchie I., (2005) Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): Changes in Thyroid, Vitamin A, Glutathione Homeostasis, and Oxidative Stress in American Kestrels (*Falco sparverius*) *Toxicological Sciences* 88:375-383.

Frode S. (2005). Killer Whales: The most toxic mammals in the European Arctic. Norwegian Polar Institute. Disponible en:
http://npiweb.npolar.no/scripts/cgiip.exe/WService=polar/d_nyhet.html?hPKey=2133&hParent=9&hDKey=3



Garza AV. (2000) Re-uso agrícola de las aguas residuales de Cd. Juárez, (Chih., México). En el Valle de Juárez y su impacto en la salud pública. Salud Pública y Nutrición (1). Disponible en:

http://www.respyn.uanl.mx/3/ensayos/aguas_residuales.html

He J., Kristin R., Robrock T., Álvarez-Cohen L. (2006). Microbial Reductive Debromination of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Environ Sci Technol.40: 4429-4434.

Hites RA.(2004). Polybrominated Diphenyl Ethers in the Environment and in People: A Meta-Analysis of Concentrations. Environ Sci Technol. 38: 945-956.

Hovander L., Athanasiadou M., Asplund L., Jensen S., Wehler M. (2000). Extraction and Cleanup Methods for Analysis of Phenolic and Neutral Organohalogenes in Plasma. J Anal Toxicol. 24: 696-703.

INE (2005). Hacia una gestión integral de la calidad del aire en paso del norte, disponible en: <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/233/cap7.html>

INEGI (2006). Hogares con equipamiento de tecnología y comunicaciones por tipo de equipo. Encuesta nacional sobre disponibilidad y uso de tecnologías de la información en los hogares, disponible en:

<http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=tin196&c=5585>

Jones-Otazo HA., Clarke JP., Diamond ML., Archbold JA., Ferguson G., Harner T. (2005). Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure to PBDEs. Environ Sci Technol 39: 5121-5130.

Kuriyama SN., Chris ET., Konstanze G., and Ibrahim C. (2005). Developmental Exposure to Low-Dose PBDE-99: Effects on Male Fertility and Neurobehavior in Rat Offspring. Environ Health Perspect 113: 149–154.

La Guardia MJ., Hale RC.,Harvey E. (2006). Detailed Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Contener Composición of the Widely Used Penta-, Octa-, and Deca-PBDE Technical Flame-retardant Mixtures. Environ Sci. Technol. 40: 6247-6254.

Lee S., Ikonomou M., Park H., Baek S., Chang Y. (2007) Chemosphere 67: 489–497.

López D., Athanasiadou M., Athanassiadis I., Yáñez L., Ramírez R., Díaz-Barriga F. Bergman Å. Estudio preliminar sobre los niveles de exposición a PBDEs en sangre y leche materna en México. (2006). Acta Toxicol. Argent14 (Suplemento): 52-54.



Mazdai A., Dodder N.G., Abernathy M.P., Hites R.A., Bigsby R. M. (2003). Polybrominated Diphenyl Ethers in Maternal and Fetal Blood Samples. *Environ. Health Perspect.* 111: 1249-1252.

McDonald TA. (2005). Polybrominated diphenyl ether levels among United States residents: Daily intake and risk of harm to the developing brain and reproductive organs. *Integr Environ Assess Manag.* 1: 343-354.

Meironyté GD., Aronsson A., Ekman-Ordeberg G., Bergman Å., Norén K. (2003). Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorobiphenylols and pentachlorophenol. *Environ. Health Perspect* 111: 1235-1241.

Nielsen//NetRatings (2006) Two-Thirds of Active U.S. Web Population Using Broadband, up 28 Percent Year-Over-Year to an All-Time High. Internet news, disponible:

http://www.ip97.com/two_thirds_of_active_u_s_web_population_using_broadband_up_28_percent_year_over_year_to_an_all_time_high_according_to_dacias_px

Palm A., Cousins D., Mackay M., Tysklind CM. Alae M. (2002). Assessing the environmental fate of chemicals of emerging concern: a case study of the polybrominated diphenyl ethers. *Environ Pollution.* 117: 195-213.

Petreas M., She J., Brown FR., Winkler J., Windham G., Rogers E., y cols. (2003). High body burdens of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in California women. *Environ. Health Perspect.* 111: 1175-1179.

Romo-Aguilar M.L., Córdova-Bojórquez G., Cervera-Gómez L.E., (2004). Estudio urbano-ambiental de las ladrilleras en el municipio de Juárez. *Estudios Fronterizos* 5:9-34.

Schechter A., Pavuk M., Pöpke O., Ryan J., Birnbaum L., Rosen R. (2003). Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in U.S. Mothers' Milk. *Environ. Health Perspect.* 111: 1723-1729.

Schechter A., Pöpke O., Harris, T., Tung K.C., Musumba A., Olson J., Birnbaum L. (2006). Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Levels in an Expanded Market Basket Survey of U.S. Food and Estimated PBDE Dietary Intake by Age and Sex. *Environ. Health Perspect.* 114:1515-1520.

Siddiqi MA., Ronald HL., Kurt DR. (2003). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants-old diseases. *Clin Med Res.* 1: 281-90.



Sjödin A., Hagmar L., Klasson-Wehler E., Kronholm-Diab K., Jakobsson E., Berman A. (1999). Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. *Environ. Health Perspect* 107: 643–648.

Staskal DF., Diliberto JJ., DeVito MJ., Birnbaum LS. (2005). Toxicokinetics of BDE 47 in female mice: effect of dose, route of exposure, and time. *Toxicol Sci.* 83: 215–223.

Thomsen C., Lundanes E., Becher G. (2002). Brominated Flame Retardants in Archived Serum Samples from Norway: A study on Temporal Trends and the role of age. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1414 -1418.

Thureson K. (2004). Occupational Exposure to Brominated Flame Retardants With Emphasis on Polybrominated Diphenyl Ethers. Doctoral Thesis, Department of Environmental Chemistry Stockholm University. SE-106 91 Stockholm Sweden.

Verreault J., Geir WG., Shaogang C., Derek CG., Muir MA., Ahmad H., Robert JL. (2005). Flame Retardants and Methoxylated and Hydroxylated Polybrominated Diphenyl Ethers in Two Norwegian Arctic Top Predators: Glaucous Gulls and Polar Bears. *Environ. Sci. Technol.* 16: 6021 -6028.

Webster T., Vieira V., Schechter A. (2005). Estimating human exposure to PBDE-47 via air, food and dust using Monte Carlo Methods. *Organohalogen Compounds.* 67: 505–508.

WHO. Environmental Health Criteria 162.(1994). Brominated diphenyl ethers; International Program on Chemical Safety, World Health Organization: Geneva, Switzerland.

WHO. Environmental Health Criteria 192. (1997). Flame Retardants: A General Introduction; International Program on Chemical Safety, World Health Organization: Geneva, Switzerland.

PIE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de las zonas de estudio.

Figura 2. Concentración de PBDEs totales (mediana) en las comunidades estudiadas. Se usaron las pruebas estadísticas de comparación múltiple Kruskal-Wallis y Dunn's, para evaluar diferencias significativas entre las tres poblaciones. $P < 0.05$, * diferente significativamente con respecto a Cd. Juárez y El Refugio.

Figura 3. Concentraciones de PBDEs por congéneres (medianas) en las comunidades estudiadas (A = Cd. Juárez, B = El Refugio, C = San Luis Potosí). Se aplicaron las pruebas estadísticas Kruskal Wallis y Dunn para ver diferencias entre grupos con una $P < 0.05$, & significativamente diferente con respecto a El Refugio y San Luis Potosí; * Significativamente diferente con respecto a Cd. Juárez y El Refugio. BDE-154 y BDE-209 resultaron $< LD$.

Figura 4. Porcentaje de PBDEs por congéneres presentes en cada una de las poblaciones estudiadas.



Tabla 1. Estadísticas descriptivas (mediana y rango) de los seis congéneres de PBDEs correspondientes a las poblaciones de Cd. Juárez, El Refugio y San Luis Potosí (ng/g lípido)

	BDE-47		BDE-100		BDE-99		BDE-154		BDE-153		BDE-209		N
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	
Cd. Juárez	3.85	0.80 - 30.70	1.15	ND - 23.50	2.00	ND - 11.80	ND	ND	2.45	1.50 - 9.10	ND	ND	31
El Refugio	1.15	0.54 - 31.72	0.97	0.45 - 26.04	2.04	1.00 - 9.37	ND	ND	2.21	1.09 - 8.99	ND	ND	35
San Luis Potosí	0.79	0.43 - 3.02	0.59	ND - 14.83	ND	ND - 4.51	ND	ND	1.36	ND - 2.36	ND	ND	34

ND < LD (límite de detección)

(BDE-47 LD = 0.12 ppb; BDE-100 LD = 0.05 ppb; BDE-99 LD = 0.19 ppb; BDE-154 LD = 0.15 ppb; BDE-153 LD = 0.12 ppb; BDE-209 LD = 0.11 ppb)

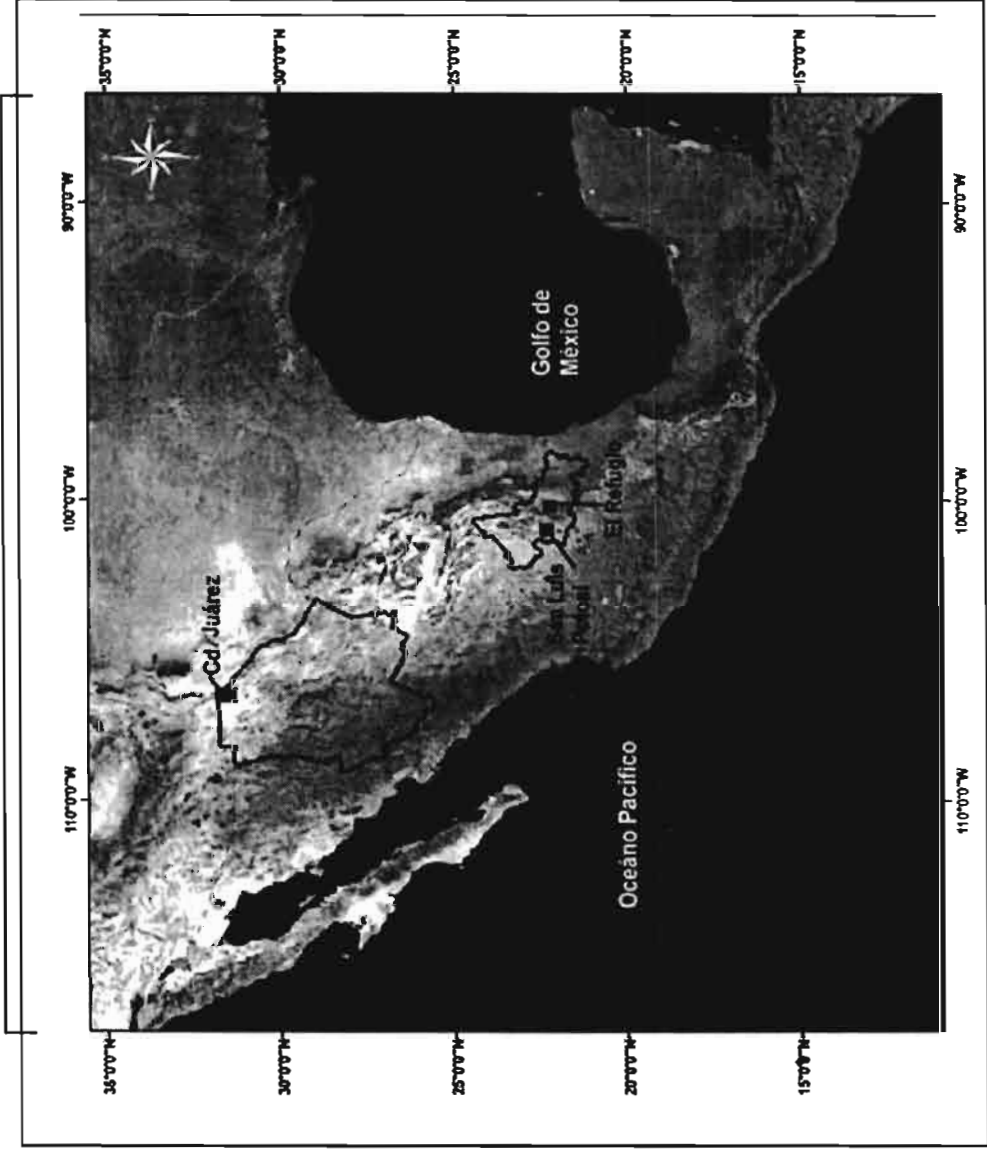


FIGURA 1

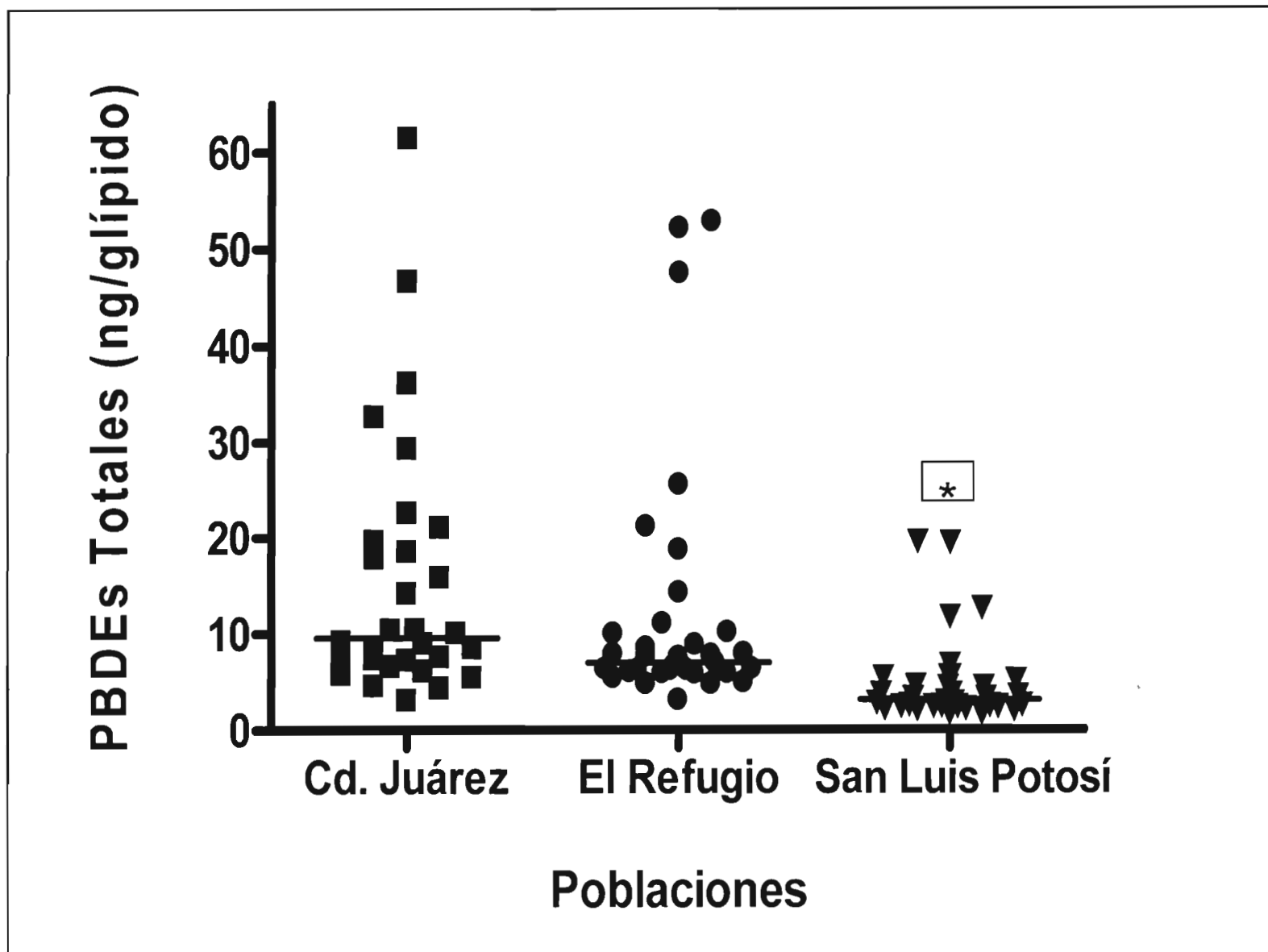


FIGURA 2

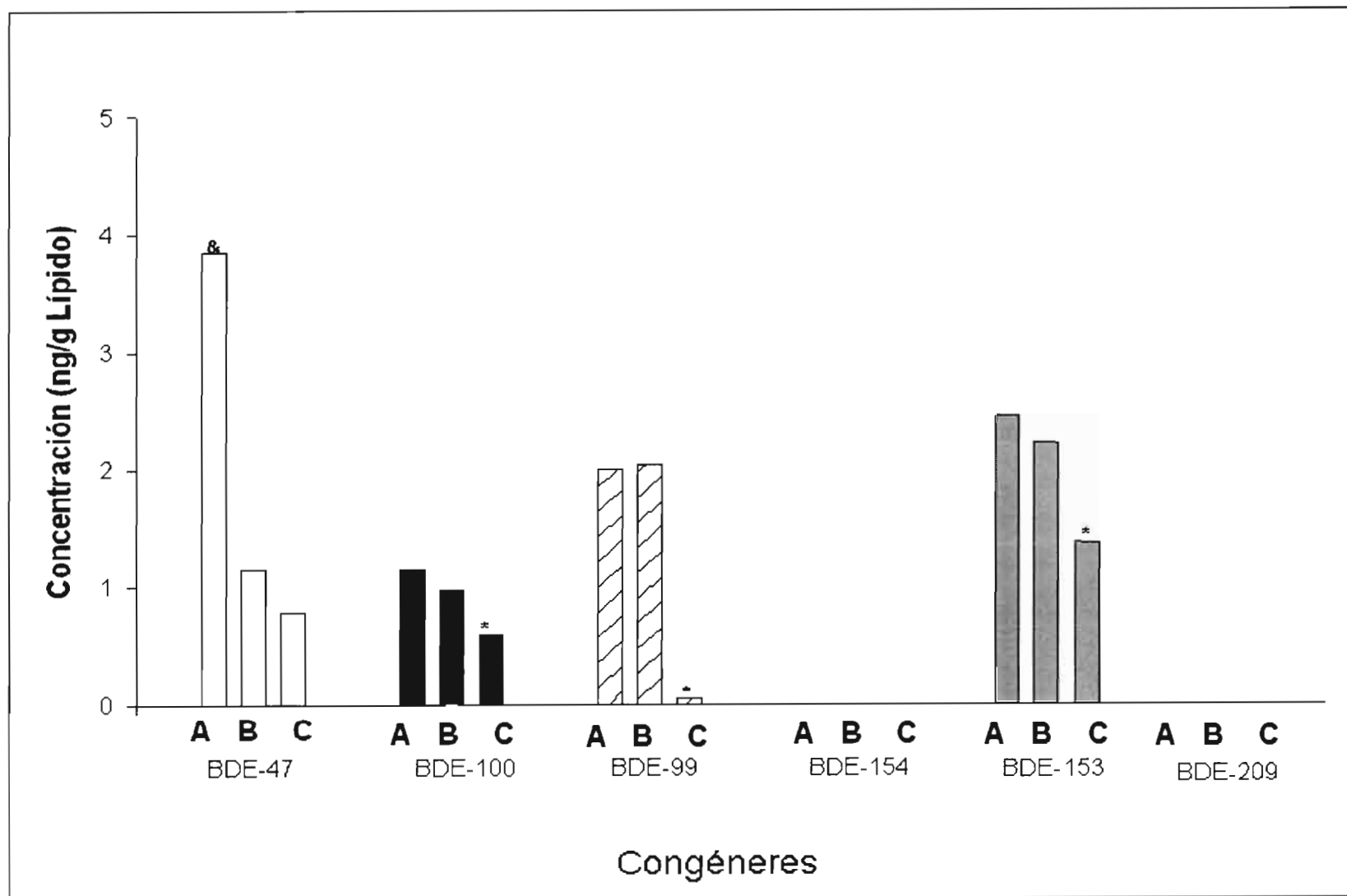


FIGURA 3

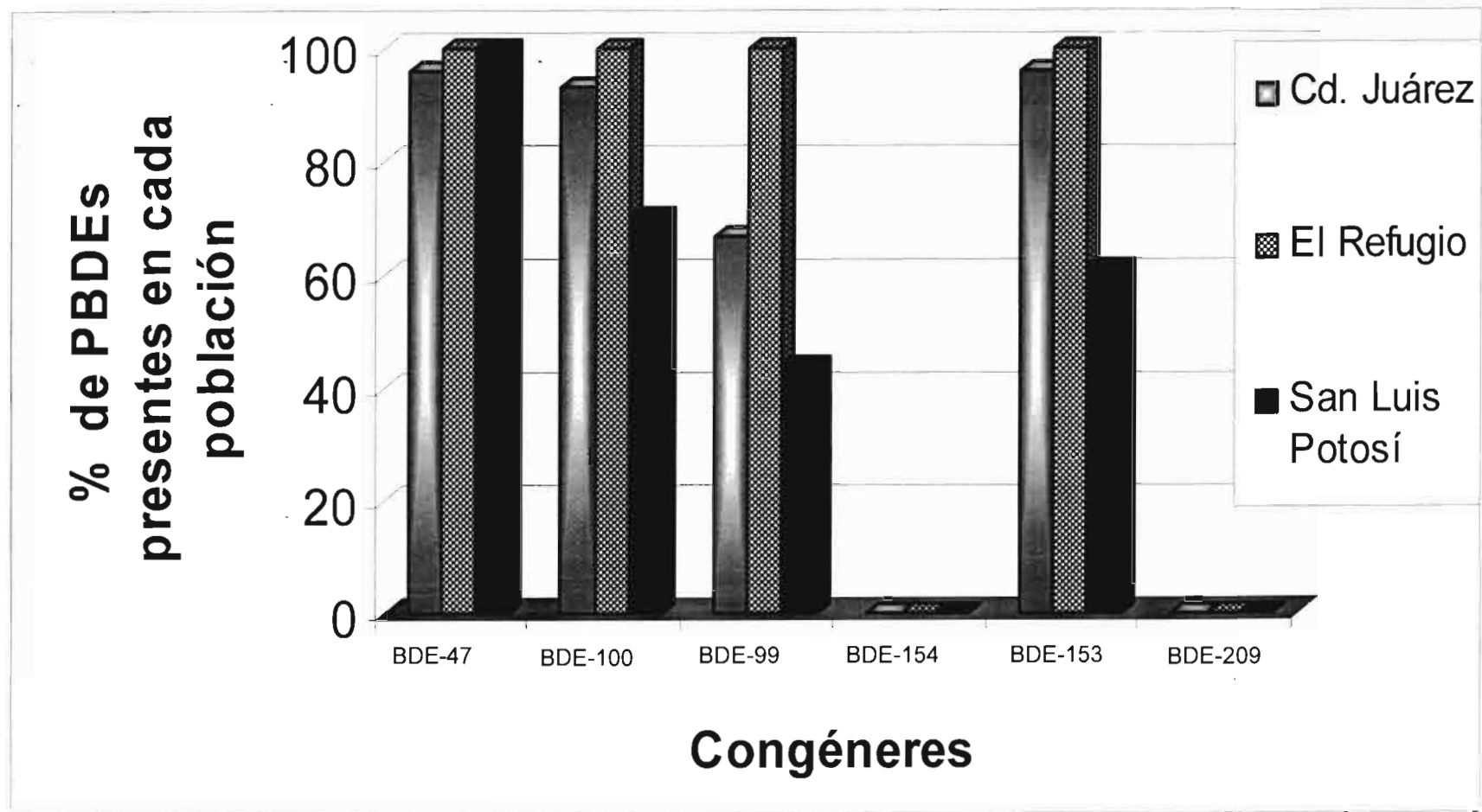


FIGURA 4

