

INVESTIGACION DE PARTICULAS DE ORIGEN MINERAL EN TEJIDO PULMONAR.

por

Leopoldo López Escobar *

RESUMEN

Ha sido posible identificar partículas de origen mineral tanto en tejido pulmonar de personas que habían estado ligada a la minería e industria como en la biopsia pulmonar de un paciente ajena a tales actividades. La identificación de las partículas se logró aplicando el método de difracción de rayos -X.

Se concluye que es posible no sólo la identificación, sino también la cuantificación de partículas minerales en biopsias de tejido pulmonar. Técnicas tales como la microscopía electrónica, el microsondaje electrónico, la fluorescencia de rayos-X, la absorción atómica y la activación neutrónica pueden ayudar en la determinación de la naturaleza, abundancia y constitución elemental de las partículas presentes en los pulmones.

ABSTRACT

The identification of mineral dust in lung tissue of miners, industrial workers and in the biopsy of a patient unrelated to mining and industry has been carried out by X-ray diffraction.

The qualitative and quantitative determination of mineral dust in biopsy of lung tissues is a possible task. Techniques such as electron microscopy, electron microprobe, X-ray fluorescence, atomic absorption and neutron activation analysis are useful in the determination of the nature, abundance and elemental constitution of harmful dust in lung tissue.

INTRODUCCION

Las partículas respirables, biológicamente activas, han re-

* Departamento de Geología, Universidad de Chile, Cas. 13518, Correo 21, Santiago.

presentado por muchos años un importante problema de salud pública especialmente en áreas mineras y en industrias que trabajan sobre la base de sustancias minerales. Los trabajadores expuestos a la inhalación de dichas partículas pueden verse afectados por enfermedades pulmonares (neumoconiosis) que varían en grado desde insuficiencias respiratorias hasta cáncer pulmonar y mesotelioma. Como la gravedad de la enfermedad parece estar vinculada en parte a la naturaleza de la partícula mineral, es importante la identificación del tipo de partícula causante del problema. Actualmente los medios principales de diagnóstico son la radiografía de tórax y la biopsia pulmonar. Estos exámenes permiten establecer una anomalía pulmonar causada por la presencia de partículas minerales, pero son incapaces de identificar con certeza la naturaleza de la partícula involucrada, pues los pulmones reaccionan en forma inespecífica ante una partícula extraña cubriéndola con una película proteica (CRALLEY et al., 1968). Es también importante conocer la relación entre el grado de la enfermedad y la cantidad de partículas que la producen a fin de poder determinar las dosis tolerables por el organismo.

La mayor parte del trabajo realizado en este campo es de tipo estadístico y se relaciona con la morbilidad y mortalidad causada por la exposición a un determinado tipo de partícula. Sin embargo, poco se ha hecho en relación con la determinación cualitativa y, sobre todo, cuantitativa de partículas minerales en biopsias de tejido pulmonar.

Dos son los objetivos de este estudio: a) la identificación de partículas minerales en biopsias de tejido pulmonar, y b) la correlación entre el tipo de partícula y su abundancia con procesos patológicos pulmonares. El logro de estos objetivos es posible mediante la difracción de rayos-X. Este método no causa ni alteración ni destrucción del material a analizar, es rápido y sus resultados pueden ser cuantitativos. No obstante, la difracción de rayos-X, presenta algunas desventajas, como por ejemplo no es capaz de distinguir si el mineral es masivo o fibroso. Esta desventaja es importante ya que los minerales fibrosos son los más perjudiciales en este tipo de alteración pulmonar. A veces por difracción de rayos-X es difícil distinguir los diversos tipos de anfíbolos que pueden estar presentes en una muestra, y la identificación del mineral se dificulta cuando éste exhibe una orientación de preferencia. Las desventajas señaladas pueden obviarse sometiendo las muestras a diferentes métodos de análisis como microscopio de luz polarizada, microscopio electrónico, microsonda electrónica, absorción atómica, fluorescencia de rayos-X, y activación neutrónica, lo que permitiría en definitiva la identificación de la o

las partículas minerales causantes del problema pulmonar.

GENERALIDADES

Es sabido que la inhalación de partículas de sílice causa la silicosis. Este tipo de neumoconiosis se caracteriza por la formación, en el pulmón, de pequeños nódulos y en casos avanzados puede desarrollarse una intensa fibrosis y enfisema pulmonar que dificultan la función respiratoria.

En la industria del carbón se conocen varios tipos de neumoconiosis, tales como la bitumiosis, la antracosis y la neumoconiosis del trabajador del carbón, todas las cuales son producidas por la inhalación de partículas de carbono.

Probablemente, la forma más benigna de neumoconiosis sea la siderosis, la cual resulta de la inhalación de partículas o vapores que contiene hierro. Las formas más serias de neumoconiosis son las causadas por la inhalación de partículas de asbesto y talco.

Asbesto es un término general para los siguientes minerales: crisotilo, amosita, actinolita y crocidolita. El crisotilo, $Mg_6(Si_4O_{10})(OH)_8$, es la variedad fibrosa de la serpentina. La amosita, $(Fe^{+2}, Mg)_7Si_8O_{22}(OH)_2$, es una anfíbola de naturaleza fibrosa; es la variedad fibrosa de la grunerita. En ella el contenido de hierro expresado como $Fe_7Si_8O_{22}(OH)_2$ puede variar entre 70 y 100 moles por ciento. La actinolita, $Ca_2(Mg, Fe^{+2})_5(Si_8O_{22})(OH)_2$, es también una anfíbola y en ella el contenido de magnesio expresado como $Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$ puede variar entre 20 y 80 moles por ciento. La crocidolita, $Na_2(Mg, Fe^{+2})_3(Fe^{+3})_2(Si_8O_{22})(OH)_2$, es otro miembro del grupo anfíbola y es la variedad fibrosa de la ribequita.

Por su naturaleza fibrosa y flexible, por su incombustibilidad y su baja conductividad del calor, los asbestos han sido usados, por mucho tiempo, como aislantes térmicos y eléctricos. Pero ellos no sólo causan un tipo de neumoconiosis conocida como asbestosis, la cual origina escaras en los pulmones que impiden el paso del oxígeno hacia la sangre, sino que actúan también como catalizadores del cáncer común y, aún más, pueden causar un tipo de cáncer conocido como mesotelioma.

Este último, además de ser muy doloroso, lleva a la muerte en el plazo de un año. Por razones aún no bien conocidas las enfermedades causadas por los asbestos no se hacen evidentes sino hasta 20 ó 30 años después de su inhalación.

Otro mineral de cuidado es el talco. Este es un silicato de magnesio hidratado, $Mg_3(Si_4O_{10})(OH)_2$, que se forma en rocas ultra básicas por alteración de minerales tales como olivinos y piroxenos. Su inhalación produce un tipo de neumoconiosis como talcosis. Aunque el talco parece ser menos peligroso que los asbestos, puede causar cáncer al pulmón y al aparato gastrointestinal.

Los minerales antes mencionados son los más comunes que han sido encontrados en tejido pulmonar. Sin embargo, son mucho más los minerales que pueden ser considerados como respirables y que pueden, por lo tanto, alcanzar no sólo a los pulmones sino también a otros tejidos vitales. Esto abre la posibilidad de una nueva línea de investigación interdisciplinaria cuyos aportes serían de gran beneficio no sólo a los trabajadores de la minería e industrias que laboran en base a sustancias minerales, sino también al ciudadano común que puede tomar contacto con partículas minerales peligrosas (talco, por ejemplo) incluso en su propio hogar.

PROCEDIMIENTO ANALITICO

1. Preparación de la muestra.

El primer problema a resolver consiste en la separación del mineral del tejido pulmonar. El cómo lograr esto depende del tratamiento previo que se le ha dado a la muestra y del tipo de partícula en sospecha. Sólo puede aplicarse técnicas que no destruyen al mineral.

La digestión de la materia orgánica puede realizarse con una solución de NaOH al 25% (KING y GILCHRIST, 1945), con formamida anhidra o con enzimas (NENADIC y CRABLE, 1970) y con H_2O_2 al 30% (TALVI-TIE y BREWER, 1962). La digestión con una solución de NaOH es adecuada para la determinación de materia inorgánica total, sílice y carbón, pero no puede aplicarse para la determinación de crisotilo. La digestión con formamida o enzimas es difícil de aplicar si la muestra ha sido preservada previamente en formalina. La digestión con H_2O_2 puede aplicarse en este último caso, pero es inadecuada para la determinación de carbón (CRABLE et al., 1967).

Si la muestra a analizar ha sido preservada en formalina, el procedimiento a seguir puede sintetizarse como sigue: la muestra se lava, se seca a temperaturas inferiores a 110°C, y luego se somete a molienda en su mortero de ágata. Dada la naturaleza fibrosa del pulmón, la molienda se facilita si la muestra es enfriada a la temperatura del nitrógeno líquido. Después de la molienda, la muestra se somete a 110°C hasta que el peso sea constante. Luego de pesada se procede a extraerle la materia grasa en un microextractor Soxhlet usando como diluyente una mezcla azeotrópica de alcohol metílico (100 ml) y cloroformo (370 ml) (TALVITIE y BREWER, 1962). Una vez extraída la materia grasa, el residuo es sometido a 110°C hasta peso constante y entonces se efectúa la digestión del resto de la materia orgánica usando H₂O₂ al 30%.

Existe en la actualidad un equipo que permite la combustión fría de la materia orgánica sin causar ni alteración de la estructura cristalina de las sustancias ni volatilización de elementos trazas (KEENAN y LYNCH, 1970).

Eliminada la materia orgánica, la determinación de la materia inorgánica se hace por gravimetría. Luego el residuo inorgánico es transferido a un frasco volumétrico adecuado con ayuda de un agente humedizante. La mezcla se dispersa en un baño ultrasónico y en seguida se pasa a través de microfiltro.

2. Análisis Cualitativo

Su propósito es identificar los compuestos cristalinos presentes en la muestra. Esta etapa puede realizarse con una cámara de Debye-Scherrer o con un difractómetro de rayos-X. Minerales químicamente simples, como el cuarzo, son fáciles de identificar (NENADIC y CRABLE, 1971). Pero los patrones de difracción de rayos-X se complican cuando se trata de silicatos complejos tales como talco y asbestos. A veces estos últimos minerales presentan un bajo grado de cristalización lo que origina patrones de difracción con peaks anchos y poco intensos. Otras veces están contaminados con minerales de poca importancia que causan interferencias sea introduciendo nuevos peaks o aumentando la intensidad de los peaks de importancia. También los silicatos más complejos pueden exhibir un rango de sustitución isomorfa que produce cambios en algunos espacios interplanares, cambiando así la posición de algunos peaks. Tanto la composición, como los grados de impureza y cristalinidad de un mineral dado pueden variar significativamente de una localidad a otra, siendo éste un factor que también puede complicar la identificación.

La similitud composicional presentada por muchos silicatos aumenta la probabilidad de error en su identificación (NENADIC y CRABLE, 1971). Por ejemplo, la tremolita, la actinolita y la ferroactinolita producen patrones de difracción muy similares. Dos o más de estos minerales integrados en una muestra pueden impedir la separación e identificación de los componentes de la mezcla especialmente si la muestra no puede ser alterada o tratada por algún otro método (NENADIC y CRABLE, 1971).

3. Análisis Cuantitativo

Existen, básicamente dos técnicas cuantitativas de difracción de rayos-X: el método de Comparación Directa y el método del Standard Interno.

En el método de Comparación Directa, la intensidad de uno de los elementos de la muestra se mide y compara con una curva standard que se ha obtenido por análisis de diferentes cantidades del componente puro. Por ejemplo, si la muestra contiene talco, se usa como standard externo talco puro. Idealmente éste debe obtenerse de la misma fuente que el talco presente en la muestra. Se elabora entonces, una curva standard graficando la altura del peak versus la cantidad de talco standard. Esta relación es lineal.

Las interferencias pueden deberse; a) a una superimposición de un peak primario de un mineral de interés. (en este caso puede usarse un peak secundario) y b) a la presencia en la muestra de la estructura masiva del mineral que se analiza (CRABLE, 1966). Por ejemplo, la grunerita (anfíbola masiva) interfiere con los peaks primarios y secundarios de la amosita (anfíbola fibrosa). Cuando ocurre este tipo de interferencia es necesario aplicar un factor de corrección que es igual a la razón entre la cantidad de material fibroso y la suma de las partículas fibrosas y masivas. Este factor puede estimarse haciendo uso del microscopio.

El método comparativo es simple en cuanto a la preparación de la muestra se refiere, pero puede requerir de una mayor manipulación de los datos a fin de lograr la exactitud necesaria.

El método del "Standard Interno" puede usarse para compensar posibles inestabilidades del instrumento de rayos-X. Uno de los aspectos más importantes que debe tenerse en cuenta para el éxito de este método es la adecuada selección del standard interno. Según

NENADIC y CRABLE (1971) los requisitos que debe reunir un standard interno son:

- a) debe poseer un peak de difracción intenso en las cercanías del peak de difracción más intenso del mineral a analizar;
- b) debe poseer un peso específico similar al de la matriz de la muestra;
- c) las partículas del standard deben poseer un tamaño similar al de las partículas de la matriz de la muestra;
- d) no debe reaccionar con la matriz;
- e) su coeficiente de absorción debe ser similar al de la matriz;
- f) debe ser similar a la matriz en dureza y fragilidad;
- g) debe encontrarse en forma pura;
- h) las partículas del standard deben tener el mismo grado de orientación que las de la matriz y
- i) la sustancia que se usa como standard debe estar ausente de la matriz.

En el método del Standard Interno se preparan en primer lugar una serie de mezclas, en proporciones bien conocidas, del standard interno y el mineral de interés a fin de obtener una curva de calibración. En ésta se grafica la razón (Intensidad del peak primario del standard/ intensidad del peak primario del mineral) versus la proporción en que fueron mezclados standard y mineral. Luego, se pesan en forma exacta una cantidad de muestra y una cantidad de standard y se mezcla en una proporción bien definida. Esta mezcla se determina la razón (Intensidad del peak primario del standard/ Intensidad del peak primario del mineral de interés). Esta razón en conjunción con la curva de calibración se usa para obtener la razón (peso del mineral en la muestra/peso del standard interno). Esta última razón al ser multiplicada por el cociente (peso del standard interno/ peso de la muestra) da la fracción de mineral en la muestra.

En caso que el peak primario del standard esté interferido, puede usarse un peak secundario. Como el uso de un peak secundario resta exactitud al análisis, CRABLE y KNOTT (1966) sugieren llevar a cabo, cuando es posible, la siguiente corrección: en una muestra sin standard interno se determina la razón (R_1) entre la intensidad del peak de interferencia (I_1) y la intensidad del peak primario del mineral es estudio (I_2), es decir, $R_1 = I_1 / I_2$. Luego, en una muestra con standard interno se determina la razón (R_2) entre la intensidad del peak "pri-

mario" del standard (I_3) y la intensidad del peak primario del mineral en estudio (I_2), es decir, $R_2 = I_3 / I_2$. La diferencia $R_2 - R_1$ da la razón correcta (Intensidad del peak primario del standard/Intensidad del peak primario del mineral).

4. Determinación del Carbono

La digestión del tejido pulmonar con una solución de H_2O_2 al 30% no es adecuada para la determinación del carbono. En este caso es preferible digerir la muestra siguiendo el método de KING y GILCHRIST (1945) que consiste en destruir la materia orgánica con una solución de NaOH al 25%. Luego se enfría el sistema y se lava sucesivamente con alcohol etílico al 95%, con una solución alcohólica de KOH caliente y con una solución alcohólica de HCl. (CRABLE *et al.*, 1967). El residuo representa la materia inorgánica total. Esta se seca hasta peso constante y se somete a ignición a $380^\circ C$. La pérdida por ignición representa la cantidad de carbono presente en la muestra.

5.- Otros Instrumentos y Métodos Analíticos

- a) El Microscopio de luz transmitida puede usarse para la detección y a veces identificación de fibras que posean un diámetro superior a 1μ .
- b) El Microscopio electrónico se usa para detectar y, a veces, identificar partículas más pequeñas que 1μ .
- c) La microsonda electrónica puede emplearse para la determinación puntual de elementos. Este método ayuda en la diferenciación de asbes verdaderos y de pseudo-asbestos (KEENAN y LYNCH, 1970).
- d) La adsorción atómica, la actividad neutrónica y la fluorescencia de rayos-X son métodos que también puede utilizarse en la determinación de los constituyentes elementales de las partículas minerales presentes en los pulmones.
- e) El Magnetómetro permite la detección de asbestos en los pulmones, estómago y otros órganos, gracias a las propiedades paramagnéticas que exhiben estos minerales. Introduciendo trazas de material magnético (por ejemplo magnetita) en los pulmones, el magnetómetro permite determinar la velocidad con que este órgano es capaz de eliminar ciertas partículas extrañas (COHEN, 1973).

6. Progreso Actual y Planes Futuros

En la actualidad estamos trabajando experimentalmente en el primer objetivo de este proyecto cual es la identificación y cuantifi-

cación de especies minerales en biopsias de tejido pulmonar. Hemos sido capaces de separar e identificar minerales tales como asbestos y talco no sólo en pulmones de mineros y obreros industriales, sino también en una biopsia pulmonar de una paciente afectada por insuficiencia respiratoria y ajena a toda labor de tipo minero o industrial.

En todos los casos estudiados, la digestión de la materia inorgánica se llevó a cabo con H_2O_2 siguiendo el procedimiento propuesto por TALVITIE y BREWER (1962). El residuo inorgánico fue sometido a molienda en un mortero de ágata hasta que las partículas alcanzaron un tamaño del orden de unos 3.5μ . Luego, las partículas fueron transferidas a un tubo capilar para irradiarlas con rayos-X en una cámara Debye Scherrer. Los mejores resultados se obtuvieron con un tiempo de irradiación de ocho horas usando la línea $K\alpha$ del cobalto y un filtro de hierro. Los patrones de difracción fueron comparados con patrones de difracción obtenidos previamente usando minerales puros. En el caso de la paciente con insuficiencia respiratoria, el análisis de la biopsia pulmonar sugirió la presencia de Talco en los pulmones. Al ser consultada, la paciente reveló que había usado talco durante toda su vida y durante los últimos años lo usaba dos y hasta tres veces al día. Los patrones de difracción del talco cosmético usado por la paciente coincidieron con los patrones de difracción arrojados por las partículas separadas de la biopsia pulmonar. Esto fue considerado como evidencia de que el talco era el causante de la insuficiencia respiratoria que afectaba a la paciente.

A fin de lograr el segundo objetivo de este proyecto (correlación entre la anomalía pulmonar y el tipo y cantidad de partículas presentes en los pulmones) se está estableciendo contactos con diversos centros hospitalarios a fin de obtener la cantidad necesaria de muestras. Teniendo en cuenta que los pulmones son incapaces de eliminar totalmente las partículas minerales, el logro del segundo objetivo es importante, como se mencionó anteriormente, para establecer las dosis tolerables por el organismo.

CONCLUSIONES

Investigar si existe o no una correlación positiva entre la cantidad de una determinada partícula mineral y procesos patológicos pulmonares es una tarea posible de realizar. La difracción de rayos-X permite la identificación y cuantificación de uno o más tipos de partículas minerales presentes en los pulmones. La cantidad de muestra requerida para tal determinación puede ser tan pequeña como 1 gramo de

tejido pulmonar seco. Determinaciones cualitativas pueden llevarse a cabo usando aún una cantidad menor de muestra. Una completa correlación requiere el análisis de diferentes áreas pulmonares y muestras que soporten estadísticamente las conclusiones a las cuales puede llegarse. Además es absolutamente necesario obtener la historia ocupacional completa de las personas cuyos pulmones están siendo analizados. Técnicas tales como la absorción atómica, activación neutrónica y microsonda electrónica permiten estudiar los constituyentes elementales de las partículas presentes en los pulmones.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece en forma especial la colaboración que, en el desarrollo actual del proyecto, está prestando la Profesora Sra. Irma González del Departamento de Geología de la Universidad de Chile. Las muestras de pulmón de mineros y obreros industriales fueron donadas por el Servicio Médico Ambiental del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT). La biopsia de tejido pulmonar fue donada por el Hospital de Brockton (Massachusetts). Los Profesores Sra. Irma González y Sr. A. Constantino Mpodozis de la Universidad de Chile y los Profesores Sres. R. Burns y D. Hume del MIT leyeron críticamente el manuscrito.

REFERENCIAS

- COHEN, D.; (1973). Ferromagnetic contamination in the lungs and other organs of the human body. *Science*, v. 180, p. 745-748.
- CRABLE, J. V., (1966). Quantitative determination of chrysotile, amosite and crocidolite by X-ray diffraction. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Jour.*, v. 27, p. 293-298.
- CRABLE, J. V., and KNOTT, M. A. (1966). Application of X-ray diffraction to the determination of chrysotile in bulk or settled dust samples. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Jour.*, V. 27, p. 383-387.
- CRABLE, J. V.; KEENAN, R. G.; WOLOWICZ, F. R.; KNOTT, M. J.; HOLTZ, J. L., and GORSKI, C. H., (1967). The mineral content of bituminous coal miner's lungs. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Jour.*, v.28, p. 8-12.
- CRABLE, L. J.; KEENAN, R. C.; LYNCH, J. R.; and LAINHART, W. S.; (1968). Source and identification of respirable fibers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Jour.*, v. 29, p. 129-135.

- KEENAN, R. G., and LYNCH, J. R., (1970). Techniques for the detection, identification and analysis of fibers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Jour.*, v. 30, p. 587-597.
- KING, E. J., and GILCHRIST, M., (1945). Chronic pulmonary disease in South Wales coalminers. Experimental studies. The estimation of coal and aluminum in dried lung. *Med. Res. Council. Spec. Rept.*, v. 250, p. 21-30.
- NENADIC, C. M., and CRABLE, J. V., (1970). Enzymatic digestion of human lung tissue. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Jour.*, v. 31, p. 81-86.
- NENADIC, C. M., and CRABLE, J. V., (1971). Application of X-ray diffraction to analytical problems of occupational health. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Jour.*, v. 32, p. 529-538.
- TALVITIE, N. A., and BREWER, L. W., (1962). Separation and analysis of dust in lung tissue. *Am. Ind. Hyg. Assoc. Jour.*, v. 23, p. 58-61.