

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



DETERMINACION DE TRITIO EN PRODUCTOS AISLADOS DE
MAIZ EXPUESTO A UNA CONTAMINACION AGUDA
CON AGUA TRITIADA”

T E S I S
que para obtener el título de:
Q U I M I C O
p r e s e n t a :
HECTOR ARMANDO SILVA JIMENEZ

Ciudad Universitaria, D. F.

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LAB. Tesis 1977

Nº [REDACTED]

FECHA

PRDC

370

8



QUÍMICA

PRESIDENTE: NINFA GUERRERO DE CALLEJAS
VOCAL: GUADALUPE VELEZ PRATT
JURADO: SECRETARIO: CIELITA ARCHUNDIA DE LA ROSA
1er. SUPLENTE: GUILLERMINA BURRILLO DE VELAZQUEZ
2o. SUPLENTE: GUILLERMO RENDON PADILLA

El tema fué desarrollado en el:
DEPARTAMENTO DE RADIATIVIDAD AMBIENTAL
DEL
INSTITUTO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

Sustentante: HECTOR ARMANDO SILVA JIMENEZ
Asesor del Tema: CIELITA ARCHUNDIA DE LA ROSA
Supervisor Técnico: REBECA M. DE NULMAN

A mis padres:

Guadalupe Jiménez de Silva

Vicente Silva Acevedo.

A mis hermanos

A Carolina

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la M. en C. Rebeca M. de Nulman y a la M. en C. Cielita Archundia de la Rosa por sus valiosas orientaciones y facilidades para el desarrollo de este trabajo; al igual que a mis compañeros de laboratorio, maestros, amigos y familiares que directa o indirectamente me ayudaron a la realización de este trabajo.

Asímismo, quiero hacer constar mi agradecimiento al Instituto Nacional de Energía Nuclear, por la beca otorgada para la realización de esta Tesis.

INTRODUCCION	1
CAPITULO I EL TRITIO	
A).- Características radiactivas.....	7
B).- Origen.....	11
CAPITULO II CENTELLEO LIQUIDO.....	
A).- Métodos de detección del Tritio.....	14
B).- El proceso de Centelleo Líquido.....	15
C).- Química de los centelleadores líquidos.....	17
D).- Instrumentación.....	20
E).- Extinción.....	22
CAPITULO III EL MAIZ.....	
A).- Características botánicas.....	24
B).- Utilización del agua.....	29
C).- Estructura y composición química.....	31
CAPITULO IV PARTE EXPERIMENTAL.....	
A).- Siembra y contaminación del maíz.....	37
B).- Consideraciones generales de la separación de los productos del maíz.....	38
C).- Métodos de Análisis.....	39
D).- Métodos de separación de los componentes del maíz.....	44
E).- Determinación del tritio en agua libre.....	48
F).- Determinación del tritio ligado.....	49
G).- Medición del tritio por centelleo líquido...	54

pág.

CAPITULO V	RESULTADOS Y CONCLUSIONES	
A).- Resultados.....		58
B).- Conclusiones.....		60
BIBLIOGRAFIA.....		64

I N T R O D U C C I O N

El tritio es el isótopo radiactivo del hidrógeno que está presente en el medio ambiente terrestre, debido a que se forma de manera natural en la atmósfera por interacción de la radiación cósmica de alta energía con el oxígeno y el nitrógeno. El tritio así formado reacciona rápidamente convirtiéndose en agua tritiada, la cual es arrastrada por la lluvia e incorporada al ciclo del agua en la biósfera.

El tritio de origen natural tiene una velocidad media de producción de 0.2 ± 0.05 átomos de tritio por centímetro cuadrado por segundo en las capas superiores de la atmósfera (1), lo que equivale a una actividad anual de 1.6 MCi, sin embargo, debido a su decaimiento y velocidad de producción, existe una cantidad de tritio constante en la naturaleza, la cual ha sido calculada en 28 MCi (2).

En los últimos años esta cantidad, que había estado en equilibrio en la naturaleza, ha sido alterada debido a que han sido liberadas en la atmósfera grandes cantidades de tritio fabricado por el hombre. Esta acumulación de tritio es consecuencia directa de explosiones termonucleares; descargas de reactores nucleares; desechos radiactivos de la investigación médica, química y biológica (donde el tritio es usado como trazador); distribución comercial de productos tritiados, etc.

Según el informe presentado en 1970 por el Comité Científico de la OEA, el período comprendido entre 1963 y 1970 fueron incorporados a la atmósfera 1 900 MCi procedentes exclusivamente de pruebas termonucleares mayorías de ellas realizadas en el hemisferio norte (3).

Por otra parte la escasez mundial de energéticos ha propiciado el desarrollo acelerado de la industria nuclear para la producción de energía en muchos países del mundo y se espera que en el futuro la producción de energía nuclear será mayor con lo que la cantidad de tritio también irá

La operación de reactores carecería de importancia si no fuese que los reactores por fisión producen isótopos radiactivos como deuterio y algunos pueden ser separados para eliminar la contaminación y dentro de estos últimos se encuentra el tritio, el

cual es producto tanto de la fisión del uranio, como por reacciones de captura de neutrones en las superficies de los materiales que forman el reactor. Este tritio, al igual que el natural, se transforma en agua - tritlada (HTO), la cual constituye casi la totalidad de la radiactividad contenida en aguas de desecho de dichos reactores y un buen porcentaje de la contenida en desechos gaseosos. En una planta nuclear típica para la producción de energía eléctrica, el agua tritlada constituye casi el 40% de la actividad arrojada al medio ambiente (4). Esto representa todo un problema, puesto que para separarla no pueden ser empleados los métodos convencionales, por lo que no se puede evitar que esta actividad pase a incorporarse a la biósfera.

En los reactores enfriados por agua, el porcentaje de tritio arrojado al ambiente por Kwatt de energía eléctrica producida es mayor y este porcentaje aumenta si se emplea hidróxido de litio para evitar la corrosión. Los reactores que emplean uranio natural como combustible, producen en sus desechos grandes cantidades de tritio, puesto que es necesario el empleo de agua pesada, la cual incrementa la producción de este isótopo.

La cantidad de tritio acumulada por descargas de reactores de potencia en el año de 1970, según el informe del Comité Científico de la ONU (5), fue de 0.97 MCi y conservadoramente se espera que para el año 2000 esta cantidad se eleve a 550 MCi.

Por otra parte, desde el punto de vista de la radiación externa, el tritio es considerado un isótopo de baja toxicidad, puesto que es un emisor beta puro de baja energía, con una E_{max} de sólo 18.6 KeV, esto, aunado al hecho de su difícil detección y medición, hizo que los estudios encaminados a conocer su contribución a la radiación ambiental, así como su transporte e incorporación a la biósfera carecieran en un principio de interés .

Sin embargo, el tritio está presente en los lugares más apartados, ya que tanto el de origen natural como el fabricado por el hombre, se transforma de manera inmediata en HTO, la cual se suma a las aguas superficiales, de donde ya no es posible separarla puesto que pasa a formar parte del ciclo del agua y por consiguiente se esparce por toda la biósfera. La importancia de esto estriba en que el tritio puede ser

incorporado a los seres vivos mediante los procesos metabólicos que se realizan tanto en animales como en vegetales y de una u otra forma, lo gra pasar a formar parte del hombre, en donde una vez incorporado actuará como una fuente de radiación interna. Estas circunstancias han hecho que el tritio se convierta en un radioisótopo de interés mundial por lo que se ha prestado mayor atención a su estudio; que aunque actualmente no representa un problema serio para el equilibrio ecológico, sí podría serlo en el futuro.

La importancia del estudio de la fijación del tritio en los seres vivos es de especial interés para el hombre, especialmente en aquéllos que son base de su cadena alimentaria, no sólo por ser el tritio un radioisótopo que contribuye de manera considerable a la radiación interna a la que está expuesto el hombre, sino también porque hasta el momento se desconoce, tanto la forma en que este radioisótopo es metabolizado, como en qué fracciones, estructuras o compuestos su incorporación es mayor. Este desconocimiento impide la predicción aproximada del daño que esta radiación puede causar, así como el establecimiento de niveles permisibles que pueda aceptar el organismo cuando la radiación debida al tritio aumente en forma considerable.

Este problema puede ser más grave si consideramos que el 99% del peso de los seres vivos está constituido únicamente por cuatro elementos fundamentales: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, siendo el hidrógeno el que contribuye con el mayor número de átomos. Tan sólo en el ser humano tiene una abundancia relativa del 60% en peso comparado con el 25.5% del oxígeno, el 10.5% del carbono, el 2.4% del nitrógeno y el 0.7% del sodio (6).

Otra consideración importante es que, del hidrógeno total presente en los seres vivos, una parte se encuentra como constituyente en todos los compuestos orgánicos y la mayor parte unido al agua; la cual juega un papel de vital importancia tanto en la formación de estructuras como en la determinación de propiedades químicas y biológicas de muy variados compuestos celulares como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, membranas, etc.

Aún dentro de la complejidad química que representa un ser vivo, podemos establecer que todas las biomoléculas y estructuras biológicas que lo forman, por muy complejas que éstas sean, en última instancia derivan por uno u otro camino, de tres precursores químicos sencillos: CO_2 , N_2 y H_2O , los cuales se convierten en materia viviente a través de los procesos metabólicos; donde el agua entra tanto por el proceso fotosintético como por absorción directa, de esta forma el tritio, como HTO , puede incorporarse al metabolismo y pasar a formar parte de cualquier biomolécula. Teniendo en cuenta los hechos expuestos anteriormente el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), ha puesto gran interés en el estudio de la conducta del tritio en la naturaleza, tanto en sus mecanismos de transporte como en su incorporación a los seres vivos, especialmente en aquellos que forman parte importante de la cadena alimentaria humana; por ello ha patrocinado un amplio programa de investigación tendiente a conocer el transporte e incorporación del tritio a ecosistemas particulares. El programa se realiza a nivel internacional en el que participan los siguientes países E.U.A., Francia, Holanda, Bélgica, República Federal Alemana, Finlandia, India, Filipinas, Tailandia y México.

A México, a través del Comité de Seguridad Radiológica del Instituto Nacional de Energía Nuclear (INEN), en su Departamento de Radiactividad Ambiental, le ha sido encomendado el estudio de un ecosistema agrícola constituido por plantíos de maíz y frijol.

Existen muchas razones que acentúan la importancia del estudio del tritio en el maíz, entre las cuales destaca el hecho de que el maíz representa la fuente principal de energía de una gran parte de la población mundial. El maíz no sólo es utilizado en forma directa en la dieta sino que existe una gran variedad de productos industrializados tales como: almidones, harinas, maicenas, mieles, aceites, grasas, etc., cuya base es el maíz, las cuales a su vez son empleadas para la fabricación y preparación de multitud de productos alimenticios. Por otra parte, tanto el grano como la planta misma, son empleados como forraje para alimentar animales domésticos muchos de los cuales también contribuyen a enriquecer la dieta humana.

Si el problema se considera desde el punto de vista de la contaminación, hay un hecho que aumenta la importancia de la incorporación del tritio en el maíz, debido a que un gran porcentaje de las tierras cultivables en México son sembradas con este cereal.

El proyecto para estudiar la fijación del tritio al ecosistema, consistió básicamente en producir una contaminación aguda en un plantío de maíz en estadíos tempranos del desarrollo de la planta, para lo cual se sembró y cultivó en un terreno experimental el maíz híbrido H-309, bajo las condiciones acostumbradas en México, en un terreno experimental del INEN, dividido en cuatro parcelas. La contaminación fue realizada por aspersión de 1 Ci nominal de HTO diez días después de la germinación.

La primera parte del proyecto se propone evaluar la cantidad de tritio incorporada en la planta en las distintas etapas de su desarrollo, así como la cantidad de tritio remanente en el suelo y aire.

El trabajo que se presenta en esta tesis se incorporó a la segunda parte del proyecto que consistió en determinar la cantidad de tritio incorporada al grano de maíz, tanto en sus estructuras como en sus principales compuestos.

El tritio, por su condición de isótopo del hidrógeno, será utilizado por la planta de forma similar al hidrógeno, encontrándose unido al agua libre que se localiza en los líquidos intersticiales y protoplasma celular así como formando parte de diferentes moléculas (tritio ligado) en las cuales es incorporado en las diferentes reacciones bioquímicas que efectúa la planta y por el proceso fotosintético. Si consideramos que la relación de masas entre el tritio y el hidrógeno es de 3 a 1, podemos suponer que el tritio no será utilizado por la planta de maíz en forma idéntica al hidrógeno puesto que esta diferencia no sólo de masas sino también de volumen, influirá directamente en su reactividad.

El conocimiento de la incorporación del tritio a los distintos compuestos del maíz es básica dado que este cereal es utilizado directamente en la dieta humana y el metabolismo de las diferentes substancias alimenticias en el hombre es distinto ya se trate de lípidos, carbohidratos o proteínas, y por tanto, el comportamiento del tritio en cada una de

estas fracciones será diferente, es decir, será incorporado o eliminado por el organismo humano con mayor o menor facilidad.

Por las razones expuestas en párrafos anteriores, la determinación del tritio fue realizada en los compuestos siguientes: agua libre, almidón, proteínas, grasas y fibra, igualmente se determinó en las tres estructuras más importantes del maíz: endospermo, embrión y cascarilla.

El tritio se determinó como HTO por el método de centelleo líquido. El agua libre se obtuvo directamente de la muestra por destilación azeotrópica con benceno, en tanto que el tritio ligado a compuestos orgánicos fue transformado a HTO mediante la oxidación de las muestras en atmósfera de oxígeno.

CAPITULO I
EL TRITIO

A).- Características radiactivas.

Existen tres isótopos del hidrógeno: el hidrógeno normal o protio (${}^1_1\text{H}$), el deuterio o hidrógeno pesado (D ó ${}^2_1\text{H}$) y el tritio (T ó ${}^3_1\text{H}$).

El tritio fue descubierto en 1934 por Lord Rutherford al bombardear con deuterones agua pesada en el acelerador de Cambridge, encontrando que en el producto de la reacción se habían formado dos nuevos isótopos, uno de ellos con una masa atómica tres veces mayor que la del hidrógeno al cual denominó tritio y otro con una unidad de masa atómica menor que la del helio normal (${}^3_2\text{He}$), también descubrió que la muestra bombardeada era radiactiva pero atribuyó esta radiactividad al ${}^3_2\text{He}$. Sin embargo, un análisis posterior realizado por Libby demostró que la radiactividad presente en la muestra de Rutherford era ocasionada por el tritio (7,8).

Estudios posteriores de este radioisótopo han demostrado que se desintegra exclusivamente por emisión de partículas beta negativa (electrones) con energía bastante baja si es comparada con otras emisiones beta producidas por otros radioisótopos (9).

La reacción de desintegración puede esquematizarse de la forma siguiente:



en donde podemos observar que el núcleo de tritio original aumenta su número atómico en una unidad por expulsión de una partícula beta, pero su número de masa permanece constante en tanto que el número de neutrones también disminuye en una unidad, transformándose de esta forma en un núcleo de helio con número de masa tres.

La actividad A del tritio, (definida como desintegraciones por segundo), sigue como cualquier otro núcleo radiactivo la ley del decaimiento exponencial, que puede ser deducida de la siguiente manera:

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N = A \quad (1)$$

en donde el signo negativo indica el decaimiento, o sea, que el número

de núcleos originales disminuye con el tiempo. N representa el número de núcleos en el tiempo t y λ establece la probabilidad de que un núcleo se desintegre, comúnmente es llamada constante de decaimiento. La ecuación diferencial (1) tiene como solución:

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad (2)$$

donde N_0 es el número de núcleos originales en el tiempo $t = 0$.

Una medida muy útil del tiempo con respecto a la actividad para un radionúclido dado es la "vida media" $T_{1/2}$, estando definida como: el tiempo requerido para que el número de núcleos disminuya a la mitad, de otra forma, el tiempo requerido para que la actividad disminuya a la mitad.

Teniendo en cuenta la consideración anterior, podemos substituir en la ecuación (2).

$$N = N_0/2 \quad y \quad t = T_{1/2} \quad \text{obteniendo:}$$

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} = \frac{0.693}{T_{1/2}} \quad (3)$$

de esta forma podemos reescribir la ecuación (2) como:

$$N = N_0 e^{-\frac{(\ln 2) t}{T_{1/2}}} \quad (4)$$

La ecuación (2) también la podemos escribir en términos de actividades como:

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad (5)$$

La vida media del tritio ha sido determinada experimentalmente por varios métodos; en las referencias bibliográficas se registran valores que van desde 31 años para el primer valor reportado (10), hasta 12.3 años (11) aunque algunos autores consideran que éste es de 12.35 años (12). Actualmente se propugna por establecer una convención acerca del valor que debe ser empleado (13).

Aceptando la vida media del tritio como de 12.35 años podemos emplear la ecuación (3) para calcular la constante de decaimiento del tritio.

$$\lambda_{\text{tritio}} = 1.53 \times 10^{-4} \text{ días}^{-1}$$

Las partículas beta tienen las siguientes características, su masa es de $1/1840$ una (9.1×10^{-28} g), su carga tiene un valor de 1.6×10^{-19} cb y puede ser positiva o negativa; son partículas que se mueven a una gran velocidad (entre 0.93 y 0.99 c) y por tanto son portadoras de una gran energía cinética, la cual fluctúa entre 0.017 y 4 MeV. Las partículas beta emitidas por un elemento radiactivo no son monoenergéticas como las de radiación alfa o gama, sino que presentan un espectro continuo de energías desde cero hasta un valor máximo, E_{max} , característico del emisor. (Fig. 1).

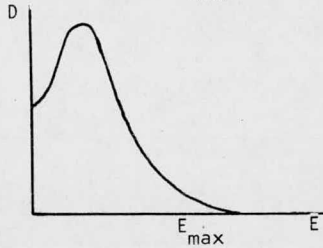


Fig. 1. espectro característico de un emisor beta.

La energía máxima, E_{max} , en el espectro corresponde a la diferencia entre los niveles energéticos entre el padre y el hijo, esto es, para el caso del tritio la diferencia entre el nivel de energía del tritio y el nivel energético del ${}^3_2\text{He}$. Sin embargo, y para poder explicar la continuidad del espectro, las partículas beta sólo poseen una parte de la energía total disponible en la desintegración, la diferencia la posee un neutrino.

El valor de la E_{max} de las betas del tritio se ha determinado teóricamente y experimentalmente y es de 18.6 KeV, valor bastante bajo si lo comparamos con las betas de otros radionúclidos emisores beta puros, los cuales llegan a tener valores hasta de 4 MeV (14).

Al interactuar la radiación beta con la materia se producen fundamentalmente tres fenómenos: a) ionización y excitación, b) dispersión y c) Bremsstrahlung. El fenómeno de ionización y excitación es quizá el más importante pues en él se basa la detección y medición de la radiación.

Las partículas beta pueden ionizar los átomos del material que atraviesan, pero debido a su gran velocidad tienen menor probabilidad de interacción que las partículas alfa, consecuentemente su alcance es mayor, dependiendo de su energía, recorriendo trayectorias tortuosas, puesto que son desviadas fácilmente por su pequeña masa. Estas partículas también pierden energía excitando a moléculas o átomos cercanos a su trayectoria, elevándolos a niveles de energía superiores sin producir ionización. En estos fenómenos se basa la determinación del tritio por centelleo líquido, los cuales serán explicados en el capítulo siguiente.

Por otra parte, debido a la baja energía de la emisión beta del tritio, la radiación es muy poco penetrante en la materia. Tiene un alcance máximo de sólo 6 mm en aire y su coeficiente de absorción másico es de 6 micras (en un material de densidad unitaria y uniforme como el agua) (15). Esto implica que las medidas de seguridad radiológicas que deben tenerse en el laboratorio durante el desarrollo del presente trabajo, no ameritan el uso de blindajes (para este radionúclido) y las precauciones son en el sentido de evitar tanto la contaminación del laboratorio como la contaminación por radiación interna.

La actividad de una muestra radiactiva está definida como el número de desintegraciones por unidad de tiempo. La unidad más usada es el Curie (Ci), la cual se definió en principio como la cantidad de radiactividad debida al $^{222}_{86}\text{Rn}$ que está en equilibrio con un gramo de $^{226}_{88}\text{Ra}$ (16).

El valor del curie en desintegraciones, puede ser calculado si se conoce la vida media del $^{226}_{88}\text{Ra}$ que es de 1620 años. Por tanto, substituyendo la ecuación (3) en la ecuación (1) y haciendo $N=N_a/226$, donde N es el número de núcleos en un gramo de $^{226}_{88}\text{Ra}$ y N_a el número de Avogadro, obtenemos:

$$A = \lambda N$$

$$A = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} \times \frac{N_a}{226}$$

Por tanto:

$$1\text{Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ dps}$$

donde dps representa desintegraciones por segundo.

Los múltiplos y submúltiplos de esta unidad son:

Kilocurie	KCi = 10^3 Ci
Megacurie	MCi = 10^6 Ci
milicurie	mCi = 10^{-3} Ci
microcurie	μ Ci = 10^{-6} Ci
nanocurie	nCi = 10^{-9} Ci
picocurie	pCi = 10^{-12} Ci

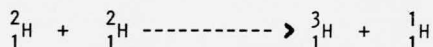
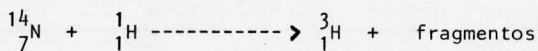
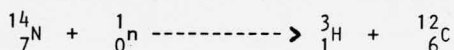
B).- Origen.

El tritio está presente en la naturaleza tanto por procesos naturales como artificiales.

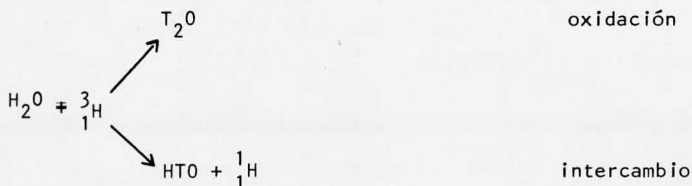
El tritio de origen natural fue detectado por primera vez en el hidrógeno atmosférico, por Filtings y Harteck (17), posteriormente Libby demostró su existencia en agua de lluvia (18).

Antes de las pruebas termonucleares, en 1954 se calculó que la cantidad de tritio presente en la tierra era de 900 g, lo que equivale en términos de radiactividad a aproximadamente 9 MCi (19).

El tritio natural es el resultado de reacciones nucleares inducidas por rayos cósmicos de alta energía al colisionar neutrones rápidos, protones y deuterones con moléculas de nitrógeno, oxígeno e hidrógeno y formar átomos de tritio altamente energéticos (tritones) en las capas superiores de la atmósfera. Ejemplos de estas posibles reacciones son:



Los tritones producidos en estas reacciones pueden, (es muy posible que así ocurra) interaccionar a su vez con las moléculas de agua presentes en el medio, por dos procesos: oxidación o intercambio, para producir agua tritiada y óxido de tritio (20).



La producción natural del tritio en la atmósfera ha sido medida en forma directa e indirecta; por este último método se ha obtenido un valor de 0.12 átomos de tritio/cm²seg. Una medición efectuada recientemente de manera directa calcula la velocidad media de producción en 0.2 ± 0.05 átomos de tritio/cm²seg (21). Siendo este último el valor más aceptado, se ha calculado, basándose en él, que la producción anual de tritio es de 1.6 MCi, correspondiendo a un inventario en la atmósfera de 28 MCi (2,22).

En muestras de agua de lluvia obtenidas antes de marzo de 1954, fecha en que se marca el inicio de las pruebas termonucleares y de la liberación de grandes cantidades de tritio al medio ambiente, los niveles de tritio en aguas superficiales variaron de 6 a 24 pCi/litro de agua (23).

Por otra parte, aproximadamente el 90% del tritio ambiental reside en la hidrósfera, un 10% en la estratósfera y escasamente un 0.1% se encuentra en la tropósfera (24); como puede observarse el contenido de tritio en la tropósfera y estratósfera es bajo, esto se debe fundamentalmente a que el tritio formado en estas regiones se convierte rápidamente en HTO, la cual es arrastrada a las capas inferiores de la atmósfera y finalmente acarreada por el agua de lluvia. Los primeros trabajos tendientes a conocer el tiempo de residencia media del agua tritiada en las capas superiores de la atmósfera, revelaron que éste podría ser de 20 a 40 días (25), pero estudios más recientes han demostrado que este tiempo es de escasamente 10 días (26).

Es importante conocer la dosis a la que está expuesto el ser humano por radiación debida exclusivamente al tritio. En un esfuerzo por solucionar éste problema la dosis promedio de exposición ha sido calculada bajo la hipótesis de que la relación hidrógeno-tritio presente en el cuerpo humano, es la misma que en las aguas superficiales; de ésta

forma la dosis promedio que un ser humano recibe por radiación interna debida exclusivamente al tritio natural puede encontrarse entre los límites de 0.6 y 2.5 rad/año (27).

En lo tocante al tritio producido artificialmente, éste ha aumentado considerablemente en los últimos años, debido a que se produce en explosiones termonucleares, en reacciones controladas en reactores y en desechos de la investigación científica.

Erikson (2) ha estimado que se han arrojado a la atmósfera 1 900 MCi por pruebas termonucleares a partir de 1963.

C A P I T U L O I I

C E N T E L L E O L I Q U I D O .

A).- Métodos de detección del Tritio.

Para la detección de la radiación beta, se puede hacer uso de de tectores gaseosos (cámara de ionización, detectores proporcionales y Geiger-Muller) de paredes suficientemente delgadas para permitir el paso de la radiación al volumen sensible del detector, o bien detecto res internos donde el radioisótopo a detectar se encuentra dentro del volumen sensible.

Para los detectores con ventana, la eficiencia de la detección, que es función de la energía de las partículas beta y del espesor má- sico de la ventana, puede llegar a ser cero si las betas son poco ener- géticas o la ventana muy gruesa.

En el caso de los detectores internos (sin ventana) esta eficien- cia puede aumentarse hasta cerca del 100% en cámaras con geometría 4π .

Los cristales de centelleo comunes, en general, no pueden emplear- se para detectar betas, porque su envoltura metálica absorbe gran par- te de la radiación, sin embargo, existen centelladores especialmente diseñados para betas como es el caso de los cristales de antraceno y los centelladores plásticos.

En la detección por centelleo líquido el radionúclido emisor se incorpora a una mezcla de uno o varios compuestos disueltos en el sol- vente apropiado. Esto permite el íntimo contacto entre el radionúclido y el centellador, aumentando la eficiencia puramente geométrica al 100% (28).

Para la detección de las betas del tritio se han desarrollado técnicas específicas dependiendo del estado físico de la muestra y si ésta es discreta o es un flujo.

Para muestras discretas, la detección por centelleo líquido es la técnica más usual. Una gran variedad de soluciones y suspensiones tritiadas pueden ser determinadas directamente o después de un trata- miento previo como en el caso de éste trabajo.

El detector proporcional gaseoso con muestra interna también puede ser usado para determinar tritio, con la ventaja de tener una alta eficiencia, un bajo fondo y buenas características de medición. Es también utilizado eficientemente en laboratorios de bajo nivel de actividad, pero existe el problema de que la muestra tiene que estar en estado gaseoso, para lo cual puede ser oxidada y el agua resultante ser reducida mediante Zn o Mg para producir hidrógeno ---- (T_2 o HT), que al reaccionar con acetileno o etileno produce etano que es un buen gas de conteo (29).

Si la determinación no requiere de una gran precisión se pueden usar detectores gaseosos de ventana delgada (30).

Para determinar tritio en flujos líquidos y gaseosos existen varias técnicas ya publicadas (31,32), entre las cuales se destacan el empleo de centelladores líquidos, centelladores plásticos, cristales de antraceno, cámaras de ionización y contadores proporcionales de flujo.

Sin duda el método más sensible para determinar tritio es el de espectrometría de masas basado en la separación del ^3_2He , que es el producto de la desintegración del tritio (33), sin embargo por este método la determinación es muy tardada.

La cromatografía de gases también ha sido empleada con buenos resultados y esta basada en una separación isotópica (34).

La selección del método más conveniente para una determinación dependerá de la sensibilidad y precisión requerida en la misma, del tiempo que toma la medición, del grado de especificidad para tritio, de la forma física o química de la muestra, de la disponibilidad del equipo, del número de muestras, etc.

De lo expuesto anteriormente puede deducirse que un método apropiado para la determinación del tritio en este trabajo es el de centelleo líquido puesto que cumple con los requerimientos como son: bajos niveles de actividad específica y el bajo fondo requerido .

B).- El Proceso de Centelleo Líquido.

El proceso básico del centelleo líquido es hasta el momento poco

conocido, puesto que en él tienen lugar fenómenos de gran complejidad que son bastante difíciles de explicar.

Un centellador líquido es una solución orgánica que interacciona con un cuanto de radiación ionizante para dar un espectro de fotones cuya energía integrada depende de su composición y cuya forma es característica del soluto (35).

El centellador líquido es normalmente usado en combinación óptica con un tubo fotomultiplicador que se encarga de convertir el espectro de fotones producido por la partícula ionizante en la solución centelladora, en un pulso eléctrico que puede ser interpretado.

El proceso de centelleo, desde la salida de la radiación ionizante hasta la formación de un fotoelectrón en el fotocátodo del tubo fotomultiplicador, es una combinación de etapas de gran complejidad. Hipotéticamente el proceso podría ocurrir de la siguiente forma: la radiación nuclear puede ionizar una molécula del solvente para dar como resultado un catión y un electrón libre, las moléculas del soluto que pueden sufrir este proceso son despreciables debido a su baja concentración, en este estado excitado ocurren rápidos cambios y recombinaciones de las moléculas del solvente; posteriormente tiene lugar una secuencia de transferencias de energía, con lo cual el último soluto emisor (generalmente el soluto secundario) emite un espectro característico de fotones que es registrado por el fotocátodo (36).

Entre las condiciones que requiere este tipo de detección pueden mencionarse las siguientes: cada molécula excitada por la emisión radiactiva debe emitir sólo un fotón; el número de fotones emitidos tiene que ser proporcional al número de moléculas excitadas; el pulso de voltaje obtenido del tubo fotomultiplicador deberá ser proporcional al número de fotones capturados; los fotones emitidos por el centellador, especialmente por los solutos, deberán tener la longitud de onda adecuada (generalmente en el ultravioleta) para ser detectados por el fotocátodo: el pulso de voltaje o cuenta sólo se presentará si es ocasionado en último término por un radionúclido suficientemente energético para producir un número de fotones detectables (37).

En el aspecto de aplicación práctica directa, los problemas más frecuentes encontrados en las mediciones por centelleo líquido son referentes a la incorporación de la muestra al centellador, de modo que la solución siga siendo homogénea, ya que de no serlo así, la eficiencia de la detección disminuirá considerablemente.

C).- Química de los centelladores líquidos.

Un centellador líquido está formado por uno o más solutos disueltos en uno o más solventes. La energía de las partículas ionizantes es absorbida en primer término por el solvente, algo de esta energía es transferida a los solutos de donde un alto porcentaje es emitida como luz que puede escapar del líquido y ser detectada.

Los solventes más apropiados son el benceno y sus homólogos, el tolueno y p-xileno. El tolueno es el solvente de uso más frecuente puesto que tiene un bajo costo y un punto de congelación, (-95°C) menor que la temperatura de refrigeración usada en algunos equipos de detección, sin embargo, en sistemas modernos se ha demostrado que la refrigeración es innecesaria (38). Por tanto, el uso del p-xileno (punto de congelación de 12°C) también se ha extendido.

La gran desventaja de los solventes aromáticos es su incompatibilidad con el agua. Debido a que el agua y las muestras acuosas representan una gran proporción de las muestras tritadas, se han desarrollado esfuerzos para encontrar mezclas que sean capaces tanto de incorporar muestras acuosas como de transmitir eficientemente la energía absorbida. El solvente no aromático que ha resultado más conveniente es el dioxano, el cual fue introducido por Kallman (39); pero el dioxano por si mismo es incapaz de transferir la energía absorbida al soluto de manera eficiente, no obstante se pueden obtener eficiencias comparadas con las obtenidas con solventes aromáticos añadiendo naftaleno como solvente secundario en concentraciones relativamente altas. La mejor formulación, de entre las determinadas experimentalmente, incorpora alrededor de 20% en volumen de naftaleno sin afectar en gran medida el espectro obtenido (40). La desventaja del sistema dioxano naftaleno es la degradación de luz cuando están presentes

compuestos inorgánicos, el efecto de fosforescencia y su alto costo (41).

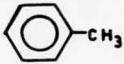

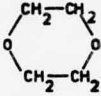
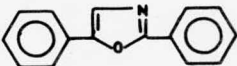


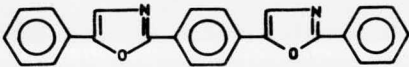
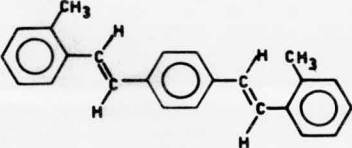
También se ha logrado hacer que los solventes aromáticos acepten muestras acuosas mediante la incorporación de detergentes alquifénolicos a la solución centelladora (42), ejemplos de éstos detergentes son el Tritón-100 y el Tritón N-101. La mayoría de los centelladores líquidos disponibles comercialmente como el Instagel y el Aquasol están basados en el uso de detergentes para ayudar a la formación de una emulsión estable de la muestra acuosa con el tolueno (43).

Los solutos en el proceso de centelleo, tienen la función de tomar la energía del solvente y transmitirla en la longitud de onda apropiada para que sea detectada por el tubo fotomultiplicador, Horrocks (44a) ha resumido las propiedades de los solutos más comúnmente usados en las soluciones de centelleo.

El más común de los solutos primarios es el difeniloxasol (PPO) que tiene un máximo en el espectro de emisión a 370 nm, el p-terfenilo también es ampliamente usado pero no es tan eficiente como el PPO y no puede ser usado con naftaleno, todos los demás solutos primarios tienen máximos de emisión del orden de 370 nm, o menores. Puesto que muchos fotomultiplicadores son más sensibles a la luz de 400 - 450 nm, se hace necesario el empleo de un soluto secundario que se encarga de emitir la luz en una longitud de onda mayor. De entre los muchos solutos secundarios los más adecuados parecen ser el p-bis-2 (5-feniloxasolil)-benceno (POPOP) tiene un máximo en 415 nm, el derivado dimetilado del POPOP (M_2 -POPOP), que es más soluble que el primero, tiene un máximo en 427 nm y el p-bis-(o-metilestilil) -benceno(bis-MSB) (44b,45).

Los nuevos fotomultiplicadores con fotocátodo bi-alcalino son más eficientes a longitudes de onda de 380 a 390 nm, de donde se deduce que en este caso el soluto secundario no es necesario (46).

En el cuadro 1 se resumen algunos de los solutos y solventes más comúnmente usados en los líquidos centelladores.

S O L V E N T E S		
AROMATICOS		NO AROMATICOS
 tolueno	 p-xileno	 diexano
S O L U T O S		
PRIMARIOS		
 PPO	 p-terfenilo	 naftaleno
SECUNDARIOS		
 POPOP		 bis-MSB

CUADRO 1

Los siguientes centelladores líquidos han sido recomendados para muestras acuosas (47,48) en donde las concentraciones de los solutos se expresan por gramo de solvente.

- 1) Solvente: Tolueno o p-xileno con un detergente alquilfenólico en una relación de 3-5 a 2

Soluto primario: PPO o p-terfenilo en proporción de 5 a 10 mg.

Soluto secundario: bis-MSB, POPOP o

M₂-POPOP en concentración de 0.5 a 2 mg.

11) Solvente: Mezcla dioxano-naftaleno en una relación en volumen de 8-12 a 1.

Soluto primario: PPO en proporción de 5 a 10 mg

Soluto secundario: bis-MSB a una concentración de 0.5 a 2 mg.

Entre los centelladores líquidos mencionados se escogió, para la realización experimental de este trabajo al último, debido a que se adapta mejor a las condiciones de trabajo y del equipo disponible obteniendo una eficiencia de conteo del 40 al 45%.

La incorporación directa de las muestras al centellador líquido es difícil, debido a que se presentan diversos problemas como son: un mezclado incompleto de la muestra con el centellador, dificultades para evaluar la eficiencia de conteo y alto grado de extinción. En la bibliografía se encuentran algunos de estos métodos (49).

D).- Instrumentación.

Un detector de centelleo líquido (Fig. 2,) se puede describir como la combinación óptica entre el líquido de centelleo y el tubo fotomultiplicador, mediante el cual se convierte la energía de la partícula ionizante en un pulso eléctrico. Las componentes electrónicas que siguen al tubo fotomultiplicador tienen funciones separadas para realizar la amplificación del pulso, la discriminación del mismo y la presentación de los datos.

Para realizar estas funciones, el sistema básico de un espectrómetro de centelleo líquido consta, de un detector formado por el líquido de centelleo y la muestra radiactiva, los tubos fotomultiplicadores, la fuente de alto voltaje, el circuito de anticoincidencia, uno o varios sistemas de amplificación, un analizador monocanal y un escalador, así como un control general, un sistema automático de medida para una o varias muestras y un contenedor con una fuente radiactiva para estandarización externa.

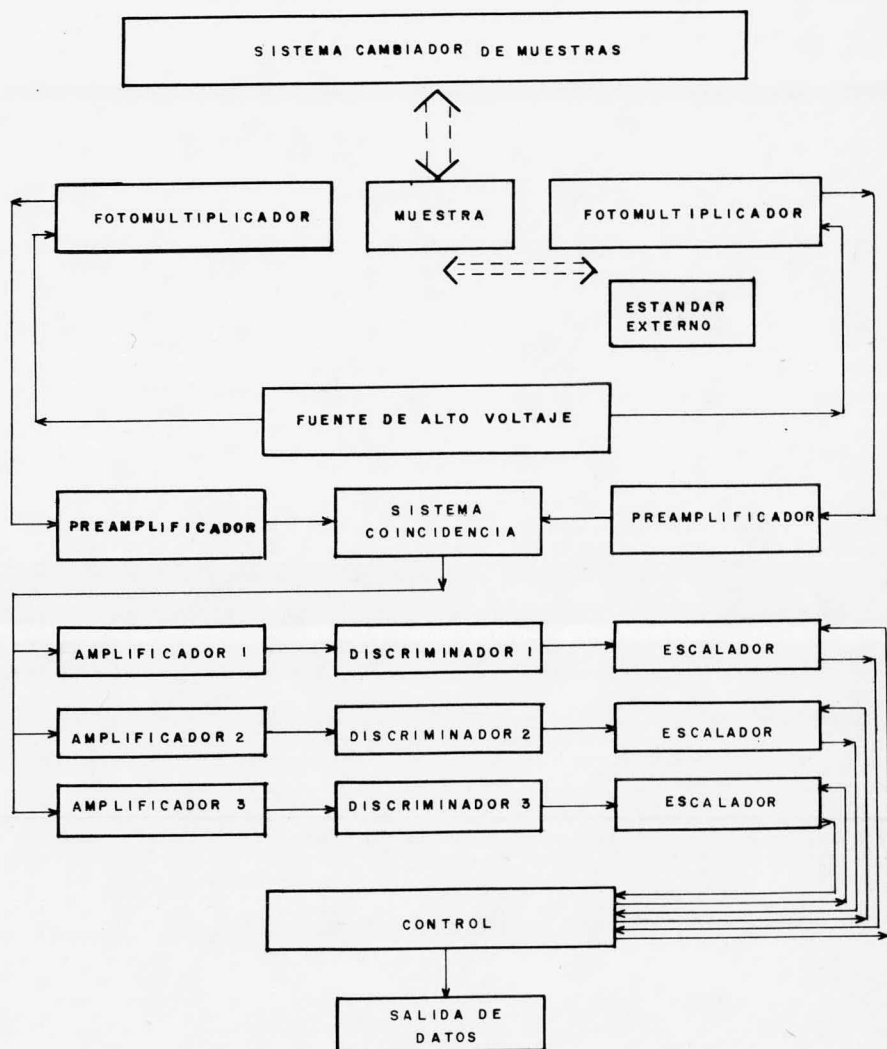


FIG 2

DIAGRAMA A BLOQUES DE UN ESPECTROMETRO DE CENTELLEO LIQUIDO

El tubo fotomultiplicador está básicamente constituido de tres partes: el fotocátodo cuya función es recibir el espectro de fotones producidos en el centellador y transformarlo en electrones mediante el efecto fotoeléctrico, estos electrones son a su vez multiplicados en una serie de dinodos a diferentes voltajes y finalmente recibidos en el ánodo del tubo, de donde son alimentados a un preamplificador que sirve como puente entre los circuitos de alto voltaje del tubo y los amplificadores subsecuentes. En la salida del tubo fotomultiplicador, como consecuencia de la diferencia de potencial entre los electrodos, se forma un pulso cuya amplitud es proporcional a la can tidad de fotones recibidos y consecuentemente es representativo de la energía de la partícula ionizante producida en el centellador (50).

Los amplificadores más usados tienen ganancias del orden de 40 000 y no deforman de manera apreciable la forma del pulso.

La clasificación de los pulsos está a cargo del discriminador y está afectada tanto por la amplitud como por la duración del pulso. La función del discriminador consiste en producir un pulso de salida normalizado de todos aquellos pulsos iniciales que estén comprendidos entre ciertos voltajes máximos y mínimos establecidos previamente. Esto hace posible la selección de los pulsos adecuados para el estudio.

En la mayoría de los casos se tienen dos discriminadores que re cibren el mismo espectro de pulso, pero con diferente nivel de discri minación, los cuales están acoplados a un circuito de anticoincidencia, el cual producirá pulsos normalizados de todos aquellos pulsos iniciales que se encuentran entre los dos niveles de discriminación (ventana o canal). A este dispositivo se le denomina analizador mono canal y con él es posible clasificar los pulsos que se encuentran en tre determinados límites de energía de las partículas ionizantes.

Los pulsos de baja amplitud, producidos por emisiones radiactivas de baja energía, suelen estar acompañados de una gran cantidad de pulsos espurios producto de emisiones termoiónicas del tubo fotomultiplicador. Para resolver este problema se usan dos tubos fotomu ltiplicadores con circuitos de discriminación separados, acoplados a un circuito de coincidencia con un tiempo de resolución que determi-

na el intervalo de tiempo en el cual los pulsos deben llegar para producir un pulso de salida. De modo que cualquier pulso originado en el centellador estará en coincidencia y el circuito rendirá un pulso de salida, así que todo pulso que se origine en cualquiera de los fotomultiplicadores no estará en coincidencia y el circuito no rendirá pulso alguno, de esta forma la emisión termoiónica no contribuirá a las cuentas producidas por la muestra. (51)

La presentación de los datos de salida, culminación de todas las etapas anteriores, puede realizarse de forma muy diversa, en ocasiones se usa un escalador que se encarga de mostrar el número de cuentas recibidas en un intervalo de tiempo previamente establecido o cuenta el tiempo requerido para la llegada de un determinado número de pulsos. También pueden usarse adicionalmente máquinas de escribir eléctricas, osciloscopios o teletipos, como en el caso particular de este trabajo.

E) Extinción

Uno de los problemas principales del centelleo líquido es el llamado "quenching" que puede traducirse como apagado o extinción, el fenómeno consiste en la absorción, dispersión y degradación de los fotones luminosos por sales, gases o sustancias químicas disueltas en la mezcla muestra-centellador o por coloración de ésta y consecuentemente la pérdida de información que llega a los fotomultiplicadores. El resultado final de esto es que cambia la forma del espectro, bien por la disminución del total de los fotones o por una disminución en la energía de los mismos y con ello un corrimiento del espectro (52). En suma, la extinción hace variar la eficiencia de la detección. Como el sistema de medición usa un analizador monocanal, la extinción causa el corrimiento del espectro con respecto al canal esperado y por tanto se hace necesario evaluar un factor que corrija dicho corrimiento.

Existen en las referencias bibliográficas varios métodos que permiten evaluar el factor de extinción (53,54).

Los productores de extinción química pueden ser desde trazas de impurezas en el centellador mismo, solutos de funciones especiales, hasta sustancias constituyentes de la muestra misma. Entre los grupos orgánicos que producen extinción en mayor grado se encuentran: los

grupos nitro, yodo, mercaptanos, fenoles, aminos, aldehídos y cetonas; con menor intensidad alcoholes, éteres, nitrilos y alquenos. Un productor de extinción siempre presente es el oxígeno disuelto y cuya separación mejora el funcionamiento del centellador considerablemente. El agua también es un fuerte productor de extinción lo mismo que la presencia de iones hidroxilo y sales inorgánicas, pequeñas cantidades de estas sustancias disueltas en el centellador son capaces de disminuir considerablemente la eficiencia de la detección (55).

C A P I T U L O I I I

E L M A I Z

Entre los muchos cereales, miembros de una sola familia botánica; Gramíneas, se encuentra el maíz que ha sido cosechado desde la antigüedad en varias regiones del mundo y en la actualidad sigue siendo uno de los cereales que prestan mayores servicios a la humanidad, ya sea como base de la alimentación de muchos pueblos o como materia prima para obtener multitud de productos industrializados o semi-industrializados.

El cultivo del maíz se extendió debido a las magníficas características que presenta: alto contenido de carbohidratos y otros nutrientes, facilidad de almacenaje, alto rendimiento agronómico, etc.

Se han emitido variadas opiniones acerca del origen del maíz, algunos aseguran que es originario de América del Sur, otros de América Central y más específicamente de México, sea cual fuese su origen debemos aceptar que el maíz se cultiva en México desde mucho antes de la conquista y que las culturas aborígenes en México lograron desarrollar las seis tribus (maíz palomero, dulce, harina, duro, dentado y tunicado).

En la actualidad, no sólo en México sino en muchos países del mundo, el maíz sigue siendo la principal fuente de energía en la dieta humana, este grano no sólo es utilizado de forma directa, sino que también contribuye de manera apreciable en la alimentación de animales domésticos que forman parte de la cadena de alimentos para el humano.

En México se cultivan anualmente de 5 a 6 millones de hectáreas con un rendimiento promedio de una tonelada por hectárea lo que conduce a una producción anual de 5 a 6 millones de toneladas anuales (56).

Bajo estas condiciones, la importancia tanto nutricional como económica de este cereal es evidente y en consecuencia se hace necesario su estudio.

A).- Características botánicas.

El maíz es una planta angiosperma, cuyo nombre científico es Zea mays L., pertenece a la familia de las Gramíneas, sub-familia

de las Maideas, tribu de las Tripsáceas, género *Zea* y especie *mays*. (Fig 3). Presenta las siguientes características botánicas (57): las raíces del maíz son fibrosas y cuando la planta se ha desarrollado forman una masa de raíces completamente entrelazadas formando así el sistema de absorción de nutrientes. Además del sistema fibroso, existen en la planta raíces adventicias o de anclaje que brotan de los tres primeros nudos del tallo, se ha comprobado que el crecimiento del sistema reticular está relacionado con el desarrollo total de la planta.

El tallo en la planta de maíz es alargado y presenta nudos de donde brotan las hojas. Está formado por tres estructuras: la epidermis que es una capa impermeable y transparente cuya función es la protección del tallo, a continuación se encuentra una pared leñosa que no es más que un conjunto de haces fibrovasculares que forman canales por donde circula el agua y las sustancias alimenticias que van de las raíces a las hojas y a las mazorcas. Por último se encuentra la médula que es una sustancia suave que llena la parte central del tallo, en ella se almacena la humedad y reservas alimenticias.

Las hojas salen directamente de los nudos del tallo y están colocados de forma alterna, son lanceoladas y envainadoras. En la epidermis se encuentran los estomas que facilitan el intercambio gaseoso de la planta con el medio. La mesófila que se encuentra distribuida en toda la hoja es la que contiene los cloroplastos que son los órganos donde se realizan las reacciones fotosintéticas que dan como resultado la síntesis de carbohidratos.

El maíz es una planta monoica, es decir, las flores masculinas y femeninas se encuentran en la misma planta, pero en sitios diferentes. Las flores masculinas aparecen antes que las femeninas y están situadas en la espiga en la parte superior del tallo. Las flores femeninas están situadas en las axilas de las hojas y es donde se desarrolla la mazorca.

El producto final de la floración es la semilla o grano, como es de suponerse el proceso de la formación del grano de maíz se inicia con la formación de las flores. Durante el crecimiento de la planta ciertos grupos de células de división mitótica rápida dan lu

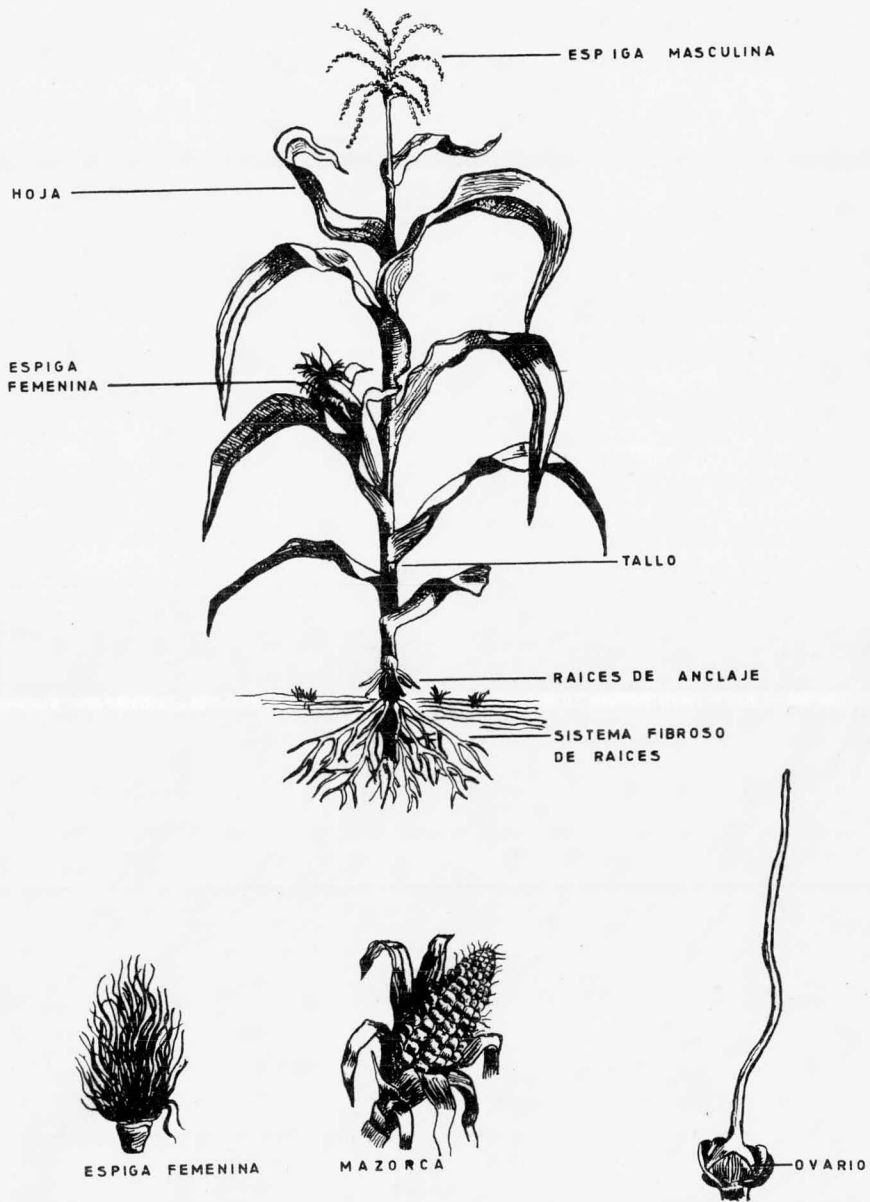


Fig. 3 PLANTA DE MAIZ Y SUS DIVERSOS ORGANOS

gar a la formación de los primordios florales. Las flores que se forman en la extremidad del tallo dan origen a los gametos masculinos en tanto que las flores formadas en las axilas de las hojas producen los gametos femeninos y posteriormente dan lugar a la mazorca de maíz.

Las anteras, los órganos que formarán los granos de polen, se originan durante el desarrollo de las flores masculinas en la espiga. A medida que una antera se desarrolla, ciertas células en cada uno de los cuatro lóbulos se desarrollan y diferencian y cada una de ellas origina una célula madre de polen, la cual se divide por meiosis dando lugar a las microsporas que posteriormente originan los granos de polen.

El precursor del grano de maíz es el ovario, que con la fecundación se transformará en el grano de maíz, el estigma y el estilo cuya combinación constituirá el cabello del elote. El ovario contiene un óvulo, que llena completamente el espacio del ovario. Una célula colocada cerca del vértice se desarrolla grandemente a medida que el óvulo crece, esta célula por división meiótica da origen a las cuatro megasporas, tres de estas cuatro células se desintegran y sólo una continúa su desarrollo, posteriormente por tres divisiones mitóticas consecutivas se produce un saco embrionario con ocho núcleos. Una se convierte en una célula huevo y dos, los núcleos polares, emigran al centro del saco embrionario.

Cuando los granos de polen, transportados por el viento dan lugar a una polinización cruzada, caen en los cabellos del elote y producen tubos polínicos. Cuando el tubo polínico penetra en el saco embrionario, los núcleos espermáticos del polen se ponen en libertad. Un gameto masculino se fusiona con los dos núcleos polares (doble fecundación), produciendo una triple fusión de núcleos, posteriores divisiones de este último núcleo formarían al endospermo. De esta manera el cigote dará origen al embrión, la célula producida en la doble fecundación dará origen al endospermo y el saco embrionario al pericarpio o cascarilla.

Cuando la polinización se inicia, la actividad fisiológica de la planta aumenta de manera apreciable y se pueden observar divisio

nes celulares por mitosis en la formación tanto del embrión como del endospermo (58).

El grano de maíz madura en un lapso de cincuenta a noventa días después de la fecundación, dependiendo de la variedad (59).

B).- Utilización del agua.

El hidrógeno del agua que la planta de maíz toma del medio es utilizado en parte para la formación de compuestos orgánicos a través de la fotosíntesis y de las reacciones bioquímicas que se desarrollan durante el crecimiento de la planta. Otra parte del agua se encuentra como tal en sus tejidos, en el líquido intersticial o bien en el protoplasma celular.

En los vegetales vasculares, como el maíz, una corriente constante de agua y sales minerales se observa desde los órganos de absorción hasta aquéllos que son el asiento de la fotosíntesis y la transpiración, así como en los diferentes órganos de la planta. El agua penetra y circula en estado líquido y se escapa, por lo común, como vapor de agua durante la transpiración. Como las sales son absorbidas en soluciones muy diluidas, es necesario el transporte de una gran cantidad de agua, para que la planta pueda tener las sustancias minerales que requiere.

En el maíz, como toda planta vascular, la parte esencial para la absorción del agua es por los pelos reticulares de la raíz. El agua con las sales disueltas en proporciones muy débiles, penetra en los pelos absorbentes debido al fenómeno de ósmosis que se establece entre el medio externo y el protoplasma de aquéllos.

Al recibir los pelos absorbentes de manera continua el agua del medio externo, la concentración de su protoplasma es menor que la del protoplasma de las células que están a continuación; éstas al recibir el agua de los pelos, también por ósmosis, bajan su concentración con respecto a las que siguen y por consiguiente pasa agua a éstas. El fenómeno se realiza de una manera sucesiva a través de todas las células, hasta las células parenquimatosas que rodean los vasos, éstas células no cesan de perder agua asegurando, así el desequilibrio osmótico que permite una corriente constante de agua.

El desplazamiento vertical del agua de la raíz a las hojas sigue dos caminos; uno a través de los parénquimas leñosos y otro a través de los vasos (60).

El agua en las hojas, que son los principales órganos fotosintéticos del maíz, aunque también los tallos pueden realizar esta función, es utilizada al igual que el bióxido de carbono obtenido del aire y empleando la luz como fuente de energía, como materia prima para la síntesis de carbohidratos.

La mayor parte del agua absorbida se pierde por la transpiración, algo de lo que queda es utilizada en varios procesos metabólicos y como constituyente principal de cualquier nuevo protoplasma y jugo celular que se forme, por éste proceso el tritio también es incorporado. Sólo una cantidad relativamente pequeña, generalmente menor de 1% del agua absorbida se usa directamente en la fotosíntesis (61).

El maíz es una planta que tiene una actividad fotosintética elevada, es decir, tiene una gran eficiencia para convertir el agua y el bióxido de carbono, con ayuda de la luz solar en energía química. Se ha calculado que en 4000 m² de un sembrado de maíz, se fijó aproximadamente el 1.2% de la energía solar que incidió sobre esta superficie durante una estación de crecimiento de 100 días, después de tomar en cuenta la pérdida por respiración. Cerca de una tercera parte del producto neto fotosintético está en el grano, de tal forma que la eficiencia del maíz para convertir energía solar en energía química del grano es de aproximadamente 0.4% (62).

Bajo condiciones relativamente favorables, los productos de la fotosíntesis se acumulan durante el día más rápidamente de lo que pueden ser usados o transportados a otras partes de la planta. La glucosa es un producto primario usual de la fotosíntesis y en el maíz gran parte de la glucosa se convierte en almidón tan rápidamente como se produce. Durante la noche, gran parte del almidón se reconvierte en glucosa y en otros azúcares solubles y se transporta a las partes no fotosintéticas de la planta, entre ellas al grano después de la polinización de la planta (63).

La glucosa y otros solutos orgánicos son transportados usualmente al través del floema el mecanismo del movimiento se desconoce.

Las diversas sustancias alimenticias en el maíz se almacenan en diferentes formas, incluyendo carbohidratos, proteínas y grasas en varios órganos de la planta. Muchas de las sustancias almacenadas en una célula también se elaboran ahí a partir de azúcares simples, o de éstos y otros componentes.

Por otra parte, después de la contaminación aguda con agua tritiada en etapas tempranas del desarrollo de la planta, el maíz utilizará el tritio de manera similar al hidrógeno, por lo que será posible encontrarlo distribuido en toda la planta durante su crecimiento y en los componentes del grano, tanto en forma de tritio ligado a los compuestos orgánicos como en forma de agua libre en el protoplasma celular o en líquidos intersticiales.

Cuando se estudia el comportamiento del material radiactivo introducido a una planta, como es el caso de la presente contaminación aguda por agua tritiada, la disminución de la actividad se efectuará no sólo por el decaimiento natural del tritio, sino también por los mecanismos asociados a los seres vivos, transpiración, respiración, asimilación y desasimilación celular, etc.

C).- Estructura y composición química.

El grano de maíz o sea la semilla, es el óvulo maduro producido durante la polinización, está constituido por cinco partes o estructuras (Fig. 4).

- 1.- Una cubierta exterior formada por un tejido de células muy apretadas llamada cascarilla, epidermis o pericarpio, que es una membrana de protección del grano, incolora en la mayoría de las variedades comerciales con un alto contenido de celulosas y hemicelulosas.
- 2.- Una cubierta interior que recubre el endospermo y el embrión, muy delgada e incolora.
- 3.- El endospermo que es un tejido almacenador de alimentos. Pueden distinguirse dos partes dependiendo de la variedad el endospermo blando que se encuentra situado en la parte superior y central del grano, formado por un tejido de células muy sueltas con grandes inclusiones de almidón y el endos-

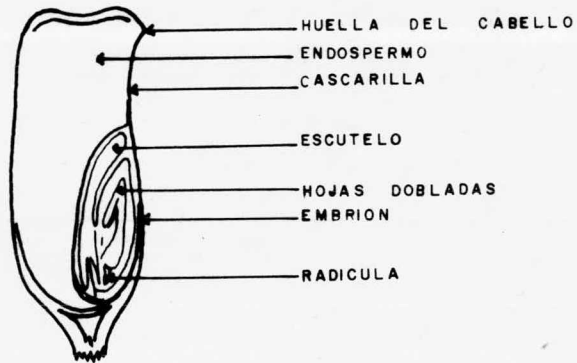
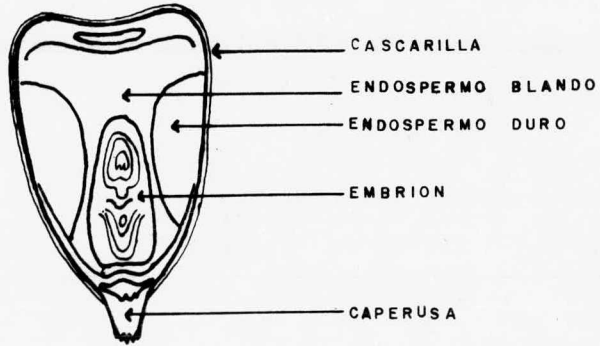


Fig. 4

ESQUEMA DE UN GRANO DE MAIZ

permo duro, situado a los lados y en la parte media del grano, está constituido por células que tienen grandes inclusiones de proteína y almidón de mayor densidad cuyo conjunto es llamado gluten.

4.- El embrión o germen que es una planta en miniatura, situado en la parte inferior del grano, está constituido por tres partes: la plúmula, la radícula y el scutelum. De la plúmula proceden el brote del tallo y las raíces permanentes; la radícula da origen a raíces temporales; el scutelum transforma, absorbe y transporta las materias de reserva contenidas en el endospermo hacia la plántula en vías de formación. El embrión es rico en grasas y proteínas del tipo albuminoideo.

5.- La caperuza o sombrero que cubre la parte inferior del grano, por la que se inserta al olote (64).

La composición química del grano de maíz depende, entre otras cosas, de la variedad de la semilla, la composición química del suelo, el uso de fertilizantes, el foto-período, las condiciones de humedad, forma de cultivo, la altitud sobre el nivel del mar y el clima, pero podemos establecer que para un cultivo dado el factor que afecta de manera predominante en la composición, es la variedad. En general en el maíz, como en todo cereal, los principales compuestos son los carbohidratos, las proteínas y las grasas de donde deriva su importancia nutricional.

Los carbohidratos están constituidos en la semilla del maíz fundamentalmente por almidón, el cual es la principal substancia de reserva en los vegetales y es un representante de los polisacáridos ramificados. El almidón se encuentra en el grano en forma de inclusiones en las células del endospermo y en menor cantidad en el embrión, el tamaño de la partícula es de 4 a 26 micras. El gránulo de almidón está formado por dos tipos de polisacáridos: la amilosa que es un polisacárido poco ramificado que se encuentra en la parte interior del gránulo y equivale aproximadamente a un 26% y la amilopectina que es un polisacárido mucho más ramificado. (Fig. 5). El contenido de almidón en el grano de maíz puede variar desde un 40 a un 70% (65).

Otros carbohidratos constituyentes del maíz son las celulosas y hemicelulosas que también son polisacáridos constituyentes fundamentales de las fibras del pericarpio, el contenido de fibras en el maíz varía del 2 al 4%. La cantidad de azúcares simples en el grano maduro es muy baja (66).

Otro grupo de sustancias con características químicas semejantes lo forman las proteínas (Fig. 6). El contenido de proteínas en el maíz varía ampliamente, dependiendo de la variedad, desde un 4% hasta un 10 ó 12% en variedades de maíz cristalino.

En función de su solubilidad pueden distinguirse cuatro tipos de proteínas en el maíz:

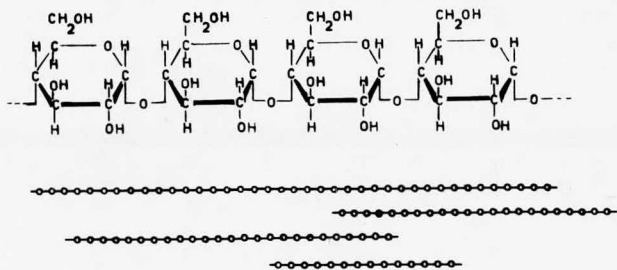
- 1.- Solubles en agua, albúmina fundamentalmente.
- 2.- Solubles en soluciones salinas, globulinas.
- 3.- Solubles en alcohol ó prolaminas (zeína). y
- 4.- Solubles en soluciones alcalinas, glutelinas.

De la proteína total contenida en el endospermo y el embrión un 80% se encuentra en el endospermo y el 20% restante en el embrión. El 32% son proteínas solubles en soluciones salinas de las cuales sólo un 2% es albúmina y un 30% globulinas; la albúmina se encuentra en el endospermo, en tanto que las globulinas se encuentran repartidas 12% en el endospermo y 18% en el embrión. El gluten contiene alrededor del 68% de la proteína total, de la cual el 45% es zeína, constituyente exclusivo del endospermo y el 23% de las proteínas restaⁿtes del gluten son glutelinas repartidas de la siguiente forma 20% en el endospermo y sólo un 3% en el embrión (67).

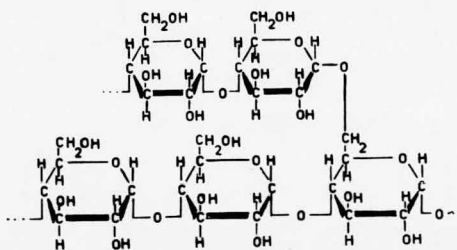
Los lípidos en el maíz están constituídos fundamentalmente por triglicéridos de ácidos grasos (Fig. 7), como linoléico, oléico y ácidos grasos saturados, pero también existen en menor proporción ácidos grasos libres, sitoesteroles, tocoferoles y otros productos terpénicos así como fosfolípidos, hormonas vegetales y vitaminas (68).

El contenido total de grasas varía considerablemente de una especie a otra y va de un 3 a un 9% (69).

En el grano de maíz también se encuentran vitaminas, aunque su



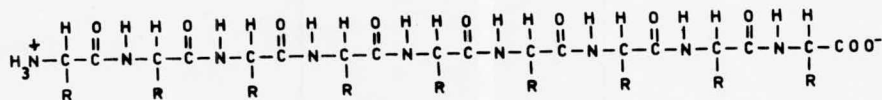
A).- AMILOSA



B).- AMILOPECTINA

◇ UNIDAD DE GLUCOSA

Fig. 5 CONSTITUYENTES DEL ALMIDON



R = GRUPO CARACTERISTICO DEL AMINOACIDO

Fig. 6 ESTRUCTURA DE LA CADENA PEPTIDICA DE LAS PROTEINAS

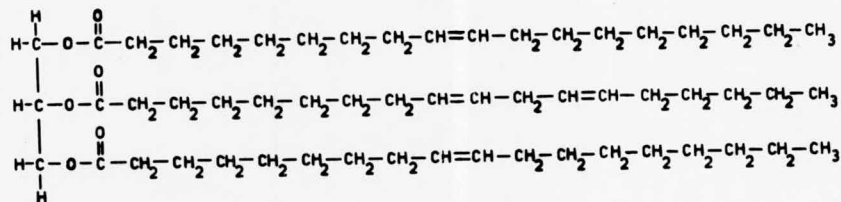


Fig. 7 UN TRIGLICERIDO.

distribución varía ampliamente de un tipo de maíz a otro, entre las vitaminas encontradas en el grano de maíz están: la vitamina B₁, B₆ y A. El contenido de vitaminas en el maíz puede encontrarse en las referencias bibliográficas (70).

Los constituyentes inorgánicos del grano son compuestos de sodio, calcio, potasio, fósforo, azufre y cloro que forman las cenizas.

CAPITULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

A).- Siembra y contaminación del maíz.

La siembra del maíz utilizado en este trabajo se llevó a cabo durante 1975, en una parcela experimental de riego del INEN en la hacienda "Doña Rosa" (110°10'W, 20°37'N) en la región del Bajío a 320Km de la Ciudad de México y 1800m sobre el nivel del mar.

La tierra donde se efectuó la siembra es del tipo vertisol que tiene un perfil uniforme entre 40 y 200cm de profundidad, de color gris cuando está seca y negro cuando está húmeda, tiene una textura arcillosa y un contenido de materia orgánica entre 0.5 y 1%, su pH fluctúa entre 7 y 7.5. La zona tiene una precipitación pluvial de 500 a 600mm por año. La irrigación del terreno se efectuó por capilaridad.

El terreno se preparó empleando 180Kg de fertilizante 18-46-0 (N, P, K)/Ha y dos irrigaciones antes de iniciarse la estación de lluvias, con un equivalente de 200mm de precipitación pluvial.

La variedad de maíz cultivada fué el híbrido H-309, debido a que se adapta mejor a las condiciones meteorológicas del lugar.

La siembra del maíz se efectuó en surcos a 80cm de distancia y 30 cm entre plantas. En el terreno experimental se delimitaron cuatro parcelas rectangulares de 10m de longitud por 1.60m de ancho (dos surcos) con una zona de amortiguación de tres surcos para evitar una contaminación cruzada.

La contaminación fué realizada diez días después de la siembra, mediante la aplicación de un Curie nominal de tritio por aspersión directa en las parcelas, teniendo cuidado de que la contaminación fuera uniforme.

El maíz fué sembrado el 14 de abril de 1975 y cultivado por los métodos convencionales y cosechado el 15 de octubre del mismo año, obteniéndose de las cuatro parcelas 31.5Kg del grano.

B).- Consideraciones generales de la separación de los productos del maíz.

En el capítulo anterior quedó establecido que las estructuras más importantes del maíz son: embrión, endospermo y cascarilla o pericarpio, por lo que se decidió hacer la determinación de la distribución de tritio en ellas.

Entre las sustancias químicas fundamentales en el grano de maíz se encuentran: el agua, las grasas, las proteínas, el almidón y la fibra; las cuales fueron separadas para realizar la determinación de tritio en cada una de ellas.

El valor de estas determinaciones, radica en que cada una de ellas sigue rutas metabólicas diferentes al ser incorporadas al ser humano en los procesos alimentarios. Así, el almidón, el más importante de los carbohidratos del maíz, entra al metabolismo a través de la glucólisis; las grasas, constituidas fundamentalmente por triglicéridos, entran al ciclo de Krebs como acetyl-CoA, las proteínas son hidrolizadas hasta aminoácidos y de esta forma entran al metabolismo; la fibra constituida por celulosas, hemicelulosas y otras fibras, no se incorporan puesto que son sustancias no digeribles. El agua libre juega un papel importante en el metabolismo y es absorbida en las paredes celulares para pasar al protoplasma o queda en los intersticios celulares, para eventualmente ser incorporada a los diversos compuestos formados en gran variedad de reacciones metabólicas.

El criterio seguido para separar cada una de estas sustancias, estuvo dado fundamentalmente por el tipo de trabajo relacionado con la detección de radiactividad a bajo nivel. Puede resumirse diciendo que se trató de obtener muestras representativas, con un buen grado de pureza, evitando un excesivo tratamiento químico, en cantidades suficientes para hacer varias determinaciones con el objeto de lograr una buena estadística y por consiguiente métodos de separación reproducibles y confiables.

Para poder efectuar una relación cuantitativa tanto en la extracción como en la determinación del tritio, es necesario hacer un análisis de dichos compuestos en el grano de maíz.

Antes de proceder a realizar las separaciones correspondientes en las muestras tritiadas, se efectuaron ensayos para experimentar los métodos sobre granos de maíz comunes y así elegir el procedimiento más conveniente para cada caso.

El análisis del grano es necesario realizarlo sobre las muestras contaminadas, dado que la concentración de sus componentes cambia con la variedad de la planta, las condiciones de luz y humedad y la forma de cultivo entre otras variables.

C).- Métodos de Análisis

Los componentes que se analizaron en el grano de maíz fueron: humedad, materia seca, cenizas, grasas, carbohidratos, proteínas y fibra.

C-1.- Preparación de las muestras para el análisis.

Para obtener una muestra representativa adecuada para el análisis, se efectuó un cuarteo sobre las muestras cosechadas en cada una de las cuatro parcelas contaminadas, hasta obtener aproximadamente 50g de cada una, las cuatro muestras fueron mezcladas para obtener finalmente, después de otro cuarteo, una muestra aproximadamente de 10g sobre la que se efectuó el análisis.

La muestra así obtenida se pulverizó en licuadora, evitando siempre el calentamiento, se homogeneizó en mortero hasta obtener una harina fina de 250 mallas; la pulverización se realizó de manera exhaustiva, incluyendo la cascarilla que presenta problemas debido a su dureza.

C-2 Determinación de humedad.

Esta determinación fué realizada por dos métodos; el primero por secado directo a la estufa y el segundo por destilación azeotrópica con benceno, que se detallará más adelante (ver el inciso E de este mismo capítulo).

En el primer caso se pesaron 3g de la muestra preparada en un pesafiltro puesto a peso constante y se secó a la estufa a 110°C hasta peso constante (71). La muestra seca se enfrió en un desecador con CaO.

El porcentaje de humedad se obtuvo de la relación siguiente:

$$\%H_2O = \frac{(M-m) 100}{g}$$

donde:

M = peso del pesafiltro con muestra húmeda

m = peso del pesafiltro con muestra seca

g = peso de la muestra

C-3.- Determinación de las cenizas (72).

Las cenizas se determinaron directamente por calcinación de la harina en una mufla.

En un crisol puesto a peso constante, se pesaron por diferencia 5g de la muestra de harina se carbonizaron con mechero y después se calcinaron en mufla, cuidando de que la temperatura no pasara de los 550°C para evitar la volatilización de cloruros, el calentamiento se prolongó hasta que se obtuvieron cenizas blancas.

El cálculo del porcentaje de cenizas estuvo dado por:

$$\%cenizas = \frac{(A - B) 100}{M}$$

en donde:

A = peso del crisol con muestra calcinada

B = peso del crisol

M = peso de la muestra

C-4.- Determinación de las proteínas.

La determinación de las proteínas totales en el grano de maíz se realizó por el método de Kjeldahl (73) y por el método espectrofotométrico de Biuret (74).

El conocido método de Kjeldahl para la determinación de proteínas se basa en la determinación de nitrógeno presente en la muestra. En este procedimiento, tanto las proteínas como las demás materias orgánicas de la harina se oxidan por medio de ácido sulfúrico, de modo que el nitrógeno orgánico se fije como sulfato de amonio, esta sal se hace reaccionar con una base fuerte con el objeto de liberar el nitrógeno como amoníaco, el cual se destila y se recibe en un volumen conocido de ácido valorado como el HCl. Su titulación

proporciona la cantidad de amoníaco desprendido y por consiguiente la cantidad de nitrógeno presente en la muestra, ésta al ser multiplicada por un factor de 6,25 nos da la cantidad de proteína presente en la harina de maíz.

Se pesaron con exactitud muestras de harina del orden de 500mg y se sometieron a la oxidación clásica en un matraz de Kjeldahl, con 0.3g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10g de K_2SO_4 y 25ml de H_2SO_4 .

El amoníaco producido y recogido en HCl 0.1N, se obtuvo por titulación del exceso de ácido con NaOH 0.1N, usando como indicador rojo de metilo.

Esta determinación fué corregida aplicando el mismo método de Kjeldahl sobre un testigo constituido por todos los reactivos y un gramo de sacarosa como muestra orgánica.

El contenido de nitrógeno se calcula por la relación:

$$\%N_2 = \frac{(P - B) N (0.014) 100}{M}$$

donde:

P = ml de NaOH utilizados en la titulación del problema

B = ml de NaOH utilizados en la titulación del testigo

N = normalidad de la solución de NaOH

M = peso de la muestra

El segundo método empleado para la determinación de proteínas fue el de Biuret, escogido entre los métodos espectrofotométricos debido a su aceptable sensibilidad para el caso presente, además de ser bueno para concentraciones altas de proteína (mayores de 50 gamas) y por tener la ventaja de no ser tan específico, es decir es independiente de la composición de la proteína.

El método está basado en la medición de la absorción, en 310nm, que presenta el complejo formado entre los enlaces peptídicos de la proteína y el sulfato de cobre en un medio fuertemente alcalino.

La operación analítica consiste en determinar las condiciones en las cuales se obtiene la absorción en el ultravioleta debida a la proteína al eliminar la absorción debida al reactivo de cobre y a cualquier otro material presente. Esto se logra mi-

diendo la absorción de la proteína en álcali contra un álcali como testigo y restando este valor del obtenido por diferencia entre las absorciones debidas a la proteína en una solución alcalina con el reactivo de cobre y el reactivo de cobre alcalino.

Los métodos de separación de proteínas del maíz serán descritos posteriormente, en donde se explicará la obtención de la solución proteína-CuSO₄ en NaOH.

Para cada determinación se prepararon cuatro soluciones conteniendo:

A₁.- 2 ml de H₂O destilada más 1ml de solución
CuSO₄.5H₂O al 21% en NaOH al 30%

A₂.- 3 ml de solución proteínica

B₁.- 2 ml de agua destilada más 1ml de NaOH al 30%

B₂.- 3ml de solución proteínica

Las cuatro mezclas fueron agitadas vigorosamente; las lecturas se hicieron en celdas por separado a 310nm, en un lapso comprendido entre 10 minutos y 2 horas después de efectuadas las mezclas. A₂ se leyó contra A₁ para obtener la lectura D_a, B₂ se leyó contra B₁ para obtener la lectura de D_b, de forma que:

$$D_a - D_b = D$$

donde D es la densidad óptica de la proteína.

El valor D se interpoló en una curva estándar para obtener finalmente la concentración total de la proteína.

C-5.- Determinación de las grasas.

Los lípidos en el grano de maíz están constituidos fundamentalmente por triglicéridos de ácidos grasos como oléico y linoléico; sin embargo existen en mucha menor proporción ácidos grasos libres, aceites esenciales, productos terpénicos: fitoesterol, sitoesterol, tocoferol, además de fosfolípidos, todos ellos solubles en hexano, a este extracto se le da el nombre de grasa cruda.

El método usado para determinar la grasa cruda en el maíz (75), consiste en hacer una extracción exhaustiva de ésta con hexano a reflujo en un Soxhlet y por diferencia de pesos obtener la cantidad

de grasa contenida en la muestra.

Se utilizaron muestras de aproximadamente 5g de la harina obtenida del maíz en estudio y la extracción se prolongó aproximadamente 48hs.

La cantidad de grasas en la muestra procesada se obtuvo de:

$$\% \text{ grasas} = \frac{(A - B) 100}{M}$$

donde:

A = peso del matraz después de evaporar el hexano

B = peso del matraz antes de la extracción

M = peso de la muestra

C-6.- Determinación de la fibra (76).

La fibra cruda en los alimentos se define como el componente orgánico que es insoluble en H_2SO_4 y NaOH hirvientes.

Para su determinación se partió de una muestra aproximada de 4g de la harina desgrasada, obtenida en la determinación anterior, después de que el hexano ha sido evaporado completamente.

La muestra se digirió a reflujo en H_2SO_4 al 1.25%, el residuo se sujetó a la misma operación con NaOH al 1.25% y el nuevo residuo se calcinó a $900^\circ C$.

El contenido de fibra en la muestra estuvo dado por:

$$\% \text{ fibra} = \frac{(A - B) 100}{M}$$

donde:

A = peso del crisol con residuo sin calcinar

B = peso del crisol con residuo calcinado

M = peso de la muestra

C-7.- Determinación de los carbohidratos.

El cálculo del porcentaje de carbohidratos se realizó por diferencia entre el valor de 100 y la suma de los cinco datos obtenidos en las determinaciones anteriores. Esta diferencia se reportó como carbohidratos asimilables (77).

D.- Métodos de separación de los componentes del maíz.

Los métodos empleados para la separación de los diferentes compuestos del grano de maíz, son una modificación de métodos ya experimentados en material no radiactivo que tuvieron que adaptarse a los requerimientos de las muestras, ya que es necesario considerar siempre la baja actividad en tritio que cada una presenta.

La separación se realizó individualmente sobre cuatro muestras de 100g obtenidas por cuarteo de cada una de las cosechas pertenecientes a las parcelas contaminadas.

El método general de la separación está descrito en el esquema mostrado en la figura (8).

D-1.- Separación del agua libre.

La separación del agua libre se detalla en la sección E de este mismo capítulo.

D-2.- Materia seca.

La materia seca se obtuvo directamente de la muestra de maíz después de la determinación de agua libre por destilación azeotrópica y evaporación del benceno bajo lámpara de rayos infrarrojos.

Muestras de aproximadamente 5g se pulverizaron cuidadosamente, el polvo obtenido se guardó en bolsas de polietileno en un desecador con gel de sílice hasta la determinación del tritio por el método de oxidación (sección F de este mismo capítulo).

D-3.- Separación de las estructuras.

La determinación de la cantidad de tritio incorporada a las diferentes estructuras del grano del maíz, endospermo, embrión y casca rilla, es conveniente puesto que estas tienen importancia desde el punto de vista de la industrialización del grano.

Después de haber experimentado varios métodos para la separación de estas estructuras como la molienda y tamizado a diferentes velocidades y aberturas de mallas, la molienda y flotación en diferentes solventes y mezclas de los mismos, molienda en molino, etc.

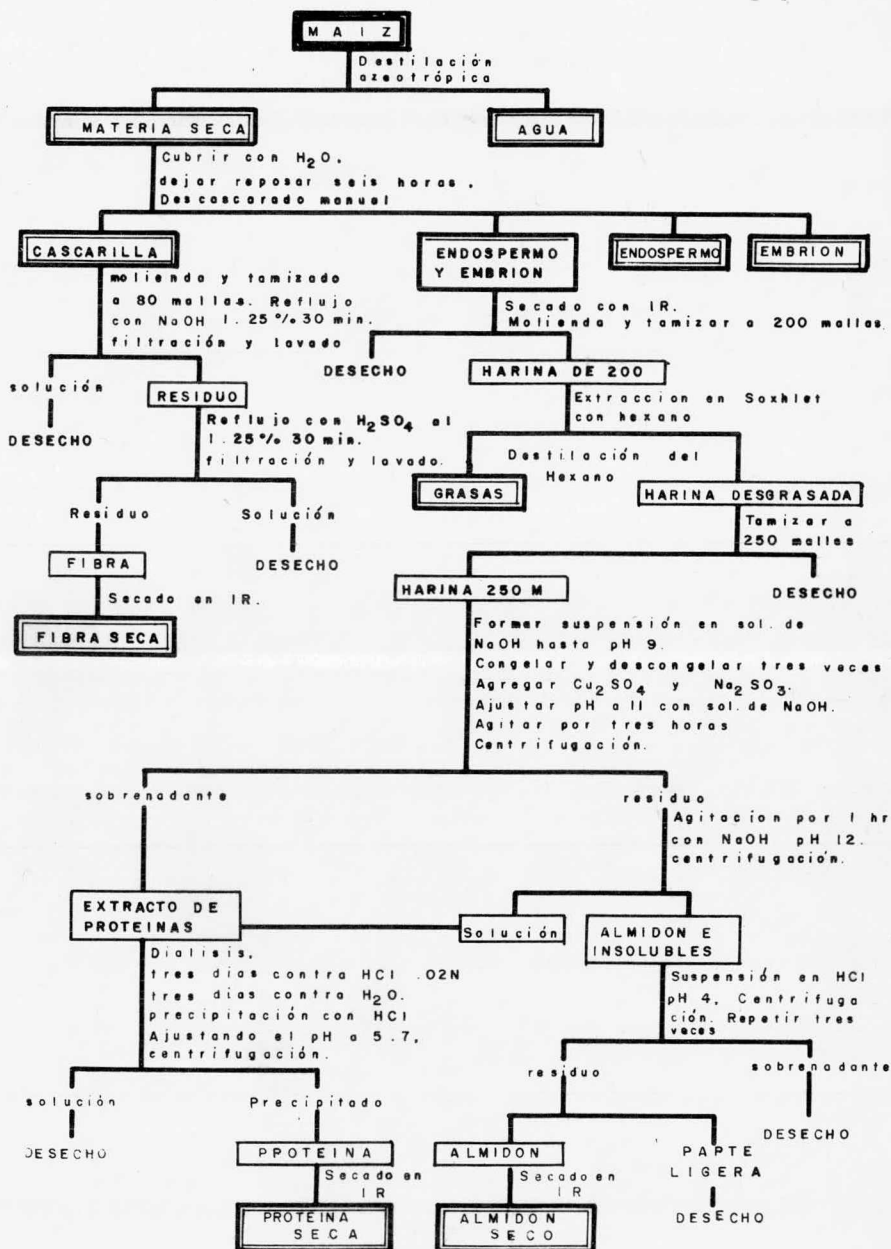


Fig 8

se llegó a la conclusión de que la única forma eficiente, aunque tediosa, para la separación exhaustiva de estas estructuras, era la separación manual.

El procedimiento se realizó tomando muestras de 10g de cada parcela a las cuales se les extrajo el agua libre por destilación azeotrópica. El grano de maíz seco se cubrió con agua destilada para su humectación durante tres horas, pasado este tiempo la cascarilla que recubre el grano es fácilmente desprendible con el uso de pinzas y el embrión se separó del endospermo por disección con una navaja delgada. Las estructuras separadas se secaron nuevamente con lámpara infrarroja, se molieron cuidadosamente y se guardaron en desecador hasta la determinación del tritio por oxidación.

D-4.- Separación de las grasas.

Debido a que en la cascarilla de maíz se localiza el mayor porcentaje de fibra, además de tener muy bajos porcentajes tanto de proteínas como de grasas y almidón, se decidió no utilizarla en la separación de estos compuestos y extraer a partir de ella únicamente la fibra. De modo que las grasas, las proteínas y el almidón se separaron exclusivamente a partir del endospermo y del embrión.

Al grano de maíz seco obtenido después de la extracción del agua libre, se le separó la cascarilla manualmente por el procedimiento ya descrito. El endospermo-embrión se secó en lámpara de luz infrarroja y posteriormente se pulverizó en licuadora y mortero, con las precauciones ya citadas, hasta convertirlo en harina de 250 mallas.

Las muestras de harina se colocaron en un cartucho de celulosa y se separaron las grasas en un extractor Soxhlet haciendo reflujar 400ml de hexano durante 48hs, se comprobó que la extracción fuese exhaustiva. Las grasas se recuperaron por destilación del hexano.

D-5.- Separación de las proteínas.

La extracción de las proteínas del maíz presenta un problema especial debido: 1º a la distribución anatómica de las proteínas en el endospermo y en el embrión como quedó establecido en el capítulo anterior y 2º debido a su baja solubilidad en solventes acuosos neutros. En la bibliografía existen algunos métodos de separación de proteínas

del maíz (78,79,80). Sin embargo, ninguno de ellos permite una extracción rápida de la proteína total en cantidades suficientemente grandes para poder realizar una determinación de tritio de baja actividad.

Se experimentaron en el laboratorio varios métodos sobre material inerte, entre los que pueden mencionarse extracciones acuosas de NaCl, de etanol de NaOH entre otras; también se intentó una separación usando detergentes aniónicos. Se llegó a la conclusión de que el único método que podría realizarse en las condiciones del laboratorio, con una eficiencia de extracción elevada, en el menor tiempo y que incluyera tanto proteínas del endospermo como del embrión además de que el extracto estuviese libre de impurezas no proteínicas, era una modificación del método propuesto por Mertz y Bressani (81).

El método está basado en una extracción en un medio altamente alcalino del complejo formado por la proteína y el sulfato de cobre en presencia de sulfito de sodio. La proteína se obtiene del extracto por diálisis o por precipitación al disminuir su pH.

La modificación introducida al método consiste en congelar y descongelar repetidamente el extracto para solubilizar la proteína y variar el pH de precipitación disminuyéndolo a 5.7; puesto que el punto de mínima solubilidad de las proteínas del endospermo se encuentra a un pH de 6, en tanto que para las proteínas del embrión el pH de mínima solubilidad es de 5.5. De esta forma, aunque no se obtiene una precipitación cuantitativa, sí se logra obtener una muestra representativa del total de las proteínas presentes en el grano.

Se describe a continuación la metodología de la extracción:

Muestras de aproximadamente 50g de harina desgrasada y seca se pulverizaron hasta obtener partículas de 250 mallas, ya que la eficiencia de la extracción depende del tamaño de la partícula.

La harina se mezcló con 10ml de agua destilada y se llevó a un pH de 9 con una solución al 0.2% de NaOH agitando continuamente para evitar la gelificación, la suspensión se congeló y descongeló tres veces, la muestra descongelada se diluyó con 1250ml de agua

destilada (25ml por cada gramo de muestra seca). Posteriormente se trató con 7.5g de sulfato de cobre pentahidratado y 1g de sulfito de sodio (15 gramos de CuSO_4 y 2g de Na_2SO_3 por cada 100g de muestra) se agitó para disolver completamente las sales. Una vez disueltas y sin suspender la agitación, la solución se llevó lentamente hasta un pH de 12 con NaOH 0.1N. Se requiere agitación continua para evitar la formación de zonas alcalinas que pueden provocar la gelación de la suspensión y consecuentemente disminuir el rendimiento

La suspensión con pH 12, se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas y posteriormente se centrifugó a 2000rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se guardó y el residuo se agitó nuevamente durante una hora con 800 ml de una solución de NaOH de pH 12. Esta suspensión se centrifugó nuevamente y el sobrenadante se combinó con el primer extracto. Este se congeló y finalmente se centrifugó para eliminar el almidón precipitado.

El residuo de ambas extracciones se recogió de los tubos de centrífuga con una solución de HCl de pH 4 y la suspensión se utilizó para la obtención del almidón.

La proteína se obtuvo del extracto por precipitación de la misma al ajustar el pH de la solución a 5.7. El precipitado se separó por centrifugación y posteriormente se secó, primero al vacío y luego en lámpara infrarroja.

La proteína seca se guardó en desecador para posteriormente determinar su contenido de tritio previa oxidación.

D-6.- Separación del almidón.

Los residuos obtenidos de la extracción de las proteínas que fueron recogidos con una solución de HCl con pH 4, se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el objeto de solubilizar el cobre. La solución fue centrifugada a 3000rpm durante 30 minutos, el sobrenadante se descartó y con espátula se separó la parte más ligera del residuo. La porción restante se recogió con otros 500ml de solución de HCl con pH 4. El procedimiento se repitió tres veces. (82)

Después de haber separado la proteína insoluble y alguna otra substancia de densidad menor que la del almidón, el residuo final se suspendió y agitó en 500ml de agua destilada y nuevamente se centrifugó, repitiéndose el procedimiento hasta que el sobrenadante no dió reacción ácida. El residuo final formado por almidón, se lavó con etanol al 70% y se secó en lámpara infrarroja para eliminar la humedad, se guardó en desecador hasta la determinación del tritio.

D-7.- Separación de la fibra.

La fibra cruda se obtuvo a partir de la cascarilla del grano, la cual se secó y pulverizó hasta obtener una partícula de 80 mallas.

La separación de la fibra se basó en obtener los compuestos insolubles en H_2SO_4 hirviendo y NaOH hirvientes al 1.25%, para lo cual se dejó a reflujo durante 30 minutos una suspensión formada por 500ml de una solución de H_2SO_4 al 1.25% piedras de ebullición y 10g de cascarilla pulverizada.

La suspensión aún caliente se filtró aplicando vacío y el residuo se lavó con agua destilada, hasta que las aguas de filtrado no dieran reacción ácida al rojo de metilo.

El procedimiento se repitió sobre el nuevo residuo usando NaOH al 1.25%, al término del cual se lavó con etanol al 70%, se secó en lámpara infrarroja y finalmente se guardó en desecador hasta la determinación del tritio.

E.- Determinación del tritio en agua libre.

Se da el nombre de tritio en agua libre al HTO que se encuentra en los líquidos intersticiales y el protoplasma celular.

La separación de esta agua se realizó por destilación azeotrópica del agua. Entre los solventes que forman azeótropos con el agua se encuentran, el xileno, el tolueno y el benceno, éste último fue seleccionado debido a que el vapor durante la destilación mantiene una relación constante benceno-agua, el punto de ebullición es de $64.4^{\circ}C$, en tanto que los puntos de ebullición de los otros azeótropos son más elevados y puesto que las muestras utili-

zadas en este trabajo son biológicas y sensibles a la descomposición a altas temperaturas, esto es una ventaja. El benceno es producido a partir del petróleo y por consiguiente no contiene tritio, además de que el intercambio isotópico entre el benceno y el agua es mínimo (83). El porcentaje de agua en este azeótropo en la fase de vapor es de 8.9% comparado con el 20.2 y el 40.0% en el tolueno y el xileno respectivamente, por ello requiere de un mayor tiempo de destilación. El porcentaje de agua en el benceno destilado es de 0.06% en tanto que en la capa acuosa es de 99.94%, lo cual asegura una buena separación.

Técnica de separación.- La destilación azeotrópica se efectuó en el equipo que se muestra en la figura (9). Las muestras de maíz se colocan en el matraz A y se cubren con benceno anhidro. Se calienta a ebullición utilizando la manta de calentamiento E, el azeótropo se condensa en el refrigerante C y el agua se separa en la trampa tipo Barret B; la ebullición se continúa hasta que el nivel del agua en la trampa se mantiene constante.

Un mililitro del agua obtenida se coloca en un portamuestras de polietileno y se agregan 10ml de solución centelladora para la medición del tritio.

El líquido de centelleo usado en estas determinaciones fué tanto el S0-XI de la casa Fisher como un centellador preparado en el laboratorio (inciso G de este mismo capítulo).

F.- Determinación del tritio ligado.

Al tritio utilizado por la planta para formar compuestos orgánicos se le da el nombre en este trabajo de tritio ligado.

Para determinar el tritio ligado en el endospermo, embrión, cascarilla, almidón, proteínas y fibra es necesario convertir el tritio ligado a estos compuestos a una forma que sea compatible con el líquido de centelleo. Los métodos más comunes son la oxidación de la muestra o su disolución.

El primer método, el de oxidación, consiste en tratar de convertir mediante una combustión en atmósfera de oxígeno todo el carbono e hidrógeno presente en la muestra en bióxido de carbono y

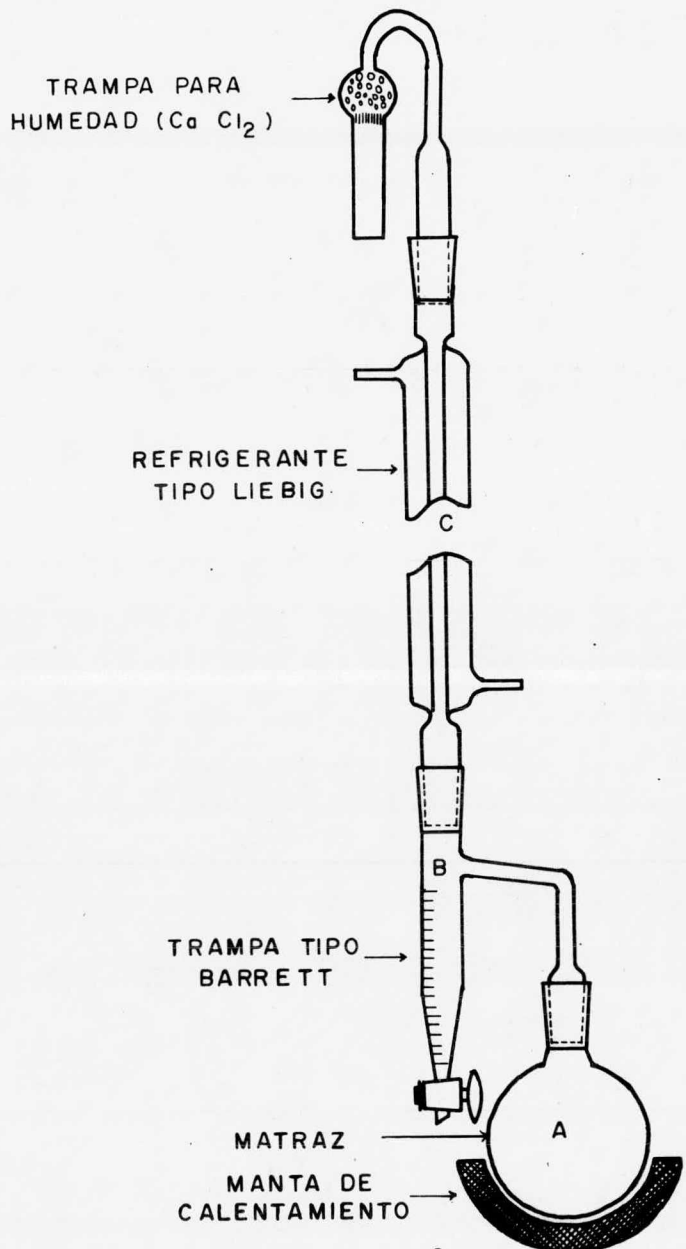


FIG 9

EQUIPO PARA LA DESTILACION A ZEOTROPICA

agua, de este modo el tritio ligado a las diferentes substancias puede ser medido como HTO. Se han desarrollado técnicas específicas para lograr este objetivo en las que se distinguen dos categorías: oxidación húmeda y combustión seca. En el primer caso hay que digerir la muestra mediante el uso de oxidantes fuertes y clarificar posteriormente la solución formada para reducir la extinción producida tanto por la coloración como por los residuos de agentes oxidantes. Una alícuota de esta solución puede tomarse para la determinación del tritio. Sin embargo, la oxidación húmeda no es un método recomendable para un análisis que requiera precisión y sensibilidad o para muestras de baja actividad ya que presenta considerables pérdidas de tritio, los residuos de agentes oxidantes pueden provocar quimioluminiscencia durante la determinación y es necesario agregar reactivos hidrogenados a la muestra.

El método de oxidación seca se basa en la combustión de la muestra en una atmósfera de oxígeno, este método fue desarrollado en el laboratorio para la realización de este trabajo y es una modificación del de Schöniger (84).

El equipo para la oxidación seca (fig.10) consistió de un matraz Kitasato A de 2 litros conectado a través de una llave de paso B con un manómetro de mercurio.

El matraz se cierra con un tapón de hule C que forma el sistema de combustión propiamente dicho, el tapón de hule C contiene dos conductores de cobre del No. 12 conectados a una canatilla portamuestras formada por 25 vueltas de alambre nicromel del No. 20 que funciona como una resistencia. La canatilla utiliza aproximadamente 90 cm de alambre, cuyo costo permite desecharla después de cada combustión evitando así una posible contaminación cruzada.

En la parte superior del sistema de combustión se encuentra la llave de paso D que une el matraz de combustión con el sistema de vacío y el tanque de oxígeno.

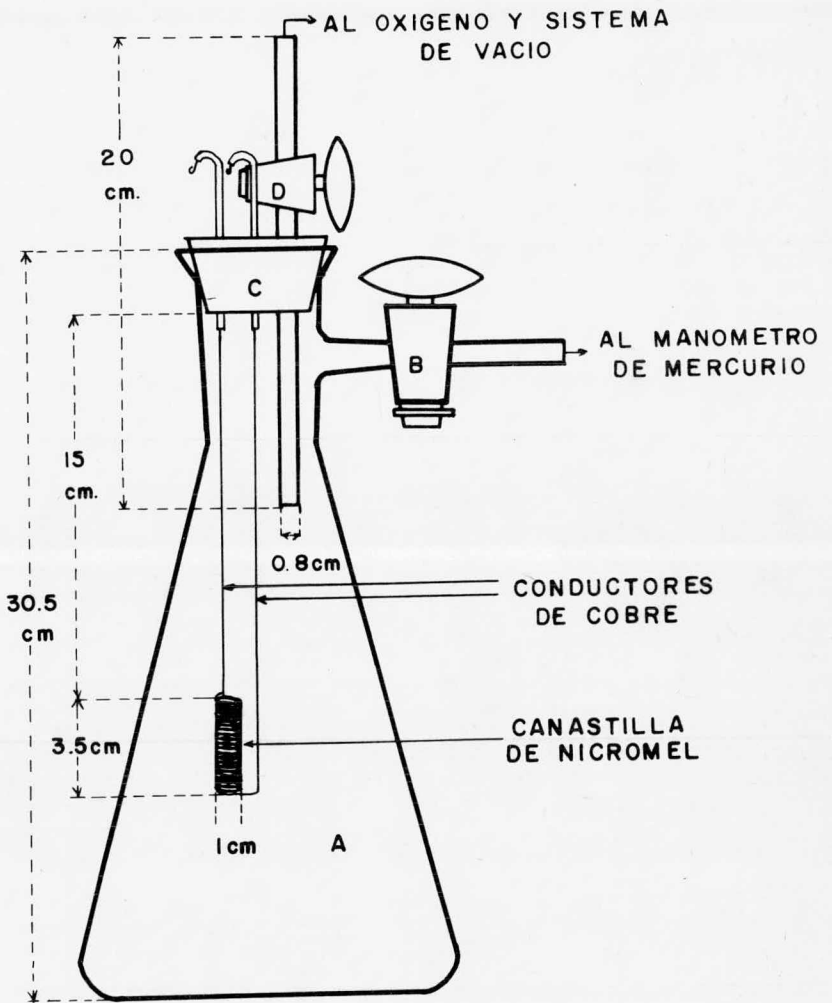


Fig. 10

MATRAZ DE OXIDACION

Técnica de oxidación.

- 1.- Las muestras obtenidas de las distintas separaciones se secan con lámparas de rayos infrarrojos durante 30 minutos.
- 2.- Se pesan con exactitud entre 100 y 200 mg de la muestra en media hoja de papel para lentes, este papel no produce extinción química, es de fácil combustión y permite un pesado rápido.
- 3.- El papel se dobla envolviendo la muestra y se sella utilizando cemento "Duco" (Dupont).
- 4.- La muestra se coloca en el sistema de combustión, se introduce en el matraz y se presiona el tapón hasta conseguir un cierre hermético.
- 5.- Se hace vacío en el matraz y se inyecta oxígeno hasta una presión ligeramente mayor que la atmosférica (en el laboratorio se hizo un vacío de 13 cm de Hg y se oxidó la muestra en una presión de oxígeno de 2.5 cm de Hg).
- 6.- El matraz se introduce en la cámara de seguridad (Fig.11) y se conectan los conductores al suministro de corriente eléctrica a través de un reóstato "Controvac".
- 7.- Se aumenta el voltaje paulatinamente hasta que se inicia la combustión de la muestra.
- 8.- Terminada la combustión, se saca el matraz de la cámara de seguridad y se coloca en un baño de salmuera durante 45 minutos para que el vapor de agua producido en la com bustión se condense en las paredes del matraz.
- 9.- El agua condensada se recoge al abrigo de la luz con 15ml de solución centelladora, se deja reposar durante 30 minutos para que la solución centelladora baje al fondo.
- 10.- Se recogen 11 ml de la muestra-centellador medidos con exactitud y se colocan en un porta-muestras de plástico para la determinación del tritio.

El contenido de tritio de las muestras de grasa fué medido tanto por oxidación como por disolución directa de las mismas en el centellador.

En el primer caso, la oxidación se logró empapando un pequeño

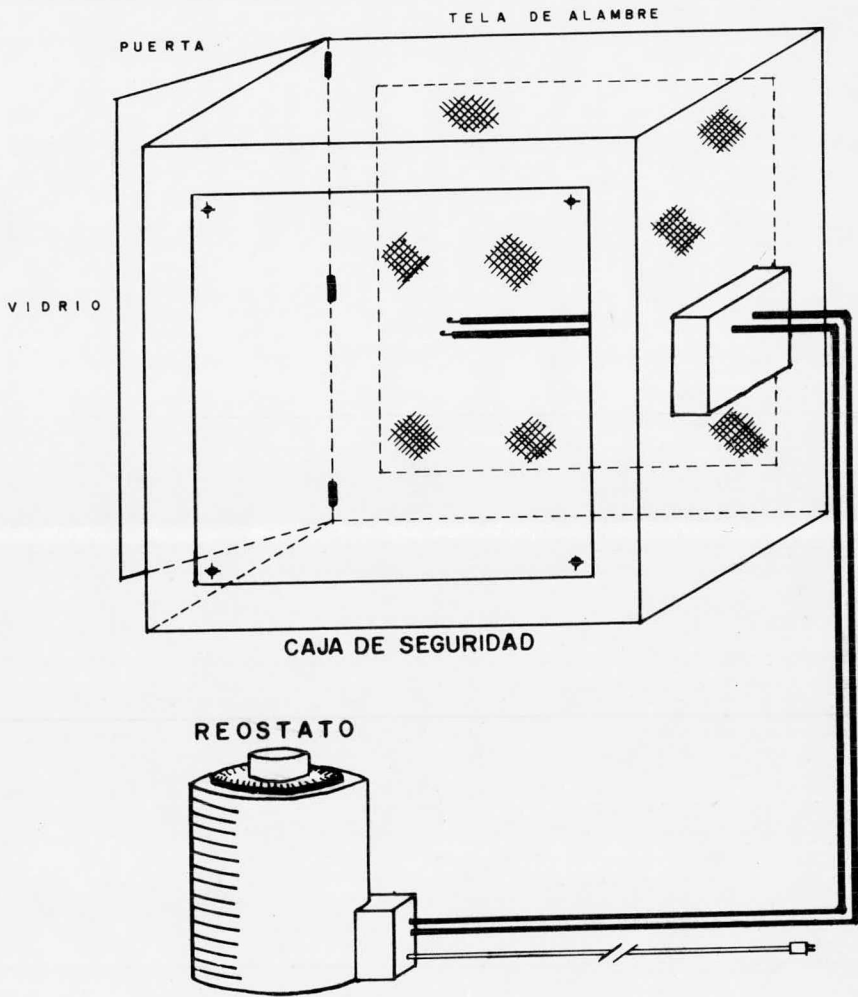


Fig. 11

EQUIPO PARA LA INCINERACION DE LA
MUESTRA

trozo de algodón en la muestra de grasa y pesando por diferencia la grasa absorbida, la oxidación se efectuó por el método ya descrito. Sin embargo por este método la combustión lograda es incompleta y produce mucho humo el cual entorpece la medición del tritio.

En el segundo caso, las grasas también fueron medidas por disolución de las mismas en el centellador, para este caso fué necesario corregir la medición por estándar interno.

En todos los casos, cuando la mezcla muestra-centellador adquiere un color amarillento es necesario hacer una corrección por extinción debida a la coloración.

G.- Medición del tritio por centelleo líquido.

La medición del tritio se realizó por el método de centelleo líquido, que satisface las condiciones requeridas en este trabajo.

El equipo empleado para la determinación fué el espectrómetro Beckman LS-150 para cien muestras, con un sistema especialmente diseñado para determinar analíticamente tritio y carbono ¹⁴, opera a temperatura ambiente y los resultados los entrega con un doble nivel de confianza en un teletipo.

Las muestras a contar se colocan en un portamuestras de plástico con el objeto de disminuir el fondo.

En cada grupo de diez muestras para determinar el tritio se incluyeron una muestra blanco y una muestra estándar.

Los estándares para la determinación de tritio en agua libre se prepararon mezclando un mililitro de agua tritiada con una actividad de 1830 dpm en 10 ml de centellador, en tanto que las muestras estándares para las muestras de tritio ligado fueron preparadas mezclando 0.05 ml de agua tritiada con una actividad de 915 dpm en 10 ml de centellador líquido. Las muestras blanco fueron preparadas de la misma forma, sólo que se empleó agua destilada.

El líquido de centelleo se preparó en el laboratorio disolviendo 6 g de PPO, 1.5 g de bis-MSB y 120 g de naftaleno en un litro de dioxano, utilizando un agitador magnético para una completa disolución. Para eliminar el aire que se introduce en la solución du

rante su preparación se burbujeó nitrógeno durante cinco minutos.

Medición del factor de extinción.

Las muestras de grasa obtenidas tanto por disolución directa como por oxidación y las muestras de tritio ligado que presentaron coloración al incorporarlas al centellador fueron corregidas por extinción aplicando el método del estándar interno (85).

El contenido del tritio en las muestras de agua libre se calculó aplicando la fórmula:

$$\text{pCi/ml} = \frac{\text{cpm} - \text{fondo}}{(\text{E}) (\text{V})} \quad (2.22)$$

En tanto que para las muestras de tritio ligado se empleó la fórmula:

$$\text{pCi/g} = \frac{\text{cpm} - \text{fondo}}{(\text{E}) (\text{W}) (\text{Q}) (\text{F}) (\text{D}) (\text{A/B})} \quad (2.22)$$

donde:

cpm = cuentas por minuto de la muestra

fondo = cuentas por minuto de la muestra blanco

V = volumen de agua usada en la determinación

W = peso de la muestra en gramos

E = eficiencia de la determinación

Q = factor de extinción

F = eficiencia de la oxidación

D = factor de decaimiento

A = alícuota de centellador tomada en la determinación

B = volumen de centellador empleado para recuperar la muestra

2.22 = factor de conversión de dps a pCi.

La eficiencia E de la determinación del número de cuentas está definida como:

$$E = \frac{\text{cpm}_s - \text{fondo}}{\text{dpm}}$$

donde:

cpm_s = cuentas por minuto del estándar

dpm = desintegraciones por minuto del estándar.

Para el caso de las muestras corregidas por estándar interno, el factor Q de extinción se calculó de la siguiente forma:

$$Q = \frac{E_{m+s}}{E_s}$$

donde:

E_{m+s} = es la eficiencia de la determinación para la muestra dada a la cual se le ha incorporado el estándar interno y viene dada por:

$$E_{m+s} = \frac{cpm_{m+s} - cpm_m}{dpm_s}$$

donde:

cpm_{m+s} = cuentas por minuto de la muestra después de haber incorporado el estándar interno.

cpm_m = cuentas por minuto de la muestra antes de agregar el estándar

dpm_s = desintegraciones por minuto del estándar interno agregado.

La E_s de la ecuación de Q es la eficiencia de la determinación para el estándar interno únicamente definida como:

$$E_s = \frac{cpm_s}{dpm_s}$$

donde:

cpm_s = cuentas por minuto de la muestra con el estándar interno y centellador únicamente.

Por lo tanto substituyendo ambas eficiencias en la ecuación para Q obtenemos:

$$Q = \frac{cpm_{m+s} - cpm_m}{cpm_s}$$

El factor de decaimiento D puede calcularse empleando la ecuación (5) del capítulo I. Sin embargo, para el presente trabajo este factor está muy cercano a la unidad debido a que el muestreo del maíz se realizó en el mes de octubre de 1975 y el análisis de tri-

tio en el período abril-junio de 1976, siendo éste un lapso de tiempo muy corto en comparación con la vida media del tritio que es de 12.35 años.

La eficiencia de oxidación F fué obtenida aplicando el método ya descrito a muestras de intercomparación de almidón, leche, papa, chícharo, pasto y alfalfa con contenido de tritio conocido provenientes del laboratorio del Centro Nuclear de Mol, Bélgica, que es miembro del programa de tritio del OIEA.

Cinco muestras provenientes de las muestras de intercomparación se oxidaron y analizaron por el sistema empleado en el desarrollo experimental de esta tesis y de esta forma se obtuvo un factor de recuperación para cada grupo de muestras, se tomaron los promedios de cada una de las muestras intercomparadas y con estos promedios se obtuvo un nuevo promedio el cual fué tomado como eficiencia de oxidación F.

CAPITULO V
RESULTADOS Y CONCLUSIONES

A).- Resultados.

1) El contenido de los principales componentes del maíz híbrido H-309 en base húmeda, se obtuvo con los métodos de análisis ya expuestos y son los siguientes:

	%
Agua libre (Humedad)	10.5
Grasa cruda	6.1
Proteínas	9.3
Fibra cruda	3.5
Carbohidratos totales	68.3
Cenizas	2.3

Los valores calculados en base seca indicados en la tabla 1, muestran una aceptable concordancia con aquellos obtenidos de la bibliografía, a pesar de que no se refieren explícitamente a la variedad de maíz que se utilizó en este estudio.

El contenido de tritio determinado en agua libre fué de 7.35 ± 0.8 pCi/ml., en tanto que el de tritio ligado a compuestos orgánicos determinado como materia seca total fue de 64.29 ± 13.61 pCi/g.

Los valores de tritio orgánico encontrados en las diferentes estructuras del maíz fueron:

Endospermo	47.50 ± 12.31 pCi/g
Embrión	59.29 ± 14.93 pCi/g
Cascarilla	43.36 ± 7.22 pCi/g

El tritio ligado a los diferentes compuestos de interés biológico fué el siguiente:

Proteína	63.62 ± 9.96 pCi/g
Grasa cruda	87.23 ± 3.23 pCi/g
Almidón	39.23 ± 10.65 pCi/g
Fibra	38.23 ± 8.74 pCi/g

Estos resultados son los promedios de 12 determinaciones y el error estadístico señalado en todos los casos se expresa con un 96% de nivel de confianza.

T A B L A 1

COMPUESTOS	% en base seca								
	Resultados en este trabajo	Maíz dulce (86)	Maíz amarillo (87)	Maíz blanco (88)	Maíz negro (89)	Maíz rojo (90)	Maíz híbrido blanco (91)	Maíz híbrido amarillo (92)	Maíz híbrido amarillo (93)
Materia seca total	89.5	90.7	91.79	86.42	86.27	84.32	87.23	90.89	91.53
Grasas	6.81	7.9	5.46	2.54	1.50	3.43	3.69	5.89	7.11
Proteínas	10.39	11.5	10.43	8.19	7.30	11.13	9.09	7.63	8.51
Fibra	3.91	2.3	2.64	3.14	1.90	5.95	4.55	12.53	3.18
Cenizas	2.56	1.8	2.09	3.14	1.76	3.71	2.22	1.79	2.05
Carbohidratos	76.31	76.5	79.38	80.40	87.54	75.78	80.45	72.16	79.10

La eficiencia de la determinación del tritio por centelleo líquido obtenida en este trabajo varió del 40 al 45%.

El error en la determinación de la actividad de las muestras varió del 3 al 7%.

La eficiencia de oxidación para el método de oxidación fué de $83 \pm 2.5\%$

B).- Conclusiones

1) De los métodos.-

El método utilizado durante la contaminación del plantío de maíz fué bueno debido a que se obtuvieron resultados estadísticamente compatibles tanto en tritio en agua libre como en tritio unido a estructuras y compuestos orgánicos.

Los resultados del análisis son similares a los reportados para otras variedades de maíz lo que indica que los métodos de análisis empleados son aceptables.

Debido a que los datos obtenidos, de estructuras, y de compuestos son compatibles, implican que los métodos de separación empleados fueron buenos.

La destilación azeotrópica empleada para la separación del agua libre, fué muy eficiente ya que al compararla con el método de secado en la estufa se obtuvieron resultados similares.

El método de oxidación empleado para la determinación del tritio ligado a compuestos orgánicos, presenta grandes ventajas para el tratamiento de un gran número de muestras, no emplea equipo complicado y costoso y la eficiencia de oxidación es de 83% con variaciones muy bajas (2.5%).

A pesar de que las partículas beta del tritio son poco energéticas y las actividades medidas en este trabajo son bajas, por el método de centelleo líquido se lograron eficiencias en la medición de la actividad del 40 al 45% usando el líquido de centelleo basado en la mezcla dioxano-naftaleno. Estas eficiencias son elevadas dado que se trata de muestras acuosas.

El uso de portamuestras de polietileno también contribuyó a mejorar la medición por centelleo líquido, debido a que con ellos se lograron fondos de 9 a 11 cpm en tanto que usando portamuestras de vidrio el fondo que se obtuvo fué de 18 a 20 cpm. Indudablemente este cambio mejoró la estadística de la determinación.

El burbujeo de N_2 en el líquido de centelleo después de su preparación mejoró su eficiencia, lo mismo que el guardar y extraer las muestras al abrigo de la luz disminuyó considerablemente la fosfoluminiscencia.

En lo referente al factor de extinción determinado por estandarización interna, también fué un método apropiado, ya que su evaluación por otras técnicas no es confiable, como consecuencia tanto de la baja energía de la radiación del tritio como de la baja actividad que presentan las muestras estudiadas en este trabajo.

Esta determinación se mejoró empleando un estándar interno de una actividad mucho mayor que la de la muestra.

2) De los resultados.

De los resultados obtenidos en la parte experimental de este trabajo podemos establecer que el tritio introducido al sistema como HT0, fué incorporado por la planta de maíz a pesar de que el tritio tiene una masa tres veces mayor que la del hidrógeno normal, lo que demuestra que su conducta dentro del ecosistema estudiado es parecida a la del protio.

La presencia de tritio, ligado a compuestos orgánicos o como HT0, en el grano de maíz, demuestra que este radioisótopo es absorbido del medio e incorporado por la planta en los diferentes compuestos que sintetiza. Este hecho implica que el tritio, como HT0, que se encuentra en las aguas superficiales, provenientes tanto de procesos naturales como el liberado a la biósfera por el hombre, será incorporado por las plantas de maíz, por tanto, pasará a formar parte de la cadena alimentaria humana contribuyendo de esta forma a aumentar la radiación interna a la que está expuesto el hombre. Como la cantidad de tritio liberado a la atmósfera se incrementa día a día, es de esperarse que el tritio que entre a la

cadena alimentaria será mayor, con lo que también la radiación interna que reciba el hombre irá en aumento.

Un resultado interesante de este trabajo es que la cantidad de tritio ligado a los diferentes compuestos orgánicos es mayor que el encontrado en agua libre, esto agrava el problema del cálculo de la radiación interna recibida por el hombre, pues si bien la vida media biológica del agua tritiada en el organismo humano es conocida, se desconoce por completo, no sólo el metabolismo del tritio ligado a los diferentes compuestos biológicos, sino también su vida media biológica.

En los compuestos de interés biológico separados y analizados se encontró un contenido de tritio mayor en grasas y proteínas respecto a todos los demás, lo que implica que el tritio no es incorporado en igual proporción en todos los compuestos y que existen preferencias en su incorporación.

Esta incorporación puede realizarse posiblemente por intercambio isotópico con átomos de hidrógeno lábiles o por incorporación directa durante la síntesis de esos compuestos en posiciones no intercambiables.

El hecho de haber encontrado diferencias significativas en cada una de las fracciones separadas indica que el tritio no está homogéneamente distribuido en el grano.

El grano de maíz cuando ha sido separado del resto de la planta forma un sistema independiente y el tritio contenido en él decaerá con su vida media radiactiva de 12.35 años independientemente de su vida media biológica.

El metabolismo del tritio como HTO en el hombre, ha sido amplimente estudiado habiéndose fijado una vida media biológica de 8 días (93). La vida media biológica del tritio en compuestos biológicos tritiados se desconoce por completo y se supone que variará con el tipo de compuesto, consecuentemente no se ha fijado aún el valor correspondiente a grasas y proteínas.

Como ha quedado demostrado en este trabajo, una contaminación aguda en un cultivo de maíz provoca una mayor fijación de tritio en grasas y proteínas: el estudio del metabolismo de estos compuestos

tritiados es importante para establecer el factor de transporte entre la contaminación ambiental y la dosis en el hombre provocada por el tritio.

Bibliografía

- (1).- Reporte del Comité Científico de las Naciones Unidas sobre Efectos de la Radiación Atómica, Vol. II, pág. 29.
- (2).- Ibidem (1) pp (61), pág. 29.
- (3).- Ibidem (1) pp (166), pág. 41.
- (4).- Stanley, M. G., "Environmental Protection Agency's Role in Environmental Tritium" en "Tritium" edt. por. Moghissi, A. y Carter, M. W., Ed., Messenger Graphics. Las Vegas, Nevada, pág. 12 (1973).
- (5).- Ibidem (1) Table 55, pág. 100.
- (6).- Lehninger, A. L. "Bioquímica" Cap I, pág. 19, Ed. Omega, Barcelona (1972).
- (7).- Libby, W. F. "History of Tritium" en "Tritium" Edt. por Moghissi, A. y Carter M.W., Ed. Messenger Graphics. Las Vegas, Nevada, pág. 3-12 (1973).
- (8).- Evans, E. A. "Tritium and its Compounds" Edt. Butterworths, Londres pág. 4 (1966).
- (9).- Ibidem (8) pág. 3.
- (10).- Goldhaber, M., Phys. Rev. 58 pág. 574 (1940).
- (11).- Evans, E. A., "Tritium and its Compounds" Edt. Butterworths, Londres pág. 2 (1966).
- (12).- Ibidem (13) pág. 30.
- (13).- Moghissi, A.A. "Certain Subjects of General Interest on Tritium, Half - Life and Nomenclature", en "Tritium" Edt. por Moghissi, A. y Carter, M. W., Ed. Messenger Graphics, Las Vegas, Nevada pág. 28 (1973).
- (14).- Overman, R. T. and Crack, H. M., "Radioisotope Techniques". Mc. Graw Hill Book Co., pág. 95 (1966).
- (15).- Evans, E. A. "Tritium and its Compounds " Ed. Butterworths, Londres, pág. 2 (1966).
- (16).- Loyola, Victor M., Apuntes sobre Química Nuclear y Radioquímica, pág. 29.
- (17).- Faltings, V. and Harteck, 1o. Naturf. pág. 438 (1950).
- (18).- Libby, W. F. et al, Science, 113, pág. 1 (1951).

- (19).- Libby, W. F. "Scientific American " 190, pág. 38 (1954).
- (20).- Ibidem (8) pág. 4.
- (21).- Reporte del Comité Científico de las Naciones Unidas. Vol II, pág. 29.
- (22).- Teegarden, B. J. "Cosmic-ray Production of Deuterium and Tritium in the Earth's Atmosphere". J. Geophys, 72, pág. 4863.
- (23).- Ibidem (8) pág. 5.
- (24).- Ibidem (1) pp (61) pág. 29
- (25).- Ibidem (1) pp (62) pág. 29
- (26).- Ibidem (1) pp (61) pág. 29
- (27).- Ibidem (1) pp (62) pág. 29
- (28).- Price, W. J., Nuclear Radiation Detection, Mc. Graw Hill, 2a. Ed., (1964). pág. 185.
- (29).- Bainbridge, A. E., Sandoval, P. and Suess, H. E., "Natural Tritium Measurements by Ethane Counting". Science 134, pág. 552.
- (30).- N C R P Report No 49 pág. 26 (1976).
- (31).- Ibidem (30) pág. 60.
- (32).- Ting, P. and Little, L. P. "Continuous Monitoring of Aqueous Tritium Activity" pág. 170, en "Tritium", Edt. por Moghissi, A. and Carter, M. W., Ed. Messenger Graphics, Las Vegas, Nevada (1973).
- (33).- Genty, et al. "Determination of Tritium in Analytical Chemistry Laboratory" pag. 170, en "Tritium", de Moghissi and Carter Ed. Messenger Graphics, Las Vegas, Nevada (1973).
- (34).- Ibidem (33) pág. 103-4.
- (35).- Hayes, F. N., "Liquid Scintillators: Attributes and Applications", Int. J. Appl. Rad. Isotopes, 1, pág. 46 (1956).
- (36).- Ibidem (35) pág. 48.
- (37).- Horrocks, D. L., "Measuring Tritium with Liquid Scintillation System" en "Tritium", Edt. por Moghissi, A. y Carter M. W., Ed. Messenger Graphics, Las Vegas, Nevada, pág. 144 (1973).
- (38).- Ibidem (30) pág. 32.
- (39).- Kallmann, H. Furtst, M., "Increasing Fluorescence Efficiency of Liquid Scintillation Solutions" Nucleonics 13, pág. 58 (1955).
- (40).- Moghissi, A. A., Kelley, H. L., Regnior, J. E. and Carter, M. W.

- "Low- Level Counting by Liquid Scintillation - I "Tritium Measurements Homogeneous Systems" Int. J. Appl. Radat. and Isotopes, 20, pág. 145 (1969).
- (41).- Ibidem (30) pág. 34.
- (42).- Lieberman R. and Moghissi A. A. "Low-level Counting by Liquid Scintillation - II Application of Emulsions in Tritium Counting" Int. J. Appl. Radat. and Isotopes, 21, pág. 319 (1970).
- (43).- Patterson, M. S. and Greene R. C., "Measurement of Low Energy Beta-emitters in Aqueous Solution by Liquid Scintillation Counting of Emulsions" Anal. Chem. 37, pág. 854 (1965).
- (44a) Horrocks D. L., "Applications fo Liquid Scintillation Counting" Cap. III pág. 48 Academic Press, New York (1974).
- (44b) Bush, E. T., "Relative Efficiency of a New Liquid Scintillation Fluor, p-bis (o-methylstyryl)-bencene" Anal. Chem. 38, pag. 1241, (1966).
- (45).- Moghissi, A. A. and Carter, M. W., "Internal Standards with Identical System Properties for Determination of Liquid Scintillation Counting Efficiency" Anal. Chem. 40, pág. 812 (1968).
- (46).- N C R P Report No. 47, "Tritium Measurement Techniques" pág 35 (1976).
- (47).- Ibidem (46) pág. 35
- (48).- Ibidem (40) pág. 146.
- (49).- Ibidem (30) pág. 36.
- (50).- Ibidem (44a) pág. 69.
- (51).- Tanarro. A., Instrumentación Nuclear, Ed. JEN, Madrid, pág. 158 (1970).
- (52).- Siegbann, K. "Beta and Gama Ray Spectroscopy", Amsterdam North Holland, pág. 86 (1955).
- (53).- Ibidem (37) pág. 150.
- (54).- Ibidem (44a) pág. 210-225.
- (55).- Ibidem (35) pág. 48.
- (56).- Díaz del Pino Alfonso, "El Maíz", pág. 28, Ed. Ediciones Agrícolas, (1964).
- (57).- Ibidem (56) pág. 17.
- (58).- Weiss, G. M., y Sass, E. J., "El Hilo de la Vida a Través de

- las semillas" en "Semillas", Edt. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos," Ed. CECSA, pág. 130 (1964).
- (59).- Ibidem (56) pág. 20.
- (60).- Ruiz, M., "Tratado Elemental de Botánica", Edt. Porrúa, S. A., México, D. F., pág. 288.
- (61).- Cronquist, A., Introducción a la Botánica, Cap. 29, pág. 528, Ed. CECSA. (1974).
- (62).- Simon and Schuster "Plant Life", Scientific American book, pág. 237.
- (63).- Gordon, W. W., "Principles of Biology". Harper and Row Publishers, N. Y. pág. 198 (1964).
- (64).- Ibidem (58) pág. 348.
- (65).- Jirgensons, B., "Natural Organic Macromolecules" pág. 142, Pergamon Press (1962).
- (66).- Crocker, E. S., and Bartom, A., "Physiology of Seeds" pág. 27, Pergamon Press (1960).
- (67).- Wall, J. S., "Cereal Protein" pág. 318, en "Proteins an their Reactions" Academic Press (1964).
- (68).- Wkistler and Paschal, "Starch: Chemistry and Technology", pág; 31 Academic Press (1960).
- (69).- Ibidem (66), pág. 23.
- (70).- Bailey, C. H., "The Constituents of Wheat and Wheat Products" pág. 232, Reinhold Publ. Corp., (1944).
- (71).- Bravo, Armando, (Comunicación personal) Práctica "Harinas" del Instituto Nacional de Nutrición, S S A.
- (72).- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), (official Methods of Analysis), 10a. Ed. (1965), método 13006.
- (73).- Ibidem 72, Método AOAC 13004.
- (74).- Rutn, F. I., Izhaki, and Gill, D. M., "A Micro-Biuret Method for Proteins" Analytical Biochemistry, 9, No. 4, pág. 410 (1964).
- (75).- Ibidem 72, Método AOAC 13067.
- (76).- Ibidem 72, Método AOAC 13020.
- (77).- Ibidem 72, Método AOAC 13028.
- (78).- Foster, J. F., Yang, J., "Extraction and Electrophoretic Analysis of the Proteins of Corn", Cereal Chem., 27, 477-87, (1950).

- (79).- Woff, M. J., Buzan, C. L., Mac Mastors, M. M., "Structure of the Mature Corn Kernel, III, Cereal Chem. 29, 349-61 (1952).
- (80).- Nagy, D., Widleim, W., "Factors Affecting the Solubility of Corn Proteins", Cereal Chem. 18, pág. 514-23 (1941).
- (81).- Mertz, E. T., and Bressani, R., "Studies on Corn Proteins I" Cereal Chem., pág. 63-69, (1957).
- (82).- Ing. Agr. Bravo, Armando (Comunicación personal) Instituto Nacional de Nutrición, SSA.
- (83).- Moghissi, A. A., Bretthauer, E. W. and Compton, E. H. "Separation of Water from Biological and Enviromental Samples for Tritium Analysis" Anal. Chem. 45, pág. 1565 (1973).
- (84).- Schöniger, W. "a Microanalysis Method of Determination Halogen in Organic Compounds" Microchem. Acta, pág. 123 (1955):
- (85).- Horrocks D. L., "Applications of Liquid Scintillation Counting" Cap III pag 48 Academic Press, New York, (1974).
- (86).- Crocker and Bairon, "Physiology of Seeds" Pergamon Press, pág. 23 (1960).
- (87).- (92).- Q.F.B. Tellez, Guadalupe (Comunicación personal) Departamento de Nutrición animal y Bioquímica del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.
- (93).- I C R P (International Comission on Radiological Protection) Report II, Pergamon Press, N. Y., Tabla 12, pág. 152 (1959).