



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

APLICACION DE PIXE EN LA DETERMINACION DE
METALES PESADOS Y ELEMENTOS TRAZA EN
LECHE DE VACA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MONICA VIDAL HERNANDEZ



EXAMENES PROFESIONALES
ASESOR: DRA. CORRYA SOLIS ROSALES
FACULTAD DE QUIMICA



MEXICO D. F.

2004



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.

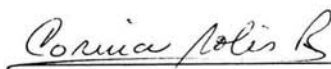
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Ernestina Cervera Flores.
Vocal	Prof. Zoila Nieto Villalobos.
Secretario	Dra. Corina Solís Rosales.
1er. Suplente	Prof. Berta Julieta Sandoval Guillén.
2do. Suplente	Prof. María Teresa Plata Jiménez.

Sitio donde se desarrollo tema:

Laboratorio de Física Experimental. Instituto de Física, UNAM. Ciudad Universitaria.

Asesor del tema:



Dra. Corina Solís Rosales.

Sustentante:



Mónica Vidal Hernández.

Sin duda, era posible imaginarse una sociedad en la que la *riqueza*, en el sentido de posesiones y lujos personales, fuera equitativamente distribuida mientras que el *poder* siguiera en manos de una minoría, de una pequeña casta privilegiada. Pero en la práctica, semejante sociedad no podría conservarse estable, porque si todos disfrutasen por igual del lujo y del ocio, la gran masa de seres humanos, a quienes la pobreza suele imbecilizar, aprenderían muchas cosas y si empezaban a reflexionar se darían cuenta más pronto o más tarde que la minoría privilegiada no tenía derecho alguno a imponerse a los demás... A larga una sociedad jerárquica sólo sería posible basándose en la pobreza y en la ignorancia.

La guerra es una manera de pulverizar o de hundir en el fondo del mar los materiales que en la paz podrían emplearse para que las masas gozaran de excesiva comodidad y, con ello, se hicieran a la larga demasiado inteligentes.

George Orwell, 1984.

DEDICATORIAS

Al *artículo 3º* de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos que en su fracción IV y V establece el derecho a la educación pública y gratuita en todos los niveles educativos; porque gracias a esto he podido llegar hasta dónde ahora me encuentro.

A mi madre la *Sra. Aquilina Hernández Salomón* porque gracias a su apoyo, amor y comprensión, juntas hemos realizado este sueño que no es sólo mío, pues el esfuerzo ha sido siempre de las dos; y por eso este trabajo de alguna manera también le pertenece a ella. Mami, gracias por confiar en mí; pero sobre todo, gracias por el ejemplo que nos has dado. Te admiro y quiero mucho mamita, sólo espero ser tan fuerte y valiente como tú.

A mis hermanos *Sandra y Juan José Vidal Hernández* por todo su apoyo y amor, por ser mis mejores amigos, por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores. Los quiero muchísimo.

A *Esteban Olvera* porque en todo momento ha demostrado ser mi amigo antes que cualquier cosa, porque tu apoyo incondicional, comprensión, paciencia, ternura pero especialmente tu amor me impulsan a seguir creciendo.

AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* porque a través de los sucesos que han marcado su historia, me dio la oportunidad de vivir y aprender de ellos el valor de la amistad, el significado de palabras como lealtad, ética y calidad; pero en especial por enseñarme a pensar con libertad para actuar con convicción y dignidad.

A las profesoras *Ernestina Cervera* y *Zoila Nieto* por su ayuda en la revisión de este trabajo y las observaciones que hicieron para mejorarlo.

De manera especial quisiera agradecer a la *Dra. Corina Solís Rosales* por darme la oportunidad de trabajar con ella y conocerla no sólo en el ámbito profesional sino también en lo personal, y brindarme su confianza en ambos casos. Corina, te agradezco mucho todo el apoyo y la confianza que depositaste en mí desde el primer momento para la realización de este trabajo que por supuesto, también es tuyo. Gracias por todo.

A la próxima *Dra. Alibech Mireles*, por el apoyo y la disposición de enseñarme, aclararme, guiarme y ayudarme cada vez que lo necesite. Gracias Alibech.

Al profesor *Juan Guzmán Calderón* por instruirme dentro y fuera del salón de clases y demostrarme que además de ser un buen profesor, puede ser un gran amigo. Profe, muchas gracias por todo su apoyo.

A la profesora *Lucía Bascuñan Termini* por ayudarme a descubrir y canalizar habilidades que desconocía de mí. Gracias por su apoyo y disposición para perfeccionarlas.

A mis tíos *Emilio Lucio* y *Carmina Hernández* por brindarnos su cariño y apoyo siempre y en todo momento a lo largo de esta larga y difícil tarea. A mi tío *Ramón Hernández* por su apoyo en momentos difíciles, pero especialmente quiero agradecer a mi tía *Irene Hernández*, a mis primos *Judith*, *Francisco* y *Fabrizio Hernández* por su apoyo y sus atenciones durante la larga estancia en su casa. Gracias a todos.

A mi amiga *Rosalba Nieto*, porque junto con ella pase momentos muy divertidos en la secundaria # 2. Gracias por tu amistad, confianza y enseñanza a lo largo de todos estos años.

A mi madre, pues nunca imaginé que la escuela que se empeño en elegir para mis estudios de preparatoria (cuya política, ubicación e infraestructura critique desde el primer momento); iba a darme la oportunidad de conocer a muchas personas que durante 10 años me han privilegiado con su amistad y su cariño. Algo más que agradecerte mamita. Por ello, quisiera agradecer a todos mis amigos de la prepa (Instituto Juventud) con los que viví los momentos más divertidos e inolvidables:

A mi amigo *Josué Ruiz Medina* por todo tu apoyo, tus consejos pero sobre todo, por hacerme ver que no es una buena idea mezclar la amistad con la política; desde entonces lo tengo muy presente, gracias chinito!!!. A mis amigas *Alejandra Urbina* (por demostrarme a cada momento que eres y serás una gran amiga para mí), *Berenice Vallejo* (por enseñarme que parte del arte de vivir también implica reírse de uno mismo), *Mariana Zárate* (por dejarme ver que la ternura no está peleada con la fuerza), *Martha Vázquez* (por darme la confianza para sentirme

siempre como en casa), *Elsa y Mario Vargas* (por enseñarme a no ser tan desconfiada), y por supuesto a *Heidi Rivas* (por mostrarme que la valentía y el coraje son ejemplos dignos de imitar). Por supuesto que hay muchas otras cosas que quisiera agradecerles pues de cada uno he aprendido algo, pero eso lo reservaré para la siguiente tesis, espero!!!. Sólo puedo decirles que me considero afortunada de que formen parte de mi vida, que me brinden su amistad, que me apoyen siempre que lo necesito y que compartan conmigo un momento tan importante. Gracias a todos, los quiero mucho.

A mis amigas *Adriana Pescador y Claudia Buendía*, pues juntas vivimos y compartimos momentos muy intensos que sólo podían vivirse en la universidad.

Adriana, gracias por tu amistad, cariño, pero sobre todo por tu apoyo y confianza en cada uno de los momentos que compartimos. De igual forma, quisiera agradecer las atenciones y el cariño de toda tu familia, que de alguna manera también forma parte de la mía. Gracias por todo.

Claudia, gracias por seguir brindándome tu amistad, tu confianza, pero sobre todo por enseñarme que las cosas son más simples de lo que parecen. Gracias por la oportunidad.

A mi amigo *Alejandro González* por brindarme tu amistad desde el primer momento, por estar ahí siempre que lo necesito (aún cuando no estás de acuerdo), por tenerme presente en todo momento y por enseñarme que lo realmente importante son los detalles que nacen cuando quieres a alguien.

A *Héctor Oropeza*, por brindarme tantos momentos divertidos dentro de tanta presión, gracias por brindarme tu amistad y darme la oportunidad de conocer a la verdadera persona que eres; por la rosa sin chocolate y el chocolate sin rosa en los 14 de febrero que compartimos. Sólo me resta decir que a mí también me da gusto poderte considerar mi amigo. Gracias por todo.

A *Ericka López* por haberme dado la oportunidad de conocerte y brindarme tu amistad, tu apoyo, y por supuesto, por enseñarme que las personas no siempre son lo que parecen, gracias.

A *Anahí Soria* por brindarme tu amistad y demostrarme tu cariño a pesar de la distancia y por supuesto por considerarme tu amiga, gracias. Tú sabes que eres bien correspondida.

A *Erika Chávez* por brindarme tu amistad en tan poco tiempo, por tu apoyo y confianza, gracias.

A todos mis compañeros de carrera que durante estos años de alguna manera compartieron junto conmigo las desveladas, malpasadas, tareas, trabajos, exposiciones, etc. Gracias *Alfonso Enríquez, Miguel Flores, David, Nadihezda, Dilia, Laura, Betzabé,, Armando Morales, Lupe Palacios, Sonia Martínez, Berta Silva, Ale Torres, Mauricio, Martita, etc.*

A todas las mamás de cada una de mis amigas (o) por abrirme las puertas de su casa y permitirme quedar ahí en más de una ocasión (entre otras cosas). No sólo quiero agradecer su hospitalidad sino también sus atenciones, su cariño y por supuesto su apoyo. Aunque de forma muy especial quisiera agradecer a la *Sra. Catalina Espinosa* y a la *Sra. Sara Vázquez* por recibirme en sus casas cuando más lo necesité (me recuerdan en muletas???). Gracias a todas.

A todo el personal del laboratorio de María por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo. De manera especial quisiera agradecer a la profesora *Rebeca* y al señor *Meli* por todas sus atenciones, por su ayuda y por hacer mi estancia más amena. Gracias.

A *Karim López* y *Francisco Jaimes* por su apoyo técnico durante el análisis de las muestras en el Peletrón, y al Dr. *Héctor Manjarrez* por el apoyo brindado para la preparación de las muestras.

A *Graciela Sierra* por su ayuda incondicional en la recolección de muestras en el Valle del Mezquital, pero sobretodo gracias por tu hospitalidad y confianza. Así mismo quisiera agradecer a todas aquellas personas del municipio de Mixquiahuala, Hgo. que desinteresadamente facilitaron las muestras para la realización de este estudio.

Al *Instituto de Física de la UNAM (IFUNAM)* por todos los recursos y facilidades brindados para la realización de este trabajo.

A *UC-MEXUS-CONACYT* y *DGAPA (IN228603-3)* por la beca otorgada a través de los proyectos:

Análisis de la contaminación por metales pesados en agua y otros líquidos mediante la técnica de PIXE.

Por último, pero no menos importante; quisiera agradecer a todas las personas que de alguna manera, y a través de mi madre nos han brindado su apoyo incondicional: Sr.(a) *Alejandra Herrera*, *Luz*, *Elvita*, *Concepción*, *Esmeragdo*, *Graciela Ochoa*. Gracias a todos.

***Aplicación de PIXE en la
determinación de metales
pesados y elementos
traza en leche de vaca***

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	
2.1 Generalidades de la leche	
2.1.1 Definición de leche	4
2.1.2 La leche en la dieta	5
2.1.3 El valor nutritivo de la leche para el hombre	5
2.1.4 Composición de la leche de vaca	6
2.2 Elementos traza y metales pesados	
2.2.1 Interés nutricional y toxicológico	10
2.2.2 Elementos traza	12
2.2.2.1 Zinc	12
2.2.2.2 Selenio	13
2.2.2.3 Cobre	14
2.2.2.4 Manganeso	14
2.2.2.5 Hierro	15
2.2.2.6 Níquel	15
2.2.3 Metales pesados	16
2.2.3.1 Mercurio	17
2.2.3.2 Cadmio	18
2.2.3.3 Plomo	19
2.2.3.4 Arsénico	20

	Página
2.3 PIXE	
2.3.1 Introducción a la técnica	23
2.3.2 Principios básicos de PIXE	24
2.3.3 Breemstralung	26
2.3.4 Ventajas y desventajas de PIXE	26
2.3.5 Límites y Eficiencia de detección	27
2.3.6 Análisis de muestras gruesas	29
2.3.7 Análisis de muestras delgadas	30
2.3.8 GUPIX	30
2.3.9 Instrumentación para PIXE	31
III. METODOLOGÍA	
Diagrama general del estudio	34
3.1 Material y Reactivos	35
3.2 Caracterización de los métodos de preconcentración	36
3.3 Caracterización de los métodos de mineralización	38
3.4 Preparación de muestras	38
3.5 Estudio de campo	40
3.6 Análisis con PIXE	40
3.7 Prueba de Mann-Whitney	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Caracterización de los métodos de preconcentración	41
4.2 Caracterización de varios métodos de mineralización	42
4.3 Determinación del factor de concentración	48
4.4 Repetibilidad, intervalo de confianza y porcentaje de recuperación	53
4.5 Análisis de muestras de leche colectada en el Valle del Mezquital	58
V. CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	64

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición típica de la leche	9
Tabla 2. Elementos de interés nutricional y algunos de interés toxicológico	11
Tabla 3. Especificaciones de los Límites máximos permisibles de metales pesados en leche de vaca pasteurizada, NOM-091-SSA1-1994	22
Tabla 4. Contenido de metales ($\mu\text{g/g}$ leche). Método A y B	44
Tabla 5. Contenido de metales ($\mu\text{g/g}$ leche) . Método C y D	45
Tabla 6. Contenido de metales en ($\mu\text{g/g}$ leche) Método E	48
Tabla 7. Factor de concentración	49
Tabla 8. Valores del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación e intervalo de confianza, para el estándar de leche entera NIST-8435	55
Tabla 9. Concentraciones (en $\mu\text{g/g}$) de los elementos traza en leche entera NIST- 8435	56
Tabla 10. Contenido de metales en ($\mu\text{g/g}$ leche). Estudio de campo	59
Tabla 11. Prueba de Mann Whitney para comparar los rangos de variación de los elementos presentes en la leche de vacas de establo con la de vacas de pastoreo	60

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación gráfica de la producción de rayos X característicos de un elemento	24
Figura 2. Espectro de salida del GUPIX, se señalan las líneas $K\alpha$ de algunos elementos presentes.	25
Figura 3. Límites de Detección ($\mu\text{g/g}$ muestra seca) para el estándar de hígado de bovino NBS 1577	28
Figura 4. Diagrama a escala del acelerador Peletrón (Instituto de Física, UNAM).	31
Figura 5. Dispositivo experimental típico para el análisis de PIXE.	33
Figura 6. Gráfica del % de recuperación de elementos con digestión ácida.	42
Figura 7. Espectro de PIXE para una muestra de leche entera liofilizada y calcinada.	43
Figura 8. Espectro de PIXE para una muestra de leche entera liofilizada, calcinada y preconcentrada con carbamatos.	47
Figura 9. Límites de Detección ($\mu\text{g/g}$ de muestra seca) para muestras de leche utilizando diferentes métodos de preparación de muestras.	51

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de una agricultura intensiva basada en un mayor uso de abonos químicos, de pesticidas y en el uso de aguas residuales no tratadas, ha tenido efectos benéficos en cuanto a una mayor productividad y en solucionar el problema de los desechos de las aguas residuales.

En las áreas semiáridas de México, la aplicación de aguas residuales en las cosechas ha sido una opción común. Actualmente, más de 160,000 hectáreas son irrigadas con aguas residuales, la mayoría de las cuales no recibe tratamiento antes de la aplicación a las cosechas [1].

La irrigación con aguas residuales constituye una de las principales fuentes de metales pesados en los alimentos de origen vegetal y animal: las materias primas obtenidas de suelos regados con estas aguas, son las principales vías de entrada de los metales pesados en la cadena alimenticia, al ser consumidos y acumulados por los animales. En la actualidad es reconocido que metales pesados como el Pb y Cd están presentes prácticamente en todos los alimentos [2].

Entre las fuentes alimenticias, particular atención merece la leche de vaca: La importancia de determinar la presencia de metales pesados y elementos traza en leche, radica en que además de ser un alimento importante en la dieta humana y una fuente de minerales para lactantes, niños y adultos; la leche es un alimento altamente consumido por todos los segmentos de la población del mundo, siendo los niños especialmente susceptibles a los efectos tóxicos de dichos metales, ya que la falta de desarrollo en su tracto digestivo promueve altas absorciones de

ciertos elementos pesados, incluso hay algunos elementos como el plomo y mercurio que pueden afectar al menor durante la gestación o la lactación ya que pueden ser transferidos de la madre al hijo ya sea por la placenta o la leche materna, respectivamente [3].

Para asegurar que las materias primas y el forraje utilizados en la alimentación animal no suponen un riesgo para el consumidor, es necesario implementar sistemas de control o incluso planes de muestreo a nivel nacional, que verifiquen el cumplimiento de la legislación vigente, que establece límites máximos para ciertos metales considerados tóxicos como el Pb, Cd, Hg. Esto permitirá minimizar la exposición del ser humano a niveles elevados de los metales que nos preocupan [4].

Como los metales pesados se encuentran a niveles de trazas en los alimentos, su cuantificación a estos niveles requiere de un muestreo y una preparación de muestras adecuado, así como de un análisis altamente sensible. Sin embargo este es el aspecto donde se encuentran más dificultades prácticas, por lo que es deseable contar con nuevos métodos de preparación de muestras combinados con técnicas analíticas de alta sensibilidad, precisión y reproducibilidad.

Desde hace varios años, en el Instituto de Física de la UNAM se han venido implementando técnicas analíticas basadas en haces de iones, en particular la técnica de emisión de rayos X inducida por protones (PIXE), para responder a la necesidad de contar con un análisis preciso, multielemental y rápido de elementos traza en alimentos [5]. La técnica de PIXE, introducida en Lund Suecia, por Johansson y su grupo en 1970, a pesar de su corta historia, se ha convertido en una poderosa herramienta de análisis. Sus principales características son la capacidad de un análisis multielemental de alta sensibilidad y la posibilidad de analizar numerosas muestras en poco tiempo [6]. Otra ventaja importante sobre otras técnicas convencionales de análisis es que una muestra puede ser analizada en su forma original sin ser destruida, permitiendo que se practiquen otros análisis en la misma muestra. El análisis mediante PIXE se lleva a cabo bombardeando

una muestra sólida con protones de alta energía (1-4 MeV). Esto induce la emisión de rayos X cuyas energías son características de los elementos presentes en la muestra y cuyas intensidades son proporcionales a la concentración de esos elementos. Estos rayos X son detectados por detectores adecuados que a través de un analizador multicanal son registrados mediante programas de cómputo que permiten la identificación y cuantificación de los elementos presentes.

El objetivo de este trabajo es aplicar la técnica de PIXE al análisis de leche de vaca optimizando las condiciones analíticas y los métodos de preparación de muestras, para determinar y cuantificar los elementos traza y metales pesados presentes. Dicha técnica permite un análisis multi-elemental y de alta sensibilidad que constituye un gran potencial para responder a las demandas actuales y futuras en el análisis de elementos traza y metales pesados en alimentos.

Para lograr dicho objetivo, se compararon distintas metodologías de descomposición de la materia orgánica (cenizas, digestión ácida, etc) que ofrecen una mayor reducción de masa y que combinadas con técnicas de preconcentración permiten obtener mejores límites de detección para los elementos traza y metales pesados. Una vez identificada la mejor metodología, ésta se aplicó a un estudio de campo en muestras de leche de vacas de establo y de pastoreo recolectadas en Mixquiahuala, Hgo.

Mixquiahuala está situada en el Valle del Mezquital ubicado a 50 Km al norte de la ciudad de México. Esta vasta zona agrícola de más de 80,000 hectáreas recibe las aguas residuales y pluviales de la zona Metropolitana desde 1890. Los cultivos principales de la zona son el maíz avena y alfalfa. Vacas pastando en estos ambientes y bebiendo de los canales de irrigación pueden concentrar los metales pesados en la leche. Por esta razón se decidió aplicar el método de preparación que permitiera una mayor preconcentración de los elementos de interés (traza y pesados), y por lo tanto un mejor límite de detección en este tipo de muestras mediante su análisis con PIXE.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la leche

2.1.1 Definición de Leche

La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría. Es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y pH cercano a la neutralidad [7]. En términos lactológicos, el concepto de leche se refiere únicamente a la *leche de vaca*, obtenida como materia prima (leche cruda). Si se trata de leche de otras especies, se debe indicar de cuáles proviene.

La *leche cruda* se refiere a la leche que no ha sido calentada ni sometida a ningún tratamiento con el mismo efecto. Es el producto obtenido por uno o más ordeños higiénicos de la ubre de una o de varias vacas, que inmediatamente después se ha refrigerado y al que no se ha añadido ni sustraído nada [8].

La leche es una emulsión de materia grasa, en forma globular. Este líquido es una suspensión de materias proteicas en un suero constituido por una solución que contiene, principalmente, lactosa y sales minerales. En la leche existen cuatro tipos de componentes importantes: grasas, proteínas (caseínas y albuminoides), lactosa y sales. A ellos se le añaden otros componentes numerosos, presentes en cantidades mínimas: lectinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos y gases disueltos [7].

2.1.2 La leche en la dieta

La leche es el único alimento que la naturaleza realiza para tal fin. Se tiene por uno de los productos alimenticios más antiguos y es uno de los más importantes. Además de su valor esencial por ser el único alimento de los bebés; la leche y los productos lácteos aumentan progresivamente la importancia de su contribución a la dieta mixta. La mayor parte de este aporte es en forma de leche líquida. En la dieta de los adultos la leche no se toma necesariamente como bebida, pero puede consumirse con cereales en el desayuno, con el té o el café o en platos cocinados como sopas, salsas, etc.

El consumo diario medio es de unos 380 mL, aunque, naturalmente, beben mayor cantidad los niños que los adultos. Un niño que bebe unos 570 mL al día tiene cubiertas todas sus necesidades de riboflavina, vitamina B₁₂ y calcio, y una gran proporción de proteínas, tiamina, ácido fólico y vitamina A [9].

2.1.3 El valor nutritivo de la leche para el hombre

Las necesidades nutritivas para asegurar la formación y el mantenimiento del cuerpo humano, así como para hacer frente a las necesidades energéticas, son cubiertas por los nutrientes (carbohidratos grasas, proteínas minerales, elementos traza, vitaminas y agua) contenidos en los alimentos. La leche se puede considerar como un alimento que cubre todas las necesidades nutritivas del ser humano. Contiene todos los nutrientes y todos los biocatalizadores necesarios para mantener y desarrollar los procesos vitales. Un dato importante es que el contenido energético de las proteínas de la leche es aproximadamente 20% mayor que en cualquier otro alimento (con excepción de la leche humana) [8].

Un litro de leche cubre el 20% de las necesidades energéticas diarias de una persona en la siguiente medida: de calcio 100%; de fósforo 67%; de vitamina B₂ 66%; de proteínas 49%; de vitamina A 30%; de vitamina B₁ 27%; de vitamina C

19%;de hierro 3%. Sin embargo, cabe aclarar que por diversas razones no todas las personas consumen esa cantidad de leche.

Aunque los productos lácteos tienen un valor como fuente de energía su gran importancia como alimento se debe más bien a la contribución de las proteínas de gran calidad, calcio y ciertas vitaminas [9].

2.1.4 Composición de la leche

La leche está compuesta en promedio por un 87.5% de agua y contiene además albuminoides, grasas, carbohidratos y sales en solución, en suspensiones coloidales y emulsionadas en agua. La composición de la leche varía con la alimentación del animal, el tiempo de lactancia, su salud, la época del año y las condiciones ambientales [7]. La composición típica de la leche se vaca se muestra en la Tabla 1.

Carbohidratos

La lactosa es el carbohidrato mayoritario de la leche (50g/L en leche de vaca), el único que existe en cantidad importante en la leche de casi todos los mamíferos y es característico de este alimento. Es el más simple y el más constante. [7, 8, 9]. Además de lactosa, la leche contiene cantidades traza de glucosa, galactosa y oligosacáridos. Cada gramo absorbido de azúcar proporciona al organismo 4 Kcal de energía. La lactosa, o azúcar de la leche, es un disacárido, y se degrada a monosacáridos, glucosa y galactosa, durante la digestión, gracias a la enzima lactasa. Los niños, como todos los mamíferos jóvenes, segregan altos niveles de lactasa necesarios para digerir la lactosa de la leche que ingieren, pero después del destete la secreción de lactasa disminuye [9].

Grasas

Prácticamente toda la materia grasa de la leche se encuentra en forma de glóbulos grasos, y por lo tanto, puede concentrarse fácilmente por desnatado espontáneo. Aproximadamente el 98% de la grasa de la leche es una mezcla de triglicéridos. Además se encuentran fosfolípidos (grasas fosforadas) en proporción de 0,5 a 1% y alrededor de 1% de otras sustancias "insaponificables", insolubles en agua y solubles en grasas. [7,10].

Los triglicéridos de la grasa láctea se forman a partir de ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono procedentes de los triglicéridos del plasma sanguíneo y de ácidos grasos de cadena corta (4-8 átomos de carbono) sintetizados en la glándula mamaria. La grasa láctea de los mamíferos rumiantes (vacas, ovejas, cabras y búfalos) tienen alto contenido de éstos últimos. La razón es que, en estos animales, los ácidos grasos de cadena más corta se forman en la glándula mamaria a partir de ácido acético (que tienen dos átomos de carbono).

Las grasas son una fuente de energía más concentrada que los carbohidratos y cada gramo proporciona 9 Kcal [9]. La materia grasa es el componente de la leche que varía en mayor proporción debido a factores fisiológicos, alimenticios, climáticos, genéticos y zootécnicos[7].

Proteínas

Las proteínas contienen un 16% aproximadamente de nitrógeno y para su determinación en la leche, a menudo se multiplica el contenido de nitrógeno por 6.38 (factor usado comúnmente para convertir nitrógeno en proteína cruda, dicho factor está basado en la cantidad promedio de nitrógeno en las proteínas) [9]. Aproximadamente el 95% del nitrógeno de la leche está en forma de proteínas. Las proteínas de la leche constituyen una compleja mezcla de la que resulta difícil separar los componentes puros. Esto se debe a que algunas proteínas están

relacionas entre sí [10].El contenido de proteínas depende fundamentalmente de la alimentación y oscila entre el 3.0 y el 3.6%.

La caseína, representa el 80% de la cantidad de proteína total de la leche. Constituye la fracción proteica en los quesos. La caseína es una fosfoproteína debido a que posee grupos fosfato fuertemente ligados y, además, establece enlaces con el calcio. La unión con el calcio le proporciona estabilidad por lo que no coagula al ser cocida. Únicamente calentando a temperaturas superiores a 120 °C la caseína se va insolubilizando lentamente [8]. La caseína no es una proteína globular se encuentra en la leche en forma de grandes agregados y constituye la parte nitrogenada más característica de leche [10].

Minerales

Los minerales de la leche son principalmente sales inorgánicas; parte se encuentran ionizadas y parte en forma de sales complejas. Parte de la materia inorgánica como los fosfatos, se une covalentemente a las proteínas. La leche se incinera, a veces, para determinar su "grado salino" aunque las cenizas no representan en realidad las sales de la leche ya que las orgánicas se destruyen durante la incineración y algunos componentes no salinos (por ejemplo el azufre de los aminoácidos) contribuyen a las cenizas [10].

No todas las sales se encuentran en solución; las micelas de caseínas contienen fosfato cálcico sin disolver (fosfato cálcico coloidal) y un poco de citrato; Algunos cationes y especialmente el Ca^{2+} y el Mg^{2+} se asocian a las proteínas cargadas negativamente; También pueden encontrarse unidas a las proteínas pequeñas cantidades de otros iones (Cl^-). Casi todas las sales se encuentran en el suero y en las micelas de caseína y una cantidad muy pequeña está unida a los glóbulos grasos. La leche contiene fósforo bajo muchas formas distintas; todo él se presenta como ortofosfato, pero parte está unido a los componentes orgánicos, bien esterificado a los radicales de serina y treonina de la caseína [10].

Tabla 1. Composición típica de la leche de vaca.

Componente	Composición (g / L)	Estado físico de los componentes
Agua	905	Agua libre + Agua ligada (3,7%)
Extracto seco (total)	127	
Extracto seco desengrasado	92	
Glúcidos: lactosa	49	Solución
Lípidos	35	
Materia grasa	34	Emulsión de los glóbulos grasos (3-5 micras)
Lectina (fosfolípidos)	0,5	
Parte insaponificable (esteroles, carotenos, tocoferoles)	0,5	
Prótidos	34	Suspensión micelar de fosfocaseinato de cal
Caseína	27	
Sustancias nitrogenadas no proteicas	1,5	Solución verdadera
Prótidos "solubles" (globulinas, albúminas)	5,5	Solución coloidal
Sales	9	Solución o estado coloidal (P y Ca)
del ácido cítrico	2	Sales de K, Ca, Na, Mg, etc.
del ácido fosfórico	2,6	
del ácido clorhídrico	1,7	
Componentes diversos (vitaminas, enzimas, gases disueltos)	trazas	

Fuente: Alais, C. Ciencia de la leche.

2.2. Elementos traza y metales pesados

2.2.1 Interés nutricional y toxicológico

Entre los temas relacionados con la contaminación ambiental, la posible presencia de metales tóxicos en alimentos es reconocida como una prioridad por organizaciones internacionales y constituye un nuevo reto para científicos, ingenieros y tecnólogos en alimentos. En la actualidad se están estableciendo nuevos criterios de calidad que aseguren la inocuidad de los alimentos.

Desde 1997 el Codex Alimentarius reconoce como prioridad por sus efectos altamente tóxicos, elementos tales como el plomo (efectos en el aprendizaje), estaño (efectos gastrointestinales), arsénico (toxicidad general), y cadmio (efectos nefrotóxicos). Sin embargo, mientras existen niveles máximos para diferentes alimentos, en la actualidad pocos métodos permiten un análisis rápido, preciso y multi-elemental.

Los efectos nutricionales o tóxicos de los elementos presentes en los alimentos son gobernados principalmente por su concentración, por lo que es de sumo interés la determinación de los niveles de éstos en los alimentos. De acuerdo con algunos autores, los elementos de interés en la salud, históricamente han sido divididos en dos grupos de acuerdo a su concentración: elementos minerales, los cuales se encuentran en concentraciones mayores de 10 ppm; y los elementos traza, cuyas concentraciones se hallan por debajo de 10 ppm.

Nutricionalmente, el consumo diario recomendado de elementos traza ha sido establecido en gran cantidad de alimentos. Los elementos traza se identifican de acuerdo con tres regiones de concentración:

- Deficiente.
- Normal.
- Tóxico.

En la tabla 2 se presentan aquellos elementos que producen tanto efectos nutricionales como tóxicos, es decir, un mismo elemento puede ser benéfico o dañino y esto dependerá de los niveles de concentración en los que se encuentre. La diferencia entre deficiencia y toxicidad se da por dos órdenes de magnitud de diferencia en la concentración [11].

Tabla 2. *Elementos de interés nutricional y algunos de interés toxicológico.*

Elementos de interés nutricional:
As, Co, Cr, Cu, F
Fe, I, Mn, Mo, Ni
Se, Si, Sn, V, Zn
Elementos de interés toxicológico:
As, Be, Cd, Co, Cr
F, Hg, Mn, Mo, Ni
Pb, Pd, Se, Sn, Tl
V, Zn

2.2.2 Elementos traza en la leche

Los elementos traza juegan un papel importante en la salud humana, tanto como elementos esenciales, los cuales deben mantenerse en niveles de concentración óptimos, y como elementos tóxicos, los cuales producen efectos dañinos aún en concentraciones muy bajas [10].

Los que son considerados como esenciales son el boro, cloro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc, también llamados micronutrientes, deben mantenerse en niveles de concentración óptimos. Los que se consideran tóxicos, son los metales pesados: cadmio, mercurio y plomo, producen efectos dañinos aún en concentraciones muy bajas, por lo que hay que evitar o minimizar su presencia en los alimentos [12].

Los elementos traza se incorporan a la leche por medio de la alimentación de la vaca productora o por contaminación posterior al ordeño. Las concentraciones de algunos de estos elementos en la leche (por ejemplo, B, Br, Co, I, Mn, Mo, Se, Zn) pueden aumentarse incrementando su nivel en la ración de las vacas productoras. La leche de vacas criadas en la vecindad de ciertas plantas industriales puede presentar concentraciones relativamente grandes de Cd y Pb; las vacas explotadas cerca de las autopistas producen leche rica en Pb, el contacto de leche con recipientes y equipos metálicos constituyen una vía importante de contaminación con Cu, Fe, Ni y Sn [10].

A continuación se describen brevemente algunos de los elementos traza por su importancia nutricional:

2.2.2.1 Zinc (Zn)

El zinc está presente en todos los tejidos y fluidos del cuerpo humano. El contenido total de éste en todo el cuerpo es de 2 gramos aproximadamente. El Zn es importante para el funcionamiento de un gran número de enzimas. También estabiliza las estructuras moleculares de constituyentes subcelulares y

membranales. Participa en la síntesis y degradación de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. También juega un papel importante en el proceso de expresión genética.

Una deficiencia severa de zinc produce en humanos el retraso del crecimiento y la maduración sexual. Un bajo consumo de zinc afecta el gusto y retrasa la cicatrización de heridas, entre otros.

En contraste, un consumo excesivo de zinc a largo plazo, interfiere en el metabolismo de otros elementos traza, como el cobre. El contenido total de zinc en la dieta no sólo está determinado por el tipo de alimentos que se consumen, sino también por el grado de refinamiento de los cereales; por ejemplo, el pan integral y el arroz con cascarilla contienen una mayor cantidad de Zn que el arroz pulido o descascarillado. Debido a que el Zn está prácticamente ausente de las grasas, un consumo elevado de alimentos con alto contenido de éstas puede diluir la cantidad total de Zn presente en la dieta. Se ha reportado que el consumo diario de zinc en países industrializados cuya dieta es alta en grasas, azúcares refinados y proteína animal puede llegar a ser de 10-12 mg [3].

2.2.2.2 Selenio (Se)

De este elemento sólo se conoce su función en mamíferos como un componente de la enzima glutadión-peroxidasa, que junto con la vitamina E, catalasa y peróxido dismutasa, es componente de un sistema antioxidante de defensa del cuerpo humano [3]. Es necesario para el crecimiento y fertilidad de animales, así como para prevenir enfermedades. La enfermedad del músculo blanco que ocurre en una gran variedad de especies, se caracteriza por concentraciones anormales de selenio en sangre y tejidos. Esta enfermedad puede prevenirse con suplemento de selenio en la dieta en las concentraciones apropiadas. Los mecanismos bioquímicos de la toxicidad del selenio no se han establecido claramente. El envenenamiento por selenio en animales se ha presentado en áreas donde las concentraciones de este elemento en el suelo son

altas. La tolerancia de los animales a diferentes concentraciones de selenio está determinada por la forma química en que éste se presente [31]. Un consumo anormal de este tipo de elemento se asocia con enfermedades degenerativas, tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y trombosis. Sin embargo, un gran número de estudios epidemiológicos han demostrado que no hay relación entre el consumo de selenio con el riesgo de cáncer [3].

2.2.2.3 Cobre (Cu)

El cobre está ampliamente distribuido en plantas y animales. Una gran variedad de síntomas han sido asociadas con la deficiencia de cobre en animales, muchas de las cuales han sido observadas en humanos; algunas de ellas incluyen anemia hipocrómica, hipopigmentación de piel y cabello, malformación de huesos y osteoporosis. En humanos, el envenenamiento grave con cobre es raro y comúnmente resulta por la ingestión de alimentos o bebidas almacenadas en recipientes de cobre o por una ingestión accidental o deliberada de grandes cantidades de sales de cobre.

Aunque no existen complicaciones nutricionales por deficiencia de cobre, se ha demostrado que deficiencias significativas de cobre en humanos pueden provocar situaciones clínicas anormales como el desarrollo de anemia en niños. Por lo tanto, su consumo recomendable es de 0.6 mg/día para mujeres y de 0.7 mg/día para hombres [3].

2.2.2.4 Manganeso (Mn)

El manganeso es un activador y constituyente de varias enzimas como las hidrolasas, quinasas, descarboxilasas y transferasas. Muchas de estas enzimas también pueden ser activadas por otros metales como el magnesio.

La deficiencia de manganeso ha sido observada en muchas especies de animales y en humanos. Una deficiencia de manganeso afecta el crecimiento, la reproducción y provoca defectos en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos.

A menudo, el manganeso es considerado el menos tóxico de los elementos traza cuando se administra por vía oral. Aunque se han reportado casos de intoxicación por ingestión de grandes cantidades de manganeso. Se ha observado que dietas con grandes cantidades de cereales no refinados, nueces, hortalizas presentan grandes cantidades de manganeso; mientras que dietas con grandes cantidades de granos refinados, carne y productos lácteos presentan pocas cantidades de éste. El consumo adecuado de manganeso en personas adultas debe ser de 2-5 mg/día [3].

2.2.2.5 Hierro (Fe)

El hierro es un metal que se encuentra ampliamente distribuido además de ser un constituyente vital en la vida de animales y plantas. El contenido de dicho metal en el cuerpo humano oscila entre 4 a 5 g. Esto representa aproximadamente lo doble del nivel de zinc en el cuerpo humano y más de veinte veces el contenido de cobre.

La mayor parte del hierro en el cuerpo se encuentra formando complejos proteínicos, como porfirinas, compuestos hemo, particularmente hemoglobina y mioglobina, así como compuestos como la ferritina y transferrina. El hierro de la hemoglobina corresponde al 60–70% del contenido total de hierro en el hombre. Las más altas concentraciones de dicho metal se encuentran en el hígado, riñones y corazón [31].

2.2.2.6 Níquel (Ni)

Las cuatro enzimas típicas en las que participa el níquel se encuentran en las plantas y microorganismos; ureasa, hidrogenasa, metil-coenzima M reductasa y monóxido de carbono deshidrogenasa [3].

El níquel se encuentra a bajas concentraciones en tejidos animales y vegetales (2.6 µg/L en suero humano). La presencia del níquel en una metaloproteína del suero humano, sugiere que éste y otros metales de transición de la tabla periódica, juegan un papel fisiológico esencial. Debido a la presencia de altas concentraciones de níquel en el ácido ribonucleico (RNA), se ha establecido que dicho elemento presenta bajos niveles de toxicidad para varias especies animales, por lo que se piensa que no representa riesgos para la salud humana. [31].

El consumo de níquel en la dieta varía mucho dependiendo de las cantidades y proporciones de alimento que se consuman pues los de origen animal tienen bajo contenido de níquel, mientras que los vegetales tienen un alto contenido de níquel. Aproximadamente, la mitad del consumo total de níquel en la dieta proviene del consumo de pan, cereales y bebidas. El consumo adecuado de níquel para una persona adulta es de aproximadamente 600 µg/día [3].

2.2.3 Metales pesados

El término de metal pesado se refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una densidad relativamente alta y sea tóxico o venenoso en concentraciones bajas. Los ejemplos de metales pesados incluyen el mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), y el plomo (Pb).

Los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse [13], éstos son componentes naturales de la corteza de la tierra. No pueden ser degradados o destruidos. Como elementos traza, algunos metales pesados (cobre, selenio, zinc) son esenciales para mantener el metabolismo del cuerpo humano; sin embargo, en concentraciones más altas pueden conducir al envenenamiento. Los metales pesados tóxicos pueden llegar a los alimentos procedentes de diversos orígenes, como son los suelos de cultivo, aguas, fertilizantes, altas concentraciones en el aire cerca de fuentes de la emisión, o bien proceder de los

contenedores y utensilios empleados en la fabricación, almacenamiento y preparación de los alimentos [13].

Los metales pesados pueden entrar a un abastecimiento de agua por medio de residuos industriales, por la lluvia ácida que agrieta los suelos permitiendo su entrada a las aguas subterráneas; o simplemente porque la lluvia ácida los deposita en corrientes, lagos y ríos, etc. Su presencia es cada vez más frecuente en los alimentos. Los de mayor interés toxicológico son: mercurio, cadmio, plomo, y arsénico.

A continuación se describen brevemente algunos de los elementos traza (metales pesados) por su importancia toxicológica:

2.2.3.1 Mercurio (Hg)

El mercurio es un metal ampliamente distribuido en el medio ambiente debido a las emisiones naturales y a su utilización por el hombre desde la edad antigua. En el medio ambiente se puede encontrar como mercurio metálico, formando parte de una sal inorgánica o como un compuesto organomercurial. La presencia de una u otra forma depende de diversos factores, y además tanto en el medio ambiente como en el organismo se pueden transformar unas en otras mediante reacciones de óxido reducción y de metilación, reacciones en las que pueden intervenir algunos microorganismos. Cuando la cantidad de mercurio ingerida en forma de sales inorgánicas es elevada, el riñón es el principal órgano afectado, aunque también se depositan cantidades apreciables en hígado y huesos. El metilmercurio (el compuesto organomercurial más estudiado) tiene efectos tóxicos principalmente en el sistema nervioso. Los órganos donde se acumula mayoritariamente el metilmercurio son los huesos, riñones, hígado y cerebro [14].

El mercurio presente en la leche puede contribuir de una forma importante en la cantidad total de este metal acumulado por el organismo, sobre todo en los niños

y animales jóvenes en los que la absorción de metales pesados es superior a la de los adultos. Además, se ha observado que la leche puede favorecer también su absorción. El mecanismo por el que una dieta de tipo lácteo puede incrementar la absorción del mercurio no se conoce, aunque se ha sugerido que podría deberse a la unión con proteínas que favorecen su absorción [14].

Los niveles de mercurio en la cadena alimentaria son muy bajos, debido fundamentalmente a la pequeña proporción de mercurio que pasa del suelo a las plantas por vía radicular. En los animales de abasto se pueden detectar cantidades de mercurio a nivel de vísceras, principalmente hígado y riñón. La proporción de mercurio que pasa a la leche en los rumiantes es relativamente pequeña.

La FAO, provisionalmente recomienda que el consumo total de mercurio no debe exceder de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal/ semana y no más de 3.3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal/ semana como metilmercurio [3].

2.2.3.2 Cadmio (Cd)

El cadmio, es un oligoelemento metálico no esencial, prácticamente ausente del organismo en el recién nacido, pero que se acumula con el tiempo hasta llegar a un máximo a la edad de 50 años. A esta edad, una persona normal no sujeta a la exposición tiene de 20-30 mg de cadmio en su cuerpo, de los cuales, la mitad o tres cuartas partes se hallan en los riñones y en el hígado. La cantidad de total de cadmio contenida en el organismo está relacionada con su concentración en los alimentos, el agua y otras fuentes ambientales. como suelos contaminados, tuberías antiguas, algunas pinturas (sobre todo de color rojo, amarillo y naranja) y en algunos plásticos. El cadmio se acumula sobre todo en los riñones y, en cantidad menor, en el hígado y en otros órganos. Compite con el calcio en el sistema óseo, produciéndose desmineralización ósea semejante al raquitismo, ocasiona alteraciones renales, trastornos en el crecimiento y daños en el Sistema Nervioso Central [3]. Su periodo de semi-descomposición biológica oscila entre 16 y 33 años [15].

La FAO, provisionalmente recomienda que un consumo de 7µg de cadmio/ Kg de peso corporal/ semana deben ser considerados como el límite máximo tolerable de consumo de cadmio [3].

2.2.3.3 Plomo (Pb)

Es un metal muy empleado desde la antigüedad y en la actualidad se utiliza principalmente en la industria del petróleo con varios fines, entre ellos, como antidetonante en la gasolina. Es utilizado en la fabricación de baterías, pinturas y pigmentos y como estabilizante en la fabricación de algunos plásticos. El plomo que ingresa en el organismo por vía digestiva, respiratoria o a través de la piel, se asocia a los eritrocitos. A largo plazo, el 95% del metal presente en el organismo se acumula a nivel óseo sustituyendo al calcio, el resto se acumula principalmente en los riñones e hígado [18]. Produce anemia por inhibición de la formación de glóbulos rojos y ataca el sistema respiratorio. El problema es que los niños son muy sensibles, y en éstos produce alteraciones en hueso y cerebro, mientras que las alteraciones en los adultos son preferentemente en hígado y riñón. El plomo no es biodegradable y persiste en el suelo, aire, agua y hogares. La exposición a cantidades sumamente pequeñas de plomo puede causar a largo plazo daños medibles e irreversibles en niños, aún cuando éstos no muestren síntomas particulares [4]. Se ha encontrado que una concentración de 7 µg/dL en sangre causa daños irreversibles en el sistema neurológico de los infantes [19].

La FAO recomienda que el consumo de plomo no debe ser mayor de 25 µg/Kg de peso corporal /semana en adultos, niños y bebés [3].

En los adultos, más del 60% del plomo ingerido proviene de los alimentos de origen vegetal, mientras que los productos lácteos aportan solo un 8%. En el hombre, la absorción media de plomo a nivel intestinal es de aproximadamente un 10% de la dosis ingerida . Sin embargo, la absorción y retención de plomo es mucho mayor en los niños, en los que la absorción es de un 42% de la dosis

ingerida, reteniéndose un 32% en el organismo. La absorción de plomo también está relacionada con el metabolismo del hierro, y así, en estudios realizados en animales, se ha observado que en estados de deficiencia de hierro la absorción y retención de plomo aumenta [18].

La absorción de metales pesados, y en concreto de plomo, es mayor en ratas alimentadas con leche de vaca que en los correspondientes controles. Además, se ha observado en niños la existencia de una correlación mucho mayor entre la cantidad de plomo presente en la sangre y la de la leche que consumían, respecto a otros factores ambientales. Para explicar este fenómeno se han propuesto varios mecanismos, entre los que destacan la unión del metal a los ácidos grasos de cadena media presentes en la leche y que son absorbidos fácilmente, la unión a alguna proteína de la leche que favorezca su absorción, o el efecto de algún componente de la leche que evite la formación de sales insolubles de plomo en el tubo digestivo. Sin embargo, ninguno de estos mecanismos ha sido totalmente demostrado hasta el momento, y además en la literatura tradicionalmente se ha adjudicado un efecto terapéutico de la leche sobre las intoxicaciones por plomo, aunque esto estaba basado fundamentalmente en observaciones empíricas [18].

A pesar del gran número de trabajos realizados, la controversia sobre el efecto de la leche en la absorción de plomo permanece todavía sin aclarar. Por otra parte, se han obtenido diferentes resultados según la especie animal en la que se han realizado los experimentos por lo que las conclusiones obtenidas son difícilmente extrapolables al hombre [3].

2.2.3.4 Arsénico (As)

En alimentos, agua, y aire, el arsénico está presente de forma trivalente como trióxido As_2O_3 o pentavalente como pentóxido As_2O_5 , geológicamente está ampliamente distribuido como un componente de aproximadamente 245 minerales. Aunque los compuestos arsenicales son históricamente bien conocidos por su

toxicidad, su acción farmacológica también ha sido documentada. Los efectos biológicos que produce el arsénico depende principalmente de la forma en que se consume, los compuestos inorgánicos son más tóxicos que los orgánicos [3].

La concentración de arsénico en aguas potables e industria alimenticia en México es de 0.05 mg/L. El arsénico se encuentra en el agua debido a la disolución mineral, a las descargas de aguas residuales de las industrias y de la aplicación de insecticidas [15].

El arsénico es muy tóxico y causa daños al sistema neurológico y cardiovascular. Está ligado a diversos tipos de cáncer como el de la piel. La intoxicación crónica por arsénico puede manifestarse por la aparición de llagas y un aspecto leproso. Una dosis superior a los 65 miligramos (mg) puede ocasionar una muerte violenta. Las fuentes principales de la contaminación arsenical son las fundidoras, el agua de ciertas regiones, el humo de tabaco, algunos plaguicidas, los huevos de gallinas criadas en régimen industrial (se les da arsénico para combatir los parásitos) y los mariscos.

El arsénico se absorbe principalmente a través de los aparatos respiratorio y digestivo. Una dosis de 5-50 mg de trióxido de arsénico resulta tóxica. Una dosis de 128 mg resulta letal, sin embargo, la recuperación se ha presentado [15].

Las características particulares de ciertos terrenos, la contaminación de praderas y tierras de cultivo con metales pesados procedentes de industrias de fundición y residuos, y materias primas como fosfatos, son las principales vías de entrada en la cadena alimenticia de los metales pesados al ser consumidos y acumulados por los animales domésticos.

A continuación se presentan los límites máximos permisibles de metales pesados en leche de vaca pasteurizada reportados en la norma NOM-091-SSA1-1994.

Tabla 3. Especificaciones de los Límites máximos permisibles de metales pesados en leche de vaca pasteurizada, NOM-091-SSA1-1994.

Metal	Límite máximo (mg/Kg)
Arsénico (As)	0,2
Mercurio (Hg)	0,005
Plomo (Pb)	0,1

2.3. PIXE

2.3.1 Introducción a la técnica

La técnica de emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) es un método analítico que requiere de un haz de partículas generada en un acelerador por lo que su origen se sitúa en la Física Nuclear. El nombre es el acrónimo de sus siglas en inglés; Particle-Induced X-ray Emission e indica el principio básico del método [6].

La técnica fue introducida en el Instituto de Tecnología de Lund en 1970 en una breve publicación la cual, retrospectivamente ha marcado el comienzo de una nueva técnica de análisis elemental poderosa e importante. PIXE involucra dos desarrollos tecnológicos para crear una variante del método general de análisis de emisión por rayos-X con capacidades únicas: Por un lado la excitación de los átomos de una muestra con partículas aceleradas (en general protones de unos cuantos millones de electrón Volts) tal que éstos emitan un rayo-X característico; y por otro el uso de detectores semiconductores de (Si(Li) o de Ge) para detectar los rayos X, de tal forma que los elementos de una muestra, así como la concentración en la que se encuentran son identificados por la energía y la intensidad de los rayos-X emitidos, respectivamente.

Las posibilidades analíticas de PIXE incluyen la capacidad de analizar simultáneamente muchos elementos (todos los elementos de la tabla periódica a partir del sodio), la velocidad para analizar y acumular gran cantidad de datos. Se pueden analizar simultáneamente elementos que incluyen tanto macro elementos como el K y el Ca y micro elementos como metales pesados como son el V, Ni, Cu, Zn, Se, Cd, Hg y Pb [24].

2.3.2 Principios Básicos de PIXE

Cuando una partícula cargada penetra un material, se inducen muchos efectos. Uno de estos efectos es la excitación de las capas electrónicas de los átomos. Si la energía transferida es suficiente, puede crearse una vacante en las capas internas del átomo (K o L). Posteriormente se lleva a cabo un proceso de reordenamiento de las capas electrónicas; las vacantes se van llenando por los electrones de las capas externas del átomo [24]. Cuando la vacante se llena un fotón es emitido, cuya energía se encuentra en el intervalo correspondiente de rayos X, para eliminar el exceso de energía en el átomo, figura 1 [24].

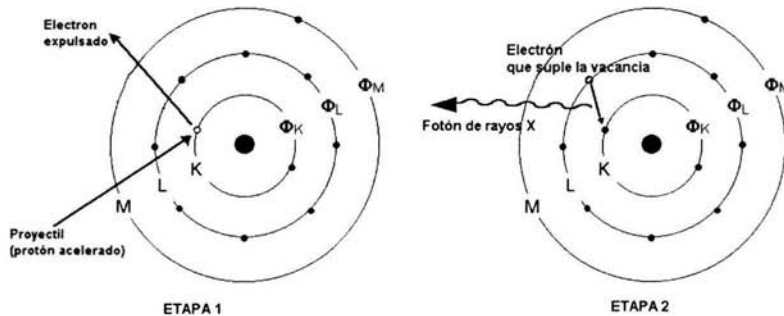


Figura 1. Representación gráfica de la producción de rayos X característicos de un elemento.

La energía que tiene el fotón emitido es característica del elemento en cuestión. Esto hace posible, con la medición de energía, la identificación del elemento, de tal forma que los elementos presentes en una muestra pueden ser identificados por las energías de los rayos X emitidos y sus concentraciones por las intensidades de los rayos X.

El espectro de rayos X emitido (Figura 2.) está determinado por la existencia de niveles discretos de energía de los electrones que conforman el átomo. El espectro de energía de rayos-X consiste de un fondo continuo junto con líneas de

rayos-X característicos de los átomos presentes en la muestra. Los rayos-X son detectados por un detector de Si(Li) (silicio dopado con litio), o de Germanio de tal forma que las señales del detector son amplificadas y finalmente registradas en un analizador.

El electrón expulsado en el proceso, puede corresponder a diferentes capas atómicas, ocurriendo lo mismo con el electrón que ocupa la vacante. Con esto se producen grupos de líneas de rayos X bien definidas, que tienen un nombre de acuerdo con la capa de la cual se extrajo el electrón original [32].

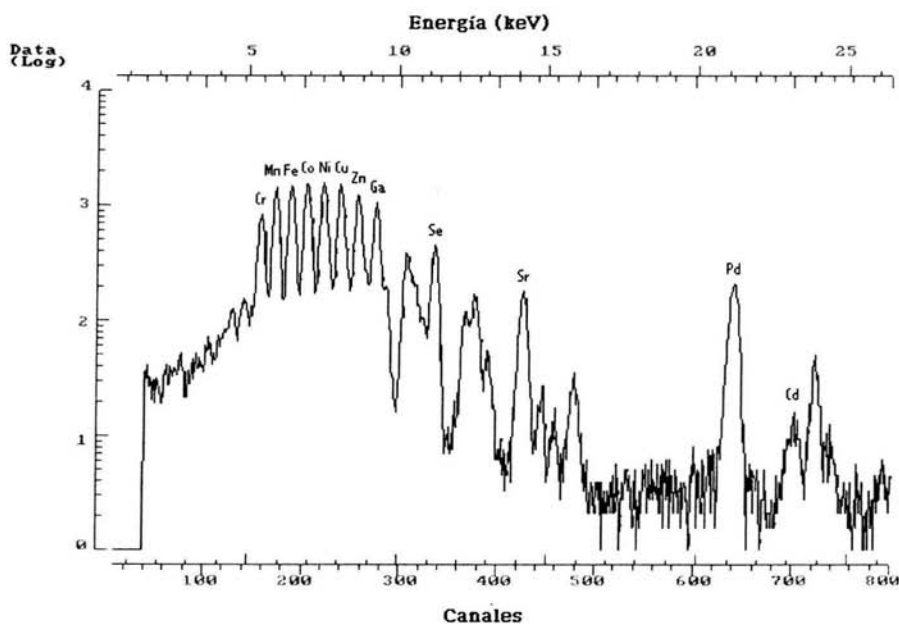


Figura 2. Espectro de salida del GUPIX, se señalan las líneas $K\alpha$ de algunos elementos presentes.

2.3.3 Bremsstrahlung

El espectro del material que se analiza se compone fundamentalmente de un conjunto de rayos X característicos de los átomos que constituyen a la muestra más una radiación de fondo que se superpone. Esta radiación de fondo o Bremsstrahlung se produce cuando una partícula cargada cambia su velocidad o su dirección y emite en consecuencia radiación electromagnética. La causa principal de este fondo se debe al Bremsstrahlung de los electrones secundarios producidos o de los mismos iones del haz que pierden energía o se desvían de sus trayectorias dentro de la muestra [6].

2.3.4 Ventajas y Desventajas de PIXE

El análisis con PIXE se ha convertido en una herramienta de gran importancia utilizada actualmente en investigación básica e investigación aplicada en varias áreas. A continuación se mencionan algunas ventajas y desventajas de esta técnica [28]:

Ventajas de PIXE:

- Aplicabilidad en un amplio rango de número atómico (Z arriba del Na).
- Posibilidad de determinar absolutamente las cantidades de los componentes de una muestra.
- Métodos de preparación de muestras sencillos.
- Método rápido y multi-elemental.
- Alta sensibilidad para la mayoría de los elementos de la tabla periódica. El mínimo límite de detección (MDL) es de ppm o por debajo (10^{-6} a 10^{-7} g/g).
- Técnica no destructiva, con excepción de muestras biológicas irradiadas con haces de alta densidad de corriente.
- Pueden analizarse diferentes tipos de muestras.
- Mediciones a presión atmosférica.
- Análisis rápido (5-10 min)

- Análisis rápido (5-10 min)

Algunas de las desventajas de PIXE:

- Se requiere el acceso a un acelerador de partículas.
- Equipo costoso.
- Rápida disminución de la sección eficaz de líneas K cuando el número atómico, Z incrementa para elementos con Z altos, es necesario utilizar las líneas de detección L, las cuales aseguran una sección eficaz más grande.

2.3.5 Límites y eficiencia de detección

En el espectro obtenido de una muestra, las alturas relativas de los picos de rayos X con respecto al nivel de la radiación de fondo determina el **límite de detección** (LOD) del método para un elemento dado. En general se acepta que el número total de cuentas en un pico debe exceder tres veces la raíz cuadrada de las cuentas de la radiación de fondo sobre el mismo intervalo de energía, para una identificación segura y una cuantificación adecuada del pico correspondiente.

Las concentraciones que exceden por poco los LOD, tienen asociadas grandes incertidumbres estadísticas, de tal forma que el resultado obtenido puede ser cuestionable. Por lo tanto, algunos autores recomiendan utilizar el límite de cuantificación (LOQ), que define límites más bajos de los rangos de concentración usuales para una técnica analítica. Recomiendan utilizar el LOQ como diez desviaciones estándar, lo que corresponde al 30% de incertidumbre en un 99% de nivel de confianza [6, 24].

Cuando se trabaja con muestras delgadas sobre sustratos de polímeros (blancos delgados), el sustrato es más delgado y los LOD más bajos, que cuando se trabaja con muestras gruesas (como una pastilla). Para algunas muestras biológicas, la preconcentración por medio de técnicas que eliminan la materia orgánica, permiten bajar el bremsstrahlung y reducir los límites de detección

considerablemente. Estas técnicas combinadas con PIXE son valiosas en este tipo de aplicación [24]. Lo anterior se ilustra en la figura 3, la cual ejemplifica que un LOD por debajo de 1 ppm se puede obtener para varios elementos usando distintos procedimientos de descomposición de materia orgánica [35].

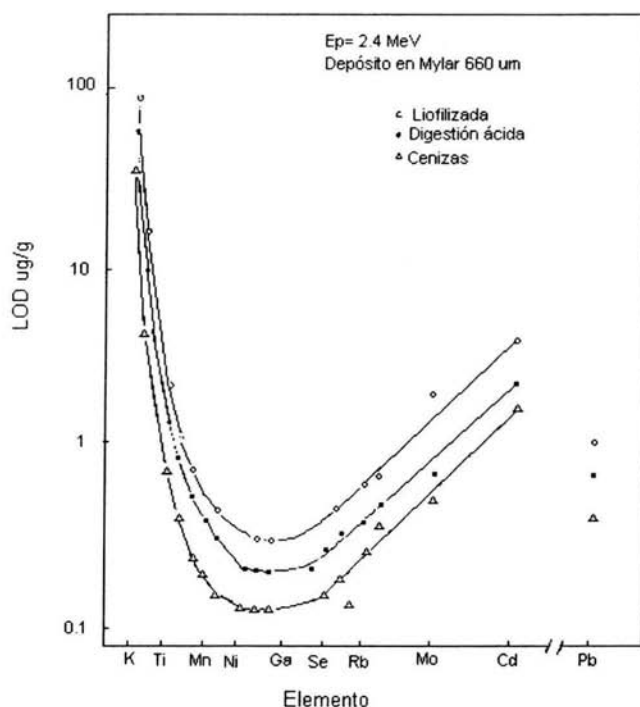


Figura 3. Límites de Detección ($\mu\text{g/g}$ muestra seca) para el estándar de hígado de bovino NBS 1577

Algunos métodos de estandarización requieren la determinación de la **eficiencia de detección**, que es número de fotones registrados por el detector dividido entre el número de fotones que fueron emitidos por la fuente. Esta eficiencia depende del material que constituye al detector, del tipo de radiación que incide en el sistema, del ángulo sólido que presenta el detector con respecto a la fuente emisora, y de la energía de los fotones [24].

2.3.6 Análisis de muestras gruesas

En el caso de un blanco grueso, cuando el proyectil deposita toda su energía en la muestra queda detenido en ella, se requiere del conocimiento completo del poder de frenado del proyectil en la matriz y la atenuación de los rayos X en la muestra.

Para obtener la ecuación para el número de fotones de rayos X que se producen a lo largo de la trayectoria del proyectil dentro del blanco, la energía final del ion debe ser cero. Así pues, la ecuación para el blanco grueso es:

$$Y(Z) = \frac{N_{av} \omega_z b_z^a \varepsilon_z N_p C_z}{A_z} \int_{E_0}^0 \frac{\sigma_z(E) T_z(E)}{S(E)} dE \quad (1)$$

donde N_p es el número de proyectiles que incidieron sobre la muestra, A_z es la masa atómica del elemento, ω_z es la producción de fluorescencia de los rayos X (K ó L), b_z es la fracción de rayos X K ó L totales que aparecen como $K\alpha$ ó $L\alpha$, ε_z es la eficiencia absoluta del sistema de detección para la línea en cuestión, N_{av} es el número de Avogadro, $\sigma_z(E_0)$ es la sección eficaz de ionización a la energía de incidencia de los proyectiles E_0 , y S es la sección transversal del haz, que se supone tiene una distribución de carga uniforme, C_z es la concentración del elemento. El término $T_z(E)$, describe la transmisión de los fotones desde las profundidades sucesivas dentro de la muestra, y se define como:

$$T_z(E) = \exp \left\{ - \left(\frac{\mu}{\rho} \right)_z \frac{\cos \alpha}{\sin \theta_{T_z}} \int_{E_0}^E \frac{dE}{S(E)} \right\} \quad (2)$$

Para realizar el análisis cuantitativo en el blanco grueso, es necesario obtener experimentalmente el espectro de rayos X de la muestra. Del número de fotones de rayos X de la línea y, mediante evaluaciones numéricas de las ecuaciones anteriores, se hace una comparación con los valores experimentales, realizando

iteraciones hasta encontrar una concordancia entre éstos y los valores numéricos [24].

2.3.7 Análisis de muestras delgadas

Cuando la muestra es delgada, es decir el depósito en un filtro varía entre 1 y 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, la pérdida de energía de los protones y la atenuación de los rayos X es despreciable, lo que simplifica notablemente la ecuación 1. El término de transmisión es igual a 1, $\sigma_z(E)$ es ahora $\sigma_z(E_0)$ y el rendimiento de rayos X queda como:

$$Y(Z) = s(Z) N_p m a \quad (3)$$

Donde el factor $s(Z)$ es la sensibilidad.

2.3.8 GUPIX

La concentración de cada elemento en la muestra, se puede obtener a partir de los espectros obtenidos usando diversos programas de cómputo. Entre los programas comerciales más completos se encuentra el GUPIX, que se usa rutinariamente en el IFUNAM. Este programa fue introducido en 1989 específicamente para el análisis de los espectros de PIXE obtenidos de muestras delgadas, semi gruesas y gruesas. GUPIX determina la intensidad de los picos de los rayos-X característicos del espectro de PIXE, por medio de un modelo. Dicho modelo está construido usando los valores de los niveles de energía K, L y M [29].

GUPIX comprende dos secciones, una de introducción de datos acoplada a una sección de prueba. Esta última utiliza un método no lineal de mínimos cuadrados, que permite al usuario ajustar un espectro de PIXE por arriba de los canales que tienen los picos de rayos X de un máximo de elementos. Los espectros teóricos son generados ajustando gaussianas al espectro de rayos X [30].

2.3.9 Instrumentación para PIXE

Para el análisis con PIXE, se utiliza el acelerador Peletrón 9SDH NEC de 3 MV. En la figura 4 se muestra un diagrama a escala del Peletrón.

El acelerador Peletrón cuenta con dos fuentes de iones. La primera que es para gases, se conoce como Alphasross. La segunda que es la que se emplea en PIXE, se conoce como SNICS ("Sputter Negative Ion Cesium Source"). En este caso, el elemento del cual se desean producir iones se encuentra como un sólido en un cátodo de cobre, el cual se bombardea con un haz de iones de cesio, produciendo un haz de iones negativos mediante la captura electrónica. Los iones son inyectados al acelerador mediante el electroimán inyector. Los iones negativos que entran al acelerador son atraídos a la terminal proporcionándoles una energía de varios eV, donde, e es la carga del electrón y V es el potencial en la terminal.

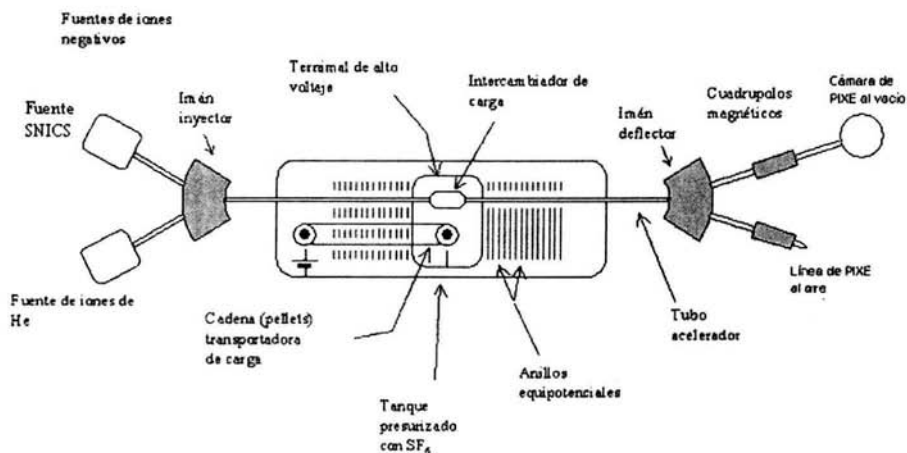


Figura 4. Diagrama a escala del acelerador Peletrón (Instituto de Física, UNAM).

En el centro del tanque existe un convertidor de iones negativos a positivos (Nitrógeno a baja presión, llamado stripper). Estos iones positivos ahora se ven empujados por la terminal, por lo cual se suma una energía neV al haz de iones, donde n es el estado de carga del ion, es decir, el número de electrones que perdió.

Así pues, la energía final E de los iones es:

$$E = (n+1)eV$$

A la salida del acelerador los iones entran a un segundo imán (el imán selector), donde se seleccionan únicamente aquellos iones que posean masa y energía deseadas. El análisis con PIXE se realiza generalmente con protones de 1 a 4 MeV. En el sistema de PIXE utilizado en el Instituto de Física de la UNAM, los análisis pueden realizarse en condiciones de vacío o bien con un haz externo en condiciones ambiente a través de una ventana delgada de aluminio [32].

La figura 5 muestra un dispositivo típico del montaje experimental de PIXE. La corriente del haz se mide con una caja de Faraday en la parte posterior a donde se coloca la muestra [27]. Los rayos X se pueden detectar con un detector (PIXE al vacío) ó simultáneamente con dos detectores (al aire). En general se utiliza un detector de Si(Li) para elementos ligeros y un detector de Ge para metales pesados, colocados a una distancia de aproximadamente 5 cm de la muestra y a un ángulo de 45° con respecto a la dirección del haz.

Un detector se puede pensar como una caja que recibe radiación ionizante (fotones X), y que envía información sobre la radiación que incidió sobre él. Debido a que la radiación es ionizante, en el detector aparece con la misma interacción una cierta carga libre. Esta carga lleva la información de la partícula incidente, y por ello, es necesario colectarla. Muchos cuantos de radiación inciden sobre el detector, creando una serie de pulsos de carga [24].

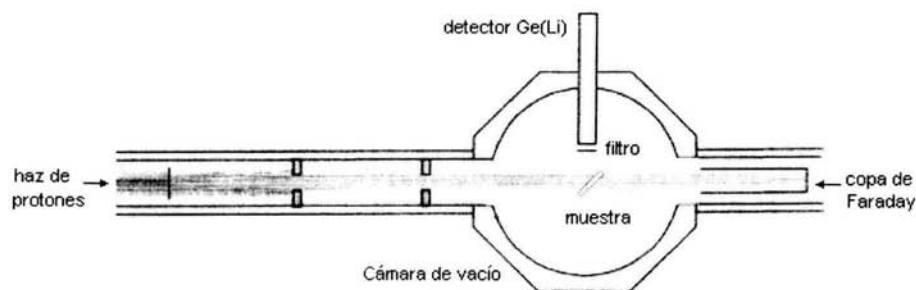


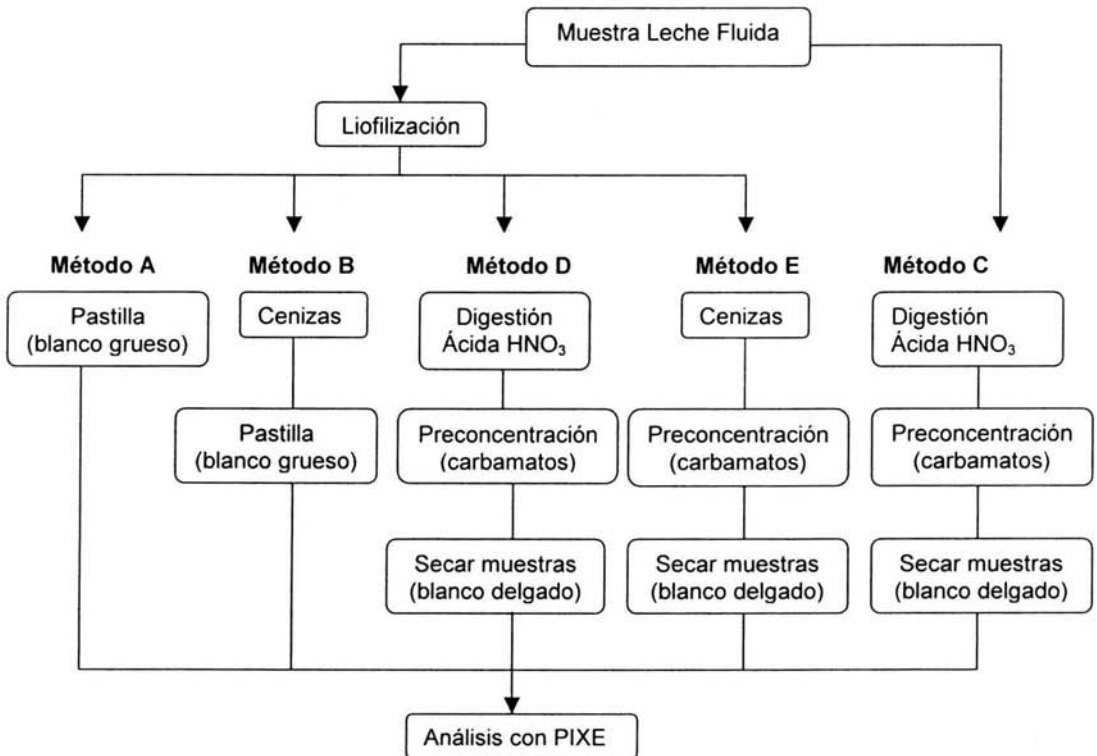
Figura 5. Dispositivo experimental típico para el análisis de PIXE al vacío.

El primer circuito asociado a un detector es el preamplificador, que recoge la señal (pulso de tensión) del detector y aumenta su amplitud hasta un tamaño que pueda ser procesado por el amplificador. El preamplificador se coloca lo más próximo posible al detector, por que se trata de minimizar la impedancia capacitiva del circuito en su totalidad. Otra función del preamplificador es la de proporcionar tensiones de polarización necesarias para el detector. Normalmente se lleva a cabo a través de la resistencia de carga conectada al circuito principal del preamplificador [27]. El amplificador toma la señal del preamplificador y la aumenta hasta un tamaño que esté dentro del intervalo dinámico del resto de los aparatos para el análisis con cierta forma. La forma del pulso es importante para dos cosas: evitar el apilamiento de los pulsos, que consiste en la suma de dos pulsos si el tiempo entre ellos es demasiado corto, y la razón señal-ruido.

El analizador multicanal (*Multichannel Analyzer, MCA*), recibe las señales de diferentes amplitudes provenientes del amplificador, las clasifica según su amplitud, y acumula el número de pulsos de una cierta altura. De esta manera, registra el espectro de energía de la radiación incidente.

III. METODOLOGÍA

Se aplicarán las metodologías de descomposición de la materia orgánica que ofrezcan una mayor reducción de masa (cenizas, digestión ácida, etc.) y que combinadas con técnicas de preconcentración permitan concentrar selectivamente los elementos traza y metales pesados y obtener mejores límites de detección. Los diferentes tratamientos se presentan en el siguiente diagrama:



3.1 Material y Reactivos

Las muestras líquidas fueron liofilizadas en una liofilizadora marca Labconco, modelo 77500 y calcinadas en una mufla marca Lindberg. Las muestras secas y calcinadas fueron pesadas en una balanza digital modelo Adventurer, marca OHAUS.

Las digestiones ácidas de las muestras se realizaron en bombas de digestión ácida modelo 4744 con capacidad de 45 mL, marca Parr y fueron transferidas a matraces aforados de 50 mL utilizando micropipetas de (100 μ L, 1mL, 5mL). Para trasvasar la muestra después de aforarla se utilizaron vasos de precipitados de 150 mL. Los valores de pH de las muestras (3,5 a 4) se ajustaron en un potenciómetro, conductronic pH 120.

Para la agitación de las muestras se utilizó una parrilla eléctrica de agitación marca Lindberg.

Las muestras filtradas se depositaron en filtros marca nucleopore de 25 mm con diámetro de poro de 0.2-0.4 μ m y sostenidas en soportes plásticos de 2x2 pulgadas, marca GEPE. Para prensar las pastillas se utilizó una prensa (pastilladora) de 10 toneladas.

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico ó suprapure:

Agua desionizada con un sistema Millipore.

APDC (Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate, $C_5H_{12}N_2S_2$).

DDTC (diethyldithiocarbamate sodium, $C_5H_{10}NNaS_2 \cdot 3H_2O$).

Cuferrón.

Oxina.

Ácido ascórbico.

Bisulfito.

Propanol.

Solución de Paladio (Merck).

HNO₃ (ácido nítrico).

Agua desionizada.

NH₄OH (hidróxido de amonio).

Solución ICP VIII de 24 elementos, marca MERCK. Conteniendo 100 µg/L de Al, B, Ba, Be, Bi, Ca Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, K, Li Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Sr, Te, Tl y Zn

Datos de la muestra:

Para los métodos A, B, C y D, se utilizó leche ultra pasteurizada baja en grasa Alpura 2000, en presentación de 1 L. Lote: V7. Para el método E, se utilizaron muestras de leche bronca de diferentes orígenes. Se estudiaron 11 muestras de leche; 6 de ellas, procedentes de vacas de establo y las otras 5 procedentes de vacas de pastoreo. Todas estas muestras fueron colectadas en la localidad de Mixquiahuala, Hidalgo, en el Valle del Mezquital.

Las vacas de establo son todas aquellas vacas cuya alimentación (alfalfa, alimento preparado y agua) está controlada por los criadores. Por otro lado, las vacas de pastoreo son aquellas que se alimentan de lo que encuentran a su paso cuando los criadores las sacan a pastar y beben agua donde la encuentran, en este caso en los canales de riego.

3.2 Caracterización de los métodos de preconcentración con carbamatos:

Para determinar cuál de los métodos de preconcentración de metales pesados ofrece una mayor recuperación de éstos, y basado en lo reportado en la literatura [33]; se ensayaron los siguientes 2 métodos:

Método 1:

- a) Se prepara una solución de 40 ml agua conteniendo 100 $\mu\text{g/L}$ de 24 elementos (Solución patrón).
- b) Se ajusta el pH de la solución a 4.
- c) Se añade 1 ml de una solución de APDC y DDTC al 10% preparada en el momento de usarla.
- d) Se agregan 100 μl de una solución de Pd a 1000 ppm como coprecipitante y estándar interno.
- e) Se afora a 50 ml
- f) Se agita por 5 minutos y se deja reposar por 30 minutos.
- g) Se filtra a través de un filtro nucleopore de esteres de celulosa de 0.45 μm de poro.
- h) El filtro se seca y se guarda en un desecador, para su posterior análisis con PIXE.
- i) Este procedimiento se realiza para cada muestra.

Método 2:

- a) Se prepara una solución de 40 ml agua conteniendo 100 $\mu\text{g/L}$ de 24 elementos (Solución patrón).
- b) Se ajusta el pH de la solución a 3,5 – 4.
- c) Se añaden 30 mg de APDC, 300 mg de ácido ascórbico, 20 mg de cuferron, y 15 mg de bisulfito, previamente disueltos en 5 ml de agua desionizada y 30 mg de oxina previamente disuelta en 2 mL de propanol.
- d) Se le agregan 100 μl de una solución de Pd a 1000 ppm, como coprecipitante y estándar interno.
- e) Se afora a 50 ml.
- f) Se agita por 5 minutos y se deja reposar por 30 minutos.
- g) Se filtra a través de un filtro nucleopore de esteres de celulosa de 0.45 μm de poro.

- h) El filtro se seca y se guarda en un desecador, para su posterior análisis con PIXE.
- i) Este procedimiento se realiza para cada muestra.

3.3 Caracterización de los métodos de mineralización

En este estudio se investigaron los 5 procedimientos descritos en la preparación de muestras de leche. Para los métodos A, B , D y E; 100 mL de leche fluida es previamente liofilizada.

A: Pastilla (blanco grueso).

B: Calcinación-pastilla (blanco grueso).

C: Digestión ácida y preconcentración de la leche fluida (blanco delgado).

D: Digestión ácida y preconcentración (blanco delgado).

E: Calcinación y preconcentración (blanco delgado).

3.4 Preparación de las muestras

Método A: Pesar entre 0.25-0.5 g de leche liofilizada. Utilizando un pastillador prensar la leche pesada para obtener una pastilla de aproximadamente 1.5 mm de grosor, realizar este procedimiento por triplicado. Las pastillas son analizadas con PIXE como blancos gruesos.

Método B: Pesar 3 g de la muestra liofilizada en un crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente pesado y puesto a tiempo constante 2h. (aprox.) en la mufla a 600°C. Calcinar la muestra, primero con un mechero en la campana hasta que no se desprendan humos y después meter a la mufla 2h, cuidando que la temperatura no pase de 550°C. Repetir la operación anterior si es necesario, hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises, homogéneas. Enfriar en desecador y pesar entre 0.25-0.5 g para hacer la pastilla correspondiente. Realizar el procedimiento por triplicado.

Método C (digestión ácida): Para eliminar la materia orgánica, una muestra de leche líquida (3 mL) se somete a una digestión ácida con HNO_3 al 65% (1:1). La digestión se lleva a cabo en una bomba de digestión ácida durante 4 horas a 150°C en mufla. La solución obtenida de la digestión ácida se preconcentra mediante la formación de carbamatos. [33]. Para ello, se trasvasa con micro pipeta a un matraz aforado de 50 mL y se afora con agua desionizada hasta la marca. Posteriormente, se trasvasa a un vaso de precipitado y se ajusta pH 4 y sin dejar de agitar, se adiciona con micropipeta 1 mL de solución de APDC - DDTc al 1% y 100 μL de Paladio (Pd 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como patrón interno. Se mantiene en agitación durante 5 minutos (agitación magnética). Se deja reposar 30 minutos y se filtra a través de un filtro nucleopore de 25 mm de diámetro con diámetro de poro de 0.2-0.4 μm . Realizar el procedimiento por triplicado

Se montan los filtros en un soporte plástico de 2 x 2 pulgadas y se almacenan en un desecador hasta su análisis con PIXE como blancos delgados.

Método D: Pesar 400 mg de leche liofilizada y someterla a digestión ácida con 5 mL de HNO_3 al 65%. La mezcla anterior se digiere en una bomba de digestión ácida como se describe en el método C. La solución obtenida de la digestión ácida se preconcentra mediante la formación de carbamatos como se describe en el método C. Realizar el procedimiento por triplicado

Método E: Se sigue el mismo procedimiento para la calcinación de la muestra como se menciona en el método B. Una vez calcinada la muestra, se pesan 100 mg de ésta y se disuelve en 1 mL de HNO_3 al 65%, para después transferirla a un matraz aforado de 50 mL. Posteriormente aforar con agua desionizada hasta la marca de aforo y seguir el mismo procedimiento para la preconcentración de la muestra descrito en el método C. Realizar el procedimiento por sextuplicado.

3.5 Estudio de campo

Para el estudio de campo se colectó 1 L de leche de vacas de pastoreo de cinco sitios distintos y 1 L de leche de vacas de establo de seis sitios distintos, en la localidad de Mixquiahuala, Hgo. Las muestras se mantuvieron a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

3.6 Análisis con PIXE

El análisis con PIXE se llevó a cabo con el acelerador PELETRON NEC 9SDH de 3 MV. Las muestras de leche (blancos delgados) fueron bombardeadas al vacío con un haz de protones de 3 MeV con una corriente de 10-20 nA durante 5-10 minutos; las pastillas (blancos gruesos) fueron bombardeadas al aire con protones de 3 MeV con una corriente de 50 nA durante 5 minutos, los rayos X emitidos fueron detectados con un detector de germanio Canberra LEGe. Debido a que este trabajo sólo se basó en la detección de elementos pesados y traza fue necesario colocar un filtro de aluminio de 38 micras de espesor frente al detector para disminuir las cuentas provenientes de los elementos ligeros. La calibración del sistema de detección se llevó a cabo utilizando películas de Micromatter para blancos delgados y pastillas de material certificado de leche entera NIST 1835 para blancos gruesos.

3.7 Prueba de Mann Whitney

Para comparar los contenidos de metales en leches de establo y de pastoreo, se usó la prueba de Mann Whitney. Esta prueba estadística compara la suma de los rangos de variación de dos grupos independientes cuando el número de muestras es pequeño ($n < 10$). La interpretación de la prueba es esencialmente idéntica a la interpretación de los resultados de la t student para muestras independientes, excepto que se basa en la suma de rangos en vez de la suma de las medias. Si se tienen dos poblaciones continuas independientes X_1 y X_2 con medias μ_1 y μ_2 , y ambas tienen la misma forma y dispersión y sus medias (posiblemente) difieren, la prueba de la suma de rangos permite probar la hipótesis $H_0: \mu_1 = \mu_2$

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de dos métodos de preconcentración con carbamatos

Para la preconcentración de las muestras de leche, se compararon dos métodos (previamente descritos en la metodología) y se determinaron los porcentajes de recuperación de metales de una solución patrón (solución de 24 elementos) con uno y otro. En la figura 6, se muestran los resultados obtenidos para 15 elementos con ambos métodos de preconcentración con carbamatos aplicados a muestras de agua conteniendo 100 ppb de cada elemento.

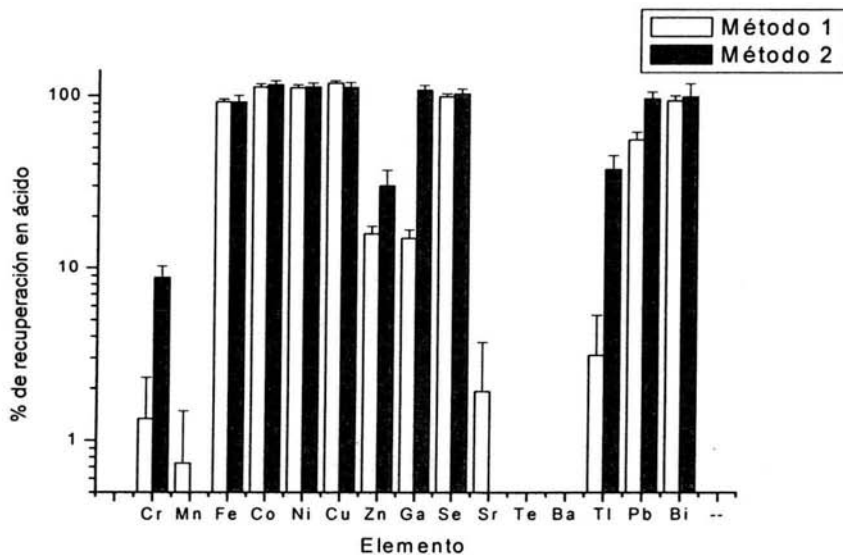


Figura 6. Gráfica del % de recuperación de elementos en presencia de HNO_3 .

La gráfica obtenida muestra que el porcentaje de recuperación fue cercano al 100% con ambos métodos para elementos como el Fe, Co, Ni, Cu, Se y Bi. El Pb se recuperó en un 100% con el método 2 y en un porcentaje mayor al 60% con el método 1. El porcentaje de recuperación para el Zn, Mn, Cr, Bi, Ba, Te, Tl y Sr fue menor al 20% con ambos métodos. Aunque la gráfica muestra un pobre porcentaje de recuperación para el Zn, es importante hacer notar que otros experimentos realizados con concentraciones mayores de este elemento mostraron porcentajes de recuperación hasta de un 80%.

Por la simplicidad que implica la preconcentración de las muestras se optó por utilizar el método 1 para este estudio.

Cabe mencionar que no se incluyeron en este estudio elementos tales como el As y Hg que también son importantes debido a su toxicidad. El As no se determinó ya que no es posible preconcentrarlo con carbamatos. El Hg aunque puede ser detectado por PIXE no está presente en la solución patrón utilizada, por lo que se desconoce su comportamiento al ser sometido a los diferentes tratamientos. El Cd se incluye en este estudio con cierta reserva debido a que los rayos X emitidos por este elemento tienen una energía muy cercana a la del Pd, el patrón interno utilizado; lo cual interfiere con la detección del Cd provocando que la concentración de este sea sobreestimada.

4.2 Caracterización de varios métodos de mineralización

Para determinar cuál es el mejor método en la preparación de muestras de leche que permita mediante su análisis con PIXE, determinar y cuantificar de manera reproducible la presencia de elementos traza y metales pesados, se estudiaron varios métodos que se describen en la metodología.

Métodos A y B (blancos gruesos)

Los primeros dos métodos involucran un mínimo tratamiento de la muestra para su análisis, y las muestras se analizan como pastillas (blanco grueso).

En estos dos métodos, la muestra de leche fue liofilizada. Una parte de la muestra se hizo pastilla (método A); y la otra se calcinó y se hizo pastilla (método B). En la figura 7 se muestra un espectro obtenido con una pastilla de leche calcinada. Algunos elementos como K, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br y Sr se distinguen fácilmente, aunque otros tales como Pb, Cr, V, Se y Cd tienen alta incertidumbre asociada.

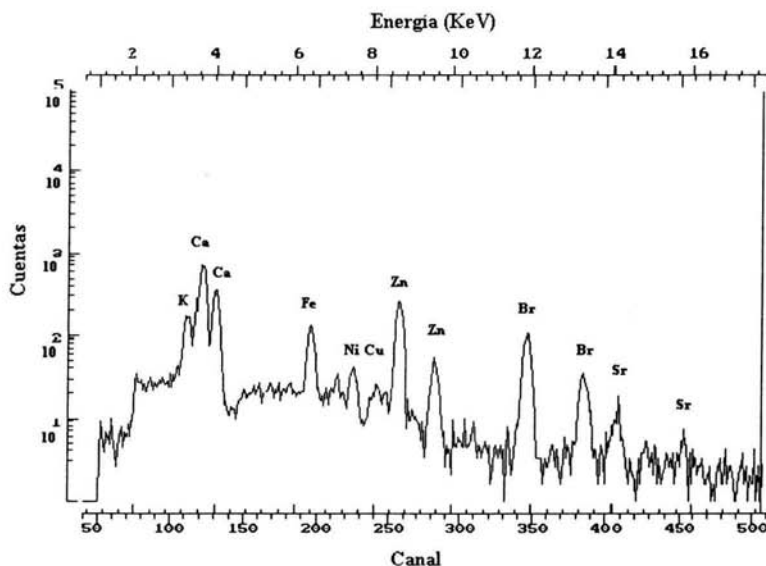


Figura 7. Espectro de PIXE para una muestra de leche entera liofilizada y calcinada.

La concentración obtenida para algunos de los elementos detectados así como su desviación estándar se muestran en la tabla 4 y se comparan con los valores para otras muestras de leche reportados en la literatura.

Tabla 4. Contenido de metales ($\mu\text{g/g}$ leche).

Elemento	Método A (n=3)	Método B (n=3)	Referencias ($\mu\text{g/g}$ leche)		
			1	2	3
Fe	13.4 ± 7.0	7.1 ± 2.0	1.78	2.53	3.65
Co	1.7 ± 0.6	0.05 ± 0.01	0.004	Nd	0.005
Ni	Nd	2.0 ± 1.5	Nd	Nd	0.93
Cu	4.2 ± 1.7	1.0 ± 0.04	0.7	0.57	0.84
Zn	44.9 ± 10	44.9 ± 7.8	46	39.56	38.9
Sr	22.4 ± 3.0	13.6 ± 2.1	Nd	4	5.4
Pb	Nd	2.7 ± 2.1	0.019	Nd	Nd

Nd = No detectado.
n: Número de muestras analizadas.
1. Estándar de leche desgrasada en polvo, NIST 1549.
2. Estándar de leche en polvo, AIEA 153.
3. Estándar de leche en polvo, AIEA 11.

Además de los elementos mostrados en la tabla anterior, en este caso se detectaron en forma esporádica elementos como manganeso (Mn), selenio (Se), cadmio (Cd) y cromo (Cr).

La calcinación de la muestra (método B) reduce la masa por un factor cercano a 16, aumentando notablemente la sensibilidad y en consecuencia el número de elementos detectados y disminuyendo la dispersión de los datos. En cambio, la sola concentración por eliminación de agua (liofilización), aunque permite la detección de varios de los elementos de interés, tiene asociada una alta desviación estándar. Por lo que no es sorprendente que los resultados obtenidos por ambos métodos difieran notablemente. Comparando los valores obtenidos con el método B con los valores publicados para otras leches (referencias 1, 2 y 3) mostrados en la tabla, se observa concordancia en los órdenes de magnitud para el Fe, Cu, Zn y

Sr, pero los resultados obtenidos en este trabajo para Co y Pb son demasiado altos en relación a los reportados.

Métodos C y D (blancos delgados)

En estos métodos las muestras de leche en forma líquida (método C) y en forma sólida (D) fueron digeridas con HNO_3 y posteriormente preconcentradas con carbamatos (Ver metodología). En la tabla 5, se reportan los valores obtenidos para Fe, Cu, Ni, Co, Zn y Pb, que son los elementos detectados mediante PIXE y que con excepción del Zn presentaron un porcentaje de recuperación cercana al 100% con el método de preconcentración. También se muestran los valores para otras muestras de leche reportados en la literatura.

Tabla 5 Contenido de metales ($\mu\text{g/g}$ leche) en muestras líquidas y liofilizadas digeridas con HNO_3 y preconcentradas con carbamatos.

	Método C	Método D	Referencias		
	(n=3)	(n=3)	($\mu\text{g/g}$ leche)		
Cantidad de leche	3 mL (188 mg)	400 mg			
Vol. HNO_3	3 mL al 32.5%	5 mL al 65%	1	2	3
Fe	3.45 ± 0.5	3.2 ± 0.7	1.78	1.8	3.65
Co	Nd	Nd	0.004	0.003*	0.005
Ni	Nd	0.03 ± 0.02	Nd	0.01*	0.93
Cu	0.14 ± 0.02	1.67 ± 0.44	0.7	0.46	0.84
Zn	69.5 ± 10	40.3 ± 0.45	46	28	38.9
Pb	Nd	1.91 ± 0.23	0.019	0.11	Nd

Nd = No detectado.
n: Número de muestras analizadas.
1. Estándar de leche desgrasada en polvo, NIST 1549.
2. Estándar de leche entera en polvo, NIST 8435.
3. Estándar de leche en polvo, AIEA 11.

Digerir la leche líquida (método C) es un procedimiento atractivo porque reduce el tiempo de preparación de la muestra. Por otro lado, la digestión ácida de la leche liofilizada (método D) permite digerir una mayor cantidad de muestra utilizando al mismo tiempo el ácido nítrico (HNO_3) a una mayor concentración.

Lo anterior se refleja en los resultados obtenidos que se muestran en la tabla 5. Cuando la leche se liofiliza previamente a la digestión con HNO_3 , el número de elementos detectados es mayor que cuando la leche líquida se digiere directamente. Esto muestra que en efecto, la liofilización previa permite aumentar a más del doble la cantidad de muestra que se digiere; de tal forma que se tiene una muestra más concentrada, facilitando la determinación de un mayor número de elementos.

Es importante mencionar que a diferencia de los métodos A y B; en los métodos C y D las muestras además de ser digeridas con ácido, son preconcentradas selectivamente con carbamatos, separando los elementos traza de los elementos mayoritarios de la leche disminuyendo así, los límites de detección.

Los valores de Fe y Zn son similares en ambos métodos y del mismo orden que los valores reportados para otras muestras de leche. El níquel (Ni) se detectó con el método D y su valor es del mismo orden que el reportado en la referencia 2. Sin embargo, los valores obtenidos para Cu por ambos métodos discrepan.

Método E (liofilización-calcinación y preconcentración)

De los resultados presentados en las tablas 4 y 5 se observa que el número de elementos traza detectados aumenta cuando la muestra es calcinada (método B) y cuando la muestra además de liofilizada, es digerida y preconcentrada con carbamatos (método D). En vista de lo anterior, y considerando que el riesgo de contaminar la muestra es menor; se decidió combinar estos dos tratamientos. Por

lo que las muestras liofilizadas se calcinaron y posteriormente se preconcentraron. El espectro obtenido para este método se presenta en figura 8. Puede verse que la relación pico-fondo para los elementos y metales traza es significativamente mayor que en el espectro de las muestras calcinadas (Figura 7).

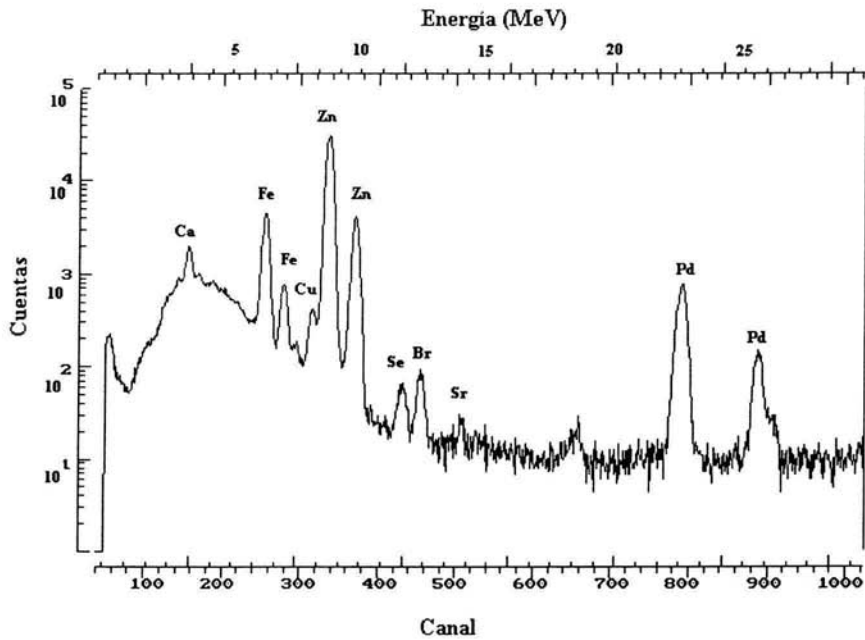


Figura 8. Espectro de PIXE para una muestra de leche entera liofilizada, calcinada y preconcentrada con carbamatos.

Las concentraciones para Fe, Co, Ni Cu, Zn, Se y Pb se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 Contenido de metales en ($\mu\text{g/g}$ leche) en muestras calcinadas y preconcentradas con carbamatos.

Elemento	Método E ($\mu\text{g/g}$ leche) (n=6)	Referencias ($\mu\text{g/g}$ leche)	
		1	2
Fe	3.3 ± 0.17	1.8	3.65
Co	Nd	0.003*	0.005
Ni	0.039 ± 0.004	0.01*	0.93
Cu	0.34 ± 0.02	0.46	0.84
Zn	23.5 ± 0.38	28	38.9
Se	0.05 ± 0.01	0.131	Nd
Pb	0.10 ± 0.02	0.11	Nd

Nd = No detectado.
n: Número de muestras analizadas.
1. Estándar de leche entera en polvo, NIST 8435.
2. Estándar de leche en polvo, AIEA 11

Los valores son muy semejantes a los reportados en la literatura para otras muestras de leche entera. Con este método se detectaron elementos tales como el Se, Ni, Pb presentes en la leche a concentraciones tan bajas como ng/L , que no se habían detectado con ningún método anterior.

4.3 Determinación del factor de concentración

Para determinar la eficacia de cada uno de los métodos de mineralización y preconcentración en la preparación de muestras para su análisis con PIXE, fue necesario determinar el factor de concentración que ofrece cada uno de ellos en este estudio. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7 y se interpretan como el número de veces que el método permite concentrar la muestra.

Tabla 7. Factor de concentración que ofrece cada uno de los métodos en la preparación de muestras.

	Deposición sobre filtro	Método B	Método C	Método D	Método E
Muestra	Sólida	Sólida	Líquida	Sólida	Sólida
Tratamiento	Digestión ácida	Calcinación	Digestión ácida y preconcentración	Digestión ácida y preconcentración	Calcinación y preconcentración
Reducción de masa	5.46	16	No se determinó	5.46	16
Factor de concentración total	-	-	44	161	690

Cuando la leche liofilizada se digiere con HNO_3 y se deja secar sobre un filtro de teflón (deposición sobre filtro) la reducción de masa es de 5 veces. En cambio, la calcinación de la muestra liofilizada (método B) permite reducir la masa inicial 16 veces. Evidentemente, la calcinación resulta un tratamiento mucho más eficaz en la reducción de masa que la digestión ácida, lo cual representa una ventaja en este caso. La calcinación es un procedimiento que permite eliminar toda la matriz orgánica, exponiendo una mayor cantidad de elementos traza; y además ofrece pocas probabilidades de contaminación en comparación con la digestión ácida, pues al parecer los vapores que se desprenden durante la digestión, entran en contacto con la bomba y al condensarse contaminan la muestra; de tal forma que al ser analizadas, presentan altas concentraciones de elementos como Cu y Zn. Por lo que no es recomendable trabajar bajo esas condiciones.

Comparando los valores del factor de concentración obtenidos con los métodos C y D, se observa que cuando se parte de la muestra liofilizada, se puede obtener un factor de concentración significativamente mayor (161), aunque esto

implique someter a la muestra a una liofilización previa al análisis. Lo anterior puede deberse a que una matriz sólida es mucho más fácil de descomponer que una líquida, pues la interacción que presenta el ácido en la matriz sólida es directa sobre los componentes de ésta; mientras que en una matriz líquida la primera interacción del ácido es con el agua presente en ésta, diluyendo la concentración del ácido empleado y dificultando así la destrucción "total" de la materia orgánica. Para probar todo lo anterior, valdría la pena variar parámetros como el tiempo o la temperatura de digestión y estudiar su efecto en el factor de concentración.

La liofilización previa permite concentrar de manera significativa los elementos presentes; pues se dispone de una mayor cantidad de muestra seca (400 mg), asegurando que la concentración final de dichos elementos en el filtro sea mayor al límite de detección que la técnica de PIXE por sí sola ofrece. Cuando la digestión se hace partiendo de la leche líquida el volumen de la bomba limita a 3 mL la cantidad de muestra, que corresponde en peso seco a 188 mg.

Los datos obtenidos para el método B, indican que cuando la muestra de leche se calcina, la reducción de masa que se obtiene es de 16, pero cuando la muestra, además de calcinada es preconcentrada (método E), ofrece una concentración de elementos en la muestra estudiada evidentemente mayor que cualquiera de los métodos estudiados, es decir, que al liofilizar, calcinar y preconcentrar una muestra de leche, los elementos de ésta se pueden concentrar hasta 690 veces, lo cual se espera se vea reflejado en los límites de detección.

Para corroborar lo reportado en la tabla 7; en la figura 9 se presentan los límites de detección obtenidos para algunos elementos con cada uno de los métodos estudiados para muestras de leche. Dicha figura ilustra lo obtenido para los métodos A, B, C, D y E.

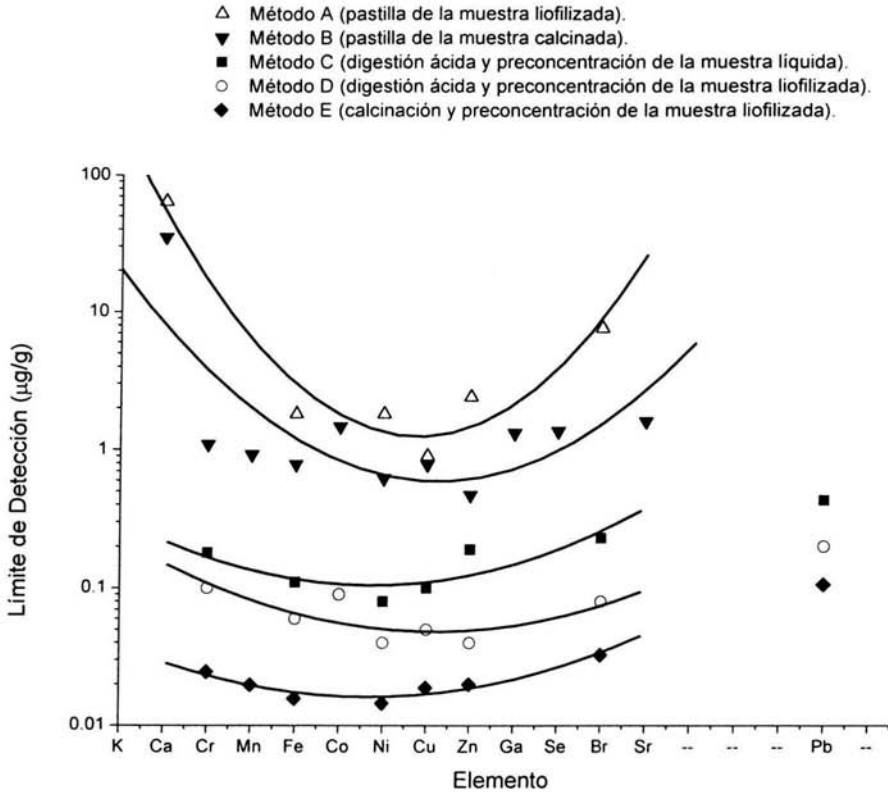


Figura 9. Límites de Detección ($\mu\text{g/g}$ de muestra seca) para muestras de leche utilizando diferentes métodos de preparación de muestras.

Para el análisis de la gráfica anterior, sólo se tomarán en cuenta dos elementos de cada método para los que se obtuvieron el mayor y el menor valor de LOD.

Cuando el factor de concentración en la muestra es 1, es decir, cuando la muestra de leche líquida es liofilizada y analizada como pastilla (método A), sin más tratamiento que la liofilización, se obtienen valores de LOD entre 1.8 y 7.6

$\mu\text{g/g}$, para elementos como el Fe y Br, respectivamente. Sin embargo, cuando la misma muestra liofilizada se somete a una digestión con ácido (método D), se logra disminuir significativamente el LOD, pues ahora, los valores para los mismos elementos oscilan entre 0.06 y 0.08 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. La liofilización (método A) sólo extrae el agua de la muestra, pero deja intactos los macro componentes restantes (carbohidratos, proteínas y lípidos). Cuando la muestra se digiere con ácido (método D) la materia orgánica es eliminada permitiendo concentrar los elementos de estudio, y obteniendo mejores límites de detección en comparación con el método A.

Por otro lado, cuando la muestra se calcina y se analiza como pastilla (método B), se obtiene una reducción significativa en los LOD. Para el caso del Fe, se obtiene un valor de 0.78 $\mu\text{g/g}$ para el LOD. En este caso, sin embargo, no es posible identificar el Br, y el Se ya que se pueden perder durante la calcinación de la muestra o bien el LOD es alto para detectarlos. Este método permite la detección de algunos elementos presentes en la muestra en cantidades mucho más pequeñas que la sola liofilización de la muestra (método A), pero a costa de la pérdida de algunos de ellos. La digestión ácida de la muestra liofilizada (método D) resulta más efectiva en la disminución del LOD en comparación con los métodos A y B.

Cuando la muestra líquida es digerida con ácido (método C) los valores de LOD para los mismos elementos Fe y Br disminuyen (0.11 y 0.23 $\mu\text{g/g}$, respectivamente) en comparación con los valores obtenidos para los métodos A y B. Aunque se ha demostrado que la digestión ácida es uno de los tratamientos más efectivos para destruir la materia orgánica; en este caso es necesario eliminar el agua de la muestra para obtener mejores límites de detección con el mismo tratamiento químico (método D).

Por último, se observa que cuando la muestra es calcinada y además preconcentrada con carbamatos (método E); se obtienen valores de LOD mucho

más pequeños que los obtenidos con los métodos anteriores. Para el caso del Fe se obtienen valores de 0.01 $\mu\text{g/g}$; mientras que para el Br se obtiene un valor de 0.03 $\mu\text{g/g}$.

Este método además de ofrecer los mejores valores de LOD, evita los riesgos de contaminación en comparación con la digestión ácida.

Como se ha podido observar en este estudio; la descomposición de la materia orgánica combinada con la preconcentración, es un procedimiento adecuado para la detección de elementos traza y metales pesados mediante PIXE, pues se logra eliminar los llamados macro componentes (proteínas, grasas y carbohidratos, principalmente) facilitando la detección de los elementos de interés. Por otra parte, la preconcentración con carbamatos elimina elementos presentes en altas concentraciones como Na, Ca, K y P permitiendo la precipitación selectiva de metales como, Cu, Fe, Zn, Pb, Ni, Ga, Se, Co, entre otros.

4.4 Repetibilidad, intervalo de confianza y porcentaje de recuperación

De acuerdo a lo obtenido, se adoptó el método de calcinación y preconcentración (método E) y se probó en la cuantificación de elementos traza aplicándolo al estándar internacional de leche entera NIST- 8435.

Para esto se determinaron los siguientes parámetros estadísticos:

Repetibilidad ó coeficiente de variación (C.V.): Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.

Intervalo de confianza (I.C): Intervalo que con un cierto nivel de confianza, contiene al parámetro que se está estimando.

Porcentaje de recuperación (recobro): Cociente porcentual de la cantidad recuperada de cada elemento con respecto a la cantidad que tiene el estándar .

Las fórmulas empleadas en los cálculos se describen a continuación:

Media aritmética

$$y = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar

$$s = \frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}$$

Coefficiente de variación

$$CV = \frac{s}{y} \times 100$$

Intervalo de confianza para la media poblacional

$$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{s}{n}$$

$$t_{0.975, n-1} = 2.571$$

$$n = 6$$

Los valores obtenidos al tratar seis muestras de leche idénticas con el método E, se muestran en la tabla 8 para elementos tales como Fe, Cu, Zn, Pb, Se y Br. Los cálculos fueron realizados con las fórmulas anteriores siguiendo los pasos recomendados en la Guía de Validación de Métodos Analíticos [34].

Tabla 8 Valores del porcentaje de recuperación, coeficiente de variación e intervalo de confianza, para el estándar de leche entera NIST- 8435.

Elemento	% de recuperación	Repetibilidad (C.V. %)	(I.C)
Fe	98.0	11.5	83.5–112.6
Cu	92.5	10	80–102.6
Zn	83.0	4.1	78.6-86.7
Pb	95.6	9.8	82-108
Se	48.0	5.7	44.4-51.5
Br	0.35	20	0.26-0.43

En general se observa que elementos como el Fe, Cu, Zn y Pb, presentan un porcentaje de recuperación aceptable utilizando el método E (lío-filización, calcinación y preconcentración con carbamatos), lo cual coincide con los valores de porcentaje de recuperación que se reportaron para dichos elementos cuando se preconcentra con carbamatos (Figura 6), excepto para el Zn que se recupera mejor (83%) cuando la muestra es calcinada previamente. Es importante aclarar que no sucede lo mismo con elementos tales como el Se y el Br, pues aunque éste último no se encontraba en la solución patrón de 24 elementos; y por lo tanto se desconoce su comportamiento al preconcentrar con carbamatos, se sabe que ambos elementos, se pierden durante la calcinación de la muestra [35]; por lo que, no es posible recuperarlos ni siquiera al 50%.

El valor de C.V. para elementos como Fe, Cu y Pb se acercó al 10%, mientras que para elementos como el Zn y Se es alrededor de 5%. En el caso del Br el valor de C.V fue de 20%, lo cual se explica por la pérdida casi total y evidentemente inconsistente de dicho elemento. Tomando en cuenta los valores de C.V para los elementos detectados; de manera general, se puede considerar que la técnica de

PIXE ofrece una mejor repetibilidad cuando las muestras se preparan utilizando el método E

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos al analizar el estándar y el error asociado entre las réplicas. También se muestran los valores certificados, así como el porcentaje de recuperación.

Tabla 9. Concentraciones (en $\mu\text{g/g}$) obtenidas mediante PIXE de los elementos traza en leche entera NIST- 8435.

Elemento	Estándar analizado ^a (n=6)	Valores reportados ^a	% de Recuperación
Mn	0,091 ± 0.0135	0,17 ± 0.005	52.94
Fe	1,907 ± 0.2708	1,8 ± 1.1	105.5
Co	Nd	0.003*	-----
Ni	0,027 ± 0.004	0.01*	270 sobre estimado
Cu	0,425 ± 0.0405	0,46 ± 0.08	91.3
Zn	23,263 ± 0.9729	28 ± 3.1	82.85
Se	0,063 ± 0.0102	0,131 ± 0.014	46.15 (se pierde)
Br	0,072 ± 0.0159	20 ± 10	0.35 (se pierde)
Cd	0,085 ± 0.1668	0,0002*	sobre estimado
Pb	0,106 ± 0.0237	0,11 ± 0.05	90.9

Nd: No detectado.
n: Número de muestras analizadas.
^a Estándar de leche entera en polvo, NIST 8435.
* Valores no certificados.

Comparando los resultados experimentales obtenidos al analizar el estándar mediante PIXE con los que se reportan para éste, se obtienen porcentajes de recuperación del 90% para elementos como el Pb y Cu; del 82% para el Zn, del 105% para el Fe y del 50% para el Mn. Es de hacer notar que el porcentaje de recuperación para el Mn, Zn y Pb en estos experimentos de calcinación y preconcentración con carbamatos, es mayor que en el experimento realizado con el estándar de 24 elementos (Figura 6). Cabe mencionar que la concentración total de cada elemento en la muestra original de la Figura 6 era de solo 5 µg mientras que en el caso del estándar de leche, la concentración antes de la preconcentración era mucho mayor, lo que facilita la acción quelante de los carbamatos. El Co no se detectó, pues la concentración en la que dicho elemento se reporta en la estándar es muy pequeña.

Aunque el porcentaje de recuperación de un metal, dependa directamente de la concentración que haya de éste en la muestra, es importante considerar el tipo de tratamiento que se le da a ésta para evitar la pérdida de algunos elementos de interés. Hay elementos como el Cd, Se y Br que se pierden parcialmente durante la calcinación de la muestra; por eso no es posible recuperarlos al 100% [35].

En este caso en particular, el Cd se reporta como sobre estimado y no como perdido, debido a que en la preparación de la muestra se utiliza Pd como patrón interno. Lo anterior se debe a que tanto el Cd como el Pd tienen energías de emisión de rayos X muy cercanas entre sí. De tal forma, que al analizar el espectro obtenido de PIXE para cuantificar el área bajo los picos; buena parte del área correspondiente al pico del Pd, se cuantifica como Cd. Esto puede corregirse utilizando otro elemento como patrón interno que tenga una energía más grande o más pequeña que la de Cd, en este caso.

4.5 Análisis de elementos traza en muestras de leche de vacas de establo y de pastoreo colectada en el Valle del Mezquital.

Para completar nuestro estudio, la metodología adoptada (método E) fue aplicada a un estudio de campo en el que se determinó la presencia de metales traza mediante PIXE, en leche de vacas de establo y de pastoreo recolectada en Mixquiahuala, Hgo., en el Valle del Mezquital.

Esta es una región donde se usa el agua residual de la ciudad de México desde hace más de 100 años para fines agrícolas. Los suelos de este valle presentan altos contenidos de metales pesados, siendo el Cu uno de los metales mas concentrados el cual se encuentra a niveles considerados como potencialmente tóxicos [36].

Las vacas de pastoreo se alimentan de alfalfa y zacate cultivado en la zona y llegan a beber agua de los canales de riego que transportan el agua residual. En cambio las vacas de establo son alimentadas con fórmulas comerciales que además de zacate y alfalfa contienen cereales y melazas. El objetivo de este estudio consistió en comparar el contenido de metales pesados en leche de establo y de pastoreo y determinar si la leche de vacas de pastoreo contiene metales pesados a concentraciones tales que su consumo constituye un riesgo a la salud.

Los resultados obtenidos para Fe, Ni, Cu, Zn, Se y Pb se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Contenido de metales en ($\mu\text{g/g}$ leche). Muestras liofilizadas, calcinadas y preconcentradas con carbamatos.

Elemento	Método E		Referencias ($\mu\text{g/g}$ leche)		
	Establo (n=6)	Pastoreo (n=5)	1	2	3
Fe	2.82 \pm 0.50	2.33 \pm 0.67	1.8	2.53	3.65
Ni	0.06 \pm 0.03	0.040 \pm 0.003	0.01*	Nd	0.93
Cu	0.33 \pm 0.06	0.21 \pm 0.03	0.46	0.57	0.84
Zn	21.90 \pm 2.04	26.47 \pm 2.80	28	39.56	38.90
Se	0.050 \pm .003	0.051 \pm 0.005	0.131		
Pb	0.084 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	0.11	Nd	Nd

Nd = No detectado.
n: Número de muestras analizadas.
1. Estándar de leche entera en polvo, NIST 8435.
2. Estándar de leche en polvo, AIEA 153.
3. Estándar de leche en polvo, AIEA 11

Para comparar los niveles de los elementos en ambos tipos de leche se realizó un análisis estadístico usando la prueba de Mann-Whitney (Ver metodología). Esta prueba compara los rangos de variación de cada elemento en ambos grupos. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11 Prueba de Mann Whitney para comparar los rangos de variación de los elementos presentes en la leche de vacas de establo con la de vacas de pastoreo.

Elemento	Promedio Establo	Suma de Rangos Establo	Promedio pastoreo	Suma de Rangos Pastoreo	p
Fe	2.82 ± 0.50	42	2.33 ± 0.67	24	0.2733
Ni	0.06 ± 0.03	22	0.040 ± 0.003	33	0.2477
Cu	0.33 ± 0.06	50	0.21 ± 0.03	16	0.0105
Zn	21.90 ± 2.04	18	26.47 ± 2.80	37	0.0465
Se	0.050 ± .003	35	0.051 ± 0.005	30	0.9265
Pb	0.084 ± 0.03	37	0.05 ± 0.01	17	0.0361

* La diferencia entre los promedios es significativa cuando $p < 0.05$

Los valores mostrados en la tabla anterior indican que la concentración de Cu es significativamente mayor ($p = 0.010$) en la leche de vacas de establo que en la leche de vacas pastoreo. El Pb también es significativamente mayor en la leche de establo ($p = 0.036$) pero los rangos de variación son más altos en este grupo (0.05 a 0.11 $\mu\text{g/g}$) lo que hace que el factor de diferencia se encuentre en la línea de la diferencia significativa con 95% de confianza. El Zn está presente a una concentración significativamente menor ($p < 0.5$) en la leche de vacas de establo que en la de vacas de pastoreo, pero al igual que el Pb, la diferencia se encuentra en la línea de la diferencia significativa.

Un nivel de Cu mayor en la leche de vacas de establo es sorprendente si tomamos en cuenta que los suelos del Mezquital presentan altos niveles de Cu [36]. Sin embargo, es importante mencionar que las fórmulas con las que se

alimentan a las vacas de establo, además de cereales, melaza y otros componentes, pueden contener gallinaza o pollinaza (excremento de gallina o de pollo) que contiene coxidiostáticos, antibióticos ricos en Cu [37]. Ahora bien, los niveles de Cu encontrados en la leche de ambos grupos es menor que los niveles reportados en otras leches, como se muestra en la tabla 10, lo que refleja que aunque el alimento o los suelos contengan altas concentraciones de Cu, éste no se concentra en la leche.

Las vacas de pastoreo de la zona de Mixquiahuala están aparentemente expuestas a una mayor contaminación ya que se alimentan de todo lo que encuentran a su paso durante el pastoreo. Estudios anteriores han mostrado la presencia de altas concentraciones de plomo en alfalfa cosechada en la zona [36]. Por lo tanto también se esperaba encontrar una mayor cantidad de Pb en esta leche Sin embargo, como se muestra en la tabla 10 el nivel de Pb en ambos tipos de leche está por debajo de los límites máximos permisibles de dicho metal establecida en la norma oficial mexicana para leche de vaca pasteurizada (0.11 mg/Kg, NOM-091-SSA1-1994).

Los resultados muestran que independientemente de los niveles ingeridos de Cu y Pb por ejemplo, la excreción de estos elementos a través de la leche no es un mecanismo importante. Lo anterior, probablemente se deba a que en los animales de abasto como las vacas, el plomo se acumula especialmente en hígado y riñones debido a la capacidad de dichos órganos para acumular este tipo de elemento en el animal vivo.

V. CONCLUSIONES

- ✓ En este trabajo se estudiaron varios métodos de preparación de muestras que en combinación con la técnica de PIXE permitieran la detección y cuantificación de elementos traza en muestras de leche entera de vaca.
- ✓ El tratamiento de las muestras de leche que incluye la liofilización, calcinación y preconcentración con carbamatos combinado con el análisis mediante PIXE, cumple con las expectativas del estudio ofreciendo la posibilidad de detectar metales como el Fe, Cu, Ni, Zn y Pb con un buen límite de detección en muestras de leche cruda en su forma líquida. Otros elementos como el Se y Br pueden ser detectados por la técnica de PIXE, sin embargo son elementos que pueden perderse parcialmente durante la calcinación, por lo que es importante tener en cuenta su nivel de recuperación. El potencial de la metodología para la detección de Cd no pudo ser explorado, ya que el estándar interno que se usó durante la preconcentración interfiere con la detección de este elemento.
- ✓ La concentración a la que se encuentren los elementos traza y metales pesados en una muestra, determinarán la cantidad que se pueda recuperar de éstos. Sin embargo, es importante considerar qué elementos se quieren determinar para elegir el tipo de tratamiento que se le dará a la muestra, y evitar aquellos que provoquen la posible pérdida de los elementos de interés.

- ✓ El procedimiento desarrollado (método E) eliminó fuentes de contaminación (como lo es el uso de ácidos fuertes y las bombas de digestión) y los resultados obtenidos con el estándar de leche fueron satisfactorios para la mayoría de los elementos estudiados.

- ✓ El estudio estadístico realizado con el estándar de leche entera NIST 8435 permitió demostrar que la metodología de preparación de las muestras de leche combinada con el análisis mediante PIXE ofrecen buena repetibilidad, exactitud y precisión.

- ✓ La viabilidad de PIXE en la determinación y cuantificación de los elementos traza y metales pesados en leche, se ha podido demostrar para algunos elementos que son importantes tanto por su interés toxicológico como nutricional (Fe, Cu, Zn, Se, Pb, etc).

- ✓ Los resultados obtenidos en el estudio de campo muestran que aunque los suelos del valle del Mezquital contienen metales pesados a concentraciones elevadas, estos no se transfieren a la leche en concentraciones tales que presenten un riesgo para la salud humana, ya que los niveles detectados son mucho menores que los límites establecidos por la norma oficial (NOM-091-SSA1-1994) y comparables con los niveles reportados en la literatura para otras muestras de leche.

- ✓ Aunque el uso de PIXE en este tipo de estudios requiere el acceso a un acelerador de partículas, las ventajas que esta técnica ofrece para el análisis elementos traza en alimentos (análisis multielemental, rápido, no destructivo y de alta sensibilidad para la mayoría de los elementos de la tabla periódica), justifica la continuación en el desarrollo de este tipo de técnicas aplicadas al estudio de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jiménez, B., A. Chávez, J. Barrios, J. Eugenio. (1999). "Recarga del Acuífero del Valle de Mezquital por el Re uso Masivo de Aguas Residuales Municipales en Riego Agrícola 9th Bienal Symposium on the artificial recharge of groundwater" Tempe, Arizona, EUA.
2. Cifuentes, E. (2000). "Predictors of blood lead levels in agricultural villages practicing wastewater irrigation, Central Mexico". *International Journal Occupational Environmental Health* (6) 3:177-182.
3. World Health Organization WHO. (1996). "Trace elements in Human Nutrition and Health" Geneva. Págs. 1, 72-79, 105, 108-109, 124-128, 131, 163-166, 171-173, 195, 203, 206-209, 217.
4. Méndez, J. (2001). "Metales pesados en alimentación animal". XVII Curso de especialización FEDNA.
5. Solís, C., M. Lagunas, B. Perley, C. Piña. (2002). "Development of a Non-thermal Accelerated Pulsed UV Photolysis Assisted Method for Digestion of Fresh and Dried Samples" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 189 Nos 1-4: 77-80.
6. Johansson, S.A.E, J.L. Campbell, K.G. Malmqvist eds. (1995). "Particle-Induced X-ray Emission Spectrometry (PIXE)". John Wiley & Sons. EUA Págs. 1, 35-36, 89-92.

7. Alais, C. (1994). "Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera". Ed. CECOSA. Novena Reimpresión. México Págs 16-17,35-36, 53-54, 345-346.
8. Spreer, E. (1994). "Lactología Industrial". Ed. Acribia. 2da. Edición Págs. 7-9,17-18-19.
9. Porter, J.W.G. (1981). "Leche y productos lácteos". Ed. Acribia. Zaragoza, España Págs. 16-19, 24,26.
10. Walstra, P. (1987). "Química y Física Lactológica". Ed. Acribia. Zaragoza, España. Págs. 3, 37-38, 53, 81, 119.
11. Contis, E.T. (2000) "Use of nuclear techniques for the measurement of trace elements in food". Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. Vol. 243, No. 1 Págs. 53-58.
12. Pai, I. (1997). "The handbook of trace elements". Ed. St. Lucie. Boca del Ratón, Florida. Pág. 1
13. <http://www.lenntech.com/espanol/metales%20pesados.htm>
14. Mata, L., L Sánchez, M. Calvo. (1996). "Mercurio en leche y otros alimentos". Departamento de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos. Universidad de Zaragoza.
15. Martínez, J.M. (1979). "Contaminación de Alimentos por metales pesados". Tesis, Facultad de Química. UNAM.
16. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1988). "The nature and extent of lead poisoning in children in the United States: a report to Congress". www.texascenter.org/publications/torreon.pdf

17. Reuters. (1999). "Mexican silver plant accused of lead poisoning". www.texascenter.org/publications/torreon.pdf
18. Mata, L., L. Sánchez, M. Calvo, Miguel (1996). "Plomo en leche y otros alimentos". Departamento de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos. Universidad de Zaragoza.
19. Rosen, J.F. (1992) "Effects of Low levels of lead exposure". Science 256 Pág. 294.
20. Abollino, O., M. Aceto. (1998). "Speciation of copper and manganese in milk by solid- phase extraction/inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry". Analytica Chimica Acta 375 299-306.
21. FAO/OMS (2000) Informe de la 32ª reunión del comité Codex sobre aditivos y contaminantes de los alimentos (www.codexalimentarius.net).
22. AAFCO (1996) Association of American Feed Control Officials. Official Publication. Pág. 230. American Academy of Pediatrics (1996) Pediatrics 97 (3): 413-416.
23. Norma Oficial Mexicana NOM-091-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
24. Johansson, S. A. E., J. L. Campbell. (1988). "A Novel Technique for Elemental Analysis". John Wiley & Sons, Chichester Págs 1-2, 49, 58, 97
25. Llabador, Y., P. Moretto eds. (1998). "Applications of Nuclear Microprobes in the life Sciences. An efficient Analytical Technique for research in Biology and Medicine". World Scientific. Singapore Págs. 6-7, 12-13.

26. Gómez, J., T. Ramírez. (1988). "X ray Spectroscopy in Atomic and solid state Physics". Series B, Physics Vol. 187. London.
27. Romero, E. (2001). "Aplicación de técnicas de origen nuclear basados en aceleradores de partículas a la determinación del contenido de elementos en puré de jitomate" Tesis, Facultad de Química, UNAM.
28. Koltay, E. (1996). "Particle Induced X-ray Emission: Basic principles, Instrumentation and Interdisciplinary applications". Institute of Nuclear Research (ATOMKI) of the Hungarian Academy of Sciences. Págs. 301-302.
29. J.A. Maxwell, W.J. Teesdale, J.L. Campbell. (1995). "The Guelph Pixe software package II". Nuc. Instr. and Meth. B 95. Págs. 407-421.
30. J.A. Maxwell. (1990). "Thick/Thin target interactive PIXE routine user's guide". Physics Department. University of Guelph. Guelph, Ontario, Canada.
31. V. Valkovic. (1975). "Trace element analysis". Taylor & Francis Ltd. Gran Bretaña Págs. 108, 109, 111, 115.
32. Miranda, J. (2000). "Técnicas analíticas de origen nuclear: Un curso Introductorio". 2da. Edición. Instituto de Física, UNAM.
33. Linder, H.R., H. D. Seltner. (1978). "Use of Dibenzylthiocarbamate as coprecipitant in the routine determination of 12 heavy metals in Pharmaceuticals by X-ray Fluorescence Spectroscopy". At Spectroscopy. Analytical Chemistry, Vol. 50, No. 7.
34. Guía de Validación de métodos analíticos. (2002). Ed. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México, A.C.

35. Maenhaut, W; L. de Reu, J. Vandenhaute. (1984). "Comparison of different sample and target preparation procedures for PIXE analysis of biological materials". *Nuc. Instr. and Meth. B3*. Págs. 134-140.
36. Mireles, A., C. Solís, E. Andrade, M. Lagunas Solar, C. Piña, CR. G. Flocchini. (2004). "Heavy metal accumulation in plants and soil irrigated with wastewater from Mexico city". *Nuc. Instr. and Meth B*. 219-220. Págs. 187-190.
37. Vermeulen, A., D. Schaa, C. Schetters. (2001). "Control of coccidiosis in chickens by vaccination". *Veterinary Parasitology* 100 (1-2) Págs.13-20.