

14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE HIDROCARBUROS AROMATICOS
POLICICLICOS (HAP) EN MUESTRAS DE OSTIONES
(*Crassostrea virginica*) COMERCIALES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
PAVEL CASTILLO URUETA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Jurado Asignado:

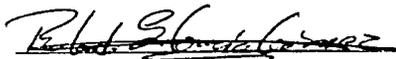
Presidente	Prof. ERNESTINA CERVERA FLORES
Vocal	Prof. LUCÍA CORNEJO BARRERA
Secretario	Prof. ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ
1er suplente	Prof. LUIS MEDINA TORRES
2o suplente	Prof. MA. DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ

Lugar donde se realizó la investigación:

- (I) Laboratorio E-301 del Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (PIQAYQA) de la Facultad de Química de la UNAM
- (II) Laboratorio de Espectroscopías del Laboratorio Central IMP

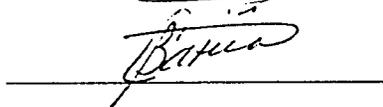
Asesor del tema

M. en C. Rolando S. García Gómez



Supervisión Técnica (UNAM)

Dra-Ing. Carmen Durán Domínguez



Sustentante

Pável Castillo Urueta



Agradecimiento especial

Al Instituto Mexicano del Petróleo por el apoyo económico brindado durante la realización de esta tesis

A la Q. Victoria Aguilar Iris por su asesoría y revisión del trabajo experimental y escrito de esta investigación

Agradecimientos

A mis padres, por haberme formado y apoyado en todo momento. Les debo todo lo que soy

Al Instituto Mexicano del Petróleo por el apoyo económico recibido durante la realización de la tesis

Al M. en C. Rolando García, por ser un excelente asesor y ante todo un gran amigo, ¿Qué más puedo decir?

A la Dra-Ing. Carmen Duran de Bazúa por su apoyo y su rápida revisión del manuscrito final

A la Q. Victoria Aguilar Iris por la asesoría recibida durante la parte experimental y durante la escritura de la misma

Al personal del laboratorio de espectroscopías del IMP: Biol. Marcela Rutz F, Tec. Jorge Cedillo por haberme apoyado durante el trabajo en el laboratorio, por ser buenos compañeros y grandes amigos por sus risas y sus chistes

Al personal de Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, en especial a M. en C. Marisela Bernal, Lorena Nuñez, Sra. Irene, Sra. Julia

A Gladys, por todo su apoyo, amor y comprensión, ¿qué más puedo pedir?

A mi hermano y amigos (TRINCA): Sigfrido, Jorge, Osvaldo, Jaime, Ricardo por las aventuras y desventuras, por las risas y lagrimas; y sobre todo por lo que nos falta por recorrer juntos

A mis amigos y compañeros de trabajo: Gerardo, Viridiana, Francisco, Minerva, Alejandra*, Miguelito, José, Nora, Marielena por su confianza y apoyo. *Gracias por apoyarme en los momentos difíciles*

A Inés Díaz por todos los momentos que vivimos juntos

A todos los profesores que me formaron durante la carrera, en especial a: IQ. Adela Castillejos Salazar

“Lo máspreciado que posee el hombre es la vida. Se le otorga sólo una vez, y hay que vivirla de forma que no se sienta un dolor torturante por los años pasados en vano, para que no queme la vergüenza por el ayer vil y mezquino, y para que al morir se pueda exclamar: ¡ toda la vida y todas las fuerzas han sido entregadas a lo más hermoso del mundo, a la lucha por la liberación de la humanidad! Y hay que apresurarse a vivir. Pues una enfermedad estúpida o cualquier casualidad trágica puede cortar el hilo de la existencia”

Nikolai Ostrovski *“Así se templo el acero”*

En memoria de:

Profesora Lucia Rico Chávez

Profesor Wilfrido Urueta Carrillo

Rodolfo Díaz Mendoza

ÍNDICE GENERAL

	página
RESUMEN	1
CAPÍTULO I. PROBLEMÁTICA	2
1.1 El agua como componente del ambiente	2
1.2 Problemática	2
1.3 Lagunas costeras	4
1.4 Características de los ostiones (<i>Crassostrea virginica</i>)	6
1.4.1 Anatomía de los ostiones <i>Crassostrea virginica</i>	8
1.4.2 Desarrollo larvario	10
1.4.3 Característica del hábitat	11
1.5 Introducción de los hidrocarburos en la cadena alimenticia	11
1.6 Degradación metabólica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por organismos marinos	12
1.7 Degradación metabólica de HAP por hongos y bacterias acuáticas	14
1.8 Principales fuentes de hidrocarburos	15
1.9 Destino de los hidrocarburos	16
1.10 Clasificación de los hidrocarburos	17
1.10.1 Hidrocarburos alifáticos	17
1.10.2 Hidrocarburos alicíclicos	19
1.10.3 Hidrocarburos aromáticos	19
1.11 Reacciones químicas que presentan los hidrocarburos aromáticos policíclicos	20
1.12 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas	21
CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS ANALÍTICOS	24
2.1 Cromatografía de gases	24
2.1.1 Fundamentos	24
2.1.2 Sistema de introducción de muestra	24
2.1.3 Columna cromatográfica	25
2.1.4 Análisis cuantitativo	25
2.1.5 Análisis cualitativo	25
2.2 Espectrometría de infrarrojo	26
2.2.1 Fundamentos	26
2.2.2 Introducción de la muestra	27
2.3 Espectrometría de masas	28
2.3.1 Fundamentos	28
2.3.2 Introducción de la muestra	29
2.4 Cromatografía de gases / espectrometría de masas	30
2.4.1 Fundamentos	30
2.5 Espectrometría de fluorescencia	31
2.5.1 Fundamentos	31
2.5.2 Efecto de apagado ("Quenching")	32
2.5.3 Variante de síncronos de excitación	33

2.6 OBJETIVOS	35
2.6.1 Objetivo general	35
2.6.2 Objetivos particulares	36
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	37
3.1 Obtención y acondicionamiento de las muestras	38
3.1.1 Obtención de la muestra	38
3.1.2 Lavado	38
3.1.3 Molienda y homogeneización	38
3.1.4 Almacenamiento	38
3.2 Caracterización química de las muestras	39
3.3 Extracción de los hidrocarburos en las muestras	40
3.3.1 Extracción de hidrocarburos empleando el método UNEP-7	40
3.3.2 Extracción de hidrocarburos empleando el método EPA-3550b	40
3.4 Fraccionamiento de los hidrocarburos	41
3.5 Cuantificación de los hidrocarburos totales de petróleo por espectroscopia de infrarrojo	42
3.6 Determinaciones espectroscópicas de las muestras mediante IR	43
3.7 Determinación de los hidrocarburos aromáticos totales por espectroscopia de fluorescencia	43
3.8 Determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante cromatografía de gases / espectrometría de masas	44
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1 Caracterización química de ostiones	48
4.2 Espectros de IR de las fracciones cromatográficas	49
4.3 Determinación de los hidrocarburos totales de petróleo	51
4.4 Determinación de los hidrocarburos aromáticos totales	53
4.5 Evaluación de los HAP en la columna y en el sistema ostión-columna cromatográfica	54
4.6 Estudio de los HAP empleando cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) en las muestras de ostiones	57
4.7 Cromatogramas y espectros de masas en estándares y muestras	58
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
ANEXOS	
ANEXO A. Análisis químico	65

ANEXO B. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo	69
ANEXO C. Estudio de espectroscopía de infrarrojo de las fracciones cromatográficas de las muestras	70
ANEXO D. Estudio de fluorescencia e hidrocarburos aromáticos totales	74
ANEXO E. Curvas de calibración y parámetros empleados en CG/EM	79
ANEXO F. Cromatogramas y espectros de masas de estándares y Muestras	88
BIBLIOGRAFÍA	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Anatomía externa de los ostiones <i>Crassostrea virginica</i>	9
Figura 1.2 Anatomía interna del ostión <i>Crassostrea virginica</i>	10
Figura 1.3 Metabolismo del naftaleno por <i>Pseudomonas putida</i>	15
Figura 2.1 Componentes generales de un espectrómetro de Masas	30
Figura 2.2 Esquematación del proceso de fluorescencia	32
Figura 3.1 Análisis químico y elemental	39
Figura 3.2 Metodología	47
Figura 4.1 Espectros de IR de las 4 fracciones cromatográficas para una muestra extraída por sonicación	51
Figura 4.2 Espectros de fluorescencia de muestras de ostiones	54
Figura 4.3 Cromatograma de una mezcla de 8 estándares	59
Figura 4.4 Cromatograma de una muestra contaminada con 8 estándares en la cual no se identificó el naftaleno	60
Figura 4.5 Cromatograma de una muestra de ostión	60
Figura 4.6 Espectro de masas correspondiente al fenantreno identificado en una muestra de ostiones	61
Figura 4.7 Espectro de masas correspondiente al fluoranteno identificado en una muestra de ostiones	61
Figura 4.8 Espectro de masas correspondiente al benzo(a)pireno identificado en una muestra de ostiones	61
Figura B.1 Curva de calibración para hidrocarburos totales de petróleo	69
Figura C.1 Espectros de infrarrojo de las 4 fracciones correspondientes a una muestra de ostiones contaminada con estándares de HAP, extraída con sonicador	70
Figura C.2 Espectros de infrarrojo de las 4 fracciones correspondientes a una muestra de ostiones contaminada con estándares de HAP, extraída con soxhlet	71
Figura C.3 Espectros de infrarrojo de las 4 fracciones correspondientes a una muestra de ostiones, extraída con sonicador	72
Figura C.4 Espectros de infrarrojo de las 4 fracciones correspondientes a una muestra de ostiones, extraída con soxhlet	73
Figura D.1 Espectros de fluorescencia de las 4 fracciones de una muestra	74
Figura D.2 Espectros de fluorescencia de muestras de ostiones	74
Figura D.3 Espectros de 2 muestras extraídas por soxhlet M1, M2 y sonicación S1	75

Figura D.4	Espectros de 3 muestras: Roja Contaminada con pireno, azul muestra extraída en soxhlet, verde muestra extraída en sonicación	75
Figura D.5	Espectros de fluorescencia correspondientes a las fracciones cromatográficas de una muestra (MO-1) extraída mediante soxhlet	76
Figura D.6	Espectros de fluorescencia correspondientes a las fracciones de una muestra extraída por sonicación	76
Figura D.7	Curva de calibración para determinación de hidrocarburos aromáticos totales	77
Figura E.1	Estructuras de los 9 HAP en estudio	80
Figura E.2	Curva de calibración para el naftaleno	82
Figura E.3	Curva de calibración para el acenafteno	82
Figura E.4	Curva de calibración para el fluoreno	82
Figura E.5	Curva de calibración para el fluoranteno	83
Figura E.6	Curva de calibración para el fenantreno	83
Figura E.7	Curva de calibración para el pireno	83
Figura E.8	Curva de calibración para el criseno	84
Figura E.9	Curva de calibración para el benzo(a)pireno	84
Figura E.10	Curva de calibración para el dibenzo(a,h)antraceno	84
Figura E.11	Curva de calibración para el naftaleno (estudio en columnas)	85
Figura E.12	Curva de calibración para el acenafteno (estudio en columnas)	85
Figura E.13	Curva de calibración para el fluoreno (estudio en columnas)	85
Figura E.14	Curva de calibración para el fenantreno (estudio en columnas)	86
Figura E.15	Curva de calibración para el fluoranteno (estudio en columnas)	86
Figura E.16	Curva de calibración para el pireno (estudio en columnas)	86
Figura E.17	Curva de calibración para el criseno (estudio en columnas)	87
Figura E.18	Curva de calibración para el benzo(a)pireno (estudio en columnas)	87
Figura F.1	Cromatograma de una mezcla de 16 HAP 10 µg/ml	88
Figura F.2	Cromatograma de una mezcla de 8 estándares	89
Figura F.3	Cromatograma de una muestra contaminada con 8 estándares en la cual no se identificó el naftaleno	89
Figura F.4	Cromatograma de una muestra en estudio	90
Figura F.5	Espectro de masas correspondiente al fenantreno identificados en una muestra de ostiones	90
Figura F.6	Espectro de masas correspondiente al fluoranteno identificados en una muestra de ostiones	90
Figura F.7	Espectro de masas correspondiente al benzo(a)pireno identificado en una muestra de ostiones	91
Figura F.8	Espectro de masa correspondiente al estándar de naftaleno	91
Figura F.9	Espectro de masa correspondiente al estándar de acenafteno	92
Figura F.10	Espectro de masa correspondiente al estándar de fluoreno	92
Figura F.11	Espectro de masa correspondiente al estándar de fenantreno	93

Figura F.12	Espectro de masa correspondiente al estándar de fluoranteno	93
Figura F.13	Espectro de masa correspondiente al estándar de pireno	94
Figura F.14	Espectro de masa correspondiente al estándar de criseno	94
Figura F.15	Espectro de masa correspondiente al estándar de benzo(a)pireno	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Plantas petroquímicas en operación por entidad Federativa	4
Tabla 1.2 Producción pesquera en peso desembarcado según principales Especies	7
Tabla 1.3 Valor de la captura pesquera en peso desembarcado según entidad federativa	8
Tabla 1.4 Cantidades de algunos HAP más persistentes en sedimentos marinos	22
Tabla 1.5 Presiones de vapor de HAP representativos a 25°C	22
Tabla 1.6 Solubilidades de HAP en agua a 25°C	23
Tabla 1.7 Peso molecular, dosis letal promedio, actividad carcinogénica de algunos HAP	23
Tabla. 2.1 Longitudes de onda de emisión y excitación para algunos HAP	35
Tabla 3.1 Equipos empleados	37
Tabla 3.2 Reactivos empleados	37
Tabla 3.3 Comparación de las condiciones de extracción del método UNEP y el método EPA	41
Tabla 3.4 Sistema de elución de las muestras	42
Tabla 3.5 Condiciones de operación del cromatógrafo de gases	46
Tabla 3.6 Condiciones de operación para el detector de masas	46
Tabla 4.1 Análisis químico de la harina de ostión	48
Tabla 4.2 Valores de los hidrocarburos totales de petróleo en las muestras saponificadas y sin saponificar	53
Tabla 4.3 Valores de hidrocarburos aromáticos totales determinados en las muestras de ostiones por espectroscopía de fluorescencia	53
Tabla 4.4 Estudio de retención de los compuestos por los adsorbentes en la columna de separación cromatográfica	56
Tabla 4.5 Estudio de retención de los HAP por los ostiones - columna	56
Tabla 4.6 Valores de HAP determinados en las muestras	58
Tabla A.1 Análisis de los contenidos de C, H, y S en la harina de ostión	68
Tabla A.2 Contenido de proteína en la harina de ostión de acuerdo con los valores obtenidos del % de nitrógeno en el análisis elemental	68
Tabla B.1 Curva de calibración para hidrocarburos totales de petróleo empleando celda de 0.1 cm de paso óptico	69
Tabla D.1 Condiciones de operación del equipo de fluorescencia y valores de la curva de calibración	77
Tabla D.2 Valores de hidrocarburos aromáticos totales determinados en las muestras de ostiones por espectroscopía de fluorescencia	78
Tabla E.1 Condiciones de operación del cromatógrafo de gases	79
Tabla E.2 Condiciones de operación para el detector de masas	79
Tabla E.3 Iones moleculares y tiempos de retención de los 9 HAP en estudio	80

Tabla E.4 Datos para las curvas de calibración para los 9 HAP analizados en las muestras	81
Tabla F.1 Tiempos de retención, Ión molecular y abreviaturas de los 9 HAP en estudio	88

Abreviaciones empleadas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ACEN	Acenafeno
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos de EEUUA (Association of Official Analytical Chemists)
Apagado, efecto ("Quenching")	Disminución de la intensidad de fluorescencia por factores físicos y químicos
BaP	Benzo(a)pireno (Benz(a)pyrene)
CG	Cromatografía de gases
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CHR	Criseno (Chrysene)
DaA	Dibenzo(a,h)antraceno (Dibenz(a,h)anthracene)
EM	Espectrometría de masas
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency)
ESI (SIM)	Evaluación selectiva de iones (Selected ion monitoring)
eV	Electrón-volt
FLN	Fluoreno (Fluorene)
FLT	Fluoranteno (Fluoranthene)
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HAT	Hidrocarburos aromáticos totales
HHA	Hidrolasa para hidrocarburos aromáticos
HMW	Peso molecular elevado (High molecular weight)
HTP	Hidrocarburos totales de petróleo
IE	Impacto Electrónico
INEGI	Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática
INN	Instituto Nacional de Ciencias de la Nutrición "Salvador Zubirán"
IR	Espectroscopía de infrarrojo
LMW	Peso molecular bajo (Low molecular weight)
MFO	Oxidasa de función mixta (Mixed function oxidase)
NAP	Naftaleno (Naphthalene)
OFM	Oxigenasas de función mixta
PCB	Bifenilos policlorados (Polychlorinated byphenyls)
PEMEX	Petróleos Mexicanos
PHE	Fenantreno (Phenantrene)
PNUMA (UNEP)	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (United Nations Environmental Program)
PYR	Pireno (Pyrene)
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
"Septum"	Sello de teflón
UMA	Unidad de masa atómica
Veliger, estado	Fase de desarrollo de los ostiones

Resumen

El objetivo de este trabajo fue montar una metodología de extracción rápida y eficiente encaminada a la determinación y cuantificación de nueve hidrocarburos aromáticos policíclicos o HAP (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH, en inglés) en muestras de ostiones comerciales provenientes de la laguna de Tamiahua, Veracruz, México. La metodología de extracción fue propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de los EEUUA (Environmental Protection Agency, EPA-3550b) con el propósito de reducir el tiempo de análisis de las muestras así como mejorar los porcentajes de recuperación, en vez de emplearse el método tradicional propuesto por el Programa de la Organización de las Naciones Unidas para el Ambiente (United Nations Environment Program en inglés, UNEP-7), el cual se basa en extracción mediante equipo soxhlet. Los ostiones fueron adquiridos en el mercado de la Central de Abastos de la Ciudad de México y transportados al laboratorio en bolsas de plástico con hielo para evitar su descomposición. Los ostiones fueron liofilizados y las muestras se caracterizaron practicándoseles un análisis químico para conocer los porcentajes de humedad (6.96 ± 0.129), cenizas (11.25 ± 0.37), grasa cruda (5.052 ± 0.2076) y proteína cruda (40.64 ± 0.877). Mediante el estudio por espectroscopia en el infrarrojo (IR) no fue posible observar las bandas características para los HAP de interés en las muestras de ostiones, debido al gran contenido de material biogénico existente en ellos; sin embargo, al determinarse los hidrocarburos totales de petróleo mediante espectroscopia infrarroja (IR), se encontraron concentraciones que van desde 4.93 ± 0.169 ppm, hasta 6.249 ± 0.098 ppm, mientras que el contenido de hidrocarburos aromáticos totales determinados por espectroscopia de fluorescencia, arrojaron valores que oscilan desde 2.399 ± 0.011 ppm, hasta 4.572 ± 0.125 ppm. Al compararse ambos métodos de extracción resultó más eficiente el método tradicional UNEP-7, (1993) en un 63%, mientras que con el EPA-3550b, únicamente se obtuvo el 36.83%. La identificación y cuantificación de los 9 HAP se realizó empleando cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM) lográndose identificar compuestos tales como el fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno y benzo(a)pireno en concentraciones de 0.35 ± 0.01 , 0.96 ± 0.26 , 0.50 ± 0.09 , 0.86 ± 0.09 , 0.59 ± 0.04 ppm, respectivamente. Los porcentajes de recuperación fueron variables para cada uno de los HAP analizados, encontrándose valores de 67 a 97% de recuperación. Con los resultados obtenidos en esta experimentación se considera necesario implementar una norma alimentaria que regule la presencia de estos contaminantes en productos pesqueros destinados al consumo humano, así como realizar un seguimiento continuo en la Laguna de Tamiahua, Ver., con la finalidad de impedir el consumo si rebasan los límites permisibles y causar un menor impacto en la salud del consumidor.

ANTECEDENTES

CAPÍTULO 1. PROBLEMÁTICA

1.1 El agua como componente del ambiente

El agua cubre las dos terceras partes de la tierra y, junto con el suelo y el aire, forman los tres "elementos" o esferas más importantes del Planeta. En estos estratos, se encuentra una gran diversidad de ecosistemas, en los cuales se alojan un sinnúmero de especies. Dentro del ambiente marino se albergan el mayor número de especies del planeta, por lo que cualquier cambio físico o químico que se presente en él, repercute en los organismos marinos, terrestres y en el hombre mismo (Pompa, 1968).

1.2 Problemática

La contaminación de ríos, lagos, lagunas y mares por hidrocarburos se remonta a principios del Siglo Veinte. Su importancia se vio acrecentada paralelamente con la intensificación del uso del petróleo como la principal fuente de energía en el mundo. En la actualidad, se piensa que existe una disminución del problema en el ámbito mundial. No obstante, en los últimos cuarenta años se ha despertado un especial interés dirigido hacia la contaminación de origen petrogénico debido, en gran parte, al número de derrames registrados en el ámbito mundial y a las altas concentraciones que de estos han sido detectados en agua, sedimentos y organismos marinos. Numerosos estudios a escala mundial, como el de Castro (1981), pretenden tener una visión global del daño ocasionado por el petróleo en los mares y océanos, con la finalidad de observar las repercusiones ambientales que esto ha ocasionado mundialmente. Las

zonas cuya problemática se ve agravada son aquéllas que sirven como rutas de transporte del crudo, aquellas en donde se ubican plataformas de extracción, refinerías y aquéllas que descargan sus efluentes residuales ya sean, urbanos e industriales, a ríos y lagunas (Zsolnay, 1979; Preston, 1992; Escartin y Porte, 1998).

Los derrames "accidentales" en ambientes marinos y suelos siguen registrándose, razón por la cual el problema sigue vigente (Perés, 1980). Tan sólo a mediados del mes de julio del año 2000 un derrame de crudo fue registrado en Brasil en el cual se estima que más de 33 mil barriles fueron introducidos en los ríos Barigüi e Iguazú dejando una pérdida ecológica gigantesca. Por otro lado, el 17 de abril del 2001 se presentó en México un derrame de crudo en el municipio de Nanchitlán, Veracruz, vertiéndose 5 millones 400 mil litros de petróleo crudo sobre el cauce del Arroyo Tepeyac, afluente del río Coatzacoalcos, afectándose severamente la biota de esa localidad (Reuters, AP y DPA, 2000).

La petroquímica en México, representa una de las más importantes empresas desde el punto de vista económico. Sin embargo, PEMEX se encuentra dentro de las industrias que generan más residuos y que, de una u otra forma, son liberados al medio ambiente. Dentro de estos residuos generados se encuentran numerosos compuestos tóxicos, entre los que destacan los hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAP, debido a los graves peligros de salud que representan. En la actualidad, PEMEX tiene en funcionamiento 468 plantas petroquímicas en tan sólo 14 estados de la república. De este total, en Veracruz se encuentra el 17% de ellas, lo que representa un total de 81 centros en operación (Tabla 1.1). La importancia económica de este estado

radica en parte a su producción ostrícola, ya que aporta el 90% de la producción nacional. Debido a esta razón, es de vital importancia realizar un seguimiento sobre la contaminación de los ostiones comerciales, con la finalidad de contar con información valiosa para estimar el riesgo potencial que puede representar el consumo de este producto al ser humano.

En la Tabla 1.1, se muestra el número de plantas petroquímicas que se encuentran actualmente funcionando en México, de las cuales 81 se ubican en el estado de Veracruz.

Tabla 1.1. Plantas petroquímicas en operación por entidad federativa (INEGI, 1999)

Concepto	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Chiapas ¹	9	9	9	9	9	9	9
Distrito Federal	77	74	74	74	74	74	74
Durango	17	17	17	17	17	17	17
Guanajuato	23	23	23	23	23	23	23
Hidalgo	8	8	8	8	8	8	8
Jalisco	21	21	21	21	21	21	21
México	106	126	126	126	126	126	126
Morelos	12	12	12	12	12	12	12
Nuevo León	31	31	31	31	31	31	31
Puebla	19	19	20	20	20	20	20
Querétaro	14	14	14	14	14	14	14
Tamaulipas	23	23	24	24	24	24	24
Tlaxcala	8	8	8	8	8	8	8
Veracruz	81	81	81	81	81	81	81
Total	449	466	468	468	468	468	468

1.- Incluye Oaxaca y Tabasco

1.3 Lagunas costeras

Las lagunas costeras se encuentran prácticamente en todos los continentes y en diferentes latitudes. Son definidas como sistemas semicerrados, en comunicación efímera o permanente con el mar; se encuentran protegidas por una barrera, manteniendo de esta forma una relación directa con los sistemas hidrológicos continentales. La conexión con el mar y los ríos mantiene una gran influencia en la dinámica de las lagunas. El aporte de nutrientes, elementos

trazas y otros componentes provenientes de reservorios continentales son movilizados por los procesos o cambios climáticos, por los procesos biológicos, actividades humanas y sedimentación, provocando cambios morfológicos de una manera creciente. Las lagunas costeras también son consideradas como ambientes de transición entre el ecosistema marino y el terrestre, en donde las actividades de procesos continentales, marinos y climáticos producen las características ecológicas especiales (Castro, 1981; Becerra, 1984). El gran contenido de materia orgánica disuelta provee de nutrimentos a estos ecosistemas y junto con el rápido reciclaje de los mismos, son los factores básicos que determinan su alta productividad, lo cual permite la explotación de importantes especies marinas potencialmente comerciales. En este marco de equilibrio, las lagunas costeras son altamente vulnerables a los cambios provocados por las actividades antropogénicas, tales como los procesos de dragado y relleno que producen turbulencias, causando el abatimiento del oxígeno disuelto y la disminución en la penetración de la luz. De manera similar ocurre con la construcción de presas y diques que eliminan o disminuyen el aporte de agua dulce, lo que provoca el aumento en la salinidad y, finalmente, el aporte de fertilizantes y detergentes causantes de la eutroficación de lagunas y ríos. Por estudios previos realizados por Neff (1979); Castro (1981); Becerra (1984); Wade y col (1989); González (1990); Botello y col (1991); Pendoley, (1992); Golg-Bouchot y col (1995); Michel y Zengel (1998); Botello y col (1998); Noreña y col (1999); Tricklebank (2000) y Calderón y col (2001), se sabe que los contaminantes como son metales pesados, plaguicidas y todo tipo de hidrocarburos (tanto aromáticos como alifáticos), pueden tener efectos letales o tóxicos en los organismos, quedando anualmente eliminadas numerosas

especies acuáticas y causando un grave desequilibrio ecológico, lo cual se refleja negativamente en los sectores económicos y de salud pública. Los agentes xenobióticos como son los HAP presentes en organismos, sedimentos y agua han provocado cáncer en animales de laboratorio, considerándose que dichos compuestos contribuyen significativamente a la generación de hematomas en humanos, ya que al ser metabolizados en las células de los mamíferos, se producen los diol-epóxidos que se unen covalentemente a las macromoléculas celulares, en las que se incluye al ADN, causando errores en la replicación de dicha molécula y, de esta manera, se generan las mutaciones que inician el proceso cancerígeno.

1.4. Características de los ostiones (*Crassostrea virginica*)

El ostión *Crassostrea virginica* es uno de los invertebrados estuarinos que aporta mayores beneficios al país como productos pesqueros, ya que tan sólo en octubre del 2000, se produjeron un total de 41,920 toneladas en peso vivo. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de las costas en el océano Atlántico. En nuestro país, se encuentran localizados en las lagunas costeras del Golfo de México y el Caribe, donde se ubican las pesquerías de mayor importancia de la República. Al noreste del país, se encuentra una pesquería que comienza en la ciudad de Tuxpan en el estado de Veracruz y que termina al sur de Tamaulipas. Esta pesquería abarca las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua y Tapamachoco. Al sureste de Tabasco se encuentra otra zona pesquera que comprende a la Laguna de Machona, la del Carmen y la de Mecoacán y, en el estado de Campeche, la Laguna de Términos (Becerra, 1982; INEGI, 1999). En la actualidad se considera que la zona

ostrícola del estado de Veracruz, mantiene a unos 3,056 pescadores ostrícolas. Esta zona aporta más del 90% de la producción nacional de ostiones y camarones (Botello y Calva, 1998). En la Tabla 1.2 se comparan los valores de producción (toneladas) de diferentes productos pesqueros para el año de 1999. La producción de ostiones fue equivalente al 11% de la producción pesquera nacional para ese año. Los valores indican que este producto pesquero representa un factor económico importante para la población pesquera y, desde el punto de vista de salud pública, puede llegar a ser un factor de riesgo para los consumidores, en caso de estar contaminados con HAP. En la Tabla 1.3 se muestra la participación económica de cada estado por su producción pesquera. El estado de Veracruz aporta el 10% de la percepción nacional.

Tabla 1.2. Producción pesquera en peso desembarcado según principales especies, (SEMARNAP, 1999)

Principales especies	Toneladas	% Respecto al total nacional
Total	135,745	
Mojarra	23,082	17.00
Ostión	14,752	10.87
Lebrancha	6,746	4.97
Jaiba	5,317	3.92
Carpa	4,179	3.08
Peto	3,159	2.33
Jurel	3,130	2.31
Sierra	3,038	2.24
Trucha	2,994	2.21
Otras especies*	69,348	NA

Nota: El peso desembarcado se refiere al que conserva el producto y se declara en el momento del desembarque, en sus diversas modalidades: descabezado, fileteado, desviscerado, rebanado u otras; * = Incluye otras especies sin registro oficial; NA = No aplicable

Tabla 1.3. Valor de la captura pesquera en peso desembarcado según entidad federativa, (SEMARNAP, 1999)

Entidad federativa	(Miles de pesos)
Total	11 166 722
Aguascalientes	3 570
Baja California	1 339 276
Baja California Sur	526 219
Campeche	456 321
Coahuila de Zaragoza	7 092
Colima	281 911
Chiapas	362 189
Chihuahua	4 879
Distrito Federal	NA
Durango	32 804
Guanajuato	26 858
Guerrero	57 747
Hidalgo	29 214
Jalisco	98 600
México	71 105
Michoacán de Ocampo	113 608
Morelos	6 127
Navarit	341 284
Nuevo León	2 570
Oaxaca	139 562
Puebla	45 826
Querétaro de Arteaga	5 331
Quintana Roo	122 879
San Luis Potosi	7 393
Sinaloa	2 226 356
Sonora	2 071 377
Tabasco	371 285
Tamaulipas	705 043
Tlaxcala	12 958
Veracruz	1 117 925
Yucatán	544 867
Zacatecas	34 546

Nota: El valor a precios de playa o primera mano. Debido al redondeo de las cifras, la suma de los parciales puede no coincidir con los totales; NA = No aplica

1.4.1 Anatomía de los ostiones *Crassostrea virginica*

Anatomía externa

Los ostiones se encuentran constituidos por una concha formada por dos valvas (Figura 1.1), las cuales se encuentran unidas de extremo a extremo mediante un ligamento. La superficie interna de cada valva generalmente es

blanca y lisa, la impresión muscular en posición subcentral tiene un tono violáceo oscuro, las valvas de los organismos que pertenecen a este género son desiguales y elongadas en dirección dorsal-ventral (Becerra, 1982).



Fig. 1.1. Anatomía externa de los ostiones *Crassostrea virginica*

Anatomía interna

La superficie interna de cada valva la reviste el manto, tejido que envuelve a todos los órganos excepto el músculo aductor; el borde está arreglado en tres pliegues; las células especializadas de este tejido secretan las diferentes capas de la concha y del ligamento charnelar. El manto interviene en el proceso de respiración, controlando el flujo de agua que pasa a través de las branquias.

En la cavidad pericardial arriba del músculo, se localiza el corazón, que se encarga de bombear la sangre (incolora), a todo el cuerpo. Las cuatro branquias se encuentran formadas por filamentos y en constante movimiento, lo cual produce una corriente de agua que pasa a través de las mismas. De esta forma se renueva el oxígeno, permitiendo el intercambio de gases. Tanto los cilios o filamentos branquiales, como sus células, secretan mucus que atrapa las partículas alimenticias acarreándolas hacia la boca. El intestino se extiende desde el estómago hasta el extremo posterior de las branquias, el cual termina en el ano. Los órganos reproductivos o gónadas están en la parte anterior del cuerpo recubriendo el estómago. Los ductos de las gónadas se

abren dentro de la cavidad paleal y, posteriormente, son expulsadas al medio (Becerra, 1982; Brito y Mortón, 1989).

La Figura 1.2, esquematiza las partes internas del cuerpo de un ostión; se observa el músculo aductor que mantiene unidas las dos valvas, así como todos los organos más importantes que conforman este organismo.

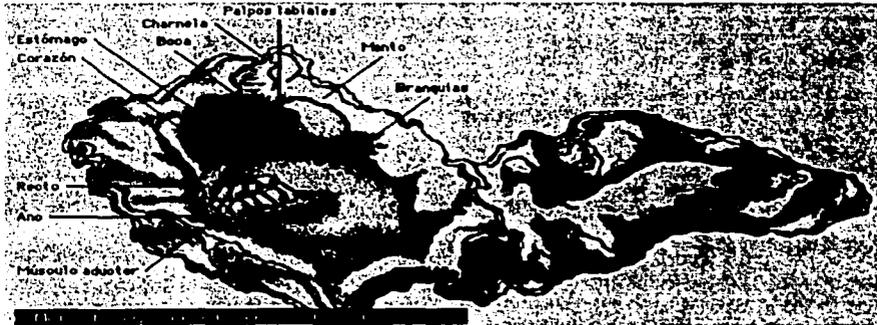


Figura 1.2. Anatomía interna del ostión *Crassostrea virginica* (Anónimo, 2001)

1.4.2 Desarrollo larvario

Esta especie no incuba sus huevecillos, es ovípara, es decir libera sus gametos sexuales en el agua, donde se realiza la fecundación. En los ostiones los sexos se encuentran separados; sin embargo, se puede presentar el hermafroditismo. En general, sus huevos son pequeños (85-150 μ m) y en varios millones (Becerra, 1984; Wilbur, 1983; Britton y Morton, 1989).

Pasando 3 o 4 horas de haberse realizado la fertilización de los huevecillos, se desarrolla una larva trocófora en un período de 24 a 36 horas pasando rápidamente a un estado umbonado denominado estado de veliger. La larva permanecerá en el plancton de 2 a tres semanas antes de que comience la metamorfosis. La larva se fija en sustratos adecuados mediante un pie

rudimentario convirtiéndose de esta manera en un organismo bentónico sedentario (Becerra, 1982; Britton y Morton, 1989).

1.4.3 Características del hábitat

Su hábitat característico es la desembocadura de ríos, lagunas y esteros (Gutiérrez, 1973 citado en Becerra, 1982). Los factores ambientales que favorecen su desarrollo óptimo son: Temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, valor de pH y turbiedad. Dentro de los factores adversos cabe señalar la sedimentación, la depredación y la contaminación por diversos agentes. La temperatura es uno de los factores que más influencia presenta sobre la reproducción, desarrollo y crecimiento de los ostiones. Los valores de temperatura tanto en el desove como en el desarrollo son de 20 a 32°C, adicionalmente, la temperatura controla la cantidad de agua filtrada, la respiración y el estado larvario, por lo que se considera una limitante para el crecimiento de los mismos.

Otro factor de extrema importancia para los ostiones es la salinidad, ya que por arriba de los 21‰ las larvas no logran fijarse, mientras que para salinidades superiores a los 32‰ también se ven afectadas. La turbidez del agua interfiere con los procesos fisiológicos como son la alimentación y la respiración provocándoles la muerte (Becerra, 1982).

1.5 Introducción de los hidrocarburos en la cadena alimenticia

No todos los hidrocarburos se logran perder por la acción de factores físicos, degradación química y biológica. Especialmente si se encuentran en altas concentraciones permanecen inalterados en el medio, por lo que son

dispersados e introducidos por el plancton y otros organismos a la cadena trófica. Los organismos que forman parte del plancton se alimentan y consumen las partículas en las que se encuentran los hidrocarburos. A su vez, el plancton es consumido por organismos de tamaño mayor, como diversas especies de peces. Se sabe que el plancton es capaz de liberar los hidrocarburos por medio de las heces, las cuales se hunden y están dispuestas para ser consumidas por organismos pelágicos y bentónicos (Castro, 1981). La contaminación de los peces y otros organismos marinos puede causarse por diversas vías: 1) Se puede llevar a cabo a través de la membrana branquial o 2) Por la vía digestiva, en donde los contaminantes pasan por la ingestión de agua y alimento, entrando al sistema circulatorio y diseminándose a todos los órganos y tejidos. Los hidrocarburos debido a su alta hidrofobicidad tienden a acumularse (bioacumularse) en el tejido graso y en órganos vitales.

Debido a que los peces se encuentran en constante movimiento, no son tan afectados por un derrame petrolero, ya que pueden escapar a las manchas de este contaminante; sin embargo, el plancton y los organismos bentónicos son severamente afectados, debido a la poca o nula movilidad. Los organismos bentónicos en las aguas costeras se encuentran representados principalmente por los moluscos bivalvos cuya alimentación es a través de filtración, lo cual les permite la acumulación de los hidrocarburos pero no su eliminación (Giam y Lee, 1987; Castro, 1981).

1.6 Degradación metabólica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAP, por organismos marinos

La absorción de hidrocarburos en los tejidos de organismos marinos como crustáceos y moluscos, los enfrenta con serios problemas fisiológicos y

metabólicos en el almacenamiento y excreción de dichos compuestos (Castro, 1981). Existen varias enzimas que conforman el sistema enzimático denominado citocromo P-450. Éstas son las encargadas de catalizar la transformación de los compuestos xenobióticos y endógenos en peces. Algunas enzimas del citocromo P-450 como la aril-hidrocarburo-hidrolasa (AHH, por sus siglas en inglés), son inducidas en peces por compuestos en los que se incluyen a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y ciertos bifenilos policlorados (BPC o por sus siglas en inglés, PCB) (Elskus y Stegeman, 1989). En los mamíferos, el citocromo P-450 es el responsable de la oxidación de compuestos extraños. Dependen de las oxidasas de función mixta (OFM o MFO, por sus siglas en inglés), de las oxigenasas de función mixta y de las aril-hidrocarburo hidroxilasas, que son las responsables del metabolismo inicial de algunos compuestos orgánicos lipofílicos, en los que se incluyen alcanos, HAP, plaguicidas, etc., y compuestos endógenos como esteroides, hormonas y sales biliares (Neff, 1979; Giam y Lee, 1987). Los compuestos que son oxidados por los OFM, resultan ser más polares que el sustrato lipídico en que se encuentran y pueden ser eliminados del cuerpo a través de difusión de las membranas en conjugación con compuestos del suero para ser excretados (Castro, 1981). La degradación de los hidrocarburos saturados se realiza por medio del metabolismo de los ácidos grasos en algunos peces e invertebrados (Neff, 1979; Castro 1981; Giam y Lee, 1987). Se han detectado en algunos invertebrados vías metabólicas para la oxidación de hidrocarburos aromáticos, las cuales involucran a la enzima aril-hidrocarburo hidroxilasa, formada en el hígado de los vertebrados y en el hepatopáncreas de los invertebrados (Castro, 1981).

Los ostiones, mejillones y otros moluscos bentónicos remueven los hidrocarburos de la columna del agua y los bioacumulan. En dichos organismos, no se ha encontrado actividad enzimática de la enzima citocromo P-450; por lo tanto carecen de la capacidad de metabolizar o excretar estos compuestos. Debido a ello, los organismos bivalvos acumulan hidrocarburos en concentraciones mayores a las determinadas en su hábitat (agua y sedimento). Por ello, estos organismos son empleados como centinelas o indicadores de la contaminación en las aguas costeras y en lagunas aledañas a plantas petroquímicas refinarias y puertos comerciales (Neff, 1979; Giam y Lee, 1987; Wade y col, 1989).

1.7 Degradación metabólica de HAP por hongos y bacterias acuáticas

Las bacterias y los hongos han demostrado su capacidad para emplear diferentes moléculas orgánicas como única fuente de carbono. Se sabe que los HAP forman parte de la biosfera desde hace millones de años. Algunas bacterias tienen la capacidad de metabolizar parcial o completamente a los hidrocarburos aromáticos hasta CO_2 y H_2O , empleando estos compuestos como fuentes de carbono y energía para producir biomasa. Otros microorganismos realizan un proceso denominado cooxidación, en el cual, no se realiza la oxidación completa de los HAP. Sin embargo, son empleados como sustratos alternativos durante el crecimiento y se produce a partir de ellos varios metabolitos oxigenados. La degradación de los HAP por bacterias se inicia de manera similar a la degradación del benceno. El naftaleno es oxidado por *Pseudomonas putida* y otras especies a cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno (Figura 1.3). El dihidrodiol es oxidado a 1,2-dihidroxi-naftaleno. Un aspecto

importante en la degradación del cis-dihidrodiol, es la formación de un intermediario (dioxetano), el cual en el sistema microsomal de los mamíferos se transforma a trans-dihidrodiol. Éste es producido a través de óxidos de arena, que junto con sus productos inmediatos de oxidación, son los responsables de las propiedades mutagénicas y carcinogénicas de los HAP (Neff, 1979).

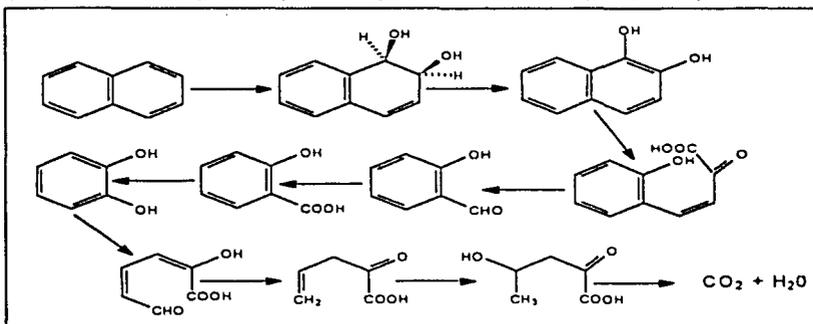


Figura 1.3. Metabolismo de la degradación del naftaleno por *Pseudomonas putida* (Neff, 1979)

1.8 Principales fuentes de hidrocarburos

Las fuentes de hidrocarburos en los mares y océanos se pueden clasificar en dos tipos, de acuerdo con la literatura: Los hidrocarburos antropogénicos y los biogénicos (Neff, 1979; Becerra, 1984; Bauer y Capone, 1988; Albert, 1990; Preston, 1992). Los primeros son introducidos a los sistemas marinos por las diferentes actividades humanas en las que destacan la explotación del petróleo, su distribución y consumo, la combustión de los automotores, combustión de materia orgánica, y los residuos industriales y urbanos. El aporte por carga, descarga y limpieza de los buques - tanques y la entrada de efluentes continentales y de refinerías etc. Estos, en su conjunto, representan el mayor aporte de contaminantes por hidrocarburos al sistema marino. Sin

embargo, no todos los aportes de hidrocarburos a los sistemas acuáticos son de origen antropogénico, lo cual implica la introducción de estos compuestos por síntesis o actividad biogénica. Los segundos se introducen al ambiente marino por diferentes rutas. Entre las principales rutas, se encuentran las infiltraciones en el fondo marino. (Neff, 1979; Becerra, 1984).

En México, es posible señalar las diferentes fuentes de contaminantes que se encuentran afectando las zonas costeras. Por su importancia destacan los desechos de las aguas residuales y municipales (domésticas, públicas y comerciales), el desarrollo portuario, el uso de combustibles fósiles, la combustión de materiales orgánicos y, principalmente, la industria petrolera, ya que en los últimos años se ha incrementado notablemente, con un total de 468 plantas petroquímicas en funcionamiento (Becerra, 1984; INEGI, 1999).

1.9 Destino de los hidrocarburos

El destino y los efectos de los hidrocarburos en los sistemas acuáticos, dependen de las condiciones biológicas del ambiente, de las concentraciones que estos presenten, del tipo de hidrocarburo y de la frecuencia de las aportaciones o descargas en el medio. La atmósfera probablemente sea la vía más importante en el transporte de material particulado hacia las áreas oceánicas, es la responsable de la contaminación de zonas remotas. El intercambio de los hidrocarburos del aerosol en las zonas costeras con el agua del mar, depende de diversos factores físicos y químicos, los cuales se encuentran basados en la velocidad de transferencia y el equilibrio existente entre el aire y la concentración de dichos compuestos en la superficie del agua (Preston, 1992). Por otra parte, la película formada sobre la superficie del agua

posterior al derrame de petróleo, tiende a ser dispersada por el oleaje y por las corrientes del viento. Los hidrocarburos de peso molecular bajo se evaporan y el resto pasa a la columna de agua o se mantiene en la superficie. Los hidrocarburos pueden llegar a formar emulsiones en el agua o adherirse a partículas sólidas suspendidas, formando así breas y alquitranes. Todas las fracciones descienden a través de la columna para depositarse en el sedimento marino o ser absorbidas por los organismos y plantas, por lo que, debido a dicho fenómeno, el proceso de degradación se hace más lento. Los hidrocarburos presentes en el aerosol o en el agua sufren procesos de intemperización como lo es la fotólisis, la oxidación química y la degradación biológica (Castro, 1981; Becerra, 1984)

1.10 Clasificación de los hidrocarburos

Los hidrocarburos se dividen en tres grandes grupos o familias para su estudio. Esta clasificación se muestra en la Figura 1.4. En dicho esquema también se incluyen las subdivisiones de cada grupo.

1.10.1 Hidrocarburos alifáticos

Esta clasificación comprende a los compuestos saturados y no saturados. Los saturados son llamados parafinas o alcanos y su fórmula general es: (C_nH_{n+2}) , algunos ejemplos de estos compuestos son metano, propano, hexano, eicosano, etc. Los compuestos no saturados son subdivididos en alquenos y alquinos, según si contienen dobles o triples ligaduras. Cada uno, a su vez, se subdivide en diversas serie homólogas, de acuerdo con el número de dobles y triples ligaduras.

Alcanos

Los hidrocarburos saturados o alcanos, también llamados parafinas, son compuestos que se encuentran formados por carbón e hidrogeno, no contienen insaturaciones y su fórmula general es (C_nH_{2n+2}) , algunos ejemplos de estos compuestos son metano, propano, hexano, eicosano, etc. Las propiedades físicas y químicas varían poco conforme aumenta el número de átomos de carbono.

Alquenos

También conocidos como olefinas, son compuestos que pueden contener una o varias dobles ligaduras. En el caso de contener solamente una doble ligadura su fórmula general es (C_nH_{2n}) . Generalmente, las olefinas como el 1-buteno, 3-propeno y el etileno son indeseables en los productos terminados de refinación del crudo debido a que los dobles enlaces son reactivos y tienden a oxidarse y formar polímeros.

Alquinos

También conocidos como acetilenos, son hidrocarburos que contienen uno o más triples enlaces carbono - carbono. El número de triples ligaduras es empleada para subdividirlos en series homólogas diacetilenos, triacetilenos, etc. Si contienen solamente una triple ligadura su fórmula general es la siguiente: (C_nH_{2n-2}) . Como algunos ejemplos se pueden mencionar al acetileno, 2-butino y al etino.

1.10.2 Hidrocarburos alicíclicos

Son compuestos cíclicos con propiedades alifáticas. Los monocíclicos se encuentran agrupados en series análogas a las de los compuestos alifáticos. Análogamente, los compuestos monocíclicos saturados se conocen como cicloparafinas, cicloalcanos o naftenos, siendo su fórmula general (C_nH_{2n}). Dentro de estos compuestos se encuentra el ciclopropano, ciclohexano, metilciclohexano, etc. En la serie de los insaturados, también conocida como ciclo-olefinas o ciclo-alquenos, se encuentran al ciclohexeno, 1,3-ciclopentadieno. Su fórmula general, representando sólo una insaturación, es (C_nH_{2n-2}).

1.10.3 Hidrocarburos aromáticos

Esta clase de compuestos contiene por lo menos una estructura de benceno, subdividiéndose en tres series. La primera de ellas es la del benceno, que incluye a los derivados alifáticos y alicíclicos de éste, entre los que se pueden mencionar al tolueno y al estireno. La segunda serie es llamada polifenilica y comprende a los compuestos en los cuales dos o más anillos bencénicos están unidos de modo tal que no tienen átomos comunes a más de un anillo, dentro de estos compuestos cabe mencionar a los derivados del bifenilo y del trifenilo. La tercer serie es la de los compuestos aromáticos polinucleares o hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAP. Estos compuestos contienen dos o más anillos fusionados, por lo menos uno de los cuales es un anillo bencénico. Los HAP difieren en el número de posiciones del anillo aromático y en el número y posición de los sustituyentes químicos en el sistema básico. Las características físicas y químicas varían más o menos en forma regular con el peso molecular. La resistencia a la oxidación y la reducción decrece al

incrementarse el peso molecular. La presión de vapor y la solubilidad en agua disminuye con el incremento del peso molecular. Como consecuencia de la gran diversidad de los HAP y a sus pesos moleculares, así como los efectos que estos producen en el medio ambiente y en los sistemas biológicos, se han clasificado en dos grandes grupos: Los de bajo peso molecular (LMW, por sus siglas en inglés) y los de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés). Los de bajo peso comprenden a los compuestos formados por dos o tres anillos aromáticos entre los que se encuentran los naftalenos, fluorenos, fenantrenos y antracenos; dentro de los de alto peso, se encuentran todos los compuestos formados por la fusión de cuatro a siete anillos. Como ejemplos de estos, se pueden mencionar al criseno y al coroneno (Neff, 1979; Albert, 1990; Menzie, 1992; Morrison y Boyd, 1996).

1.11 Reacciones químicas que presenta los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los tres tipos de reacciones que presentan los HAP son la sustitución electrofílica, la oxidación y la reducción. Las reacciones de oxidación y reducción destruyen el carácter aromático; sin embargo esto no sucede con la sustitución electrofílica. La oxidación se lleva a cabo generando radicales hidroxilo para posteriormente, originar una conversión de estos a quinonas o fenoles que pueden reaccionar con óxidos de nitrógeno produciendo los nitro-HAP, menos dañinos al metabolismo. Entre los ejemplos de reducción y oxidación de estos compuestos se encuentran el antraceno y el fenantreno que son oxidados a sus respectivas 9,10-quinonas y son reducidos a los 8,10-dihidrocompuestos. Las reacciones fotoquímicas, que se presentan durante las reacciones de fotólisis radican en la absorción de la radiación electromagnética

en la región UV por los electrones deslocalizados de los anillos bencénicos. Posteriormente, estos ceden la energía captada a otras moléculasceptoras como el oxígeno, para así generar su desestabilización obteniéndose compuestos con mayor reactividad en el ambiente (García, 2000). La fotooxidación de los HAP en sistemas acuosos se lleva a cabo por la presencia de agentes oxidantes tales como el oxígeno, el ozono, radicales hidroxilo, etc. Estos inician la autooxidación formando endoperóxidos por medio de los radicales libres. La fotólisis o pirólisis resultan de la formación de proóxidos en los anillos con su posterior desalquilación dando como resultado un gran número de productos (Neff, 1979).

1.12 Propiedades fisicoquímicas y toxicológicas

Los nueve compuestos a evaluar fueron seleccionados sobre la base de su persistencia y toxicidad en el ambiente, al número de casos reportados referente a la carcinogenicidad, a los cambios en cuanto a sus propiedades físicas con respecto al incremento de anillos en su estructura y se encuentran considerados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency, EPA, en inglés) como los principales compuestos carcinógenos y mutágenos en el ambiente. En las Tablas 1.4, 1.5, 1.6, y 1.7, se mencionan las propiedades físicas, químicas y toxicológicas más representativas de estos compuestos.

Tabla 1.4. Cantidades de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAP, más persistentes en sedimentos marinos (Botello y Calva, 1998)

Compuesto	Cantidades de HAP encontrados en sedimentos de la laguna de Pueblo Viejo ($\mu\text{g/g}$)	Cantidades de HAP encontrados en sedimentos de la laguna de Tamiahua Viejo ($\mu\text{g/g}$)	Cantidades de HAP encontrados en sedimentos de la laguna de Tampamachoco ($\mu\text{g/g}$)
Acenafteno	0.69		
Fluoreno		0.38	
Fenantreno	0.59		1.1
Antraceno			
Indeno	1.35	1.63	
Benzo(b)fluoranteno	0.51		
Benzo(k)fluoranteno	1.39		0.74
Benzo(a)antraceno		1.46	2.75
Pireno		1.36	1.11
Benzo(a)pireno		0.46	0.42
Benzo(ghi)pirileno	67.0		

Tabla 1.5. Presión de vapor a 25°C de los HAP más representativos (Finlayson y Pitts, 1986)

Compuesto	Presión de vapor	
	Pascales	mm Hg
Naftaleno	10.4 ± 0.2	7.8×10^{-2}
Acenaftileno	$(8.9 \pm 0.2) \times 10^{-1}$	6.7×10^{-3}
Acenafteno	$(2.87 \pm 0.09) \times 10^{-1}$	2.15×10^{-3}
Fluoreno	$(8.0 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	6.0×10^{-4}
Fenantreno	$(1.61 \pm 0.04) \times 10^{-2}$	1.2×10^{-4}
Antraceno	$(83.0 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	6.0×10^{-6}
Fluoranteno	$(1.23 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	9.2×10^{-6}
Pireno	$(6.0 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	4.5×10^{-6}
Benz(a)antraceno	$(2.8 \pm 0.1) \times 10^{-5}$	2.1×10^{-7}
Críseno	8.5×10^{-7}	6.4×10^{-9}
Benzo(a)pireno	7.5×10^{-7}	5.6×10^{-9}

Tabla 1.6. Solubilidades de HAP agua a 25°C (Finlayson y Pitts, 1986)

Compuesto	Solubilidad (µg/L)
Naftaleno	31,700
Acenafteno	3,930
Fluoreno	1,980
Fenantreno	1,290
Antraceno	73
Pireno	135
Fluoranteno	260
Benzo(a)fluoreno	45
Benzo(b)fluoreno	2.0
Criseno	2.0
Benzo(a)antraceno	14
Perileno	0.4
Benzo(a)pireno	0.05
Benzo(e)pireno	3.8
Benzo(ghi)perileno	0.3

Tabla 1.7. Peso molecular, dosis letal media (LD₅₀), actividad carcinogénica de algunos HAP (Finlayson y Pitts, 1986; Chem Service, 2001)

Compuesto	Abreviatura	Peso molecular	LD ₅₀ mg/kg	Actividad Carcinogénica
Naftaleno	NAP	128	490	0
Acenaftileno	ACE	152	NR	0
Acenafteno	ACEN	154	NR	0
Fluoreno	FLN	166	NR	0
Fenantreno	PHE	178	700	0
Antraceno	ANT	178	2000	0
Fluoranteno	FLT	202	2000	+
Pireno	PYR	202	2700	0
Benzo(a)antraceno	BaA	228	240	+
Criseno	CHR	228	99	0/+
Benzo(b)fluoranteno	BbF	252	72	+
Benzo(k)fluoranteno	BkF	252	2820	+
Benzo(a)pireno	BaP	252	4095	++
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	IND	276	72	+
Benzo(ghi)perileno	BGP	276	NR	+
Dibenzo(a,h)antraceno	DBA	278	360	+

NR = No reportado

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS ANALÍTICOS

2.1 Cromatografía de gases

2.1.1 Fundamentos

En este sistema, la muestra es inyectada y volatilizada al inicio de la columna, la elución del analito se realiza por el flujo de un gas inerte, de gran pureza, que circula de manera continua a lo largo de la columna durante la corrida. En la fase estacionaria de la columna, se llevan a cabo fenómenos de reparto, con lo que se logra la retención selectiva de los componentes de la mezcla a separar, por lo cual, los componentes viajan a través de la columna con diferentes velocidades, dependiendo éstas del peso y de la afinidad que presenten hacia el adsorbente. Los componentes separados son detectados en la salida del sistema, por medio de un detector. La señal se integra y envía a un sistema de captura y análisis de datos (Storch, 1982; Skoog, 1994; Bauer, 1982; Bender, 1992; García, 2000).

2.1.2 Sistema de introducción de muestra

En la cromatografía de gases la muestra es introducida en el sistema por medio de una jeringa hipodérmica, a través de un tapón de silicona denominado "septum". El sistema de inyección o inyector es calentado para producir la evaporación de la muestra líquida. Generalmente, el horno es calentado a 30°C sobre el mayor punto de ebullición que presente la mezcla de análisis. Con esto se garantiza que pequeñas muestras líquidas sean evaporadas al instante para ser arrastradas con gran facilidad hacia el interior de la columna (Bauer, 1982).

2.1.3 Columna cromatográfica

Las columnas cromatográficas pueden ser de dos tipos: Las empacadas y las capilares. Estas últimas son las de mayor uso en la actualidad, debido a su alta resolución. Generalmente se encuentran empacadas de sílice. Normalmente tienen un diámetro externo de 0.5 mm y 0.25 mm de diámetro interno. Las longitudes más empleadas son de 30 y 60 m. Algunas fases se encuentran unidas químicamente a las paredes del capilar y otras mediante tensión superficial (Bauer, 1982).

2.1.4 Análisis cuantitativo

La información cuantitativa contenida en un cromatograma de gases se expresa en función de las áreas bajo la curva de los picos y no de sus alturas, ya que estas últimas varían por diversos factores, entre los que encontramos la velocidad de inyección, la velocidad de flujo y la temperatura. Los picos son obtenidos mediante métodos convencionales como la triangulación, la integración mecánica o eléctrica en el equipo analógico. Por ello, es importante determinar el factor de repuesta relativa para cada especie o, en su defecto, normalizar las áreas de medición a una base comparativa común. El análisis cuantitativo generalmente se realiza empleando curvas de calibración (preparadas con estándares). En la práctica un error de 0.2% es considerado como aceptable (Bauer, 1982; Skoog, 1994).

2.1.5 Análisis cualitativo

El análisis cualitativo se realiza mediante la información que proporcionan los tiempos de retención (t_r) de cada compuesto. Este valor, se obtiene del centro

de gravedad de cada pico y representa el tiempo que tarda un analito en recorrer la columna cromatográfica. La coincidencia entre los tiempos de retención de un estándar y un pico desconocido no aporta evidencia contundente para la identificación de una sustancia, sin embargo, este es el procedimiento más empleado para la identificación de compuestos, en combinación con otras técnicas analíticas como son la espectrometría de masas, la espectroscopia de infrarrojo, etc. (Bauer, 1982).

2.2 Espectroscopia Infrarroja

2.2.1 Fundamentos

La espectroscopia infrarroja, IR, es una técnica analítica que proporciona una vasta información sobre los grupos funcionales de las moléculas orgánicas. La región del espectro electromagnético que abarca la radiación infrarroja se extiende desde los 12,500 hasta los 10cm^{-1} y se divide en: IR cercano, medio y lejano. La energía del infrarrojo no es capaz de provocar la excitación de los electrones de las moléculas, como en el caso de la radiación UV-Vis, únicamente ocasiona que los átomos y grupos de átomos vibren a mayor amplitud en torno a los enlaces covalentes que los unen. Por ello, es ahí donde se lleva a cabo el fenómeno de absorción. Los átomos solamente pueden vibrar en ciertas frecuencias o longitudes de onda, es decir, que se comportan como si los enlaces estuvieran sintonizados. Debido a ello, los enlaces covalentes poseen niveles específicos de energía vibracional. La excitación de una molécula de un nivel de vibración a otro ocurre cuando el compuesto absorbe radiación IR de una longitud de onda en particular. Por otra parte, para que una determinada vibración resulte en absorción de energía infrarroja, debe

causar una variación en el momento dipolar de la molécula, con lo cual ésta pasa a un estado excitado. Cuando la molécula regresa de un estado excitado a uno basal, la energía absorbida es liberada en forma de calor. Con esta técnica es posible analizar muestras sólidas, líquidas y en solución o fase vapor, siendo la intensidad de las bandas proporcional a la absorción que presente el material. Los espectros de absorción infrarroja son obtenidos a partir de soluciones, películas finas, o sólidos dispersos sobre un cristal transparente o muestras gaseosas. El vidrio y el cuarzo son materiales que absorben fuertemente en la región electromagnética del infrarrojo. Debido a ello, no son adecuados para la fabricación de celdas, prismas ópticos o rejillas para esta técnica. Para ello se utilizan placas de halogenuros de metales como NaCl o KBr ya que son transparentes en la región de 2-15 μ m. Estos materiales son altamente solubles en medio acuoso por lo que las soluciones para el estudio en IR deben realizarse forzosamente en medios orgánicos y con muestras anhidras. Adicionalmente, el disolvente empleado no deben presentar absorciones en la región de interés, empleándose para tal finalidad disolventes como el tetracloruro de carbono, el disulfuro de carbono y el cloroformo (Bauer, 1982; Skoog, 1994; García, 2000).

2.2.2 Introducción de la muestra

La muestra es colocada en el espectrómetro de infrarrojo, en el cual se mide la intensidad relativa de la energía luminosa transmitida o absorbida en contra de la longitud de onda. El haz de luz empleado para obtener las radiaciones infrarrojas proviene de una lámpara de Nernst, la cual consta de una varilla de

óxido de circonio, óxido de itrio y óxido de erbio, calentada por medio eléctrico alrededor de 1500°C (Bauer,1982; Skoog,1994; García, 2000).

Debido a que un espectro de IR contiene demasiados picos, la posibilidad de que dos compuestos generen el mismo espectro es casi nula, ya que el espectro es como su huella digital. Esta técnica es muy importante ya que se pueden determinar los grupos funcionales de una sustancia y por lo tanto si dos sustancias puras dan espectros de IR diferentes, se puede asegurar que se trata de compuestos con grupos funcionales distintos (Solomons, 2000).

2.3 Espectrometría de masas

2.3.1 Fundamento

La espectrometría de masas es una técnica analítica instrumental completa, que proporciona información cuantitativa y cualitativa. Se caracteriza por su alta capacidad de identificación, con lo cual se logra identificar en forma inequívoca, casi cualquier tipo de sustancia, abarcando desde átomos o compuestos sencillos, hasta moléculas complejas y lábiles de pesos moleculares grandes. Mediante esta técnica, es posible obtener información cinética, fisicoquímica, cuántica, estructural, isotópica, de energía de enlaces, etc. Dicho método presenta las siguientes ventajas: Es un método universal y específico, es decir, puede analizar sustancias o mezclas de sustancias sólidas, líquidas y gaseosas. También es capaz de detectar una sustancia específica proveniente de una matriz compleja. Posee gran sensibilidad, logra detectar sustancias hasta en concentraciones del orden de partes por millón (ppm) (Esteban, 1993).

La espectrometría de masas se define como la separación de moléculas cargadas (iones moleculares M^+) y especies submoleculares (fragmentos), formadas en el vacío, de acuerdo con su relación masa/carga (m/z), produciéndose el espectro de masas debido a las abundancias relativas de cada fragmento como una función de m/z (Esteban, 1993; Solomons, 2000).

2.3.2 Introducción de la muestra

En esta técnica la muestra es introducida en la fuente de ionización, donde se procede a ionizarla mediante diferentes métodos, dependiendo del tipo de muestra que se esté analizando. El sistema de ionización más empleado, es el de impacto electrónico (EI, por sus siglas en inglés), el cual es un haz de electrones de alta energía que pasa por una corriente de 70 eV, provocando la emisión estimulada de un electrón de la molécula. El ión queda cargado positivamente y se le ha denomina ión molecular. Además del ión molecular (M^+), también son producidos iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía (50 - 100 kcal). El tipo y proporción de fragmentos formados son característicos de cada molécula y se denominan patrón de fragmentación. Posteriormente, todos los iones y fragmentos obtenidos son acelerados mediante campos magnéticos, por lo que la aceleración estará en función de la masa de cada fragmento. Posteriormente, los iones siguen una trayectoria, de la cual serán desviados mediante la acción de campos magnéticos colocados a todo lo largo del analizador. La desviación dependerá de la masa de cada ión, por lo que variando el valor del campo magnético entre determinados límites, es posible dirigir los iones de diferentes masas, en orden creciente o decreciente, hacia el

sistema colector o detector. El impacto de los iones en el detector produce una señal eléctrica, proporcional al número de fragmentos de iones, la cual se amplifica, registra y grafica, para obtener el espectro de masas correspondiente. Dicho espectro se podrá comparar contra una biblioteca de espectros a fin de identificar el compuesto problema (Mann, 1975; Willard, 1988; Esteban; 1993).

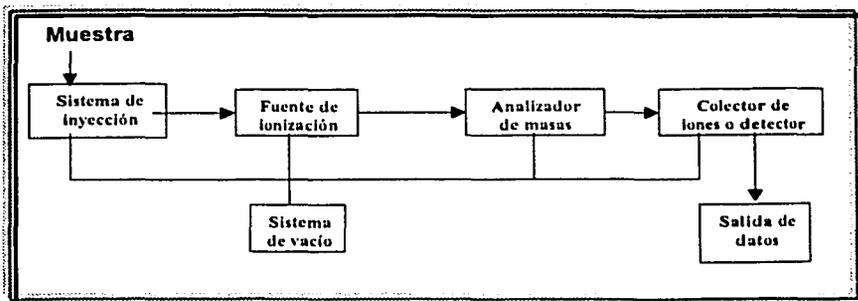


Figura 2.1. Componentes generales de un espectrómetro de masas

2.4 Cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG/EM)

2.4.1 Fundamentos

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM) es la técnica más adecuada para la identificación de los compuestos orgánicos en muestras complejas. Esta técnica analítica está basada en la separación cromatográfica de los compuestos en estado gaseoso, los cuales son transportados al detector de masas. Mediante esta técnica se obtiene el cromatograma y los espectros de masas para cada compuesto. La CG-EM presenta la ventaja de proporcionar simultáneamente información cualitativa y cuantitativa de los diferentes compuestos de la muestra (Esteban, 1993).

2.5 Espectroscopía de fluorescencia

2.5.1 Fundamentos

En la figura 2.2 se muestra las etapas en que sucede el proceso de fluorescencia en el cual se observa que como primer paso las moléculas son excitadas (I), por la fuente de iluminación, pasando de su estado singulete excitado (S_1) u (S_2) del cual en un tiempo determinado, descienden a su estado basal (S_0), mediante la emisión de un fotón (IV).

Durante la excitación (Proceso I), las moléculas adquieren energía vibracional en forma de energía electrónica, llegando a algún subnivel vibracional del estado electrónico excitado. Las moléculas tienen una fuerte tendencia a llegar a un nivel vibracional inferior, perdiendo energía a través de colisiones (Proceso II). Esta pérdida de energía se detiene en un estado electrónico excitado singulete (S_1), desde donde retornan al estado basal mediante la emisión de un fotón (proceso IV) (Galen, 1985). A esta serie de procesos se le conoce como fluorescencia, durante los cuales la transición energética no provoca cambios en el espín del electrón. La espectroscopía de fluorescencia es un método espectroscópico que presenta alta sensibilidad (partes por trillón) y especificidad (Willard, 1988). Esta técnica se encuentra encaminada al estudio de compuestos que presentan la propiedad de fluorescer. Dentro de las aplicaciones de dicha técnica se encuentra el estudio de moléculas de origen biológico como son las lectinas, ácidos nucleicos, proteínas, etc. También se pueden determinar contaminantes trazas como quinonas, drogas (ácido dietilamin lisérgico, LSD), y HAP, entre otros (García, 2000; Willard, 1988).

La alta sensibilidad es el resultado de la diferencia entre la longitud de onda de excitación y la emisión de fluorescencia. Con el empleo de la espectroscopía de fluorescencia en la determinación de HAP, el límite de detección aumenta en dos órdenes de magnitud con respecto a métodos convencionales (Wehry, 1981). Dos compuestos que son excitados a la misma longitud de onda, emiten a diferente longitud por lo que se logra diferenciar fácilmente a cada compuesto (Willard, 1988).

Diagrama de Jablonski (Lakowicz, 1999)

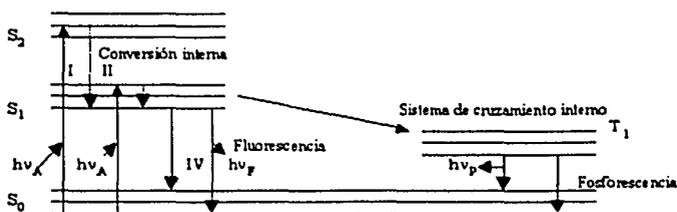


Figura 2.2. Esquemmatización del proceso de fluorescencia

2.5.2 Efecto de apagado "Quenching"

Se le denomina efecto de apagado ("Quenching" por su nombre en inglés), a la reducción en la intensidad de la fluorescencia esperada para una solución. Este efecto puede ocurrir como resultado de una absorción excesiva o por la emisión de la radiación por la misma solución. A la concentración en la cual ocurre dicho fenómeno, se le ha denominado *concentración de apagado quenching*. El efecto de apagado puede ser causado por pérdidas de energía

no radiante de moléculas excitadas. Un agente de apagado facilita la conversión de las moléculas de un estado excitado singülete a un nivel de triplete en donde la emisión no ocurre. Este efecto se presenta en muchos compuestos aromáticos debido a la presencia de oxígeno disuelto. También se puede presentar dicho fenómeno debido a factores químicos y físicos. La intensidad de fluorescencia de muchos compuestos depende de la temperatura, por lo que este factor físico representa un problema en el análisis, ya que provoca variaciones en las mediciones. Otro aspecto importante que puede causar un descenso en la intensidad de la fluorescencia es la gran facilidad con que se pueden contaminar las muestras con sustancias en cantidades indetectables. Entre los contaminantes más comunes se encuentran la baquelita, los plásticos, el cromo, etc. (Wehry, 1981).

2.5.3 Variante de síncronos de excitación

En la espectroscopia de luminiscencia convencional, existen dos tipos de espectros básicos. El primero de ellos, es el espectro de emisión, el cual se obtiene cuando se realiza un barrido ("scanning", en inglés) de la longitud de onda de emisión y se mantiene fija la longitud de onda de excitación. Por otro lado, un espectro de excitación se obtiene mediante el barrido de la longitud de onda de excitación, dejando fija la longitud de onda de emisión. Otra modalidad en la obtención de espectros es la denominada espectroscopia de sincronización ("Synchronous excitation luminescence spectroscopy", por su nombre en inglés). Los espectros de síncronos de excitación son obtenidos cuando se varían simultáneamente o en forma sincronizada las longitudes de onda λ_{em} y λ_{ex} . En un intervalo de diferencias de longitud de onda ($\Delta\lambda$)

constante. Esta técnica presenta la ventaja de ser muy selectiva, con lo cual se pueden estudiar sistemas complejos o multicomponentes. Otra de las ventajas que presenta este método es la obtención de una o dos bandas características para cada compuesto, lo cual es una simplificación de las numerosas bandas obtenidas mediante la fluorescencia rutinaria (Wehry, 1981; Willard, 1988; García, 2000).

La intensidad del síncrono, está determinada por la siguiente ecuación:

$$I_{SL}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = KcbE_x(\lambda_{ex})E_m(\lambda_{em}) \quad (2-1)$$

con

$$\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = \text{constante} \quad (2-2)$$

De donde:

c = concentración del analito

b = espesor de la celda

$E_x(\lambda_{ex})$ = espectro de excitación

$E_m(\lambda_{em})$ = espectro de emisión

K = constante que incluye el factor geométrico instrumental

Esta ecuación puede expresarse en función de λ_{em} o como función de λ_{ex} :

$$I_{SL} = KcbE_x(\lambda_{em} - \Delta\lambda)E_m(\lambda_{em}) \quad (2-3)$$

$$I_{SL} = KcbE_x(\lambda_{ex})E_m(\lambda_{ex} + \Delta\lambda) \quad (2-4)$$

La intensidad del síncrono conjunta las propiedades de los espectros de emisión y excitación. En otras palabras, la fluorescencia con síncronos toma las ventajas de las propiedades características a los espectros de absorción y emisión para cada compuestos.

Un espectro de fluorescencia de emisión para el perileno, mostraría tres bandas 440, 470, 505nm; sin embargo, al aplicar la técnica de síncronos de excitación, con un $\Delta\lambda = 3\text{nm}$, solamente se obtiene una banda de emisión, con

lo cual se facilita la identificación y cuantificación de una especie química determinada (Wehry, 1981)

En la Tabla 2.1 se muestran las longitudes de onda para la emisión y la excitación de algunos HAP, en diferentes medios orgánicos.

Tabla 2.1. Longitudes de onda de emisión y excitación para algunos HAP (Wehry, 1981)

HAP	Longitud de onda de excitación λ_{ex}	Absortividad a λ_{ex} ($M^{-1} cm^{-1}$)	Fluorescencia a longitud de onda de emisión λ_{em} (nm)	Límites de Detección	
				M	$\mu g/litro$ (ppb)
Benceno	259.95	9×10^{10} ^a	302, 273	2.5×10^{-7}	19
Naftaleno	273	6×10^{10} ^c	340, 360	1×10^{-11}	1.3×10^{-3}
Antraceno	258.70	5×10^{10} ^c	404	5×10^{-11}	8.9×10^{-3}
	254	1×10^{10} ^c		$< 2.5 \times 10^{-11}$	$< 4.4 \times 10^{-3}$
Fluoranteno	287	4×10^{10} ^b	450	5×10^{-12}	1×10^{-3}
Pireno	273	6×10^{10} ^c	395	2.5×10^{-12}	0.5×10^{-3}

a L.P. Gierring y A. Whornig Am. Lab. 9 (11), 113, 1977

b Metanol/agua

c Metanol

De acuerdo con el marco teórico anterior se plantearon los siguientes objetivos para el desarrollo de la parte experimental de esta investigación.

2.6 Objetivos

2.6.1 Objetivo general

Establecer una metodología analítica que permita determinar y cuantificar a 9 HAP en muestras de moluscos bivalvos empleando para ello técnicas espectroscópicas y cromatográficas

2.6.2 Objetivos Particulares

- Realizar un análisis químico en las muestras de estudio
- Conocer el contenido de hidrocarburos aromáticos totales (HAT) provenientes de las muestras en estudio
- Comparar la eficiencia entre las técnicas de extracción N° 7 establecido por la UNEP, contra el método N° 3550-b establecida por el de la EPA
- Caracterizar de manera rápida y eficiente a los compuestos separados por cromatografía en columna empleando espectroscopía infrarroja
- Cuantificar a los compuestos de interés mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas
- Evaluar el riesgo que representa la presencia de HAP para los consumidores de moluscos

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

En las tablas 3.1 y 3.2 se presenta un listado del equipo y reactivos empleados durante el desarrollo experimental de esta investigación.

Tabla 3.1. Equipos empleados

Equipos	Especificaciones
Liofilizadora	Marca: Labconco, Modelo: N 890925-4
Horno	Marca: Precision Scientific, Modelo: 100A
Mufla	Marca: Furnance; Modelo: 4800
Estufa de calentamiento	Marca: Thermolyne; Modelo: 100
Analizador elemental (C, N, S, P)	Marca CE instruments, Modelo: CE 1110
Cromatógrafo de gases con detector de masas	Marca: Carlo Erba; Mod: 8000 serie II, MD 800
Espectrógrafo de infrarrojo con Transformadas de Fourier (TF)	Marca: Nicolet; Modelo: Impact - 710
Espectrómetro de luminiscencia	Marca: Perkin Elmer; Modelo LS 50B
Analizador elemental	Marca: Fissions; Modelo:300
Sonicador	Marca: Brasonic S.A; Modelo Branson, 3210
Roto evaporador	Marca: Büchi; Modelo, 461

Tabla 3.2. Reactivos empleados

Reactivos	Especificaciones
Placas para cromatografía en capa fina de gel de sílice de 20 x 20 cm y 2mm de espesor	Kiesel DC con indicador fluorescente "Merck"
Disolventes: Hexano, diclorometano, metanol, acetona, tolueno	Sigma – Aldrich: Grado cromatográfico
Mezcla de 16 HAP 100 ug/ml	Chem – Service
Estándares comerciales Importados: Naftaleno 99% (ICN), acenafteno 99%, fluoreno 99%, fenantreno 99.5%, benzo(a)pireno 99%, fluoranteno 99%, pireno 99%, criseno 98%, dibenzo(a,h)antraceno 99%	Sigma – Aldrich

3.1 Obtención y acondicionamiento de las muestras

3.1.1 Obtención de la muestra

Los ostiones frescos en concha fueron adquiridos dentro de la zona de pescados y mariscos de la Central de Abastos en la Ciudad de México, dichas muestras, según información de los comerciantes, eran provenientes de la laguna de Tamiahua, Veracruz, México.

3.1.2 Lavado

Dada las características de fácil descomposición microbiológica que presentan los moluscos, deben procesarse rápidamente para evitar la descomposición causada principalmente por microorganismos proteolíticos, para lo cual se lavan con abundante agua eliminando las impurezas superficiales, así como la materia extraña que pudiera interferir con el estudio.

3.1.3 Molienda y homogeneizado

Posteriormente las valvas se retiran y se homogeneiza el tejido muscular a 300rpm en una licuadora comercial, hasta obtenerse una pasta homogénea, la cual se somete al proceso de liofilización para finalmente molerse en un mortero y homogeneizarse.

3.1.4 Almacenamiento

El polvo obtenido es guardado en frascos de color ámbar a -10°C para su posterior análisis y caracterización.

3.2 Caracterización química de las muestras

Una vez que los ostiones fueron sometidos a los tratamientos anteriores, la harina fue caracterizada realizándole varias determinaciones: Contenido de humedad y porcentajes de proteína, grasa y cenizas, de acuerdo con las metodologías presentadas en el Anexo A (AOAC, 1980, Aragón, 1991). Adicionalmente, fueron determinados los porcentajes de azufre, carbón, nitrógeno e hidrógeno con la ayuda de un analizador elemental, siguiendo el manual del fabricante. El análisis de proteína fue realizado por dos métodos: 1 nitrógeno Kjeldahl , 2 mediante el analizador elemental

La figura 3.1 presenta el diagrama de bloques correspondiente

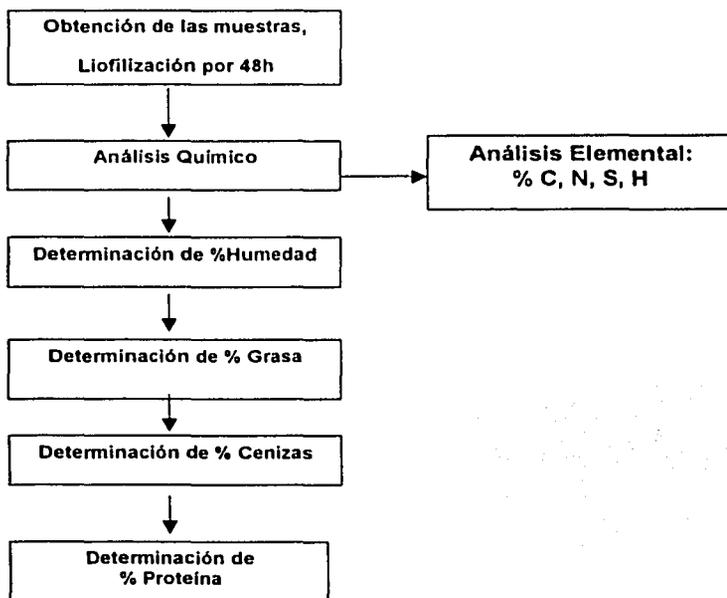


Figura 3.1. Análisis químico y elemental de los ostiones

3.3 Extracción de los hidrocarburos en las muestras

3.3.1 Extracción de hidrocarburos empleando el método UNEP-7 (1993)

1.- Las muestras de ostiones liofilizados se colocan en cartuchos para extracción, y se tapan con fibra de vidrio. Posteriormente, se colocan en el equipo de extracción soxhlet, en donde se adicionan 250 mL de metanol grado cromatográfico, mantenido en reflujo durante 8 horas. Posteriormente, se adicionan 20 mL de KOH (0.7 M) metanólica y 30 mL de H₂O en un matraz de 250 mL, con la finalidad de saponificar los lípidos presentes en la muestra, el extracto es mantenido durante dos horas adicionales en el reflujo, como lo establecido por la técnica de la UNEP-7 (1993).

2.- Una vez realizado el paso anterior los extractos se transfieren a embudos de separación de 500 mL y se extraen con hexano grado cromatográfico en tres tiempos. En las dos primeras extracciones se emplean 90 mL de hexano y en la última 50 mL. Las fracciones se mezclan y concentran a 5 mL mediante un roto-evaporador (Büchi). Los extractos se almacenan en frascos de color ámbar bajo refrigeración (- 10 °C), para su posterior análisis.

3.3.2 Extracción de hidrocarburos empleando el método EPA-3550b (1996)

Este método es una variante del método EPA -3550B (1996) en donde se pesan aproximadamente 5.0 g de la muestra en cartuchos de extracción y se colocan en vasos de precipitado, a los cuales se les adicionan 100 mL de metanol grado cromatográfico. Se pone bajo ondas sonoras en un equipo de sonicación durante 30 minutos. El procedimiento de sonicación se realiza por triplicado, cambiando cada vez el disolvente. Una vez obtenidos los extractos, se mezclan,

adicionándoles 20 mL de KOH (0.7 M) y 30 mL de H₂O en reflujo durante 2 horas. Posteriormente la mezcla se transvasa a un embudo de separación de 500 mL, para extraerse conforme al método UNEP-7, 1993. Las fracciones se combinan y concentran en destilación rotatoria. Las variantes que se realizaron al método fueron las siguientes:

- 1) Debido que el método sugiere que se emplee 30 g de muestra, se utilizaron 5g debido a las restricciones que se tienen en cuanto a la cantidad de muestra
- 2) Otra modificación fue la inclusión de la saponificación, con la finalidad de eliminar las interferencias provocadas por compuestos de tipo lipofílico.

Tabla 3.3. Comparación de las condiciones de extracción del método UNEP contra el método EPA

Características	Método UNEP No. 7 (1993)	Método EPA No.3550 (1986)
Cantidad de muestra	5 gramos	30 gramos
Disolvente Empleado	Metanol	Metanol
Tiempo de extracción	10 horas	1.5 horas
Equipo	Soxhlet	Baño de sonicación de 300 watts
Saponificación con KOH/metanol	2 horas	2 horas

3.4. Fraccionamiento de los hidrocarburos

La limpieza y fraccionamiento de los extractos para la obtención de los hidrocarburos aromáticos se realiza empleando columnas cromatográficas de vidrio de 30cm, a las cuales se les colocan en el fondo 1 g de lana de fibra de vidrio con la finalidad de poder empacar los adsorbentes. Posteriormente, se colocan 10 g de sílice y 10 g de alúmina (activadas a 200°C durante 8 horas y desactivadas parcialmente con agua al 5%p/p), para transferirse a la columna en

vasos de precipitados de 250 mL con hexano. Posteriormente, se adiciona 1 g de sulfato de sodio anhidro, para eliminar el agua que pudiese tener la muestra. La elución de las muestras se lleva a cabo empleando mezclas de disolventes con diferentes polaridades. En la Tabla 3.4, se presenta el orden de elución y los compuestos obtenidos al emplearse diferentes mezclas de disolventes.

Tabla 3.4. Sistema de elución de las muestras

Disolvente empleado	Volumen de elución (mL)	Composición esperada de la fracción
Hexano	15	Alifáticos saturados
Hexano	15	Alifáticos saturados
Hexano:diclorometano 9:1	15	Insaturados y aromáticos
Hexano:diclorometano 9:1	15	Insaturados y aromáticos
Hexano:diclorometano 1:1	15	Insaturados y aromáticos
Diclorometano	20	Insaturados y aromáticos

3.5. Cuantificación de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) empleando espectroscopía infrarroja (Ruiz e Iris, 1997)

Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP, TPH, por su siglas en inglés) se cuantifican conforme a la técnica IMP-QA-20 (Ruiz e Iris, 1997). Para ello, los extractos se concentran en roto-evaporador y, una vez secos, se resuspenden en 25 mL de CCl₄. Posteriormente, se elabora una curva de calibración preparando un estándar, empleando para ello 15 mL de n-hexadecano, 15 mL de isooctano y 10 mL de clorobenceno en un matraz volumétrico de 50 mL aforándose con CCl₄ hasta obtenerse una concentración de la solución de 15,000 ppm. Posteriormente se realizan las diluciones pertinentes para obtener absorbancias en el rintervalo de 0.2 - 0.8, en la longitud de 2930 cm⁻¹. Se grafican concentración contra absorbancia para obtener la pendiente y el coeficiente de correlación de la curva. La concentración de las muestras se obtiene aplicando la ley de Lambert - Beer con la siguiente formula:

$$C_{HTP} = \frac{C \times DC \times A}{AI \times m}$$

Donde:

C = Absorbancia/pendiente
DC = Paso óptico de la celda
A = Aforo de la muestra
AI = Alicuota de la muestra
M = Gramos de la muestra

3.6. Determinaciones espectroscópicas de las muestras mediante espectroscopia de infrarrojo, IR

Este estudio se realizó con la finalidad de determinar los principales grupos funcionales presentes en cada una de las fracciones obtenidas en las muestras, mediante espectrometría de IR. Para ello se prepara una película delgada, evaporando 500 μ L de la fracción sobre un cristal de KBr, el cual se analiza en equipo de IR haciendo un barrido de 4000 a 400 cm^{-1} . De esta forma se obtienen los espectros de infrarrojo para cada una de las fracciones.

3.7. Determinación de los hidrocarburos aromáticos totales por espectroscopia de fluorescencia (Ruiz e Iris, 1997)

Los hidrocarburos aromáticos totales se determinaron conforme lo propuesto por el método IMP-QA-610 (Ruiz e Iris, 1997). El límite de detección del método es de 0.002 mg/kg y el límite máximo de medición es de 1000 mg/kg. Las muestras son evaporadas mediante un equipo de roto-evaporación y una vez secas, son resuspenden en 5 mL de hexano grado cromatográfico. La intensidad de fluorescencia no debe ser menor a 100 ni mayor a 800 ya que se corre el riesgo de perder la linealidad del método. La curva de calibración se prepara empleando un estándar internacional como el criseno. También puede emplearse un petróleo

crudo. Para ello se pesan 0.25g de crisenó y se aforan en un matraz de 100 mL para obtener una concentración de 2,500 ppm. Posteriormente, se realizan las diluciones correspondientes hasta obtener concentraciones que se encuentren en el intervalo de 100 a 1000 ppb. La curva de calibración se obtiene al graficar la intensidad de fluorescencia contra la concentración del crisenó. Con estos resultados se obtienen, tanto la pendiente como el coeficiente de correlación. Para el análisis de la muestra se requiere contar con un espectro de emisión de fluorescencia en un intervalo de 300 a 500 nm, con una fuente de excitación a 310 nm, y tomando la lectura a una longitud de onda de 380 nm. La concentración final se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{ppb de hidrocarburos} = \frac{F \times V \times f}{M \times V_1}$$

Donde:

F = Intensidad de fluorescencia de la muestra

V = Volumen de hexano

f = Factor de dilución

M = Pendiente

V₁ = Peso de la muestra

3.8 Determinación de los HAP empleando cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)

Para la identificación y cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos se empleó un equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas. El cromatógrafo de gases GC8000 cuenta con inyectores tipo "split-splitless", analizándose las fracciones en el modo "splitless". La columna cromatográfica empleada fue una columna capilar (DB-5) de 30 m de longitud con un diámetro interno de 0.25 mm y de 0.25 µm de espesor de capa de fase estacionaria de 5%

fenil 95% metilpolisilano. Las condiciones de temperatura en las que se operó el equipo fueron las siguientes: Temperatura del inyector a 220°C y el programa de rampas de temperaturas se indica en la Tabla 3.5. Las condiciones de operación del detector de masas (MD800) fue en el modo de evaluación selectiva de iones (ESI), con 4 ciclos min⁻¹. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se identifican mediante la comparación de los tiempos de retención de los estándares de las muestras y mediante la identificación de los iones moleculares correspondientes a cada compuesto en estudio. Para la cuantificación de los HAP se recurre al empleo de una curva patrón para cada uno de los 9 HAP en estudio, utilizándose para ello una mezcla de 16 estándares de HAP, contándose par ello con 10 concentraciones diferentes (de 200 – 2000 ppb). Con los valores obtenidos de cada concentración y las áreas bajo la curva, se realiza una curva de calibración para cada compuesto de la cual se obtiene el valor de la pendiente y la ordenada al origen. La concentración de cada uno de los HAP identificados en las muestras se determinó a partir de la siguiente ecuación

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Área bajo la curva

m = Pendiente de la curva

x = Concentración de la muestra

b = Ordenada al origen

Tabla 3.5. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases

Temperatura inicial del horno (°C)	Velocidad (°C/min)	Tiempo (min)
90	8	0.5
180	5	0.0
245	2	0.0
300	6	6.0

Tabla 3.6. Condiciones de operación para el detector de masas

Emisión	500
Temperatura de la fuente	200°C
Temperatura de la interfase	250°C
Presión de análisis	kPa (- 4 psi)
Velocidad de lectura	4 ciclo s ⁻¹
Modo	ESI (SIM)
Tiempo de análisis	66 min

En la figura 3.2 se muestra la metodología propuesta para el desarrollo experimental de este trabajo.

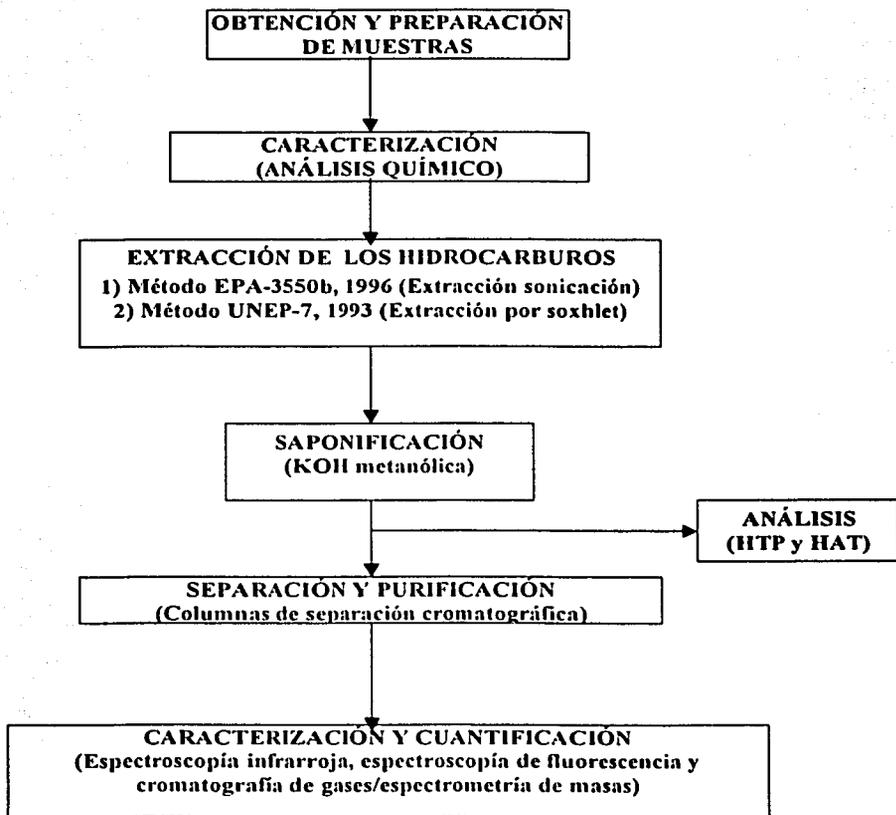


Figura 3.2. Metodología general del desarrollo experimental

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización química de los ostiones

El análisis químico se practicó con la finalidad de caracterizar las muestras de ostiones frescos y liofilizados. Los valores obtenidos de estas determinaciones fueron comparados con los reportados en la literatura por el Instituto Nacional de la Nutrición (INN) (Tabla 4.1). Adicionalmente, se realizó un análisis elemental para obtener los porcentajes de carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre (Tablas A.1 y A.2 del Anexo A). De las determinaciones realizadas, se observa que los valores obtenidos del análisis químico fueron muy similares a los reportados en la literatura por el INN; sin embargo, la discrepancia existente en cuanto al contenido de minerales puede deberse a las variaciones entre los sedimentos de donde fueron recolectadas las muestras y de las especies obtenidas (Castro, 1981; Wilbur, 1983; Becerra, 1984).

Tabla 4.1. Análisis químico de la harina de ostión

Parámetro	Porcentaje ¹	Porcentaje ²	Porcentaje ³	Diferencia (3-2)
Humedad ⁴	6.9642 ± 0.129	79.45 ± 0.168	81.8	+2.3
Cenizas ⁴	11.25 ± 0.37	16.78 ± 0.897	11.0	-5.78
Grasa ⁴	5.052 ± 0.2076	1.75 ± 0.3.076	2.3	+0.55
Nitrógeno Kjeldahl (Proteína) ⁴	40.635 ± 0.877	10.56 ± 1.2034	9.4	-1.16
Nitrógeno (Proteína) (Analizador elemental) ⁵	6.050 ± 0.230 38.064 ± 0.681	No se determino	---	---
Carbono ⁵	37.802 ± 0.540	No se determinó	---	---
Hidrógeno ⁵	6.687 ± 0.348	No se determinó	---	---
Azufre ⁵	0.377 ± 0.0354	No se determinó	---	---

1 Los valores mostrados son en ostiones liofilizados

2 Los valores son en ostiones frescos

3 Tablas de uso práctico del valor nutricional de los alimentos de mayor consumo en México (INN, 1996)

4 Los valores reportados son el promedio de tres determinaciones experimentales

5 Los valores reportados son el promedio de siete determinaciones experimentales

Al compararse los valores del porcentaje de proteína obtenidos por ambos métodos se observa una gran similitud entre ambos, debido en gran parte a los métodos empleados: El primer método se lleva a cabo mediante una digestión ácida y una destilación en micro-Kjeldahl de la cual se obtuvo un porcentaje de 40.635% ± 0.877 . En el segundo método se empleó un analizador elemental, en donde se obtuvo un porcentaje del 38.064% ± 0.681 (Tablas A.1 y A.2). Cabe destacarse que en este último método, la cantidad adicionada de muestra es menor que el anterior (de 1 a 3 mg) y el análisis se efectúa en 10 minutos. Otra de las ventajas que presenta dicho método, es que permite conocer los porcentajes de otros elementos como son H, C, S y N, a diferencia del método tradicional. Sin embargo, una de las desventajas que se presenta es que la muestra debe estar completamente homogénea ya que, debido a la cantidad empleada, ésta resulta ser una variable muy importante para el análisis. En ambos casos se empleó el factor de 6.25, para el cálculo del porcentaje de proteína, según lo reportado por Hart (1987) y Belitz (1997), ya que en la literatura no se cuenta con un valor específico para moluscos.

4.2 Espectros de IR de las fracciones cromatográficas

Los estudios de espectroscopía infrarroja se realizaron con la finalidad de detectar bandas características de compuestos aromáticos en las regiones de 3100-3000, 1630-1600, 900-700 cm^{-1} . En este estudio se colocó una muestra de la fracción sobre placas de KBr formando de esta manera una película que se analizó en el equipo de IR (Esta metodología fue descrita previamente en la sección 3.5 del capítulo III). En los espectros obtenidos se identificaron señales correspondientes al "stretching" C-H de compuestos alifáticos y bandas correspondientes a metilos

y metilenos en las regiones de 2940 – 2980 cm^{-1} y en 1450 – 1380 cm^{-1} respectivamente. Las bandas de –OH en la región de 3600 – 3000 cm^{-1} pueden ser debido a la presencia del glicerol. También se observa la presencia de una banda en la región de 1750-1720 cm^{-1} , que puede provenir del carbonilo de los triglicéridos presentes en las muestras, del glicerol, o de algún otro material biogénico. Por otro lado, se observó que la señal correspondiente al -OH se ve incrementada al aumentarse la polaridad del disolvente. El análisis de estos resultados indican que, dado a que los ostiones son una matriz compleja en la que existe un alto contenido de lípidos y de material no saponificable, no se logra eliminar mediante el lavado y la separación cromatográfica en la columna, por lo que permanecen como contaminantes y, debido a ello, las bandas correspondientes a los compuestos aromáticos (de los estándares) se ven “opacadas” haciéndolas no visibles mediante esta técnica. En la Figura 4.1 se observan las bandas descritas anteriormente, observándose la señal para el grupo (-OH) y su incremento conforme la polaridad del disolvente aumenta. Así, en las fracciones eluidas con hexano (Fracción 1) y la mezcla de hexano:diclorometano 9:1 (Fracción 2) no se aprecian estas bandas; sin embargo, en las fracciones 3 y 4, las bandas aparecen muy intensas. Cabe mencionar que estas dos últimas fracciones se obtuvieron empleando la mezcla de hexano:diclorometano 1:1 y diclorometano al 100% respectivamente.

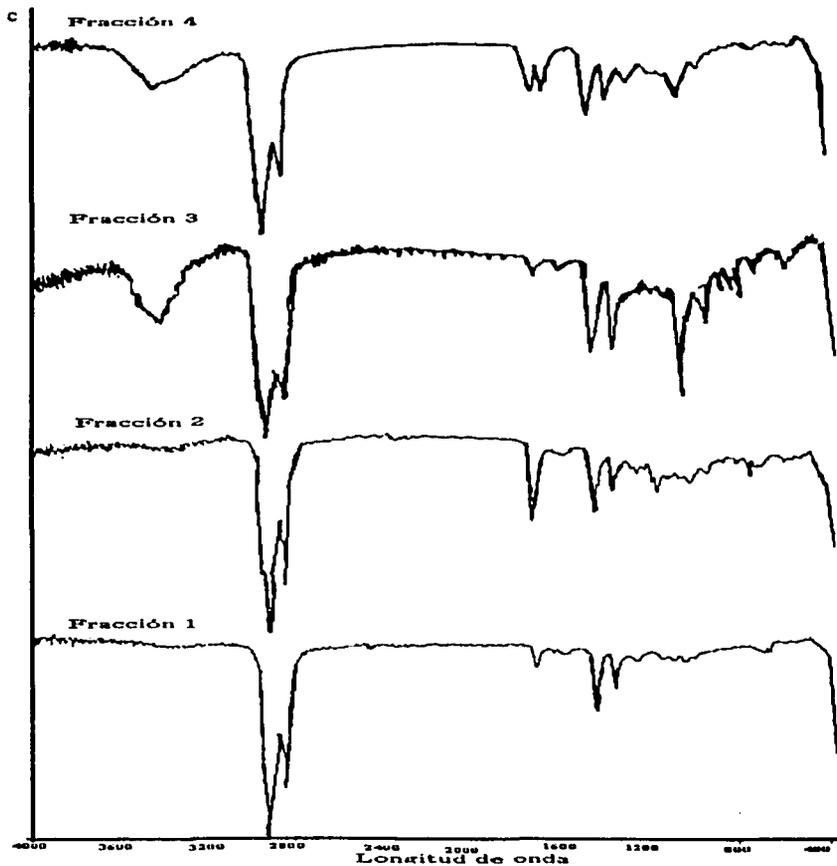


Figura 4.1 Espectros de IR de las 4 fracciones cromatográficas para una muestra extraída por sonicación

4.3 Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

La determinación de los HTP se efectuó empleando espectroscopía infrarroja, ya que el uso de esta técnica es una medida de estimar la contaminación por

compuestos del petróleo en agua, sedimento y suelo. Los valores obtenidos por esta técnica son una estimación indirecta de la contaminación del ambiente marino, ya que estos compuestos son bioacumulados por los ostiones. Gracias al estudio cualitativo de IR, se determinó que el material biogénico, aumenta la señal para los HTP, lo cual es lógico ya que dichos compuestos son analizados en la señal de 2930 cm^{-1} y todo compuesto (incluyendo al material biogénico) que presente metilos y metilenos darán absorbancia en esta banda. Debido a este panorama, esta parte del estudio fue realizado en muestras previamente saponificadas por ambos métodos (sonicación y soxhlet) y, en muestras sin una saponificación previa, empleando el método de soxhlet. Los resultados para las muestras saponificadas y no saponificadas variaron notablemente, obteniéndose valores de $4.937 \pm 0.189\text{ mg/kg}$ de ostión para las muestras extraídas por sonicación y de $6.249 \pm 0.098\text{ mg/kg}$ de ostión para las muestras extraídas por soxhlet. Por otro lado, las muestras a las cuales no se les aplicó una saponificación previa arrojaron valores de $14.80 \pm 0.325\text{ mg/kg}$. Con base en estos resultados se confirmó que los materiales biológicos provenientes de los ostiones y los cuales son solubles en los disolventes empleados en la extracción y que permanecen en forma de remanentes, son los causantes del incremento en los valores de los HTP. En la Tabla 4.2 se muestran los valores de HTP, obtenidos en el análisis de las muestras de ostiones para cada tratamiento. Cabe mencionar que, debido a los resultados obtenidos en las muestras sin saponificación, estos no fueron analizados posteriormente usando las otras metodologías.

Tabla 4.2 Valores de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en las muestras saponificadas y sin saponificar

Muestra	Método de extracción	Concentración (mg/kg)
M	UNEP-7, 1993	6.249 ± 0.098
MC4	UNEP-7, 1993	5.958 ± 0.111
S	EPA-3550b, 1996	4.937 ± 0.189
SC4	EPA-3550b, 1996	5.123 ± 0.099
MSS	Soxhlet	14.80 ± 0.325

M = Muestra extraída por soxhlet y saponificada

MC4 = Muestra extraída por soxhlet contaminada con 4 HAP y saponificada

S = Muestra extraída por sonicación y saponificada

C4 = Muestra extraída por sonicación contaminada con 4 HAP y saponificada

MSS = Muestra sin saponificar extraída por soxhlet

4.4 Determinación de hidrocarburos aromáticos totales (HAT)

Los HAT se analizaron en las muestras de ostiones obteniéndose resultados diferentes para cada método de extracción. Los valores obtenidos en este estudio se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Valores de hidrocarburos aromáticos totales determinados en las muestras de ostiones por espectroscopía de fluorescencia

Muestra	Concentración (mg/kg)	Método de extracción
M	4.572 ± 0.125	UNEP 7, 1993
MC4	2.648 ± 0.051	UNEP 7, 1993
MCP	8.452 ± 0.132	UNEP 7, 1993
S	2.399 ± 0.011	EPA 3550-b, 1996
SC4	0.653 ± 0.010	EPA 3550-b, 1996
SCP	7.326 ± 0.259	EPA 3550-b, 1996

M = Muestra extraída por el método soxhlet y saponificada

MC4 = Muestra extraída por el método soxhlet contaminada con 4 HAP y saponificada

MCP = Muestra extraída por el método soxhlet contaminada con pireno

S = Muestra extraída por el método de sonicación y saponificada

SC4 = Muestra extraída por el método de sonicación, contaminada con 4 HAP y saponificada

SCP = Muestra extraída por sonicación contaminada con pireno

El estudio de los hidrocarburos aromáticos totales, como análisis rutinario, es una medida del análisis de la contaminación causada por los hidrocarburos aromáticos provenientes de material petrogénico y, sobre todo, de aquellos compuestos que presentan ciclos aromáticos y dobles ligaduras conjugadas.

El estudio cualitativo sirvió como base para determinar las concentraciones adecuadas para el estudio cuantitativo, además de proveer información adicional sobre la concentración aproximada de estos compuestos en la muestra. En la Figura 4.2, se aprecian las intensidades que presentaron diferentes muestras según el tratamiento aplicado.

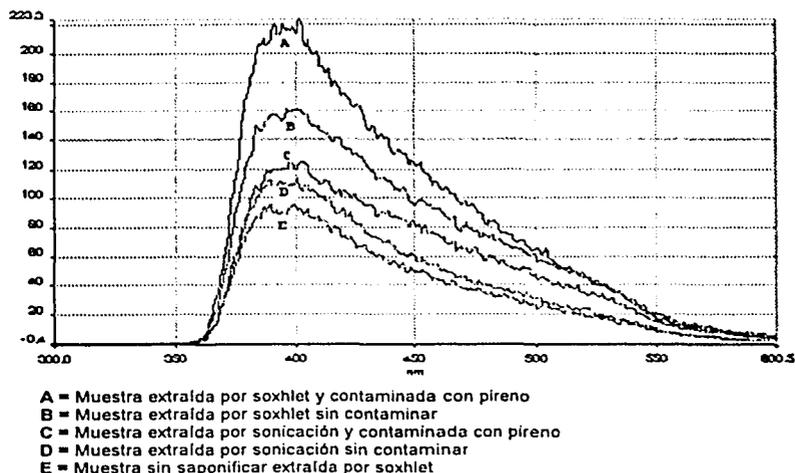


Figura 4.2. Espectros de fluorescencia de muestras de ostiones

4.5 Evaluación de los HAP en la columna cromatográfica y en el sistema ostión – columna cromatográfica empleando CG/EM

Este estudio se realizó con la finalidad de evaluar la retención de los compuestos por los adsorbentes empleados tanto en las columnas cromatográficas (alúmina y sílice) así como por la matriz en estudio (ostiones liofilizados). Para ello se realizaron por triplicado dos experimentos: El primero consistió en pasar por la columna un volumen de la mezcla de estándares de concentración conocida,

eluyéndola conforme a lo descrito en el método 7 de la UNEP (1993). De esta forma se obtuvieron los porcentajes de retención para cada compuesto en los adsorbentes. El segundo experimento consistió en contaminar una muestra de ostiones con una concentración conocida de estándares para, posteriormente, tratarse según lo establecido por el método antes mencionado. Con ello se obtuvieron, tanto los porcentajes de retención en los adsorbentes, como los de recuperación de los HAP en los ostiones. Cabe mencionar que la caracterización y cuantificación de los compuestos se realizó empleando cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM). Los resultados de estos experimentos se aprecian en las Tablas 4.4 y 4.5. Es posible observar que cada compuesto presentó diferente retención, tanto en los adsorbentes, como en la matriz, debido al número de anillos aromáticos que presentan los HAP y a la polaridad de cada uno de ellos, traduciéndose en la mayor o menor retención hacia los adsorbentes. Por otro lado, se aprecia que la recuperación del naftaleno en los adsorbentes fue del 36% y la recuperación total también fue del 51%, explicándose este fenómeno por la volatilidad tan alta con relación a los otros compuestos, perdiéndose en el momento de reducir el volumen mediante la destilación a presión reducida. En cuanto a la recuperación de los otros compuestos, ésta tiene una tendencia a incrementarse conforme se aumenta el número de anillos que conforman a los HAP. En el caso de la recuperación en los ostiones, se nota que los compuestos de menor peso molecular interactuaron con esta matriz, quedando fuertemente retenidos. No obstante, los de mayor peso molecular tienden a interactuar en una forma menor, lográndose recuperar casi en su totalidad.

Tabla 4.4 Estudio de retención de los compuestos por los adsorbentes en la columna

Compuesto	A mg/kg	B mg/kg	C mg/kg	D %	E %
Naftaleno	399.98	144.46 ± 2.58	255.52 ± 3.46	36.12	63.88
Acenafteno	400.54	318.35 ± 0.21	82.19 ± 0.33	79.48	20.52
Fluoreno	422.2	313.15 ± 0.05	109.05 ± 0.07	74.17	25.83
Fenantreno	403.26	304.34 ± 0.57	98.92 ± 0.69	75.47	24.53
Fluoranteno	417.25	286.2 ± 1.023	131.05 ± 1.48	68.51	31.41
Pireno	410.45	277.2 ± 0.99	133.25 ± 1.15	67.49	32.46
Criseno	394	383.05 ± 0.56	10.95 ± 1.05	97.22	2.78
Benzo(a)pireno	408.46	391.35 ± 0.19	83.8 ± 0.25	95.81	4.19

A = mg/kg que se pasaron por la columna

B = mg/kg recuperados

C = mg/kg retenidos por los adsorbentes

D = % de recuperación

E = % de retención en la columna

Tabla 4.5 Estudio de retención de los HAP por los ostiones

Compuesto	A mg/kg	B mg/kg	C mg/kg	D %	E %
Naftaleno	199.5	117.78 ± 1.42	81.72 ± 2.58	59.04	40.96
Acenafteno	199.78	178.69 ± 0.03	21.09 ± 0.35	89.44	10.56
Fluoreno	210.58	198.57 ± 0.03	12.01 ± 0.19	94.30	5.70
Fenantreno	201.14	187.12 ± 0.05	14.02 ± 0.23	93.03	6.97
Fluoranteno	208.36	169.53 ± 0.12	38.83 ± 0.05	81.36	18.64
Pireno	204.72	172.59 ± 0.14	32.13 ± 0.35	84.31	15.69
Criseno	196.51	193.19 ± 0.02	3.32 ± 0.01	98.31	1.69
Benzo(a)pireno	203.73	185.99 ± 0.05	17.74 ± 0.11	91.29	8.71

A = mg/kg con que se contamina la muestra

B = mg/kg recuperados

C = mg/kg retenidos por los ostiones

D = % de recuperación

E = % de retención en los ostiones

4.6 Estudio de los HAP empleando CG/EM en las muestras de ostiones

En este estudio se analizaron las muestras de ostiones extraídas mediante los métodos UNEP-7 (1993) y EPA-3550b (1996). También se incluyeron muestras contaminadas "intencionalmente" con 19.894 ppm de 4 estándares (Naftaleno, acenafteno, fluoranteno y benzo(a)pireno) y otras contaminadas solamente con 12.984 ppm de pireno. En la Tabla 4.6 se muestran las concentraciones de cada uno de los HAP determinados en cada una de las 4 fracciones, siendo los valores la suma de la concentración de las cuatro fracciones que conformaron la muestra. En la fracción uno, la cual fue obtenida mediante la elución con 100% de hexano, no se logró identificar a ninguno de los compuestos en estudio; sin embargo, conforme se incrementó la polaridad de la mezcla de elución (9:1, 1:1 hexano:diclorometano y 100% diclorometano), las concentraciones de los HAP también lo hicieron, de tal forma, que la concentración mayor se obtuvo en la fracción 4, correspondiente a la elución con 100% de diclorometano. Por otro lado, se observó que, tanto en las muestras contaminadas como en las no contaminadas no se logró detectar al naftaleno, acenafteno y fluoreno, debido a su volatilidad (ver los comentarios realizados en la sección 4.5). Los resultados obtenidos en las muestras MC4 y SC4 de la Tabla 4.6 corroboran que la extracción se realiza de forma más eficiente al emplearse el método UNEP-7 (1993), que el EPA-3550b (1996). Las muestras MC4 y SC4 fueron contaminadas con 4 estándares, de los cuales sólo se logró identificar para la fracción MC4 al fluoranteno y al benzo(a)pireno pero, adicionalmente, de los compuestos contaminados intencionalmente, también se determinaron para la

misma muestra al fenantreno, pireno y criseno, lo cual habla de que posiblemente la muestra en sí ya contenía a estos contaminantes . Para la muestra SC4 se observó la presencia de fluoranteno y fenantreno. Por otro lado, en las muestras contaminadas únicamente con pireno (MCP y SCP), se detectó la presencia de este compuesto en concentraciones de 6.78 ppm y 4.73 ppm respectivamente.

Tabla 4.6 Valores de HAP determinados en las muestras

Muestra	NAP mg/Kg	ACEN mg/Kg	FLN mg/Kg	PHE mg/Kg	FLT mg/Kg	PYR mg/Kg	CHR mg/Kg	BaP mg/Kg	DaA mg/Kg
M ¹	ND	ND	ND	0.96 ± 0.12	ND	0.83 ± 0.02	0.86 ± 0.09	0.59 ± 0.01	ND
MC4 ²	ND	ND	ND	0.82 ± 0.03	11.94 ± 0.32	0.36 ± 0.02	0.52 ± 0.12	9.64 ± 0.46	ND
MCP ²	ND	ND	ND	0.68 ± 0.02	ND	6.78 ± 0.18	0.12 ± 0.01	0.81 ± 0.10	ND
S ¹	ND	ND	ND	0.35 ± 0.01	0.96 ± 0.26	0.50 ± 0.09	ND	ND	ND
SC4 ²	ND	ND	ND	0.45 ± 0.07	4.74 ± 0.21	ND	ND	ND	ND
SCP ²	ND	ND	ND	ND	ND	4.73 ± 0.13	ND	ND	ND

M = Muestra extraída por soxhlet

MC4 = Muestra extraída por soxhlet contaminada con naftaleno, acenafteno, fluoreno y benzo(a)pireno

MCP = Muestra extraída por soxhlet contaminada con pireno

S = Muestra extraída por sonicación

SC4 = Muestra extraída por sonicación contaminada con naftaleno, acenafteno, fluoreno, benzo(a)pireno

SCP = Muestra extraída por sonicación contaminada con pireno

1 = Es el promedio de 8 submuestras

2 = Es el promedio de 4 submuestras

Naftaleno (NAP), acenafteno (ACEN), fluoreno (FLN), fenantreno (PHE), fluoranteno (FLT), Pireno (PYR), criseno (CHR), benzo(a)pireno (BaP), dibenzo(a,h)antraceno

4.7 Cromatogramas y espectros de masas en los estándares y en las muestras de ostiones

Para este estudio se preparó una mezcla con 8 estándares para observar la retención de los compuestos, tanto en la columna, como en los ostiones, y se analizó por la técnica de CG/EM, con al finalidad de determinarse tanto los tiempos de retención de cada uno de los compuestos, como las fragmentaciones de los mismos. En la Figura 4.3 se aprecia el cromatograma correspondiente a los 8 estándares en estudio y los tiempos de retención obtenidos para cada uno de

ellos. Los espectros de masas correspondientes a cada uno de los estándares se muestran en el Anexo C. El cromatograma de una muestra de ostiones contaminada con una mezcla de 8 estándares se observa en la Figura 4.4. En ella se aprecia que los tiempo de retención coinciden con los de la mezcla de estándares; sin embargo, el pico correspondiente al naftaleno (tiempo de retención de 7.9 min) no se logró identificar. Adicionalmente, en la Figura 4.5 se aprecia el cromatograma obtenido de una muestra de ostiones, observándose que los tiempos de retención de los tres picos de mayor intensidad fueron comparables con los de los estándares, los cuales correspondieron al fenantreno, fluoranteno y benzo(a)pireno cuyos pesos moleculares son de 178, 202 y 252 UMA, respectivamente. La comprobación de la presencia de estos contaminantes se realizó mediante el detector de masas; En las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8 se muestran cada uno de los espectros de masas en la variante de evaluación selectiva de iones (ESI, SIM, por sus siglas en inglés) correspondientes a los contaminantes identificados.

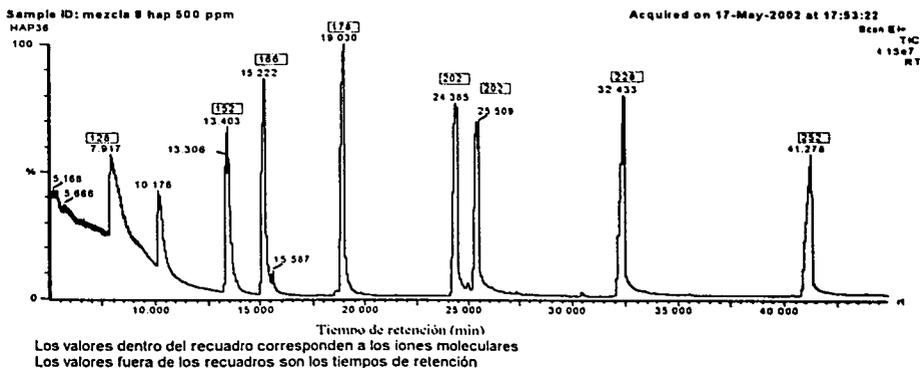
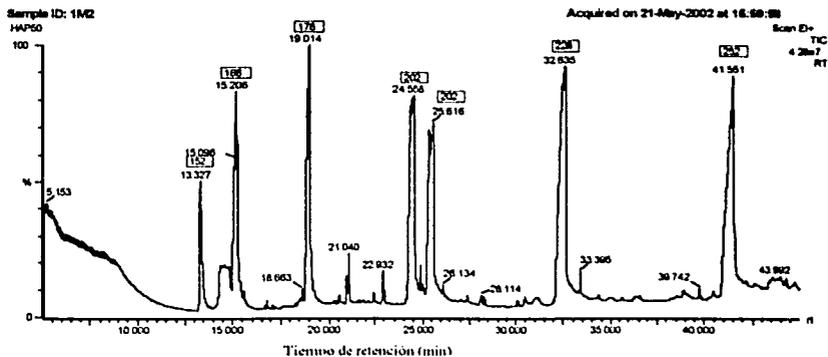
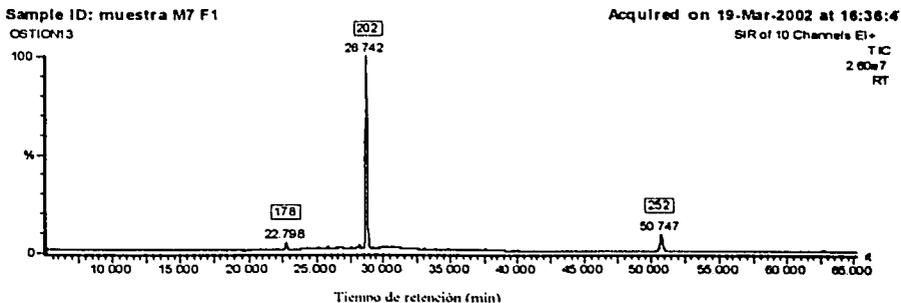


Figura 4.3 Cromatograma de una mezcla de 8 estándares



Los valores dentro del recuadro corresponden a los iones moleculares
Los valores fuera de los recuadros son los tiempos de retención

Figura 4.4 Cromatograma de una muestra contaminada con 8 estándares en la cual no se identificó el naftaleno



Los valores dentro del recuadro corresponden a los iones moleculares
Los valores fuera de los recuadros son los tiempos de retención

Figura 4.5 Cromatograma de una muestra de ostión

OSTIO 13

SIR OF 10 CHANNELS

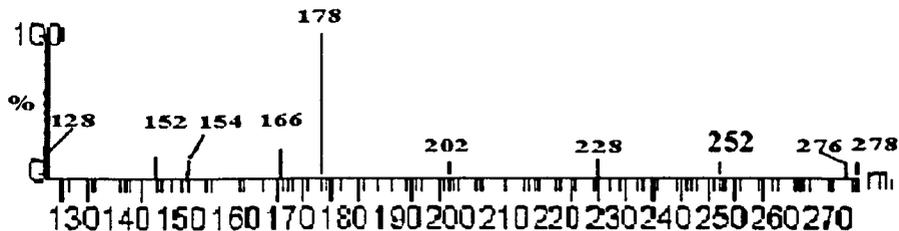


Figura 4.6 Espectro de masas correspondiente al fenantreno identificados en una muestra de ostiones

OSTIO 13

SIR OF 10 CHANNELS



Figura 4.7 Espectro de masas correspondiente al fluoranteno identificados en una muestra de ostiones

OSTIO 13

SIR OF 10 CHANNELS

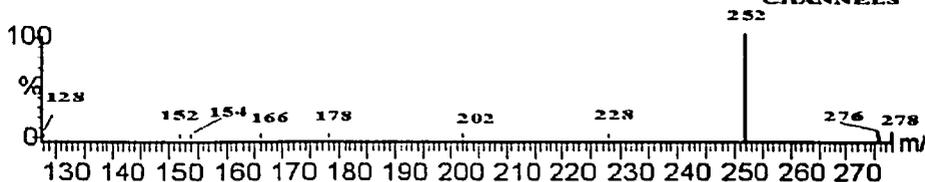


Figura 4.8 Espectro de masas correspondiente al benzo(a)pireno identificados en una muestra de ostiones

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en las investigaciones realizadas pueden derivarse las siguientes conclusiones.

Conclusiones

- Mediante el análisis químico se lograron caracterizar a las muestras de ostiones comerciales provenientes de la laguna de Tamiahua, Ver. Los valores determinados se encontraron muy cercanos a los valores reportados en la bibliografía.
- El método IMP-QA-620 establecido para la determinación de los hidrocarburos totales de petróleo ,HTP, permitió evaluar la presencia de los hidrocarburos del petróleo extraíbles con tetracloruro de carbono, en concentraciones de 4.94 a 6.25 ppm. Por otra parte, los valores de HTP obtenidos en las muestras sin saponificar fueron de 14.8 ppm, por lo que se comprueba que el material saponificable y no saponificable proveniente de los ostiones, interfiere en el análisis de los compuestos de interés y, sobre todo, sobrestima la concentración de HTP presentes en las muestras
- El método IMP-QA-610 para la determinación de hidrocarburos aromáticos totales también presentó algunas interferencias, ya que al analizar los espectros de fluorescencia se encontraron valores de 4.57 ppm para la muestra de ostión extraída mediante equipo soxhlet, (método UNEP-7, 1993) mientras que para la muestra obtenida por sonicación (método EPA, 3550b, 1996) se encontraron valores de 2.39 ppm.

- La limpieza de las muestras y el fraccionamiento de las mismas se realizó conforme a lo descrito en el método UNEP-7 (1993), constatándose que, con este método de extracción, se obtuvieron mejores rendimientos que al emplearse el método EPA, 3550b, 1996 en las muestras de ostiones, siendo este último un método no recomendable para el análisis de muestras con un bajo contenido de hidrocarburos.
- El estudio realizado por cromatografía de gases acoplado al detector de masas, resultó ser una excelente técnica para evaluar el rendimiento de la extracción. También fue una herramienta muy útil en la identificación y cuantificación selectiva de cada uno de los compuestos en estudio.
- Las concentraciones para dos HAP en las muestras se encontraron alrededor del orden de los 0.35 y 0.96 mg de fenantreno por kg de ostión y 0.50 y 0.83 mg de pireno por kg de ostión, por lo que es necesario realizar evaluaciones continuas de este producto alimenticio, ya que puede representar un problema de salud para los consumidores.

Recomendaciones

Dentro de las recomendaciones que se plantean a la luz de los resultados obtenidos en esta investigación, resaltan las siguientes.

Dado que la NOM-031-SSA1-1993 no establece límites máximos permisibles de hidrocarburos y otros compuestos orgánicos en moluscos bivalvos, es imperante realizar un estudio toxicológico para determinar la repercusión a corto, mediano y largo plazo por la ingesta de HAP en las concentraciones presentes en los ostiones comerciales.

Es recomendable colocar a los ostiones en un medio libre de contaminantes a fin de eliminar estos compuestos, antes de ser dispuestos para su distribución y consumo.

Se recomienda realizar el estudio de los HAP por fluorescencia con la variante de síncronos de excitación, a fin de corroborar los resultados obtenido.

ANEXOS

Anexo A

Determinación del contenido de humedad (AOAC, 1980; Aragón, 1991)

Se colocan aproximadamente dos gramos de la muestra húmeda (por triplicado) en pesafiltros con tapa previamente pesados después de ponerlos a peso constante. La muestra se seca por 1 hora en estufa a 130°C con la tapa del pesafiltro a un lado. Posteriormente, se retira el pesafiltro de la estufa y se deja enfriar en desecador, para pesarlo una vez que se equilibra con la temperatura del ambiente.

El porcentaje de humedad se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{A - B \times 100}{M}$$

Donde:

A = peso del pesafiltro más muestra

B = peso del pesafiltro más muestra después de secar a la estufa

M = peso de la muestra en gramos

Determinación de cenizas (AOAC, 1980, Aragón, 1991)

Las cenizas se determinan por triplicado, para ello se pesan aproximadamente 3 gramos de muestra en crisol previamente pesado después de mantenerlo en la mufia por 2 horas a 600°C. Se carbonizan las muestras con mechero hasta que ya no se observe desprendimiento de humo. Posteriormente se colocan en la mufia a 550°C para evitar la volatilización de los cloruros. El calentamiento se suspende cuando las cenizas se encuentren color blancas - grisáceas. Se dejan enfriar en desecador y se pesan. Los cálculos se realizan con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{(P_{cm} - P_c) \times 100}{P_m}$$

Donde:

P_{cm} = peso del crisol con cenizas

P_c = peso del crisol vacío

P_m = peso de la muestra en gramos

Determinación de grasa cruda o extracto etéreo (Aragón, 1991)

La grasa cruda, extracto etéreo, se determina mediante el método de extracción en soxhlet. Para dicha determinación se pesan entre 3 y 4 gramos de la harina de ostión en cartuchos de extracción, se tapa la muestra con algodón y se coloca en el extractor (soxhlet). Por otra parte los matraces con perlas de ebullición se mantienen a una Temperatura de 100°C durante dos horas. Se enfrían y se pesan. Posteriormente, se monta el equipo de destilación y se agrega éter en cantidad suficiente para dos descargas. Se mantiene el reflujo por aproximadamente 6 horas.

Una vez transcurrido el tiempo, se retira el cartucho, se prosiguiéndose la destilación del disolvente hasta casi sequedad, el extracto se seca en estufa por 30 minutos a 100°C, se enfría en desecador y se pesa.

El porcentaje de grasa cruda se calcula empleado la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa Cruda} = \frac{(P_{me} - P_m) \times 100}{PM}$$

En donde:

P_{me} = Peso del matraz con extracto

P_m = Peso matraz vacío

PM = Peso de la muestra en gramos

Determinación de proteína cruda (AOAC, 1980, Aragón, 1991)

El nitrógeno para calcular la proteína cruda fue determinado por dos métodos. El primero se realiza por digestión ácida y destilación en equipo micro Kjeldahl (Método 9, AOAC, 1980). Para ello se pesan entre 30 y 40 mg de la muestra de ostión en papel blanco delgado, se le adicionan 40 mg de sulfato de cobre, 0.5 g de sulfato de sodio y 10 mg de óxido rojo de mercurio. Se colocan en los tubos de digestión y se le adicionan 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se colocan los matracas en el equipo de digestión y se calientan aproximadamente dos horas, hasta la total destrucción de la materia orgánica. Posteriormente se procede a colocar cuantitativamente la solución de la digestión en el equipo micro Kjeldahl, se adiciona 20 mL hidróxido de sodio concentrado (60%) a fin de producir la destilación del amoníaco, el cual se recibe en 50 mL de ácido bórico. La destilación se continúa hasta obtener un volumen aproximado de 100 mL. Como último paso se procede a titular el destilado empleando ácido clorhídrico 0.01N.

Los cálculos se realizan con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{mL del blanco} - \text{mL del problema}) \times N(\text{HCl}) \times 0.014 \times 100}{\text{peso en gramos de la muestra}}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times \text{Factor (6.25)}$$

$$0.014 = \text{meq. Nitrógeno}$$

Donde:

mL del Blanco = volumen de HCl gastados en la titulación del blanco

mL del problema = volumen de HCl gastados en la titulación de la muestra

N (NaOH) = normalidad de NaOH

0.014 = miliequivalentes de nitrógeno (PM/1000=0.014)

N = normalidad del HCl

m = gramos de muestra

El segundo método empleado para la determinación de nitrógeno se hizo en un equipo de análisis elemental. En dicha técnica, la muestra es oxidada para que sus componentes se transformen en sus correspondientes óxidos: Nitrógeno (NO_x), azufre (SO_x), carbono (CO_x) e hidrógeno (H_2). Para ello se pesan entre 1 y 3 mg de muestra en cápsulas de estaño, las cuales se introducen en el analizador elemental. De este modo se obtienen los valores de dichos elementos. Con el valor del % de nitrógeno y empleando el factor para proteína de 6.25 se calculó el porcentaje de proteína cruda.

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times \text{Factor (6.25)}$$

En las Tablas A.1 y A.2 se muestran los valores obtenidos en el análisis elemental de los ostiones liofilizados

Tabla A.1 Análisis de los contenidos de C, H, y S en la harina de ostión

Elemento (%)	Promedio *
Nitrógeno (N)	6.0508 ± 0.23
Carbono (C)	37.802 ± 0.540
Hidrógeno (H)	6.687 ± 0.1208
Azufre (S)	0.377 ± 0.00126

*El valor que se muestra es el promedio de 7 determinaciones

Tabla A.2 Contenido de proteína en la harina de ostión de acuerdo con los valores obtenidos del % de nitrógeno en el análisis elemental

Porcentaje de nitrógeno	Porcentaje de proteína	Promedio (%)
5.94	37.14	38.064 ± 0.681
6.17	38.54	
6.22	38.87	
6.14	38.40	
5.97	37.37	

Nota: El factor empleado para el cálculo de proteína es 6.25

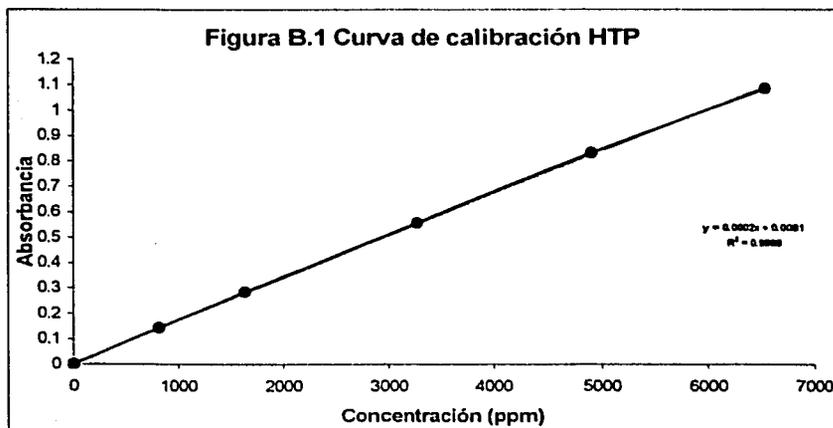
Anexo B

Determinación de hidrocarburos totales de petróleo

La cuantificación se realizó mediante el empleo de celdas de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico y se leyó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 2930 cm^{-1} . Para determinar la concentración de estos compuestos en los ostiones, los extractos se secaron y se resuspendieron en 10 mL de tetracloruro de carbono.

Tabla B.1 Curva de calibración para TPH empleando celda de 0.1 cm

Concentración (ppm)	Absorbancia
0	0
820	0.1429
1640	0.2847
3279	0.5567
4919	0.8311
6558	1.08311



Anexo C

Estudio por espectroscopía de infrarrojo de las fracciones
cromatográficas de las muestras de ostiones

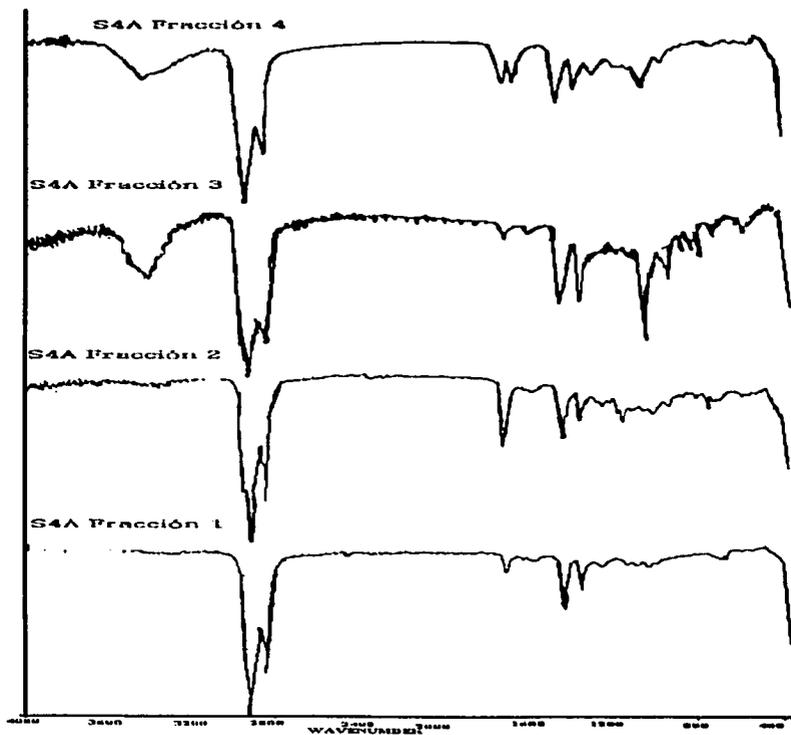


Figura C.1 Espectros de infrarrojo de las 4 fracciones correspondientes a una muestra de ostiones contaminada con estándares de HAP, extraída con sonicador

- Fracción 1 Hexano
- Fracción 2 Hexano:diclorometano 9:1
- Fracción 3 Hexano:diclorometano 1:1
- Fracción 4 Diclorometano

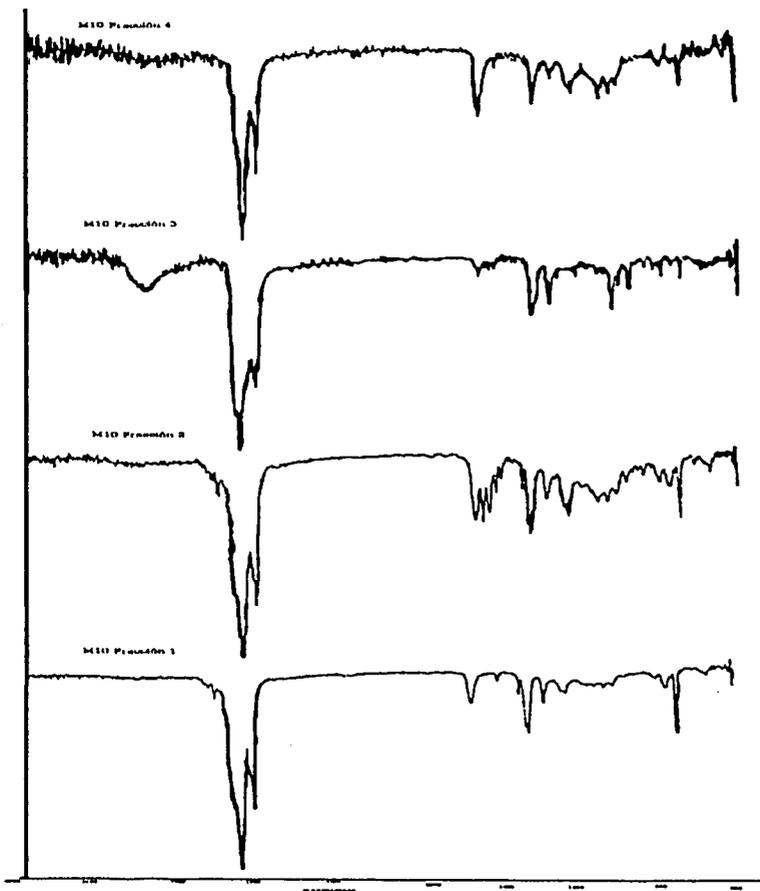


Figura C.2 Espectros de infrarrojo de las 4 fracciones correspondientes a una muestra de ostiones contaminada con estándares de HAP, extraída con soxhlet

Fracción 1 Hexano

Fracción 2 Hexano:diclorometano 9:1

Fracción 3 Hexano:diclorometano 1:1

Fracción 4 Diclorometano

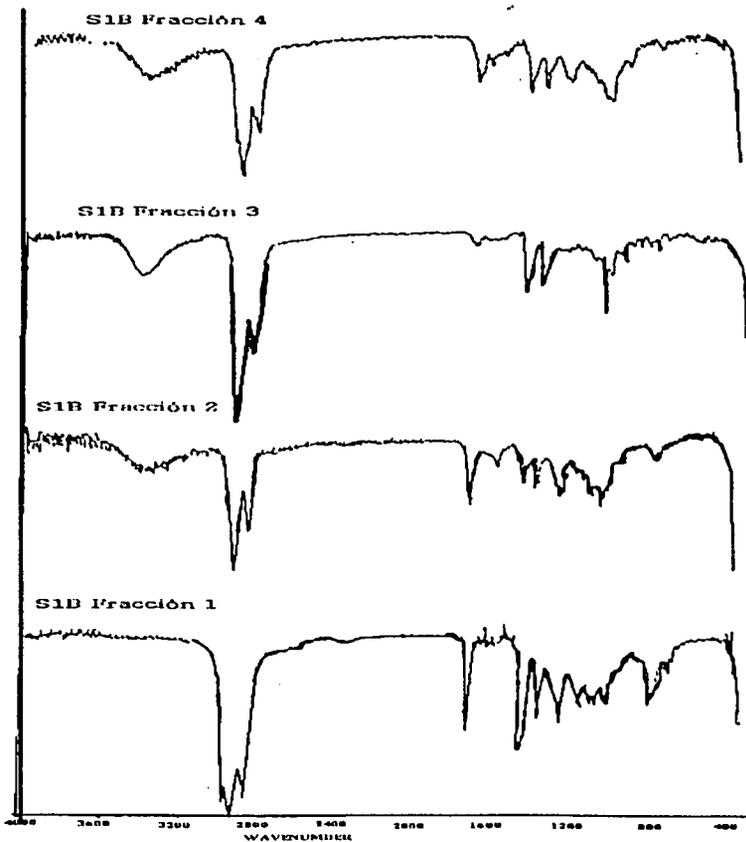


Figura C.3 Espectros de infrarrojo de las 4 fracciones correspondientes a una muestra de ostiones, extraída con sonicador

Fracción 1 Hexano
 Fracción 2 Hexano:diclorometano 9:1
 Fracción 3 Hexano:diclorometano 1:1
 Fracción 4 Diclorometano



Figura C.4 Espectros de infrarrojo de las 4 fracciones correspondientes a una muestra de ostiones, extraída con soxhlet

- Fracción 1 Hexano
- Fracción 2 Hexano:diclorometano 9:1
- Fracción 3 Hexano:diclorometano 1:1
- Fracción 4 Diclorometano

Anexo D

Estudio de fluorescencia e hidrocarburos aromáticos totales

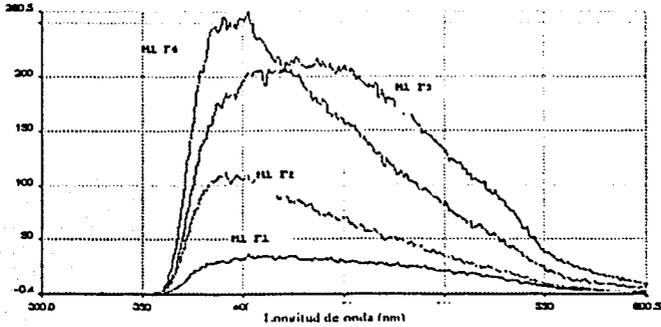


Figura D.1 Espectros de fluorescencia de las 4 fracciones de una muestra

- F1 Fracción de Hexano
- F2 Fracción Hexano:diclorometano 9:1
- F3 Fracción Hexano:diclorometano 1:1
- F4 Fracción Diclorometano

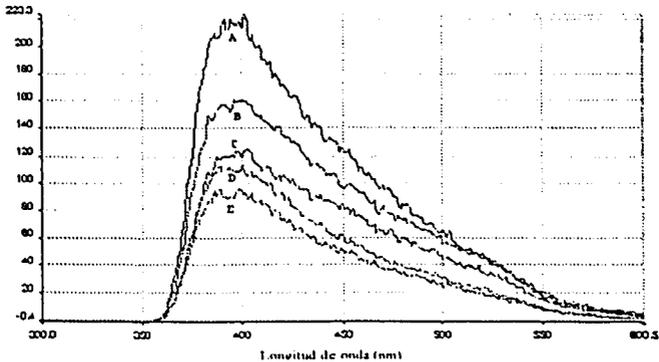


Figura.D.2 Espectros de fluorescencia de muestras de ostiones

- A = Muestra extraída por soxhlet y contaminada con pireno
- B = Muestra extraída por soxhlet sin contaminar
- C = Muestra extraída por sonicación y contaminada con pireno
- D = Muestra extraída por sonicación sin contaminar
- E = Muestra sin saponificar extraída por soxhlet

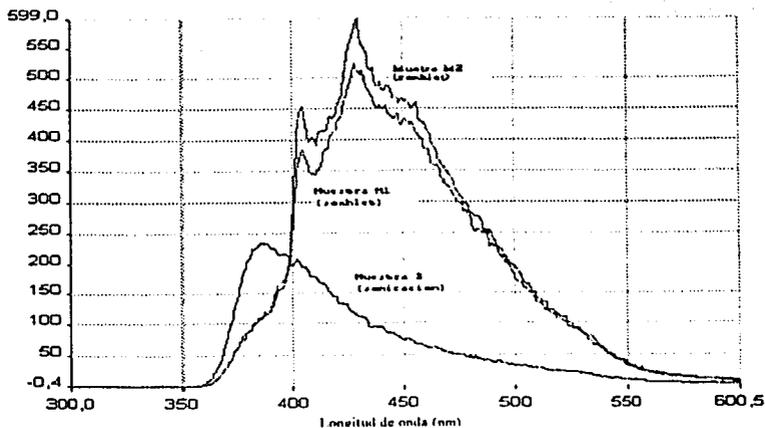


Figura D.3 Espectros de 2 muestras extraídas por soxhlet M1, M2 y sonicación S1

Muestra M1 Extraída por soxhlet
 Muestra M2 extraída por soxhlet
 Muestra S extraída por sonicación

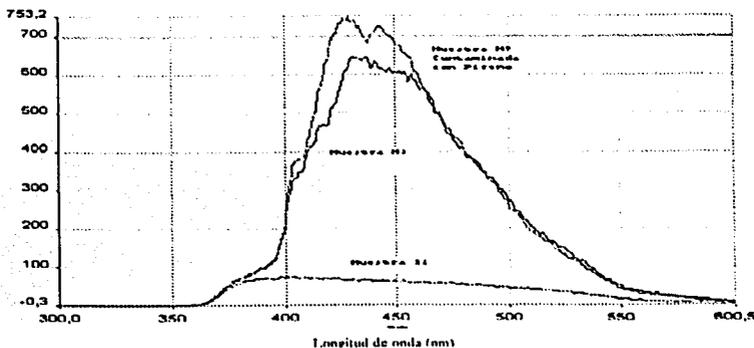


Figura D.4 Espectros de 3 muestras: Roja Contaminada con pireno, azul muestra extraída en soxhlet, verde muestra extraída en sonicación

Muestra M3 Extraída por soxhlet
 Muestra M7 contaminada con pireno, extraída por soxhlet
 Muestra S2 extraída por sonicación

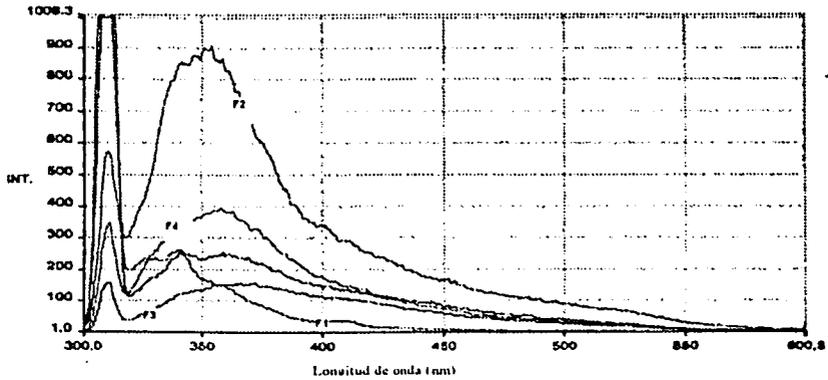


Figura D.5 Espectros de fluorescencia correspondientes a las fracciones cromatográficas de una muestra (M0-1) extraída mediante soxhlet

F1 Hexano
 F2 Hexano:diclorometano
 F3 Hexano:diclorometano
 F4 Diclorometano

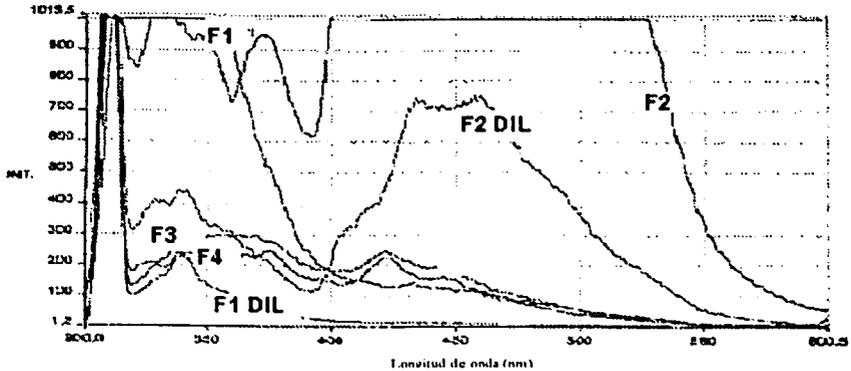


Figura D.6 Espectros de fluorescencia correspondientes a las fracciones de una muestra extraída por sonicación

F1 Hexano
 F2 Hexano:diclorometano
 F3 Hexano:diclorometano
 F4 Diclorometano

Tabla D.1 Condiciones de operación del equipo de fluorescencia y valores de la curva de calibración

FI Concentration results			
Generated on 08-10-2001			
at time 15:09:14			
Measurement conditions			
Method: C:\FLWINLAB\METHODS\CRISENO1.MTH			
Analyst: Pável Castillo Urueta			
Comments: criseno			
Ex. wavelength (nm): 310			
Em. wavelength (nm): 380			
Ex. slit (nm): 5			
Em. slit (nm): 5			
Integration time (s): 1			
Em. filter: 390nm Cut-off			
Reference sample results			
Std#	Conc*Fct (ppb)	Intens.	BG
EST1	100	81.462	0.329
EST2	200	154.555	0.329
EST3	400	265.075	0.329
EST4	600	375.741	0.329
EST5	800	494.758	0.329
EST6	1000	639.283	0.329
Fit equation	Y=MX+C		
Slope	0.603		
Intercept	23.728		
Correlation	0.9989		

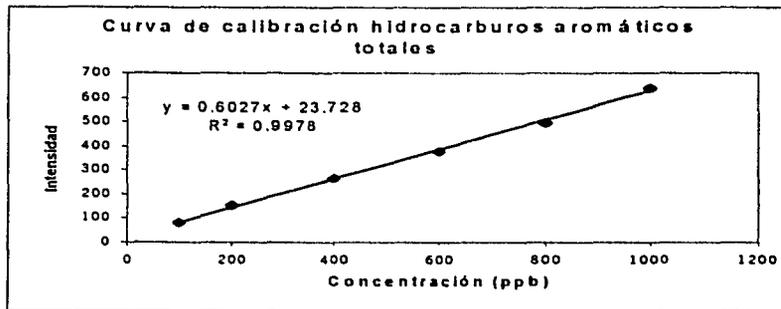


Figura D.7 Curva de calibración para determinación de hidrocarburos aromáticos totales

Tabla D.2. Valores de hidrocarburos aromáticos totales determinados en las muestras de ostiones por espectroscopía de fluorescencia

Muestra	concentración (mg/kg)	Método de extracción
M	1.357 ± 0.125	UNEP 7, 1993
MC4	2.648 ± 0.051	UNEP 7, 1993
MCP	8.452 ± 0.132	UNEP 7, 1993
S	0.399 ± 0.011	EPA 3550-b, 1996
SC4	0.653 ± 0.010	EPA 3550-b, 1996
SCP	7.326 ± 0.259	EPA 3550-b, 1996

M = Muestra extraída por soxhlet y saponificada

MC4 = Muestra extraída por soxhlet contaminada con 4 HAP y saponificada

MCP = Muestra extraída por soxhlet contaminada con pireno

S = Muestra extraída por sonicación y saponificada

SC4 = Muestra extraída por sonicación contaminada con 4 HAP y saponificada

SCP = Muestra extraída por sonicación contaminada con pireno

Anexo E

Curvas de calibración y parámetros empleados en cromatografía de gases / espectrometría de masas

Tabla E.1. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases

Temperatura Inicial del horno (°C)	Velocidad (°C/min)	Tiempo (min)
90	8	0.5
180	5	0.0
245	2	0.0
300	6	6.0

Tabla E.2 Condiciones de operación para el detector de masas

Emisión	500
Temperatura de la fuente	200 °C
Temperatura de la interfase	250 °C
Presión de análisis	73.73 kPa (- 4 psi)
Velocidad de lectura	4 ciclos s ⁻¹
Modo	SIM
Tiempo de análisis	66 min

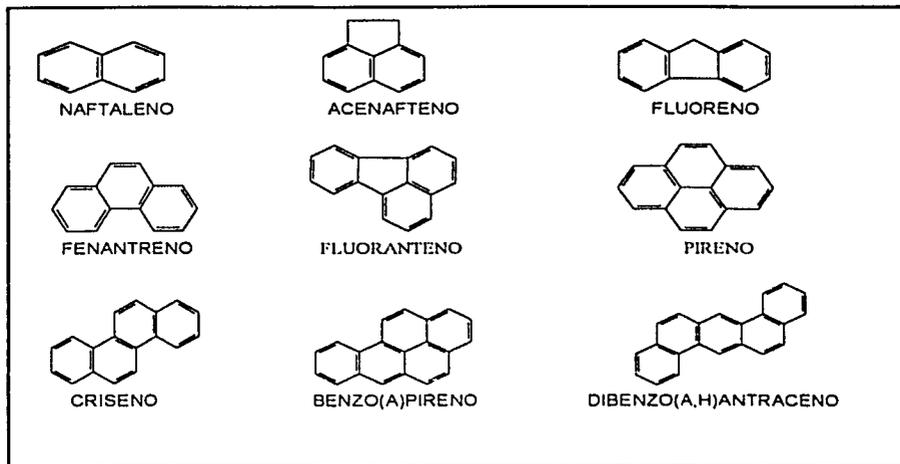


Figura E.1 Estructuras de los 9 HAP en estudio

Tabla E.3 Iones moleculares y tiempos de retención de los 9 HAP en estudio

COMPUESTO	ION MOLECULAR	TIEMPO DE RETENCIÓN
NAFTALENO	128	7.915
ACENAFTENO	154	13.936
FLUORENO	166	15.706
FENANTRENO	178	19.596
FLUORANTENO	202	24.688
PIRENO	202	25.707
CRISENO	228	32.903
BENZO(A)PIRENO	252	42.937
DIBENZO(AH)ANTRACENO	278	51.936

Tabla E.4 Datos para las curvas de calibración para los 9 HAP analizados en las muestras

Concentración (ppb)	Naftaleno	Acenafteno	Fluoreno	Fenantreno	Fluoranteno
200	657078	15950	15867	418253	10718
400	1683577	679069	772954	1055219	984572
600	2493496	1027070	1234749	1276759	1411774
800	3262933	1528342	1711563	1600266	1836423
1000	3829994	1724253	1961373	1799220	2483541
1200	4575393	2255358	2318217	2252298	2864257
1400	5281483	2632985	2723775	2573948	3626303
1600	6238025	3152947	3262752	3041205	4066133
1800	7484962	3645206	3915882	3548810	4310284
2000	8375325	4287356	4230132	3869092	5119616
Concentración (ppb)	Pireno	Criseno	Benzo(a)pireno	Dibenzo(a,h)antraceno	
200				32407	
400	1719785	855691	545525	174592	
600	1998958	1039292	670711	239148	
800	2635999	1265817	852734	359797	
1000	2719160	1439918	997688	470628	
1200	3218725	1698290	1197249	536310	
1400	3789562	2048659	1395562	632666	
1600	4092688	2299553	1586079	782578	
1800	4558472	2527968	1754017	854420	
2000	5102800	2724553	1941457	908149	

Curvas de calibración para los 9 HAP estudiados

Figura E.2 Curva de calibración para el naftaleno

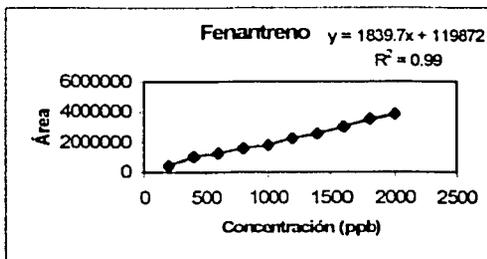


Figura E.3 Curva de calibración para el acenafteno

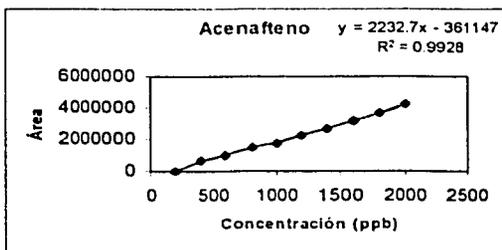
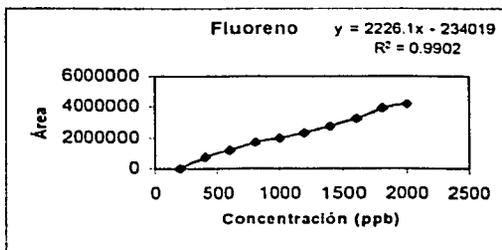


Figura E.4 Curva de calibración para el fluoreno



Curvas de calibración continuación

Figura E.5 Curva de calibración para el fluoranteno

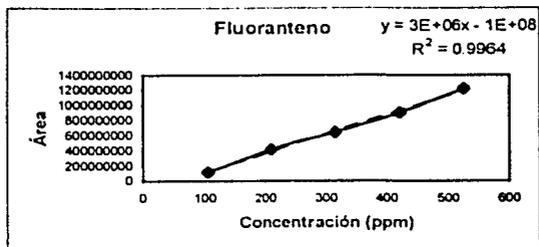


Figura E.6 Curva de calibración para el fenantreno

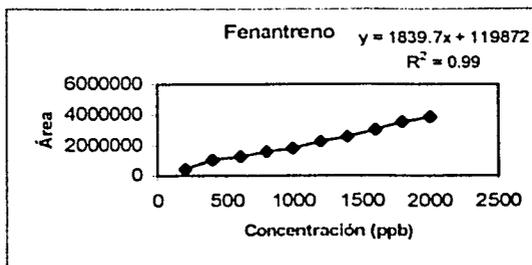
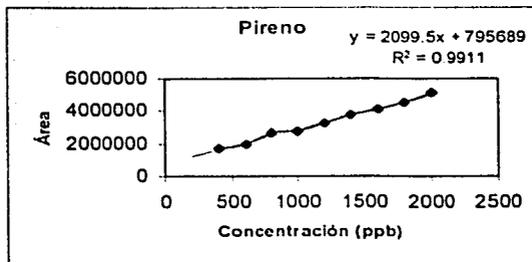


Figura E.7 Curva de calibración para el pireno



Curvas de calibración continuación

Figura E.8 Curva de calibración para el criseno

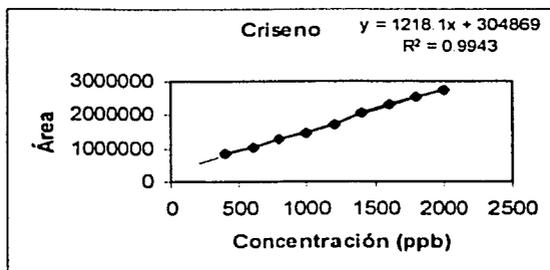


Figura E.9 Curva de calibración para el benzo(a)pireno

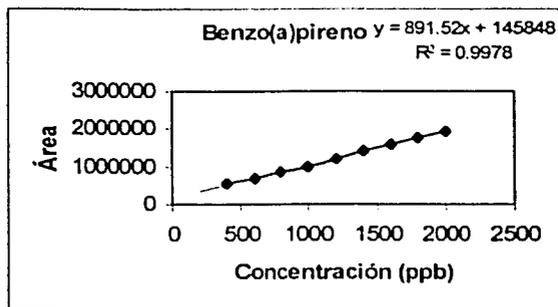
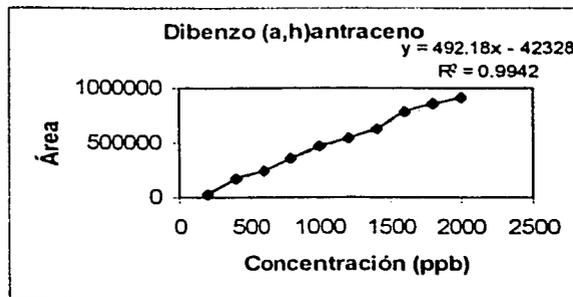


Figura E.10 Curva de calibración para el dibenzo(a,h)antraceno



Curvas de calibración empleadas en el estudio de retención en columnas y adsorbentes

Figura E.11 Curva de calibración para el naftaleno

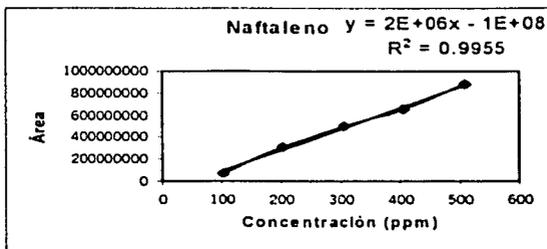


Figura E.12 Curva de calibración para el acenafteno

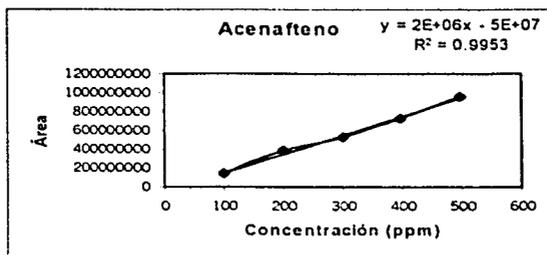
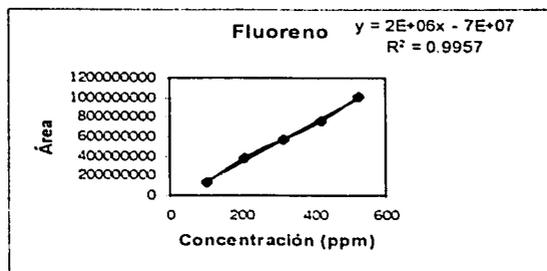


Figura E.13 Curva de calibración para el fluoreno



Curvas de calibración continuación

Figura E.14 Curva de calibración para el fenantreno

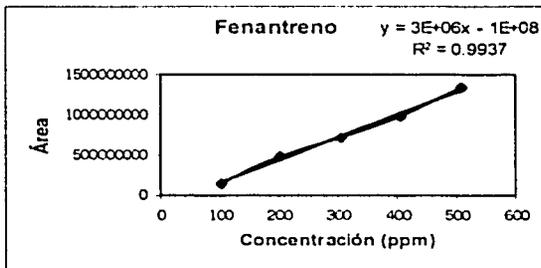


Figura E.15 Curva de calibración para el fluoranteno

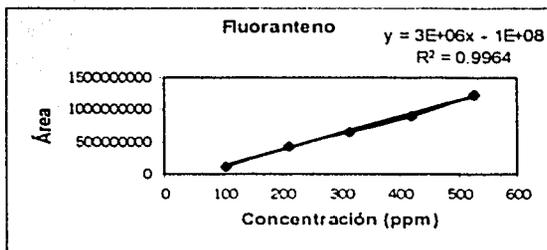
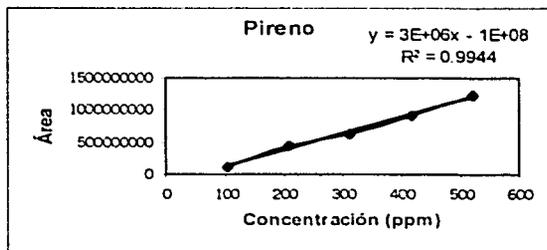


Figura E.16 Curva de calibración para el pireno



Curvas de calibración continuación

Figura E.17 Curva de calibración para el criseno

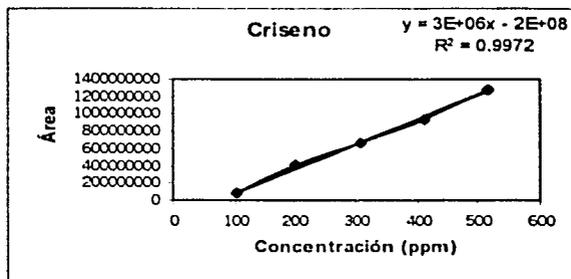
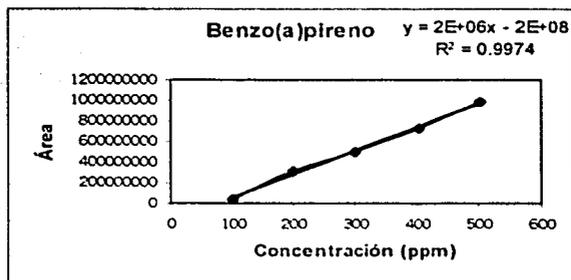


Figura E.18 Curva de calibración para el benzo(a)pireno



Anexo F

Cromatogramas y espectros de masas determinados en estándares y muestras

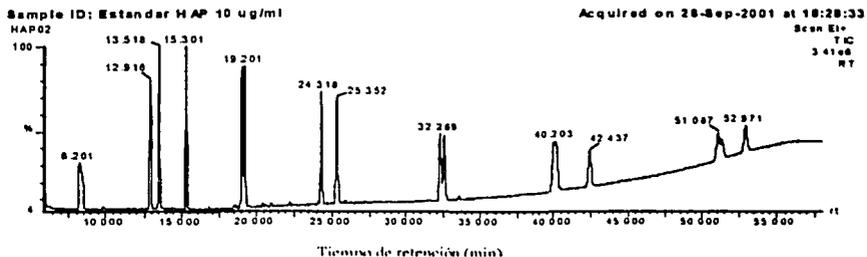


Figura F.1 Cromatograma de una mezcla de 16 HAP 10 µg/ml

El valor dentro del recuadro es la masa del ión identificado
 El valor fuera del recuadro es el tiempo de retención de cada compuesto

Tabla F.1 Tiempos de retención, ión molecular y abreviaturas de los 9 HAP en estudio

Compuesto	Abreviatura	ión molecular	Tiempo de retención (min)
Naftaleno	NAP	128	7.920
Acenafteno	ACEN	154	13.404
Fluoreno	FLN	166	15.222
Fenantreno	PHE	178	19.030
Fluoranteno	FLT	202	24.385
Pireno	PYR	202	25.509
Criseno	CHR	228	32.433
Benzo(a)pireno	BaP	252	41.278
Dibenzo(a,h)antraceno	DBA	278	46.329

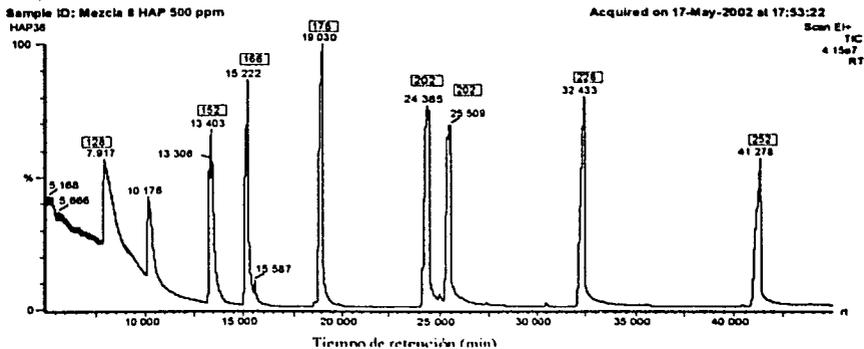


Figura F.2 Cromatograma de una mezcla de 8 estándares

El valor dentro del recuadro es la masa del ión identificado
 El valor fuera del recuadro es el tiempo de retención de cada compuesto

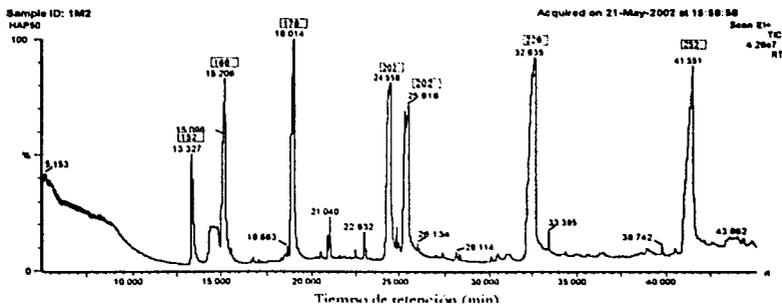


Figura F.3 Cromatograma de una muestra contaminada con 8 estándares en la cual no se identificó el naftaleno

El valor dentro del recuadro es la masa del ión identificado
 El valor fuera del recuadro es el tiempo de retención de cada compuesto

Sample ID: muestra M7 F
OSTION3

Acquired on 19-Mar-2002 at 16:36:4

SRof 10 Channels B+

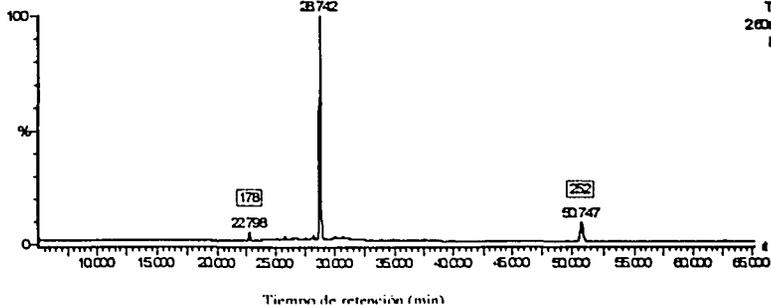


Figura F.4 Cromatograma de una muestra en estudio

El valor dentro del recuadro es la masa del ión identificado

El valor fuera del recuadro es el tiempo de retención de cada compuesto identificado

OSTIO 13

SIR OF 10 CHANNELS

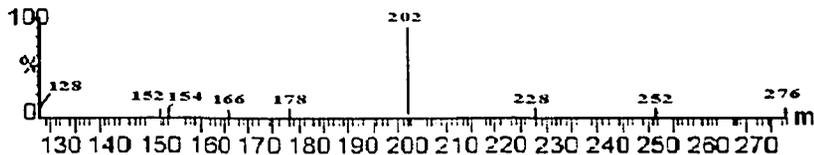


Figura F.5 Espectro de masas correspondiente al Fenantreno identificados en una muestra de ostiones

OSTION 13

SIR OF 10 CHANNELS



Figura F.6 Espectro de masas correspondiente al Fluoranteno identificados en una muestra de ostiones

OSTIO 13

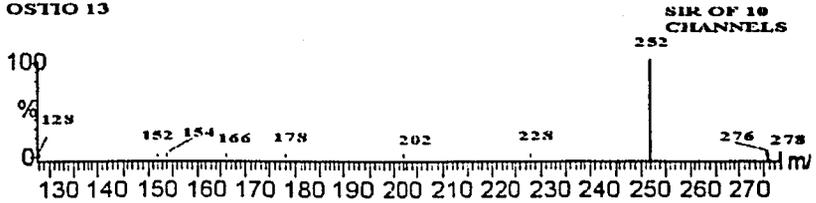


Figura F.7 Espectro de masas correspondiente al Benzo(a)pireno identificados en una muestra de ostiones

Espectros de masas correspondientes a estándares de HAP

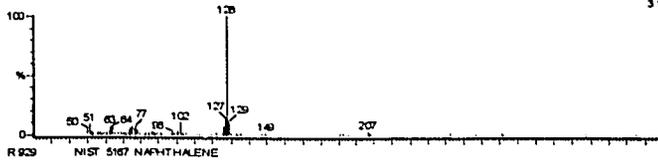
Sample ID: Estándar HAP 10 ug/ml

Acquired on 02-Oct-2001 at 16:16:31

Reverse fit factor [REV]: 82

HAP01 156 (8.546)

37965



R 929 NIST 5167 NAPHTHALENE

1412

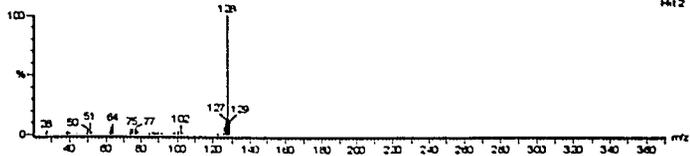


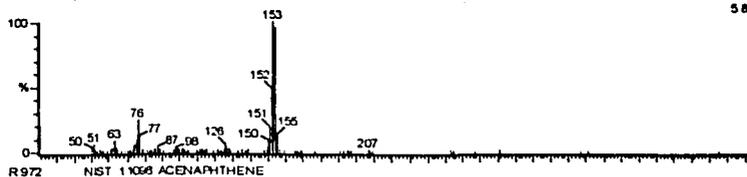
Figura F.8 Espectro de masa correspondiente al estándar de naftaleno

Sample ID: Estándar HAP 10 ug/ml

Acquired on 02-Oct-2001 at 16:18:31
Reverse fit factor [REV]: 97

HAP01472 (13.803)

5.84e5



H11

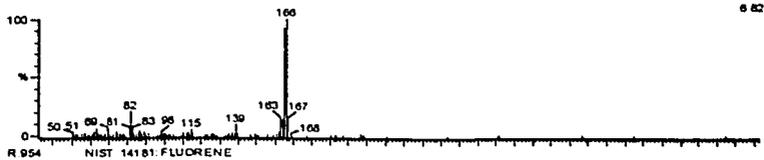
Figura F.9 Espectro de masas correspondiente al estándar de acenafeno

Sample ID: Estándar HAP 10 ug/ml

Acquired on 02-Oct-2001 at 16:18:31
Reverse fit factor [REV]: 96

HAP01578 (15.634)

6.82e5



H12

Figura F.10 Espectro de masas correspondiente al estándar de fluoreno

Sample ID: Estándar HAP 10 ug/ml

Acquired on 02-Oct-2001 at 16:15:31
Reverse fit factor [REV]: 91

HAP01802 (19.368)

7.41e5

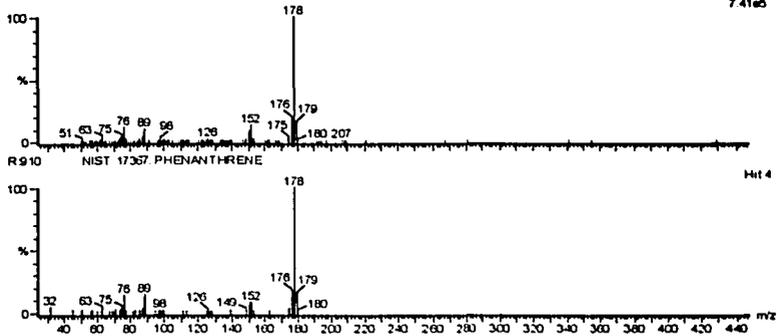


Figura F.11 Espectro de masas correspondiente al estándar de fenantreno

Sample ID: Estándar HAP 10 ug/ml

Acquired on 02-Oct-2001 at 16:15:31
Reverse fit factor [REV]: 87

HAP011123 (24718)

6.28e5

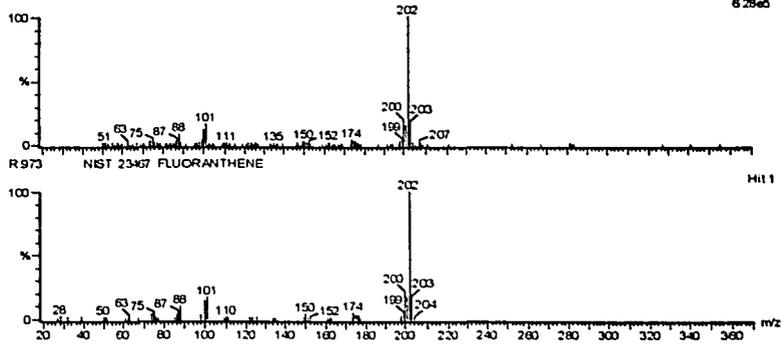


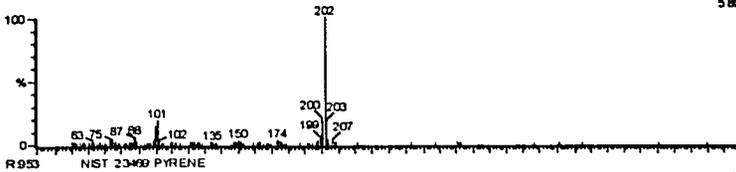
Figura F.12 Espectro de masas correspondiente al estándar de fluoranteno

Sample ID: Estándar HAP 10 ug/ml

Acquired on 02-Oct-2001 at 16:15:3
Reverse fit factor [REV]: 95

HAP011166 (25.709)

580e5



R 9.50

NIST 23469 PYRENE

Hit 2

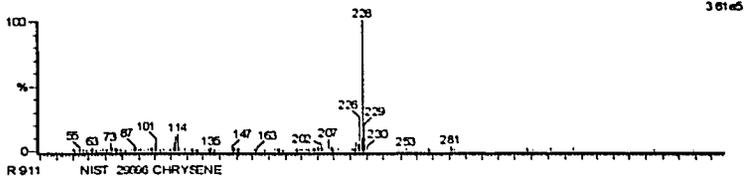
Figura F.13 Espectro de masas correspondiente al estándar de pireno

Sample ID: Estándar HAP 10 ug/ml

Acquired on 02-Oct-2001 at 16:15:3
Reverse fit factor [REV]: 91

HAP011603 (32.703)

361e5



R 9.11

NIST 29006 CHRYSENE

Hit 2

Figura F.14 Espectro de masas correspondiente al estándar de criseno

Sample ID: Estándar HAP 10 ug/ml

Acquired on 02-Oct-2001 at 16:16:3
Reverse BI factor (REV): 76

HAP012236 (43 270)

1.94e5

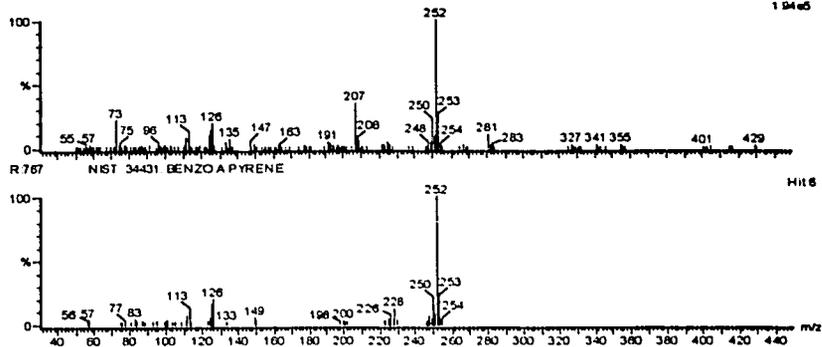


Figura F.15 Espectro de masas correspondiente al estándar de benzo(a)pireno

Bibliografía

Albert, L. (1990). *Curso básico de Toxicología Ambiental*. Ed. Limusa, México D.F. México. Pp 247-277.

Anónimo (2001). Tomado de las redes internacionales <http://www.microsoft.edu/ost>

AOAC (1980). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. 30 Ed. AOAC, Washington, DC, EEUUA.

Aragón, Ma, E., Villa, I. (1991) *Prácticas de laboratorio. Análisis de Alimentos*, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México D.F., México, pp. 1-8.

Bauer, J.E. y Capone D.G. (1988). Effect of Co-Occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**(7):1649-1655.

Bauer, R. (1982). *Instrumental Analysis*. Allyn and Bacon., Boston, EEUUA. Pp. 689 – 708

Becerra, T. N. (1984). *Determinación de los niveles de hidrocarburos en el ostión Crassostera virginica de la laguna de Términos, Campeche México*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. México.

Belitz, M.D.y Groscha W. (1997). *Química de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

Bender, G. T. (1992). *Métodos instrumentales de Análisis en Química Clínica*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp.3-34

Botello, A. y Calva, L. (1998). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in sediments from Pueblo Viejo, Tamiahua, and Tampamachoco Lagoons in the Southern Gulf of Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 96-103

Botello, A. V., Villanueva, S.F. y Diaz, G.G. (1998). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in sediments from Salina Cruz Harbour and Coastal Areas, Oaxaca, Mexico. *Marine Pollution Bulletin.* **36** (7):554-558.

Botello, A. V., González, C. y Diaz G.G. (1991). Pollution by petroleum hydrocarbons in sediments from continental shelf of Tabasco State, Mexico. *Bull. Environ. Toxicol.* **47**:565-571

Britton, J.C. y Morton, B.(1989). *Shore Ecology of the gulf of Mexico*. University of Texas Press, Austin., EEUUA.(94-105)

Calderón, H., González, R. y Durán C. (2001). Plaguicidas organoclorados en sedimentos y organismos acuáticos del Lago de Catemaco, Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental* **17**(1):23-30.

Castro, G. S. (1981). *Determinación de los niveles de hidrocarburos en sedimentos recientes y en el ostión *Crassostera virginica* de la laguna Mecoacán, Tabasco, México*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. México.

Chem Service (2001). *Certificate of Analysis*. www.chemservice.com

Elskus, A. A. y Stegeman, J. J. (1989) Induced Cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus* associated with Environmental Contamination by Polychlorinated Biphenyls and Polynuclear Aromatic Hydrocarbon. *Marine Environmental Research* 27; 31-50.

EPA (1996) Ultrasonic extraction, Method 3550b. Washington, D. C. pp. 1-14

Escartín, E. y Porte, C., (1999). Biomonitoring of PAH Pollution in High-Altitude Mountain Lakes through the Analysis of Fish Bile. *Environ. Sci. Technol.*, 33(3):406-409.

Esteban, L. (1993). *La espectrometría de masas en imágenes*. ACK editores. Madrid, España.

Finlayson, B.J. y Pitts, J.N. (1986). *Atmospheric Chemistry*. Wiley-Interscience Publication., EEUUA.

Galen, W.E. (1985). *Instrumental Methods of Chemical Analysis*. Mc. Graw-Hill International Edition, New York, EEUUA

García, R.S. (2000). *Estudio de espectroscopías de fluorescencia y masa en suelos contaminados*. Tesis de Maestría en Ciencias (Química Ambiental). Facultad de Química. UNAM. México D.F. México.

Giam, C. S. y Lee, E. R. (1987). *Pollutant Studies In Marine Animals*. Ed. CRC Press, Florida, EEUUA.

Golg-Bouchot, G., Noreña-Barroso, E., Zapata Pérez, O. (1995). Hydrocarbons concentrations in the american oysters, *Crassostrea virginica*, in Laguna de Terminos, Campeche, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54:222-227.

González, E.C., Botello, A.V. y Díaz, G. (1992). Presence of aliphatic hydrocarbons in sediments and organisms from Campeche Bank, Mexico. *Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. U.N.A.M.*

González, E.C. (1990). *Determinación de los niveles de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en sedimentos recientes de la plataforma continental de los estados de Tabasco y Campeche, México*. Tesis profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales - Zaragoza. UNAM. México D.F. México

Hart, F.L. (1987). *Análisis moderno de los alimentos*. Ed Acribia. Zaragoza, España.

INEGI (1999). *III principales actividades humanas vinculadas con el medio ambiente. "La industria química en México, 1997, 1998"*. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México D.F., México.

INN (1996). *Tablas de uso práctico del valor nutrimental de los alimentos de mayor consumo en México*. Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", México, D.F., México.

Lakowicz, J.R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2ª Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, EEUUA.

Mann, Ch. K. (1975). *Instrumental Analysis*. (455- 673) Harper & Row Publishers, New York, EEUUA.

Menzie, C.A. (1992). Exposure to carcinogenic PAH in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, **26**:1278-1284.

Michel, J. y Zengel, S. (1998). Monitoring of oysters and sediments in Cajutla, El Salvador. *Marine Pollution Bulletin*. **36**(4):256-266

Morrison, R. T. y Boyd. R.N. (1996). *Química orgánica*. Addison-Wesley Iberoamericana. México D.F. México. Pp. 490 -553.

Neff, J. M. (1979). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Sources, Fates, and Biologicals Effects*. Ed. Applied Science Publishers Ltd., Londres, Reino Unido.

Noreña, E., Gold, G., Zapata, O. y Sericano, J. (1999). Polynuclear hydrocarbons in american oysters *Crassostrea virginica* from the Terminos Lagoon, Campeche, México. *Marine Pollution Bulletin*. **38**(8):637-645

Pendoley, K. (1992). Hydrocarbons in Rowley Shelf (western Australia) oysters and sediments. *Marine Pollution Bulletin*. **24**(4): 210-215

Perés, J.M. (1980). *La polución de las aguas marinas*. Ed. Omega S.A., Barcelona, España.

Pompa, G.A. (1968). *Biología: Unidad, diversidad y continuidad de los seres vivos*. Ed. CECSA. 2ª ed. México D.F. México.

Preston, M.R. (1992). The Interchange of Pollutants Between the Atmosphere and Oceans. *Marine Pollution Bulletin*, **24**(10):477-483

Reuters, AP y DPA. (2000). Derrame de crudo amenaza llegar a cataratas de Iguazú. *La Jornada*. 19 de julio. México D.F. México.

Ruiz, F. M. e Iris, A. V: (1997). *Manual de Calidad del Laboratorio Central del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP)*. Método IMP-Q.A-610; Método IMP-Q.A-620. México, D.F. México.

Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993. Bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias. México

SEMARNAP (1999) El sector pesquero en México: Anuario estadístico México 1997, 1998. México D.F., México

Skoog, A. D. (1994). *Análisis Instrumental*. 4ª Ed. Mc Graw-Hill. México, D.F. México. pp.705 – 727

Smith, L. A. (1979). *Applied Infrared Spectroscopy. Fundamentals, Techniques, and Analytical Problem - Solving*. John Wiley & Sons, Nueva York, EEUUA

Solomons, T.W. (2000). *Química orgánica*. 2ª Ed. Limusa Wiley. México, D.F., México. Pp. 683-747.

Storch, J. M (1982). *Fundamentos de la Cromatografía de Gases*. Ed. Alhambra – Universidad. México, D.F. México. Pp:12-62.

Tricklebank, K. A. (2000). Effect of organochlorines on the ultrastructure of the liver of the damselfish *Parma microlepis* from reefs in New south Wales, Australia. *Marine Biology*. **136**: 337-348

UNEP/IOC/IAEA. (1993). *Determination of Petroleum Hydrocarbons in Samples Biota*. Reference Method No. 7. United Nations Environment Programme (UNEP). París, Francia.

Wade, T., Kennicutt, C., Brooks, J. (1989). Gulf of Mexico Hydrocarbons seep communities: Part III. Aromatic hydrocarbon concentrations in organisms, sediments and water. *Marine Environmental Research*. **27**:19-30.

Wehry, E.L. (1981). *Modern fluorescence spectroscopy*. Plenum Pres. New York, EEUUA.

Wilbur, K.M. (1983). *The mollusca: Production*. Vol.1 Academic Press Inc. EEUUA. 351-395

Willard, H. H. (1988). *Intrumental Methods of Analysis*. 7ª Ed. Wodsworth Publishing Company, EEUUA. Pp.197-222, 465-512

Zsolnay, A. (1979). Hydrocarbons in the Mediterranean Sea, 1974-1975. *Marine Chemistry*, **7**:343-352.