



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA DE MATERIAL
PARTICULADO EN BIOMONITORES DE
LA CALIDAD DEL AIRE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA QUÍMICA METALÚRGICA

P R E S E N T A

ALBINA GUTIÉRREZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F. ,2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 **Rosa Magda Unda Rodríguez**
Vocal **Guillermo Fausto Salas Banuet**
Secretario **Ciro Eliseo Márquez Herrera**
1er Suplente **Juan Manuel De la Rosa Canales**
2º Suplente **Luis Darío Escobar Mejía**

Sitio donde se desarrollo el tema: **Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares**

Nombre asesor del tema:

M. en C. [•]Ciro Eliseo Márquez Herrera

Nombre del supervisor técnico:

M. en C. Thelma Falcón Barcenás

Nombre del Sustentante:

Albina Gutiérrez Martínez



AGRADECIMIENTOS

A mi esposo Ignacio con amor y admiración

A mis Padres por todo su apoyo y paciencia

A mis hijos Víctor Daniel, Carlos Andrés y Mariana Isabel con todo mi amor

A mis hermanos, suegro, cuñados y sobrinos con mucho cariño

A mi amigo Ciro por toda su ayuda y confianza

A mis amigas Thelma y Lourdes por su amistad y apoyo

A todos mis amigos y compañeros de trabajo

Quiero agradecer a la Profesora Rosa Magda Unda y al Profesor Guillermo Salas por la amabilidad con la que han empleado parte de su valioso tiempo y sus conocimientos en la revisión de este trabajo.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Capítulo 1. Los Contaminantes Atmosféricos	5
1.1 Contaminantes Primarios	5
1.2 Contaminantes secundarios	8
1.2.1 Contaminación fotoquímica	8
1.2.2 Acidificación del medio ambiente	10
1.2.3 Disminución del espesor de la capa de ozono	11
1.3 Efectos producidos por la contaminación atmosférica	12
Capítulo 2. Biomonitores	17
Capítulo 3. Técnicas de Caracterización	23
3.1 Microscopía Electrónica	23
3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión	29
3.3 Microscopía Electrónica de Barrido	33
3.4 Preparación de muestras	36
Capítulo 4. Procedimiento Experimental	41
4.1 Método	41
4.2 Equipos	42
Capítulo 5. Análisis y Discusión de Resultados	44
5.1 Microscopía Electrónica de Barrido	44
5.2 Distribución de tamaños	54
5.3 Microscopía Electrónica de Transmisión	56
Conclusiones	62
Bibliografía	64
Índice de tablas y figuras	67

Resumen

Dentro de las técnicas de caracterización la microscopía electrónica ha venido a ganarse un lugar preponderante tanto para materiales, biología, ciencias ambientales, e incluso como apoyo en medicina forense y arqueología entre muchos otros campos de la investigación, llegando a ser una herramienta importante por las posibilidades de obtener una caracterización tanto química como morfológica. El objetivo del presente trabajo es proveer una metodología para la caracterización química elemental y morfológica de partículas individuales y la distribución de tamaños para partículas suspendidas provenientes de la contaminación atmosférica en la especie de líquen *Xanthoparmelia subsidigera*, así como la incorporación de las mismas en su estructura celular, aplicando técnicas de microscopía electrónica. La caracterización superficial y corte transversal se realizó por medio de Microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (MEB-ambiental) y el análisis elemental a través de una sonda acoplada al mismo, de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS), encontrándose gran variedad de partículas con contenidos metálicos (Cu, Fe, Ti, Zn, Mn, Al, en algunos casos Ce) de diferentes composiciones químicas y variadas morfologías, para la identificación de partículas en la estructura celular se utilizó microscopía electrónica de transmisión (MET) donde se encontraron cúmulos de partículas de tamaños nanométricos tanto en las paredes celulares como en el interior de la célula, compuestos principalmente de Fe, Ti, Cu, Zr, Mg y Al con composiciones químicas diversas así como Ca, Si, K, S y P, observándose coincidencia con los elementos encontrados en la superficie de la especie, lo que sugiere que existe una incorporación de éstos en la estructura celular de la muestra. La distribución de tamaños para partículas menores a 10 μm se llevó a cabo tomando una serie de micrografías de MEB a 2000X en una muestra de 2000 partículas.

Introducción

Dentro de las técnicas de caracterización no existe alguna técnica que proporcione toda la información necesaria sobre un material, por lo que se hace necesario utilizar diversas. La microscopía electrónica ha ganado un lugar preponderante entre las técnicas de caracterización, tanto para materiales, biología, ciencias ambientales, e incluso como apoyo en medicina forense y arqueología entre muchos otros campos de la investigación, llegando a ser una herramienta importante por las posibilidades de obtener una caracterización química y morfológica. La microscopía electrónica es una técnica que nos permite obtener información “local” del espécimen estudiado, en contraposición a la mayoría de las técnicas que aportan una información media de toda la muestra utilizada (6). Existen varios tipos de microscopía electrónica: microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido, microscopía de fuerza atómica, y otras que actualmente son menos usadas (20).

La microscopía electrónica de transmisión proporciona imágenes por medio de electrones que atraviesan la muestra como lo hace la luz en el microscopio óptico. La microscopía electrónica de barrido crea una imagen ampliada de un objeto explorando la superficie de la imagen punto por punto. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen. Este tipo de microscopio es muy útil porque produce imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto. La microscopía de fuerza atómica apenas comienza a producir importantes resultados sobre la forma y disposición de macromoléculas y conjuntos macromoleculares en muestras biológicas sumergidas en líquidos naturales o muy similares a ellos (20).

Uno de los problemas más graves que afronta la sociedad moderna es la contaminación del medio ambiente. La explotación intensiva de los recursos naturales y el desarrollo de grandes concentraciones industriales y urbanas en determinadas zonas, son fenómenos que por incontrolados, han dado lugar a la saturación de la capacidad asimiladora y regeneradora de la naturaleza lo que

puede llegar a perturbaciones irreversibles del equilibrio ecológico, cuyas consecuencias a largo plazo no son fácilmente previsibles. Se consideran contaminantes a aquellas sustancias que pueden dar lugar a riesgo o daño, para las personas o bienes en determinadas circunstancias (3). Los contaminantes presentes en la atmósfera proceden de dos tipos de fuentes emisoras bien definidas: las naturales y las antropogénicas. En el primer caso la presencia de contaminantes se debe a causas naturales, mientras que en el segundo tiene su origen en actividades humanas. Las fuentes de contaminación atmosférica más importantes son: industrias, centrales térmicas, sistemas de calefacción y especialmente el tráfico vehicular. Entre los contaminantes atmosféricos más importantes se encuentran el dióxido de azufre (SO_2), óxidos de nitrógeno (NO_x), ozono, metales pesados y compuestos químicos orgánicos, como el benceno y los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Concentraciones elevadas de estos contaminantes ponen en peligro la vida de plantas y animales en general. El estudio de las partículas suspendidas es importante, tal es el caso de las partículas menores a $10\ \mu\text{m}$, ya que por su tamaño pueden ser inhaladas y provocar efectos adversos en la salud de las poblaciones, principalmente aquellas que residen en atmósferas urbanas contaminadas. La composición química de las partículas varía según las características de la población, actividad humana e industrial, geografía, topografía, etc., lo que hace arriesgado generalizar una composición típica, ya que podría tener como consecuencia una interpretación equivocada sobre los riesgos potenciales en la salud de la población (4). La medición de contaminantes por métodos físico-químicos es importante, pero no permiten obtener conclusiones sobre los efectos de las concentraciones de contaminantes sobre los seres vivos. Los líquenes son potencialmente ideales monitores biológicos de la contaminación del aire ya que tienden a acumular elementos tóxicos del medio, presentando rápidamente cambios bioquímicos y fisiológicos. El uso de líquenes como biomonitores, son una herramienta útil, puesto que se basan en técnicas simples y relativamente económicas (21). El objetivo de este trabajo es proveer una metodología para la caracterización química elemental y morfológica y la distribución de tamaños para partículas

individuales provenientes de la contaminación atmosférica en la especie de líquen *Xanthoparmelia subsidigera*, así como la identificación de la incorporación de las mismas en su estructura celular, aplicando técnicas de microscopía electrónica. La caracterización superficial y corte transversal de la muestra se realizó por medio de microscopía electrónica de barrido de bajo vacío, y el análisis elemental por espectroscopía de dispersión de energía de rayos X encontrándose gran variedad de partículas con contenidos metálicos (Cu, Fe, Ti, Zn, Mn, Al, en algunos casos Ce) de diferentes composiciones químicas y variadas morfologías, tanto en la corteza superficial como en el corte transversal de la muestra. El análisis en la estructura celular se realizó por microscopía electrónica de transmisión y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X, localizándose gran cantidad de material particulado tanto en las paredes celulares como en el interior de la célula, compuestos principalmente de Fe, Ti, Cu, Zr, Mg y Al con composiciones químicas diversas así como Ca, Si, K, S y P, observándose coincidencia con los elementos encontrados en la superficie de la especie, lo que sugiere que existe una incorporación de éstos en la estructura celular de la muestra. La distribución de tamaños en PM_{10} se llevó a cabo en una muestra de 2000 partículas, tomando una serie de micrografías de MEB a 2000X.

Capítulo 1

Contaminantes Atmosféricos

Se entiende por contaminación atmosférica a la presencia en el aire de sustancias y formas de energía que alteran la calidad del mismo, de modo que implique riesgos, daño o molestia grave para las personas y bienes de cualquier naturaleza. Todas las actividades humanas, el metabolismo de la materia humana y los fenómenos naturales que se producen en la superficie o en el interior de la tierra van acompañados de emisiones de gases, vapores, polvos y aerosoles. Estos, al difundirse a la atmósfera, se integran en los distintos ciclos biogeoquímicos que se desarrollan en la Tierra (3).



*Figura 1.1. Vehículos automotores.
Contaminantes de tipo antropogénico*

Los contaminantes presentes en la atmósfera proceden de dos tipos de fuentes emisoras bien diferenciadas: las naturales y las antropogénicas. En el primer caso la presencia de contaminantes se debe a causas naturales, mientras que en el segundo tiene su origen en las actividades humanas (Fig.1.1). Una primera clasificación de estas sustancias, atendiendo a cómo se forman, es la que distingue entre contaminantes primarios y contaminantes secundarios.

1.1. Contaminantes primarios

Son aquellas sustancias contaminantes que son vertidas directamente a la atmósfera, que provienen de muy diversas fuentes dando lugar a la llamada contaminación convencional (Fig. 1.2). Su naturaleza física y su composición química es muy variada, si bien podemos agruparlos atendiendo a su peculiaridad más característica tal como su



Figura 1.2. Principales fuentes primarias de contaminación ambiental

estado físico (caso de partículas y metales), o elemento químico común (caso de los contaminantes gaseosos). Las emisiones primarias originadas por los focos naturales provienen fundamentalmente de los volcanes (1), incendios forestales y descomposición de la materia orgánica en el suelo y en los océanos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Contaminantes Naturales del Aire	
Fuente	Contaminantes
Volcanes	Óxidos de azufre, partículas
Fuegos forestales	Monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno, partículas
Vendavales	Polvo
Plantas (vivas)	Hidrocarburos, polen
Plantas (en descomposición)	Metano, sulfuro de hidrógeno
Suelo	Virus, polvo
Mar	Partículas de sal

Por su parte, los principales focos antropogénicos de emisiones primarias los podemos clasificar de acuerdo a la tabla 1.2, en:

Tabla 1.2. Principales focos antropogénicos de emisiones primarias		
Focos fijos	Industriales	Procesos industriales
		Instalaciones fijas de combustión
	Domésticos	Instalaciones de calefacción
Focos móviles	Vehículos automóbiles	
	Aeronaves	
	Buques	
Focos compuestos	Aglomeraciones industriales	
	Áreas urbanas	

Si atendemos a la distribución espacial de la emisión de contaminantes, podemos clasificar los focos en: puntuales, tales como las chimeneas industriales aisladas; lineales, por ejemplo, las calles de una ciudad, las carreteras y autopistas, las aglomeraciones industriales y las áreas urbanas son los ejemplos más representativos.

En la tabla 1.3 se muestra la proporción entre las emisiones primarias naturales y antropogénicas para los distintos contaminantes.

Tabla 1.3. Focos de emisión		
Contaminante	Antropogénicos %	Naturales %
Aerosoles	11.3	88.7
SOx	42.9	57.1
CO	9.4	90.6
NO	11.3	88.7
HC	15.5	84.5

Las cifras anteriores muestran la gran importancia que, en cuanto a emisiones globales, tienen las fuentes naturales de emisión de contaminantes en relación con los antropogénicos, excepto en el caso de las emisiones de anhídrido sulfuroso en que casi se igualan.

Otra circunstancia a tener en cuenta es que los focos de emisión antropogénicos están concentrados, por lo general, en áreas urbanas e industriales. Este conjunto de circunstancias hacen que la contribución de las emisiones antropogénicas al problema de la contaminación atmosférica a escala regional sea predominante.

Los metales son elementos químicos que generalmente se hallan presentes en la atmósfera en muy bajas concentraciones.

Una de las consecuencias más graves de la presencia de metales tóxicos en el ambiente es que no son degradados, ni química ni biológicamente, por la naturaleza, lo que origina su persistencia en ella. Esta persistencia lleva a la

amplificación biológica de los metales en las cadenas tróficas. Como consecuencia de este proceso, las concentraciones de metales en los miembros superiores de la cadena pueden alcanzar valores muy superiores a los encontrados en la atmósfera.

Entre los metales tóxicos más importantes por sus efectos sobre la salud del ser humano están el mercurio (Hg) y el plomo (Pb). La cantidad de plomo en el aire ha experimentado un marcado aumento como consecuencia de las actividades humanas, siendo las concentraciones de plomo en las áreas urbanas de 5 a 50 veces superiores que en las áreas rurales.

1.2. Contaminantes Secundarios

Los contaminantes atmosféricos secundarios no se vierten directamente a la atmósfera desde los focos emisores, sino que se producen como consecuencia de las transformaciones y reacciones químicas y fotoquímicas que sufren los contaminantes primarios en el seno de la misma.

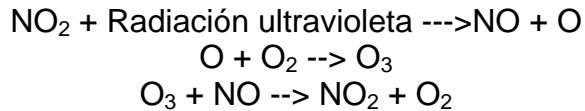
Las principales alteraciones atmosféricas producidas por los contaminantes secundarios son:

- contaminación fotoquímica;
- acidificación del medio;
- disminución del espesor de la capa de ozono.

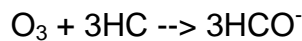
1.2.1. Contaminación fotoquímica

La contaminación fotoquímica se produce como consecuencia de la aparición en la atmósfera de oxidantes, originados al reaccionar entre sí los óxidos de nitrógeno, los hidrocarburos y el oxígeno en presencia de la radiación ultravioleta de los rayos del sol. El mecanismo de formación de los oxidantes fotoquímicos es complejo, realizándose por etapas a través de una serie de reacciones químicas (10). El proceso completo puede ser simplificado en las tres etapas siguientes:

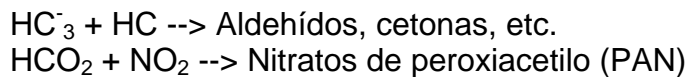
- Formación de oxidantes a través del ciclo fotolítico del NO_2



- Formación de radicales libres activos. La presencia en el aire de hidrocarburos hace que el ciclo fotolítico se desequilibre al reaccionar éstos con el oxígeno atómico y el ozono generado, produciendo radicales libres muy reactivos.



- Formación de productos finales. Los radicales libres formados reaccionan con otros radicales, con los contaminantes primarios y con los constituyentes normales del aire, dando lugar a los contaminantes fotoquímicos según las reacciones:



La mezcla resultante de todas estas sustancias da lugar a la denominada contaminación fotoquímica. Este tipo de contaminación se presenta cada vez con más frecuencia en las grandes ciudades de los países industrializados, siendo muy interesante el estudio de la variación durante el día de la concentración de los contaminantes que intervienen en el mecanismo de formación de los oxidantes fotoquímicos (16).

En las primeras horas de la mañana se produce una intensa emisión de hidrocarburos (HC) y óxido nítrico (NO) al comenzar la actividad humana en las grandes ciudades (encendido de las calefacciones y tráfico intenso). El óxido nítrico (NO) se oxida a óxido nítrico (NO₂) aumentando la concentración de este último en la atmósfera. Las concentraciones superiores de NO₂ unido a que la radiación solar se va haciendo más intensa, ponen en marcha el ciclo fotolítico del NO₂, generando oxígeno atómico que al transformarse en ozono conduce a un aumento de la concentración de este elemento y de radicales libres de hidrocarburos. Estos, al combinarse con cantidades apreciables de NO, producen una disminución de este compuesto en la atmósfera. Este descenso en la

concentración de NO impide que se complete el ciclo fotolítico aumentando rápidamente la concentración de ozono (O_3).

A medida que avanza la mañana la radiación solar favorece la formación de oxidantes fotoquímicos, aumentando su concentración en la atmósfera. Cuando disminuyen las concentraciones de los precursores (NO_x y HC) en la atmósfera, cesa la formación de oxidantes y sus concentraciones disminuyen al avanzar el día. De aquí que la contaminación fotoquímica se manifieste principalmente por la mañana en las ciudades.

1.2.2. Acidificación del medio ambiente (*lluvias ácidas*)

Entendemos por acidificación del medio ambiente a la pérdida de la capacidad neutralizante del suelo y del agua, como consecuencia del retorno a la superficie de la tierra, en forma de ácidos de los óxidos de azufre y nitrógeno descargados a la atmósfera.

La acidificación es un ejemplo claro de las interrelaciones entre los distintos factores ambientales, atmósfera, suelo, agua y organismos vivos. Así la contaminación atmosférica producida por los SO_x y NO_x afecta directa o indirectamente al agua, al suelo y a los ecosistemas. Se debe principalmente a las grandes cantidades de óxidos de azufre y de nitrógeno lanzados a la atmósfera, del total de las emisiones de SO_2 en el globo terrestre, gran parte son emitidas por las actividades humanas (antropogénicas) en las regiones industrializadas.

El proceso de acidificación se origina de la siguiente forma:

- El azufre se encuentra en un principio en estado elemental, fijado en los combustibles fósiles.
- El nitrógeno en forma elemental se encuentra en el aire y también en los combustibles.
- Durante el proceso de la combustión de los combustibles fósiles se liberan el azufre y el nitrógeno, emitiéndose, en su mayor parte por las chimeneas, a la atmósfera como dióxido de azufre (SO_2) y óxidos de nitrógeno (NO_x), respectivamente.

- Los óxidos de azufre y nitrógeno sufren una serie de fenómenos tales como transporte a gran distancia, reacciones químicas, precipitación y deposición. Con el tiempo estos óxidos y los distintos compuestos a que dan lugar retornan a la superficie de la tierra donde son absorbidos por los suelos, el agua o la vegetación.

El proceso de retorno a la tierra puede realizarse de dos maneras:

- a. Deposición seca. Una fracción de los óxidos vertidos a la atmósfera retornan a la superficie de la tierra en forma gaseosa o de aerosoles. Esto puede ocurrir cerca de las fuentes de emisión de los contaminantes o a distancia de hasta algunos cientos de kilómetros de la misma, en función de las condiciones de dispersión. No obstante, la deposición en seco es predominante en zonas próximas al foco emisor.
- b. Deposición húmeda. La mayor parte de los SO_2 y NO_x que permanecen en el aire sufren un proceso de oxidación que da lugar a la formación de ácido sulfúrico (SO_4H_2) y ácido nítrico (NO_3H). Estos ácidos se disuelven en las gotas de agua que forman las nubes y en las gotas de lluvia, retornando al suelo con las precipitaciones. Una parte de estos ácidos queda neutralizada por sustancias presentes en el aire tales como el amoníaco, formando iones de amonio (NH_4^+).

Los ácidos disueltos consisten en iones de sulfato, iones nitrato e iones de hidrógeno. Todos estos iones están presentes en las gotas de lluvia, lo que da lugar a la acidificación de la misma.

1.2.3. Disminución del espesor de la capa de ozono

Uno de los grandes problemas causados por las reacciones que tienen lugar entre los contaminantes de la atmósfera es el de la disminución de la capa de ozono de la estratosfera como consecuencia de la descarga de determinadas sustancias a la atmósfera. El ozono contenido en la estratosfera se puede descomponer a través de una serie de reacciones cíclicas en las que intervienen radicales que contienen hidrógeno y nitrógeno. El ozono se puede descomponer también por absorción de radiación ultravioleta, produciendo oxígeno atómico y molecular.

Como consecuencia de estas reacciones de producción y destrucción se forma una capa de ozono cuyo espesor varía cíclicamente, tanto diaria como estacionalmente. Se han detectado como potencialmente peligrosas para la capa de ozono, tres tipos de actividades humanas:

- Generación de gran cantidad de óxidos de nitrógeno emitidos por los aviones supersónicos.
- Los óxidos nitrosos son productos relativamente estables que pueden persistir en la troposfera, llegando a alcanzar la estratosfera donde se pueden descomponer en óxido nítrico que es activo en la destrucción del ozono. Esta es probablemente la principal fuente del óxido de nitrógeno presente en la estratosfera y el principal agente de destrucción del ozono en el ciclo natural.
- Finalmente, los átomos libres de cloro pueden producir la destrucción del ozono a través de una serie de reacciones. La presencia de estos átomos de cloro en la estratosfera se debe a las reacciones que sufren los clorofluorocarbonos cuando se dispersan en la atmósfera. En las últimas décadas dos de estos productos, el CF_2Cl_2 y el CFCl_3 se han utilizado con gran profusión como refrigerantes en la industria y especialmente como propelentes de las aspersiones ("spray"), debido a su alta estabilidad química, baja toxicidad y no ser inflamables. Su estabilidad química es la que permite la migración de estos productos hasta la estratosfera, en la que se descomponen como consecuencia de la radiación ultravioleta produciendo átomos de cloro.

1.3. Efectos Producidos por la Contaminación Atmosférica

La contaminación atmosférica afecta a millones de personas de todo el mundo, especialmente a aquellas que viven en los grandes núcleos urbanos y en áreas fuertemente industrializadas, con denso tráfico de vehículos. Las emanaciones de polvos y gases corrosivos deterioran el medio ambiente dando lugar a olores desagradables, pérdida de visibilidad y daños para la salud humana, para los

cultivos y otras formas de vegetación y además, sobre los materiales de construcciones y monumentos (22).

La contaminación atmosférica apareció primero como una molestia pero, posteriormente, se ha convertido en una amenaza para la calidad de la vida, ya que una contaminación excesiva puede poner en peligro la salud y llegar a convertir algunas zonas en lugares no aptos para ser normalmente habitados.

Los efectos tóxicos en el organismo, además de la dosis, dependen del individuo, del medio, de la forma de administración y de las propiedades del tóxico. La tabla 1.4 presenta los principales contaminantes, características, fuentes y efectos sobre la salud.

Los tóxicos penetran en el organismo por inhalación, por ingestión o a través de la piel. La vía más rápida de absorción es la pulmonar y la gastrointestinal, una vez en el torrente sanguíneo, se distribuyen a diferentes órganos y tejidos, dependiendo de la naturaleza del tóxico. Algunos se metabolizan y son expulsados a través de la orina, sudor, saliva, vómitos y respiración (3).

Los efectos fisiológicos de los tóxicos industriales pueden ser, irritantes (del aparato respiratorio principalmente), asfixiantes (impiden el transporte de oxígeno a las células), anestésicos y narcóticos (depresores del sistema nervioso central), sustancias que deterioran el tejido pulmonar (polvos que originan neumoconiosis, inertes, alérgenos), tóxicos sistémicos o generales (hepatotóxicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, hematotóxicos), cancerígenos, mutágenos y teratógenos, y sustancias que producen dermatosis.

El nombre de partículas suspendidas se refiere a una diversidad de sustancias que existen en forma de material sólido o líquido finamente particulado con un amplio intervalo de tamaño ($0.005 \mu\text{m}$ a $100\mu\text{m}$), suspendido en el aire. La toxicidad de las partículas está determinada por sus características físicas y químicas. El tamaño es un parámetro importante para caracterizar su comportamiento, ya que de él depende la capacidad de penetración y retención en diversas regiones de las vías aéreas respiratorias; también determina su tiempo de residencia en la atmósfera y por ende la concentración a la que puede estar expuesta la población. Las partículas pueden tener un origen natural o formarse

por reacciones fotoquímicas en la atmósfera. Estas últimas pueden estar constituidas por sulfatos y nitratos (y sus ácidos correspondientes), por metales pesados o por carbón orgánico, entre otros elementos. Con base en su tamaño, las PM10 normalmente se dividen en tres fracciones: gruesa, que incluye a partículas con diámetro entre $10 - 2.5 \mu\text{m}$; fina: partículas de $2.5 - 1.1 \mu\text{m}$; y ultrafina partículas menores a $1 \mu\text{m}$. Las partículas provenientes de suelos erosionados y caminos sin pavimentar son en general menos tóxicas que las generadas por procesos de combustión y se encuentran en su mayoría en la fracción más gruesa. En contraste, partículas provenientes de las quemas agrícolas y forestales, así como las generadas por la combustión de vehículos a gasolina y diesel, son en su mayoría finas y ultrafinas. El cuerpo humano posee una serie de defensas, mecánicas en primer lugar, para impedir que estas sustancias penetren en el organismo; aquellas partículas cuyo diámetro es superior a las 10 micras, quedan bloqueadas por los vellos de la nariz, y las de dimensiones cada vez más pequeñas son detenidas por la mucosa que recubre el aparato respiratorio, así como a los cilios que éste posee en toda su extensión. Solamente aquellas partículas con dimensiones de aproximadamente 0.1 micras pueden llegar hasta los alvéolos pulmonares y de ahí pasar directamente a la sangre. Ahora bien, si nos ponemos a ver la forma en que está distribuida la masa del particulado en los que se refiere a las dimensiones, encontramos que la mayor parte se halla concentrada en torno a dos diámetros: uno en las proximidades de las 10 micras, y otro en las de 2.5 micras. Ésta es, por ende, la fracción más peligrosa, debido a que el organismo no ha desarrollado prácticamente ninguna defensa mecánica que sea eficaz contra estos invasores. Las partículas que no logran penetrar al torrente sanguíneo, sino que se quedan en los pulmones, pueden igualmente ejercer daños notables, puesto que es posible que recojan sobre su superficie sustancias líquidas o gaseosas, a las que de esa manera mantienen en íntimo contacto con los pulmones. La composición química de las partículas es también muy importante con relación a los daños específicos a la salud. La mayoría de los estudios sobre efectos a la salud descritos en la literatura son de tipo epidemiológico y analizan las asociaciones encontradas entre las

concentraciones de partículas en el aire y daños a la salud. Sin embargo, actualmente se están haciendo esfuerzos muy importantes para conocer el papel que la composición química y biológica de las partículas tienen sobre la salud y cuáles son sus mecanismos fisiopatológicos.

Los efectos nocivos de las partículas suspendidas no se limitan al aparato respiratorio, sino que pueden dañar a otros aparatos y sistemas como el sistema cardiovascular. Los efectos pueden ser inmediatos o presentarse después de varios días de exposición a esos contaminantes.

La evidencia epidemiológica disponible hasta el momento sustenta el desarrollo o la planeación de estudios experimentales con el fin de esclarecer los mecanismos fisiopatológicos que apoyen los hallazgos reportados sobre la morbilidad y mortalidad. Esto implica la realización de estudios en humanos y animales, así como de estudios celulares *in vitro*.

Tabla 1.4. Principales contaminantes atmosféricos, características, fuentes y efectos sobre la salud. (4)

CONTAMINANTE	CARACTERÍSTICAS	FUENTES PRINCIPALES	EFFECTOS PRINCIPALES
1.- Partículas suspendidas totales (PST) promedio diario de 275 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Partículas sólidas o líquidas dispersas en la atmósfera (0.3 a 100 micras) como polvo, cenizas, hollín, partículas metálicas, cemento, polen, la fracción respirable de PST está constituida por aquellas partículas de diámetro inferior a 10 micras.	Combustión industrial y doméstica usando carbono, combustóleo, incendios, erosión eólica y erupciones volcánicas.	SALUD: Irritación de las vías respiratorias, su acumulación en los pulmones origina enfermedades como la silicosis y asbestosis. Agravan enfermedades como el asma y las cardiovasculares; pueden ser tóxicas dependiendo de su composición química. MATERIALES: Deterioran materiales de construcción y otras superficies. VEGETACIÓN: Interfieren con la fotosíntesis; OTROS: Disminuyen la visibilidad y provocan la formación de nubes.
2.- Bióxido de azufre (SO_2) promedio diario de 340 mg/m^3 (0.13ppm)	Gas incoloro con olor picante que al oxidarse y combinarse con agua forma ácido sulfúrico, principal componente de la lluvia ácida	Combustión de carbón, diesel, combustóleo y gasolina que contiene azufre, fundición de vetas metálicas ricas de azufre, procesos industriales, erupciones volcánicas.	SALUD: Irritación de los ojos y el tracto respiratorio, reduce las funciones pulmonares ya agrava las enfermedades respiratorias como el asma, la bronquitis crónica y el enfisema. MATERIALES: Corroe los materiales, deteriora los contactos eléctricos, el papel, los textiles, las pinturas, los materiales de construcción y los monumentos históricos. VEGETACIÓN: Lesiones en las hojas y reducción de la fotosíntesis.
3.- Hidrocarburos (HC). Criterio recomendable promedio horario de 180 mg/m^3 (0.24ppm)	Compuestos orgánicos que contienen carbono e hidrógeno en estado gaseoso, se pueden combinar en presencia de la luz solar con óxidos de nitrógeno y forman smog fotoquímico.	Combustión incompleta de combustibles y otras sustancias que contienen carbono; procesamiento, distribución y uso de compuestos del petróleo como la gasolina y los solventes orgánicos; incendios, reacciones químicas en la atmósfera; descomposición bacteriana de la materia orgánica en ausencia de oxígeno.	SALUD: Trastornos en el sistema respiratorio; algunos hidrocarburos provocan el cáncer.
4.- Oxidantes fotoquímicos ozono (O_3), Nitratos de peroxiacetilo (PAN) y algunos aldehídos, ozono. Promedio horario máximo de 216 mg/m^3	Compuestos gaseosos incoloros producidos en presencia de la luz solar. Oxidan materiales no inmediatamente oxidables por el oxígeno gaseoso.	Reacciones atmosféricas de hidrocarburos y óxidos de nitrógeno bajo la influencia de la luz solar.	SALUD: Irritación de los ojos y del tracto respiratorio, agravan las enfermedades respiratorias cardiovasculares. MATERIALES: Deterioran el hule, los textiles y la pintura. VEGETACIÓN: Lesiones en las hojas y limitan el crecimiento. OTROS: Limitan la visibilidad.
5.- Monóxido de carbono (CO). Promedio de 8 horas máximo de 14,872 mg/m^3 (13ppm)	Gas incoloro e inodoro que se combina con la hemoglobina para formar la carboxihemoglobina.	Combustión incompleta de combustibles y otras sustancias que contienen carbono: incendios.	SALUD: La carboxihemoglobina afecta al sistema nervioso central y provoca cambios funcionales cardíacos y pulmonares, dolor de cabeza, fatiga, somnolencia, fallos respiratorios y hasta la muerte.
6.- Bióxido de nitrógeno (NO_2). Promedio horario máximo de 395 mg/m^3 (0.21 ppm)	Gas rojizo de olor picante.	Combustión a alta temperatura en industrias y vehículos, tormentas eléctricas	SALUD: Irrita los pulmones; agrava las enfermedades respiratorias y cardiovasculares. MATERIALES: Deterioramiento de las pinturas. VEGETACIÓN: Caída prematura de las hojas e inhibe el crecimiento. OTROS: Disminuyen la visibilidad.
7.- Plomo (Pb). Criterio recomendable	Metal pesado no ferroso, se presenta en forma de vapor, aerosol o polvo.	Combustión de gasolina que contiene plomo: minería, fundición y procesos industriales.	SALUD: Se acumula en los órganos del cuerpo; causa anemia, lesiones en los riñones y el sistema nervioso central (saturnismo)

Capítulo 2

Biomonitores

El monitoreo atmosférico incluye a todas las metodologías que permiten muestrear, analizar y procesar las concentraciones de contaminantes y otras sustancias presentes en el aire en un lugar y tiempo determinado. Estos métodos pueden dividirse, a grandes rasgos, en dos tipos: Instrumentales (pasivos, activos, analizadores automáticos y sensores remotos) y Bioindicadores (Fig. 2.1).



Figura 2.1. Diversas especies de liquen son usadas como biomonitores. Heterodermia pseudopediosa

En esta oportunidad describiremos a los segundos. El monitoreo del estado de contaminación de un ambiente mediante el empleo de organismos es uno de los tópicos más actuales dentro de la química ambiental y es denominado “biomonitoreo” (un indicador es un elemento de medición asociado a un factor que proporciona una medida cuantitativa o cualitativa de la evolución en magnitud de un fenómeno con base a una función de valores de dichos

elementos. En el mismo sentido, un bioindicador es un organismo vivo que puede ser desde un microbio, un insecto o un pez, hasta una planta o alga, que nos permite cuantificar y calificar el nivel y evolución de la contaminación presente en un sistema determinado en virtud de su sensibilidad diferencial a diversas sustancias tóxicas (19). La utilización de plantas como biomonitores tiene la ventaja de la capacidad de las mismas para absorber contaminantes a partir de diferentes condiciones ambientales y climatológicas, lo que permite una evaluación de las reacciones e índices de sensibilidad de éstos organismos ante la presencia de sustancias contaminantes (2). De este modo, el efecto puede ser medido directamente bajo condiciones que existen en el campo. El monitoreo instrumental del aire, por otra parte, tiene en estas condiciones un valor de

predicción limitado, ya que el aire muestreado no es representativo de toda el área, los instrumentos son costosos y la concentración de los contaminantes en la atmósfera no proporciona información sobre cómo responderán los organismos que allí viven.

En las plantas, los cambios bioquímicos y fisiológicos se presentan rápidamente como respuesta a los contaminantes primarios más frecuentes (óxidos de azufre y de nitrógeno), existiendo además efectos adicionales provocados por los contaminantes secundarios, los cuales se forman por interacción de los primarios entre sí y de éstos con los componentes normales de la atmósfera. La respuesta de las especies vegetales sensibles como bioindicadores, es decir las que muestran cambios visibles, químicos o físicos, incluye no solamente daño foliar, cambios en la pigmentación o alteraciones en el crecimiento, sino también otros efectos tales como cambios fisiológicos, bioquímicos o genéticos. Las especies vegetales más utilizadas para el monitoreo de la calidad del aire son los líquenes y, dentro de las plantas superiores, las bromeliáceas (“clavel del aire”). Estas últimas son en su mayoría epífitas y tienen la capacidad de absorber, a través de adaptaciones foliares, agua y sales disueltas, constituyendo una efectiva sustitución de las raíces en hábitat deficientes y con sequías recurrentes. Poseen un crecimiento muy lento, y una extraordinaria habilidad para obtener nutrientes de la atmósfera, incluyendo una amplia variedad de contaminantes. Con respecto a los líquenes, se utilizan especies que se adhieren con toda su superficie al sustrato o también epífitos, lo que representa una ventaja en su empleo para el monitoreo de contaminantes atmosféricos, ya que éstos sólo pueden ingresar por vía aérea.

Las plantas a menudo se consideran acumuladoras, indicadoras y excluidoras (22). Las acumuladoras tienden a concentrar los elementos a niveles más altos que las concentraciones del ambiente, las indicadoras muestran las concentraciones semejantes a las del ambiente, y las excluidoras mantienen las concentraciones relativamente bajas; hasta un cierto nivel del ambiente, después de que el mecanismo de exclusión se rompe hay una incorporación sin restricción y se llega a la toxicidad. Se debe notar aquí que el término *indicador* es algo

H																			He
Li	Be													B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg													Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr		
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc*	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd?	In	Sn	Sb	Te	I	Xe		
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb?	Bi	Po*	At*	Rn*		
Fr*	Ra*	Ac*																	

Ce	Pr	Nd	Pm*	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
Th*	Pd*	U*	Np*	Pu*	Am*	Cm*	Bk*	Cf*	Es*	Fm*	Md*	No*	Lr*







-  Esencial solo para plantas
-  Esencial para plantas y animales
-  Esencial solo para animales
-  En discusión
-  Determinado cuantitativamente en plantas por intercomparación
-  * Todos los núclidos de éstos elementos son radiactivos

Figura 2.2. Tabla periódica de los elementos con indicaciones en los elementos que son esenciales y aquellos que han sido determinados cuantitativamente en las plantas (Ref. 17).

engañoso en el contexto de la acumulación de metales, Farango y Mehra (11) sugieren utilizar mejor el término *indicador de la concentración*, relativo a la concentración de metales en el medio ambiente, los líquenes son considerados invariablemente como acumuladores para la mayoría de los metales.

La mayor porción del peso fresco de una planta consiste de 85- 90% de agua en promedio. La materia seca de la planta esta compuesta de los siguientes elementos: carbón (44.5%), oxígeno (42.5%), hidrógeno (6.5%), nitrógeno (2.5%), fósforo (0.2%), azufre (0.3%), y álcalis o tierras alcalinas: potasio (1.9%), calcio (1.0%) y magnesio (0.2%), también llamados macroelementos. De la misma forma existen los microelementos, que están presentes en las plantas en cantidades reducidas y que son elementos vitales, como: cloro (2000mg/Kg de material seco), silicio (1000 mg/Kg), manganeso (200 mg/Kg), sodio (150 mg/Kg), hierro (150 mg/Kg), zinc (50 mg/Kg), boro (40 mg/Kg), cobre (10 mg/Kg), cromo (1.5 mg/Kg) y cobalto (0.2 mg/Kg). Los macro y micro elementos son necesarios en la planta

para su crecimiento y desarrollo normal, ya que su función no puede ser reemplazada por cualquier otro elemento (17). Por esta razón, los macro y microelementos son también llamados macronutrientes y micronutrientes respectivamente. La división de la tabla periódica en elementos esenciales y no esenciales, no siempre es útil, debido a que hay numerosas excepciones en el reino vegetal, cuando se comparan plantas superiores e inferiores. Por ejemplo, el calcio, boro y cloro no son considerados esenciales en algunas bacterias y hongos, como tampoco el sodio y silicio en plantas superiores. Además de los micro y macronutrientes hay otra serie de elementos que están presentes en las plantas los cuales se presentan en la Fig. 2.2, en la cual se muestra que los elementos La, Ce, Ba, Br, y muchos otros se encuentran en concentraciones similares a los micronutrientes que fueron mencionados anteriormente. Debido a que las plantas controlan metabólicamente los niveles requeridos de elementos, los líquenes pueden mostrar concentraciones bastante altas especialmente en los elementos esenciales bajo condiciones atmosféricas de baja disponibilidad.

Los líquenes pueden acumular metales de partículas suspendidas en el aire de material disuelto y suspendido. Los mecanismos de incorporación de elementos no son bien conocidos (5), sin embargo se pueden mencionar los siguientes: intercambio de iones, sorción de electrolitos y la absorción metabólicamente controlada, están todos probablemente implicados en la acumulación de elementos, no obstante se han determinado factores tales como la velocidad del viento, el tamaño de la partícula, temperatura, humedad y rugosidad de la superficie (14) como factores dependientes para que estos procesos ocurran.

Los líquenes son una asociación de un hongo y un alga. Están tan íntimamente relacionados entre sí que se comportan y reproducen como una planta única e independiente. El hongo se encarga de proteger al alga de las radiaciones directas del sol y brindarle agua y sales minerales. El alga a su vez realiza fotosíntesis y proporciona al hongo alimento y vitaminas. Los líquenes tienen una alta tolerancia a circunstancias ambientales desfavorables. En momentos de desecación ya sea por el sol o por el viento suspenden su actividad, la cual inician nuevamente al recobrar el agua por medio de la lluvia o del rocío que absorben como si fuera

papel toalla; ya que no poseen un órgano especializado para esta función. Esta forma de vida intermitente limita su crecimiento, pero les permite vivir en lugares donde difícilmente podría desarrollarse una planta. La falta de competencia y la ausencia casi total de depredadores, ha compensado su lento crecimiento, permitiendo a los líquenes diversificarse y colonizar diversos territorios en el planeta (7).

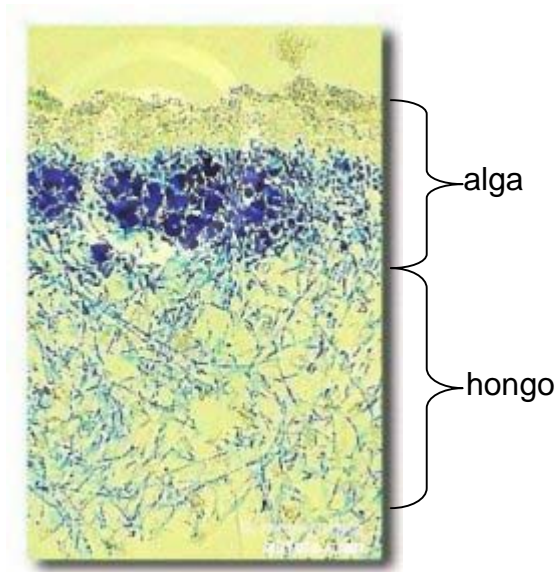


Figura. 2.3. Detalle del corte transversal de un líquen, se aprecia la zona ocupada por las algas y la zona ocupada por las hifas del hongo.

El talo o aparato vegetativo de los líquenes está formado por hifas entrelazadas que rodean y protegen al alga. El talo puede ser homómero, en este caso no se aprecia ninguna estratificación y las algas se hallan repartidas de manera uniforme entre las hifas. Si el talo es heterómero los estratos se pueden apreciar y el alga se halla en una capa próxima a la superficie, llamada capa gonidial (Fig. 2.3). La médula se encuentra por debajo de la capa y está formada por

hifas. La zona que está en contacto directo con el sustrato recibe el nombre de córtex inferior, y pueden aparecer hifas cuyo propósito es la fijación del líquen al soporte. La naturaleza del sustrato determina la distribución y crecimiento de los líquenes. Se puede afirmar que crecen sobre cualquier superficie bien iluminada, como las rocas, las cortezas de los árboles o el suelo. Aunque no son exigentes con la humedad y la temperatura sí son muy específicos del sustrato en que se desarrollan. Los líquenes que crecen sobre los árboles no son los mismos que viven sobre las rocas y aún son distintos aquellos que crecen sobre rocas silíceas o sobre rocas calcáreas. Hay líquenes que prefieren sustratos ricos en nitrógeno y viven en áreas frecuentadas por el hombre. La capacidad de absorber y acumular diversas sustancias presentes en el ambiente ocasiona que la mayoría de los líquenes no toleren la contaminación. La acumulación de estas sustancias y su

imposibilidad de excretarlas, retardan su crecimiento, dificultan su reproducción y pueden provocarles su muerte. De esta forma los líquenes se consideran indicadores naturales o bioindicadores de la contaminación atmosférica (7). Más allá del uso técnico y científico de estas plantas para el control de la calidad del aire, es interesante que podamos tener una idea general del estado del aire que nos rodea, especialmente en las ciudades, donde existen más factores que contribuyen a la contaminación. La simple observación de la presencia o ausencia de líquenes o del “clavel del aire” en los árboles, postes o paredes da una noción del grado de contaminación del ambiente, permitiéndonos tener un primer elemento indicativo a partir del cual encontrar posibles fuentes contaminantes que de otro modo pasarían inadvertidas por un mayor tiempo.

Capítulo 3

Técnicas de Caracterización

3.1. Microscopía Electrónica

El microscopio electrónico se puede considerar como un canal de comunicación entre el objeto (problema) y el observador. La información que se obtiene es función de los distintos procesos físicos de interacción del haz de electrones de alta energía (20-1500kV) con dicho objeto. La microscopía electrónica es una técnica que nos permite obtener información “local” del espécimen estudiado, a contraposición a la mayoría de las técnicas que aportan una información media de toda la muestra utilizada (6).

El primer instrumento de detección con que cuenta el ser humano es su propio aparato visual. El ojo humano es un aparato óptico de gran complejidad con resolución aproximadamente de 0.1 mm. Sí es necesario observar algo con resolución menor de milímetros, estamos obligados a recurrir a algún instrumento óptico que nos ayude; por ejemplo: una lupa nos permitirá ver décimas de milímetros y tal vez hasta centésimas de milímetros (14). Si queremos ver separaciones del orden de 10^{-10} m tendremos que recurrir entonces a un microscopio electrónico. El proceso físico de la formación de imágenes en el microscopio electrónico es exactamente el mismo que se tiene en un microscopio óptico. A pesar de las similitudes entre el microscopio óptico y el electrónico, se encuentran diferencias fundamentales que hay que mencionar y las cuales nos permitirán darnos desde este momento, una idea sobre el diseño del microscopio electrónico. Estas diferencias son:

- 1) Las lentes del microscopio óptico son de vidrio mientras que en el microscopio electrónico son bobinas, por lo tanto, hablamos ahora de lentes electromagnéticas.
- 2) La columna del microscopio electrónico tiene que estar a un vacío de al menos 10^{-7} Torr (1Torr = 1 mm Hg), puesto que el haz electrónico no puede

recorrer grandes distancias en un medio gaseoso sin que las moléculas de gas lo dispersen y reduzcan su energía. Ésta es una gran ventaja que presenta hasta nuestros días la microscopia óptica, puesto que en el microscopio electrónico no es posible la observación de la muestra viva.

- 3) En el microscopio óptico las lentes tienen una distancia focal fija; el enfoque y la amplificación se realizan cambiando la posición del objeto por medio del revolver. En el microscopio electrónico el enfoque y la amplificación se realizan al variar la corriente de las lentes electromagnéticas.
- 4) En el microscopio electrónico, la electrónica involucrada es muy refinada lo que contribuye al elevado precio del instrumento.

Los dispositivos diseñados para dirigir y enfocar haces de partículas cargadas obedecen las leyes de la óptica desarrollada para las lentes de vidrio y, por este motivo, se llaman “lentes”, en los microscopios electrónicos son de dos tipos: electrostáticas y electromagnéticas (21).

La lente electrostática, como es el caso del cañón de electrones del microscopio electrónico, se compone esencialmente de un conjunto de placas mantenidas a diferente potencial. La diferencia de potencial acelerará cualquier partícula cargada de un lado a otro dependiendo del signo de la carga eléctrica. Las placas tienen un orificio en el centro de tal forma que permiten el paso de éstas y la curvatura del campo eléctrico provoca una acción de enfoque. Por lo tanto, cuando una partícula cargada pasa a través de una lente electrostática experimenta una fuerza dirigida en la dirección del campo eléctrico, la cual tiene un componente hacia el eje óptico y gana un impulso en esa dirección, de tal forma que es enfocada en algún punto. En el caso de la lente electromagnética, se aprovecha el hecho de que una partícula cargada que viaja dentro de un campo magnético experimenta una fuerza perpendicular al plano formado por la dirección del movimiento y la dirección del campo magnético. Así cuando el electrón alcanza la región del campo, siente un impulso hacia el eje óptico más una rotación alrededor del mismo. Salvo la rotación mencionada, la cual debe ser calibrada en todo microscopio electrónico, es perfecta la analogía de estos dispositivos con las

lentes de vidrio. Actualmente la microscopía electrónica es una de las herramientas más usadas en la ciencia de los materiales, física y biología.

Los microscopios electrónicos son muy útiles porque permiten ver objetos mucho más pequeños y texturas más finas que los microscopios ópticos. Esto se debe a que tienen mayor poder de resolución. El poder de resolución es una característica numérica o parámetro de un sistema óptico (de luz o de electrones) que define su capacidad de dar imagen de detalles muy pequeños del objeto.

El concepto de resolución está muy relacionado con la ventaja que ofrece un determinado tipo de microscopio con respecto a otro, a formar las

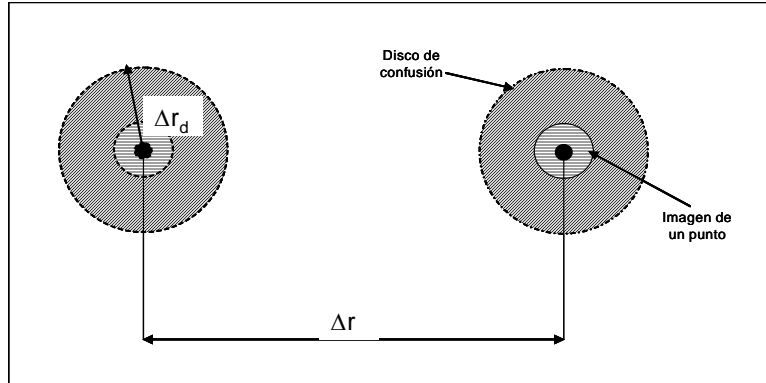


Figura 3.1. Representación esquemática del concepto de resolución Δr .

imágenes. Se define como resolución Δr de un instrumento a la capacidad que tiene de diferenciar entre dos objetos separados a una distancia Δr en la realidad (Fig. 3.1).

Sí vistos a una cierta distancia dos objetos aparecen como uno solo, diremos que estamos debajo del límite de resolución. Sin embargo, sí nos acercamos suficientemente, podremos distinguir que en realidad no era un solo objeto en forma de mancha difusa, sino dos diferentes; diremos entonces que pudimos resolver la imagen de estos objetos. En el caso de instrumentos ópticos, la resolución se considera como la mínima distancia de separación entre dos objetos, en el cual aparecen todavía como dos entes diferentes. Sí la distancia entre dos objetos es menor que la resolución, entonces los objetos parecerán como una sola mancha difusa; sí por el contrario, la distancia entre dos objetos es menor que la resolución, éstos aparecerán separados y bien definidos.

El poder de resolución fue definido por Ernest Abbe, el siglo pasado, como

$$R = K \frac{L}{n \operatorname{sen} \alpha}$$

donde **K** es una constante que depende, al menos en parte, de características del objeto, **L** es la longitud de onda de la radiación iluminante con la que se forma la imagen; **n** representa el índice de refracción del medio situado entre el objeto y la lente objetiva, y **sen** α es el seno del ángulo que subtende el radio de la lente objetiva con vértice en el objeto. Cuanto más pequeña es **R**, que es la distancia mínima entre dos puntos del objeto que se vean en la imagen como dos, mayor es el poder de resolución del sistema óptico, pues es capaz de mostrar detalles más finos (14).

El medio para aumentar en forma importante la resolución por encima de la propia de un microscopio óptico, consiste en cambiar totalmente la radiación que se utiliza para formar la imagen por otra con mucho menor longitud de onda. En efecto los microscopios electrónicos utilizan un haz de electrones acelerados para formar imágenes. Los electrones se aceleran empleando diferencias de potencial, el cual varía con el voltaje de aceleración, cuanto mayor es el voltaje de aceleración mayor es la velocidad de los electrones.

La resolución está limitada por varios factores, entre los que se encuentran la difracción, las aberraciones y el ruido.

En todo instrumento óptico el fenómeno de difracción provoca que la imagen de un objeto puntual consista de un disco de confusión sobrepuesto al punto. Este disco de confusión alrededor de la imagen del punto se llama disco de Airy y no es otra cosa que la difracción de las lentes mismas por las dimensiones finitas que tienen y la difracción de las aperturas presentes en el sistema óptico. El diámetro del disco de Airy aumenta con cada una de las aberraciones presentes en el instrumento. Las lentes electromagnéticas también presentan aberraciones, las cuales limitan la resolución en varias formas. Las más relevantes son:

- 1) Coma. Se produce por las diferencias en la distancia focal de los rayos que inciden en la lente a diferentes ángulos con respecto al eje óptico. En este caso la imagen de un punto adquirirá una forma elongada muy parecida a

una coma, esta aberración se elimina por completo si se alinea correctamente el microscopio.

- 2) Curvatura de campo. Proviene de la variación de la distancia focal de los rayos con respecto a su distancia del eje óptico. De esta forma los discos de confusión no son contenidos en un plano sino en una superficie curva, por lo que la imagen no será enfocada en un plano completamente. Se corrige de la misma manera que la coma.
- 3) Astigmatismo. Es el resultado de que las lentes no sean axialmente simétricas. Para corregirla se añaden pequeños electroimanes a las lentes, de tal forma que produzcan pequeños campos elípticos controlables independientemente.
- 4) Aberración cromática. Se presenta cuando los electrones que forman el haz no viajan a la misma velocidad y por lo tanto, muestran diferentes longitudes de onda, por lo que al pasar por la lente se refractan de manera distinta dando lugar a variaciones en la distancia focal. Se corrige escogiendo adecuadamente las aperturas del sistema y produciendo un haz altamente monocromático, de modo que las variaciones en voltaje sean pequeñas.
- 5) Aberración esférica. Corresponde a la dependencia de la distancia focal con la apertura para rayos no paraxiales. Los rayos marginales se desvían en su refracción, de tal forma que serán enfocados antes del foco correspondiente a los rayos paraxiales. Hasta el momento no existe una forma conveniente de corregir esta aberración, por lo que se ha convertido en el defecto más importante de la lente objetiva.

Por lo tanto, en un microscopio, la resolución será determinada por el mínimo disco de Airy que se produzca.

El ruido se presenta en todos los tipos de microscopia, debido principalmente a vibraciones alrededor del instrumento y a que todos los procesos de generación de la iluminación utilizada, tales como la emisión termoiónica y la emisión térmica de fotones, son procesos aleatorios, al igual que los procesos de dispersión que ocurren en la muestra. Esto afecta la resolución, puesto que dos puntos

adyacentes serán resueltos sólo si la señal proveniente de estos puntos es colectada en corto tiempo, para reducir el ruido (13).

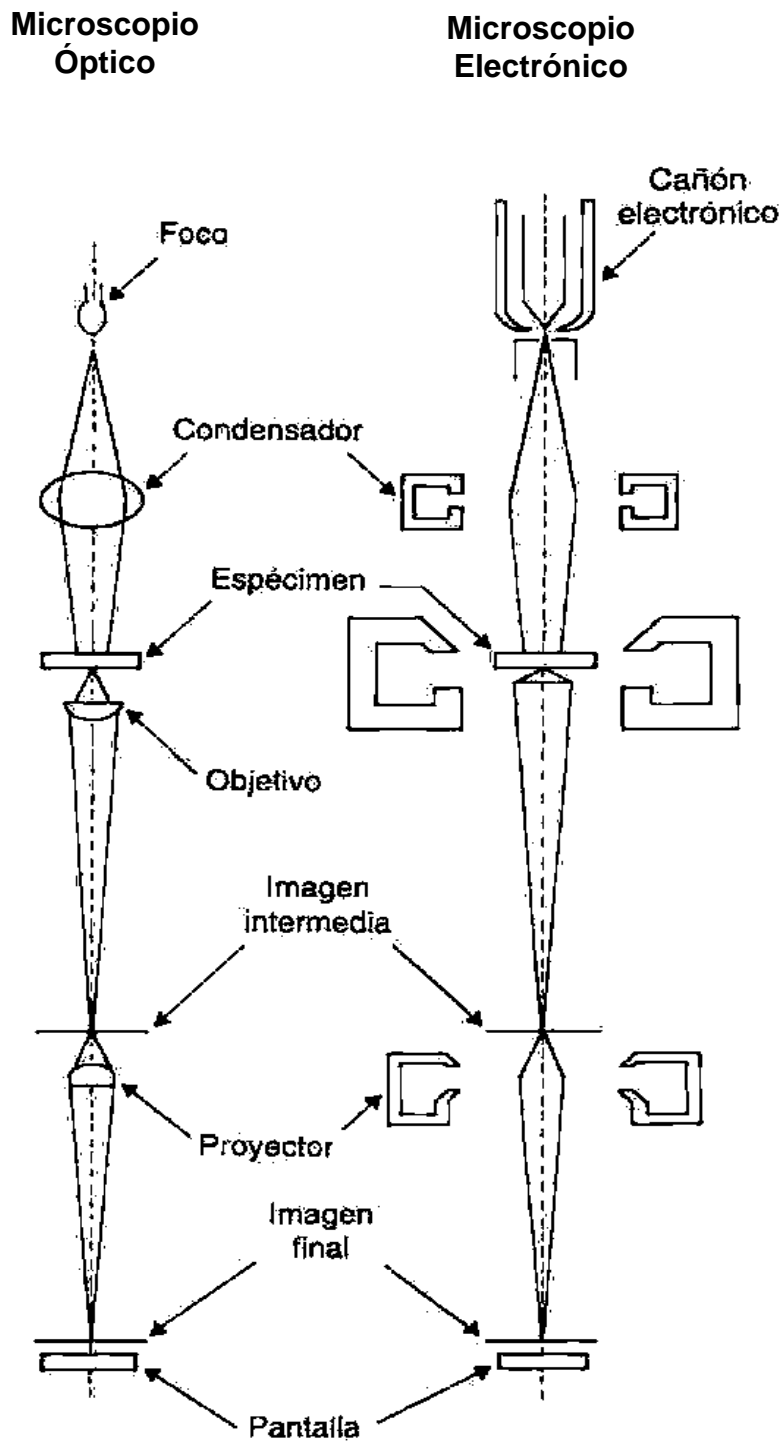


Figura 3.2. En la parte izquierda se muestra un esquema de la trayectoria de los rayos en un microscopio de luz. A la derecha se representa en forma rectilínea, muy simplificada, la trayectoria de los electrones en un microscopio electrónico de transmisión.

3.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

En un microscopio electrónico de transmisión la muestra se ilumina por un haz de electrones producidos en el cañón situado en la parte superior del microscopio (Fig. 3.2). Este cañón puede ser termoiónico (W ó LaB₆) o de emisión de campo.

Cuando los electrones son emitidos desde el filamento pasan a través de una gran diferencia de potencial (voltaje de aceleración) y adquieren una energía cinética. Antes de alcanzar la muestra el haz de electrones es modificado por las lentes condensadoras y la apertura condensadora para mejorar la coherencia del haz. La lente objetiva, situada debajo y alrededor de la muestra enfoca los haces dispersados y forma la primera imagen intermedia (12). El hecho de que los electrones estén cargados permite que tras un fenómeno de difracción equivalente al que ocurre con los rayos X, los electrones dispersados puedan ser enfocados para formar una imagen. Esta lente objetiva tiene una importancia crítica, por lo tanto, en el proceso de formación de la imagen.

La imagen producida por la lente objetiva estará afectada por la serie de aberraciones descritas anteriormente.

La primera imagen intermedia es luego aumentada por una serie de lentes proyectoras para llegar a hacerse visible en la pantalla fluorescente, que puede ser elevada para permitir que los electrones sean recogidos sobre una película

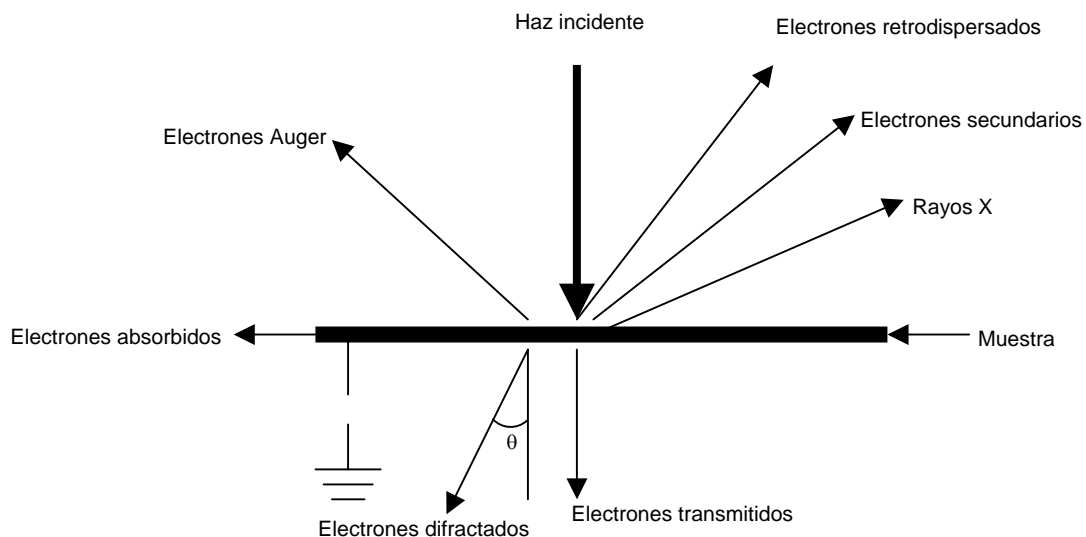


Figura 3.3. Tipos de interacciones que se producen durante la interacción del haz electrónico con la muestra.

fotográfica o a través de una cámara digital.

Cuando el haz de electrones interactúa con la muestra se producen varios tipos de señales, las cuales nos permiten hacer la caracterización estructural y química de ésta. Estas señales son: electrones retrodispersados, secundarios, absorbidos, Auger, transmitidos y rayos X característicos.

La Fig. 3.3 muestra esquemáticamente la interacción del haz electrónico con la muestra y las señales que se originan. Los electrones retrodispersados y los secundarios nos dan información sobre la superficie de la muestra, permitiéndonos de este modo obtener una imagen topográfica de ella. Estos electrones son la fuente de información para la microscopía electrónica de barrido, la cual describiremos más adelante. Los electrones absorbidos, con el detector adecuado, nos dan información sobre la resistividad de la muestra. Los electrones Auger y los rayos X característicos dependen de la composición química de la muestra, permitiéndonos hacer, por lo tanto, un análisis químico de ella (21). Los electrones que atraviesan la muestra los podemos clasificar en dos tipos: transmitidos, es decir, aquellos que pasan la muestra sin ser desviados de su dirección incidente; y difractados, que son aquellos que sí son desviados de su dirección de incidencia (6). Cuando el haz pasa a través del cristal los electrones son dispersados o reflejados por los planos del cristal con índices de Miller hkl . De acuerdo con la ley de Bragg la interferencia constructiva entre los haces dispersados tiene lugar cuando:

$$2 d_{hkl} \sin\theta = n\lambda$$

donde d_{hkl} es la distancia interplanar, θ es el ángulo incidente, n es un número entero y λ es la longitud de onda.

Los haces transmitidos y difractados son los que usa la lente objetiva para formar la imagen de la muestra en un microscopio electrónico de transmisión. Como ellos pasan a través de la muestra, portan información sobre las

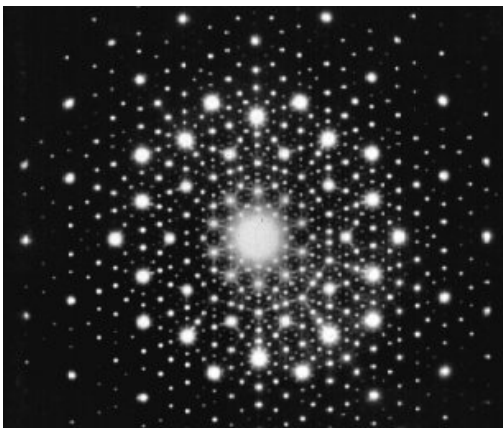


Figura 3.4. Patrón de difracción electrónico de un material monocristalino (8).

características estructurales de ésta. Si en lugar de enfocar el plano-imagen de la lente objetiva, para observar la imagen de la muestra, enfocamos el plano focal de ésta, lo que se observa es un arreglo de puntos luminosos que no son más que el arreglo de los haces difractados y transmitidos. Este arreglo recibe el nombre de patrón de difracción. Como se puede observar en la Figura 3.4, el patrón de difracción presenta un punto muy intenso (el haz transmitido) rodeado de varios puntos (los haces difractados), presentando un arreglo geométrico, el cual es característico de la muestra. Por lo tanto, el análisis del patrón de difracción nos permitirá hacer el estudio de su estructura atómica (15). Los patrones de difracción, que constan de un arreglo de puntos luminosos, son típicos de monocristales. Esto significa que sólo un cristal difracta el haz. Si el haz electrónico es muy ancho o la muestra está formada por varios cristales pequeños orientados aleatoriamente, es decir una muestra policristalina, el patrón de difracción estará formado por anillos concéntricos, cuyos diámetros corresponden al espaciado existente entre los planos atómicos del cristal. Un patrón de difracción contiene básicamente dos tipos de información:

- 1) El arreglo espacial, definido en función de la simetría que presenta el patrón, de los valores de las distancias que existan entre los puntos de difracción y el punto central, y los ángulos que se forman entre las líneas que van del centro a cada uno de los puntos.
- 2) La cristalografía, a partir de un conjunto de patrones de difracción obtenido en diferentes orientaciones de la muestra y las intensidades de los puntos de éstos. Así, al hacer una comparación entre las intensidades de los diferentes puntos difractados, y los diferentes patrones de difracción, es posible obtener el tipo de la celda unitaria que presenta el cristal en estudio.

El microscopio electrónico tiene la facultad de poder concentrar de forma controlada un haz de electrones de alta energía sobre una zona determinada de la muestra (6). Estos electrones pueden ceder parte de su energía al espécimen dando lugar a toda una serie de fenómenos de transiciones energéticas en el material estudiado que han dado lugar a un gran número de técnicas espectroscópicas. Cuando el haz de electrones es enfocado sobre la muestra

provoca una serie de tránsitos electrónicos sobre diferentes niveles de energía. El ión excitado se relaja a su estado inicial por la transferencia de un electrón, de un orbital exterior a una capa interior, lo que da lugar a la emisión de rayos X. Cada elemento tiene un espectro de emisión característico que consiste en una serie de máximos nítidos, cada uno de los cuales corresponde a una transición electrónica desde un orbital de alta energía a un orbital de baja energía. Este espectro es característico de cada elemento lo que proporciona un método de análisis elemental que es de los más usados. Para llevar a cabo el análisis elemental del material, es necesario separar adecuadamente los distintos máximos para llevar a cabo su cuantificación (6). Esto es realizado por el sistema de detección. Hay dos modos diferentes de conseguirlo (Fig. 3.5):

- 1) Análisis por dispersión de longitudes de onda de rayos X (WDS). En este tipo de espectrómetros los máximos de rayos X son discriminados de acuerdo con sus longitudes de onda por medio de un monocristal de espaciado conocido que difracta los rayos X emitidos. Sólo los rayos X que

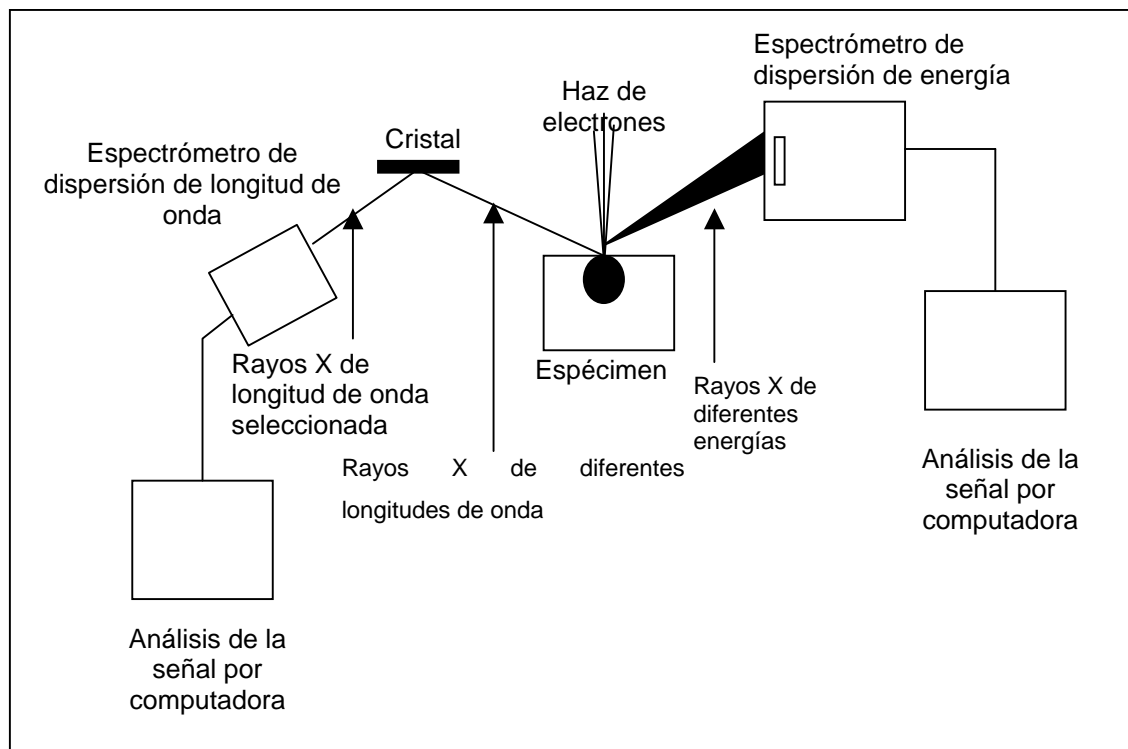


Figura 3.5. Los rayos X emitidos por la muestra se pueden caracterizar analizando sus energías o sus longitudes de onda. El espectrómetro más empleado para la resolución de problemas biológicos es el de dispersión de energía

satisfagan la ley de Bragg de acuerdo con el espaciado del monocristal serán difractados en la dirección del detector para ser medidos.

- 2) Análisis por dispersión de energía de rayos X (EDS). Éste método es el más común y raro es encontrar un microscopio electrónico que no tenga acoplado un detector de EDS, salvo que este microscopio esté exclusivamente dedicado a alta resolución. Este método consiste en un detector semiconductor que caracteriza los fotones de rayos X según sus energías incidentes. Mientras que el detector de WDS analiza los máximos de rayos X de manera secuencial, es decir, uno a uno, sin embargo el espectrómetro de energía dispersiva de rayos X registra todo el espectro simultáneamente. Este tipo de espectrómetro puede ser utilizado tanto en microscopios de transmisión como de barrido. El método WDS tiene más resolución y es más sensible por lo que se recomienda para análisis muy precisos y de elementos muy minoritarios. Sin embargo, el área analizada suele ser del orden de 1 μm , la muestra requerida ha de tener un tamaño considerable y debe ser pulimentada en la cara a analizar. Además requiere tiempos de adquisición bastante más grandes y se ha de analizar los elementos de uno en uno. Por el contrario, los espectrómetros de EDS son mucho más rápidos y pueden adquirir todo el espectro simultáneamente.

3.3. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Durante la década de los setenta surgió otra serie de técnicas relacionadas con la microscopía electrónica. Entre ellas apareció el llamado microscopio electrónico de barrido, el cual es un instrumento diseñado para estudiar, en alta resolución, la superficie de los sólidos (20). En este aspecto, el microscopio electrónico de barrido (MEB) pudiera ser comparado con el microscopio óptico, donde el primero posee una resolución y profundidad de foco mayores. Con este aparato se puede formar la imagen de los detalles más profundos de la superficie de la muestra, ya que como se menciona, su profundidad de foco es mucho mayor que en el microscopio óptico razón por la cual esta técnica da una impresión de tridimensionalidad.

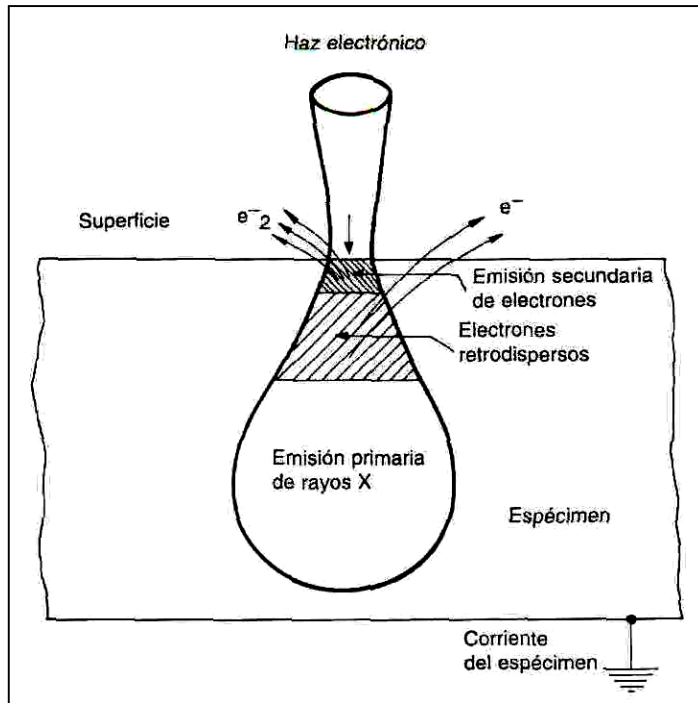


Figura 3.6. ilustración de la penetración de electrones secundarios y retrodispersos dentro de la muestra en un MEB

Por lo tanto, el microscopio electrónico de barrido es extraordinariamente útil para estudiar las características morfológicas y topográficas de la muestra. El microscopio electrónico de barrido tiene un tipo de funcionamiento diferente respecto al microscopio de transmisión. Está basado en el hecho de barrer la muestra con un

haz electrónico de sección transversal pequeña y de alta energía y generar una imagen punto a punto de ella. Los electrones emitidos en un punto son recolectados por medio de detectores apropiados y utilizados para modular la polarización de la rejilla de un tubo de rayos catódicos (monitor de TV). De esta manera se establece una correspondencia uno a uno entre la cantidad de electrones detectada y la intensidad del punto correspondiente en la pantalla del tubo. Si repetimos la operación varias veces y empezamos a barrer la muestra, esa imagen punto a punto representará las características topográficas de la superficie de ésta. Por lo tanto, la imagen en la pantalla de televisión del microscopio electrónico de barrido es un mapa de las intensidades de los electrones emitidos por la superficie de la muestra en observación, de la misma forma que la imagen de un microscopio óptico metalográfico es un mapa de la luz reflejada de la superficie. Cuando el haz de electrones (con un diámetro $D < 1 \text{ nm}$) impacta la muestra, se generan varios tipos de señales. Los electrones secundarios emitidos por la muestra se producen en un volumen relativamente

pequeño del espécimen sólo logran penetrar de 5 a 10 nm por debajo de la superficie de la muestra, Fig. 3.6, muy cercano al lugar donde incide el haz electrónico en ese instante, por lo que proporcionan una imagen de mayor resolución que la suministrada por otros detectores. Las interacciones de los electrones del haz con los electrones de los átomos de la muestra causan que algunos de estos últimos sean expulsados fuera del átomo en cualquier dirección. La energía de estos electrones será igual a la energía de los electrones del haz menos la energía necesaria para la ionización, por lo cual los electrones secundarios tendrán siempre menor energía que los del haz. Los electrones expulsados hacia la cara superior de la muestra que lleguen a la superficie con suficiente energía para cruzarla y salir al espacio de la cámara del objeto podrán ser detectados. Ahora bien, los electrones secundarios emitidos por la muestra y la cantidad que llega al detector, depende sobre todo de la morfología de la superficie del objeto y del ángulo entre cada pequeña región de la superficie y el haz. Si se inclina el objeto, las diferentes zonas de la superficie irán cambiando de contraste, haciéndose más claras mientras que otras se oscurecen. La presencia de cargas eléctricas locales en la superficie puede afectar a la cantidad de electrones secundarios o retrodispersos emitidos, de manera que pueden producir deformaciones de la imagen. Estas cargas también interfieren con los electrones del haz por repulsión debidas a las concentraciones de cargas negativas en el espécimen. Debido a esto, los lugares de la muestra cargados aparecen brillantes y sin estructura. Las cargas locales se forman rápidamente en muestras no conductoras, como las biológicas, cuando son bombardeadas por el haz electrónico del microscopio. Partiendo de que el MEB utiliza electrones para producir una imagen, la mayoría de los MEB convencionales, requieren que las muestras sean eléctricamente conductoras, no así los MEB llamados ambientales (o de bajo vacío), los cuales pueden ser usados para ver muestras no conductoras e incluso húmedas, pero el MEB común requiere de una muestra seca y conductora, el mejor método de evitar la formación de cargas locales es cubrir las muestras biológicas con una delgadísima capa de material conductor que se adapte a las irregularidades de la superficie a estudiar. De esta manera, los

electrones del haz que incidan sobre el espécimen serán conducidos por dicha capa hasta el portaobjeto metálico y por él se disiparán en las demás partes metálicas del microscopio hacia tierra.

Los electrones retrodispersados por la muestra tienen una energía muy cercana a la del haz, provienen de una región que se encuentra a $0.5 \mu\text{m}$ por debajo de la superficie, Fig. 3.6, por lo que los detectores que los colectan no están cargados o son ligeramente negativos para repeler a los electrones de baja energía como los secundarios. Estos electrones provienen de un volumen del que se originan los secundarios, de forma que la imagen obtenida de ellos tendrá menos resolución que la proveniente de los electrones secundarios. La intensidad de la emisión depende de la morfología de la superficie, de su ángulo con respecto al haz y, además, de la densidad espacial de átomos con elevado número atómico en el volumen emisor (20).

Debido a esto, los electrones retrodispersos pueden servir por un lado para dar imágenes de superficies, en lo que son menos eficientes que los secundarios, y por otro, para informar sobre la composición atómica de la región adyacente a la superficie. Este tipo de detector se emplea cuando se observan especímenes sin cubierta metálica y a veces húmedos, a un vacío muy pobre. En estas condiciones de vacío de la cámara del objeto, no puede emplearse el detector de electrones secundarios, pues se carga con tensiones relativamente elevadas, que producirán descargas en cadena. En la actualidad se fabrican MEB que cuentan con un sistema digital de medición y regulación del vacío de la cámara del objeto, de manera de adaptarlo rápidamente a las condiciones que eviten que se cargue la muestra y en esa forma permitir la observación de especímenes biológicos húmedos y sin recubrimiento conductor.

3.4. Preparación de muestras

El tema de preparación de muestras para su estudio mediante microscopía electrónica, es un campo amplio y al que se han dedicado enormes esfuerzos. Las muestras se deben preparar de acuerdo con su naturaleza, así como de la información que se pretende obtener de ellas, tanto en barrido como en

transmisión. Un punto importante de tener en cuenta a la hora de preparar la muestra es que la técnica a emplear no debe afectar a lo que se quiere observar o medir y al hacerlo, ha de conocerse de antemano el efecto que tendrá (12).

Una de las grandes ventajas de la microscopía electrónica de barrido es el hecho de que muchas especies pueden ser examinadas sin apenas preparación. El espesor de la muestra no es algo a considerar en éste caso por lo que, el tamaño viene delimitado únicamente por el portamuestras. Para examinar el contraste topográfico basta con cortar y pulir la superficie para evitar contaminar el microscopio, con el menor daño posible y empleando sólo el mínimo de limpieza necesario (en caso de muestras metálicas). Entonces la muestra se soporta sobre un portamuestras metálico normalmente con pegamento o pintura conductora, y se seca.

Si se trata de un material aislante, hay que proceder a recubrirlo con un agente conductor. Se pueden recubrir con carbón o metales, dentro de ellos el más empleado es el oro. Este metal da un recubrimiento más uniforme y evita que se cargue la muestra de forma más efectiva que lo hace el carbón. Llegado el momento de hacer análisis de rayos X, es necesario que la señal del material conductor sea conocida y sobre todo, no enmascare ninguna de las señales de la muestra. Si se van a llevar a cabo observaciones a muy bajo voltaje o en un MEB ambiental, no es preciso este recubrimiento.

Hay muchas formas de preparar muestras para microscopía electrónica de transmisión, el método a elegir depende tanto del tipo de material como de la información requerida. La muestra a estudiar por MET ha de ser principalmente delgada, las muestras son transparentes a los electrones cuando tienen un espesor del orden de 50 a 100nm (12).

Generalmente se separan las muestras en dos grupos: autosoportadas y soportadas sobre rejilla que suele ser de cobre pero también puede ser de aluminio, níquel, wolframio, etc. El tipo de muestra a preparar dependerá del tipo de material principalmente, así, una muestra uniforme compuesta por un solo material se preparará como autosoportada, mientras otro tipo de especies se

pueden soportar sobre rejillas que normalmente son de 3 mm de diámetro y de 10 a 300 mallas (12).

En el presente trabajo la materia de estudio es una muestra biológica, por lo que en esta parte abordaremos el tema de preparación de muestras biológicas. De la anterior descripción del instrumento se deduce que las muestras se observan a muy baja presión (a lo que habitualmente se llama vacío) en el interior de la columna electrónica. Esto obliga a que el espécimen biológico esté seco; de lo contrario, las moléculas de agua se vaporizarán, invadirán el espacio por donde circulan los electrones y producirán la dispersión de los mismos con la consiguiente pérdida de la nitidez de la imagen, pudiendo llegar a la abolición de la misma o a producirse descargas de alto voltaje si la cantidad de vapor es suficiente. Además, como se acaba de ver, para que se forme la imagen de la preparación, los electrones deben atravesarla sufriendo pocos choques inelásticos, por lo que el espécimen debe estar cortado en rebanadas muy finas, de un espesor menor a $0.15\ \mu\text{m}$ y mejor aún si son menores de $0.1\ \mu\text{m}$, de manera de disminuir mucho esta posibilidad. Finalmente, hay que agregar compuestos que contengan elementos de elevado número atómico para aumentar las débiles variaciones del poder dispersante de electrones que tienen las diferentes estructuras biológicas. Todas estas necesidades impuestas por las características físicas del microscopio electrónico, condicionan la preparación del espécimen biológico. Así, este deberá deshidratarse, cortarse y contrastarse. Sin embargo, es conocido desde el siglo pasado que si una muestra se deshidrata sin un tratamiento previo tendiente a estabilizar la estructura en forma parecida a las existentes en el espécimen vivo, se producen grandes alteraciones de la misma. Este tratamiento de estabilización se llama fijación y es básicamente igual al que se utiliza en microscopía óptica.

Por otra parte las propiedades mecánicas de las muestras biológicas no son las adecuadas para ser cortadas en rebanadas de fracciones de micra de espesor, por lo que dichas muestras deben infiltrarse (procedimiento llamado inclusión) con sustancias que tengan la consistencia adecuada. Entonces la preparación del

material consta de los siguientes pasos: a) fijación; b) deshidratación; c) inclusión; d) corte y e) contraste (9).

- a) La fijación debe conservar la estructura fina de las células (también llamada ultraestructura) y alterar lo menos posible su composición. El método de fijación implica el uso de glutaraldeído y/o formaldeído, seguidos a veces por un tratamiento con tetraóxido de osmio, llamado postfijación. Estas sustancias se emplean disueltas en soluciones acuosas amortiguadoras isotónicas ajustadas a $\text{pH} = 7.3$, de manera que las acciones que ejerce la solución se deben en parte al aldehído y en parte al solvente. Las soluciones amortiguadoras isotónicas tienen la función de no producir fuerzas osmóticas a través de las membranas biológicas y evitar las alteraciones debidas a cambios bruscos de pH . Al terminar la fijación se retira el aldehído lavando el espécimen varias veces con el amortiguador. La postfijación con tetraóxido de osmio da más estabilidad a la preparación; las membranas se vuelven muy permeables, lo que impide los daños por cambios osmóticos durante los tratamientos subsecuentes. Además el tetraóxido de osmio actúa como agente de contraste uniéndose a proteínas, ácidos nucleicos y principalmente a los lípidos polares de las membranas.
- b) Deshidratación. La deshidratación se realiza con líquidos que se mezclan con el agua celular y al aumentar su concentración la desplazan, hasta sustituirla totalmente. En general se emplea el etanol o la acetona; el primero es un poco mejor deshidratante, pero la segunda es más miscible con los principales medios de inclusión. La deshidratación es una condición necesaria para que el material biológico pueda ser penetrado por una sustancia que se endurezca lo suficiente para ser cortada.
- c) Inclusión. Se empapa la muestra con el monómero de alguna sustancia plástica que pueda polimerizarse en condiciones compatibles con la conservación de las estructuras finas de las células y adquiera la dureza necesaria para ser cortada en secciones de no más de $0.15 \mu\text{m}$ de

espesor. Las sustancias más empleadas son las epóxicas (hidrofóbicas) y las acrílicas (hidrosolubles). Cuando la mezcla está incluida dentro de un bloque cilíndrico o plano de una sustancia sólida que no produce vapor en el vacío, está preparada para el corte y además se ha solucionado definitivamente el problema de la presencia de líquidos.

- d) Corte. Los instrumentos que permiten realizar cortes de espesores entre 30 mm hasta 1 μm se llaman ultramicrotomos. Las cuchillas utilizadas, pueden ser de vidrio o de diamante. Las cuchillas de vidrio se fabrican de vidrio de alta calidad de 6 mm de espesor, y son utilizadas para realizar cortes semifinos (mayores a 1 μm) y las cuchillas de diamante, utilizadas para cortes ultrafinos (menores a 1 μm). Una vez que se tienen los cortes adecuados de la interfase aire-agua, se recogen en un portaobjeto constituido por una rejilla de 3 mm de diámetro.
- e) Contraste. Los compuestos químicos con elementos de elevado número atómico más usados son sales con poca capacidad de ionizarse como el acetato de uranilo y el citrato de plomo. Estos compuestos se unen a las proteínas y a los ácidos nucleicos de las células aún cuando estén incluidas en resinas epóxicas, poliéstericas o acrílicas, por lo que se emplean colocando rejillas con los cortes en contacto con la solución de la sal. Los agentes de contraste penetran por las mallas de polimerización del medio de inclusión sin reaccionar con él. Las coloraciones con acetato de uranilo y citrato de plomo postinclusión, contrastan la mayoría de los componentes celulares, sin manifestar ninguna especificidad.

Capítulo 4

Método Experimental

La muestra utilizada fue un líquen de la especie *Xanthoparmelia subisidiigera* (Fig. 4.1) colectado de rocas cuarzíticas expuestas en una zona urbana en la comunidad de La Rioja, España, en Septiembre de 2004. Cabe mencionar que estas muestras fueron proporcionadas por la Liquenóloga Ana Crespo de la Fac. de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid para este estudio.



Figura 4.1. *Xanthoparmelia subisidiigera*

4.1. Método

La especie de líquen utilizada no presenta una importancia relevante, ya que este método de preparación aplica a cualquier especie. Las muestras de líquen fueron previamente lavadas con agua destilada para eliminar cualquier resto de suelo y polvo posteriormente se lavaron con agua bidestilada.

a) Para MEB ambiental.

En este caso como se utiliza el MEB ambiental, las muestras se preparan fácilmente. Se cortaron muestras de aproximadamente 0.5 cm^2 que se adhirieron al portamuestras de aluminio con una cinta de doble cara de carbón. Las muestras no se recubrieron con ningún elemento conductor.

b) Para MET

Se cortaron pequeñas piezas longitudinales de 2 a 3 mm² que se fijaron a 4°C durante 4 h en solución de glutaraldehído al 3.25% y solución buffer de fosfato de sodio (PBS) al 2.6 %, pH = 7.4, posteriormente se enjuagaron repetidas veces con amortiguador de PBS y se postfijaron en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% durante 2 h. Subsiguientemente las muestras se deshidrataron en soluciones de acetona al 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100 %/ vol con tres cambios de 10 minutos cada una (30 min en cada concentración), excepto el de 100% en el cual se mantuvieron durante 1 hora con seis cambios. A continuación se preincluyeron en mezclas de acetona-resina (Spurr); 2:1 por 16 horas, 1:1 por 3.5 horas, 1:2 por 3.5 horas y finalmente se incluyeron en resina Spurr pura durante 15 horas; se polimerizaron en estufa a 60°C por 24 horas.

De los bloques obtenidos se realizaron cortes ultrafinos de 90 nm de espesor en un ultramicrotomo marca Reichert E y cuchilla de diamante. Estas preparaciones se contrastaron durante 20 minutos con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo al 0.3% durante 5 minutos.

4.2. Equipos

Una vez preparadas las muestras fueron observadas en MEB ambiental a 25 kV y a una presión de 20 Pa, en el modo de electrones retrodispersos. Para estas observaciones se utilizó un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío JEOL JSM 5900 LV (la tabla 4.1 presenta sus principales características), el cual tiene acoplado una sonda de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) marca Oxford.

Tabla 4.1. Características del microscopio electrónico de barrido de bajo vacío

Resolución	Alto vacío: 3.0 nm Bajo vacío: 5.0 nm
Voltaje de aceleración	0.3 a 30 kV
Magnificación	18 a 300,000x
Filamento	Tungsteno
Tamaño máximo del espécimen	7 cm de largo 2 cm de alto
Intercambio de vacío	Automático

Para las observaciones en MET, el equipo utilizado fué un microscopio electrónico de transmisión JEOL - JEM 1011 operado a 100 kV y un JEOL - JEM 2010 operado a 200 kV, con un goniómetro de doble inclinación con $\pm 30^\circ$; equipado con sonda para análisis elemental de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) marca NORAN, con diámetro del haz de 25 nm. En la tabla 4.2 se presentan sus características.

Tabla 4.2 . Características de los microscopios electrónicos de transmisión utilizados

Equipo	Voltaje de aceleración (Kv)	Longitud de onda λ (Å)	Resolución (Å)	C_s (mm)	Magnificación
JEM 1011	40 - 100	0.0370	3.0	0.7	50 - 1,000,000
JEM-2010	80 - 200	0.0251	2.3	0.5	50 - 1,500,000

Capítulo 5

Análisis y Discusión de Resultados

5.1. Microscopía Electrónica de Barrido

La observación de las muestras fue realizada en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío marca JEOL JSM5900-LV. Las muestras fueron observadas a 25 kV, los análisis elementales se realizaron con una sonda de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) marca Oxford. La muestra no se recubrió con ningún material conductor. El modo de operación fue con electrones retrodispersos (con lo cual se evitan las cargas locales en la muestra), ya que se tiene una mejor apreciación de las diferencias químicas por intensidad electrónica de los elementos presentes en las partículas, se obtuvieron imágenes topográficas de contraste en escala de grises de partículas individuales.

Se identificaron partículas y cúmulos de éstas en la superficie del líquen. Se observaron tres formas geométricas predominantes: esféricas, cuadradas e irregulares. Los análisis por EDS se realizaron sobre partículas individuales representativas, se identificaron Ca, Si, O en todas las partículas y específicamente en partículas de geometría cuadrada de tonalidad opaca y tamaños mayores a 5 μm , las cuales podrían ser de origen natural como los suelos. Las partículas esféricas son partículas de tamaño menor a 5 μm de tonalidad brillante y composición química con contenidos metálicos, encontrándose Fe, Al, Si, Mg, Ca, Cu, Zn y Ti en variadas composiciones (como se muestra más adelante). Las partículas irregulares son también partículas menores a 5 μm de tonalidad brillante que presentan contenido metálico, identificándose elementos como: Ti, Ce, Fe, Zn, Cu. A continuación se muestran algunos ejemplos representativos.

La figura 5.1. a) muestra una partícula de geometría esférica brillante en la superficie del líquen a una amplificación de 3000X, con un diámetro de 4.56 μm ; b) espectro de EDS y composición química de la misma, en la cual se identificaron

Fe(35.03%/w), Si(24.41%/w), Al(22.10%/w), Mg(6.0%/w), Ca(4.49%/w), Ti(2.83 %/w), Zn 1.71 %/w), Cu (1.43%/w) y Mn (0.40 %/w).

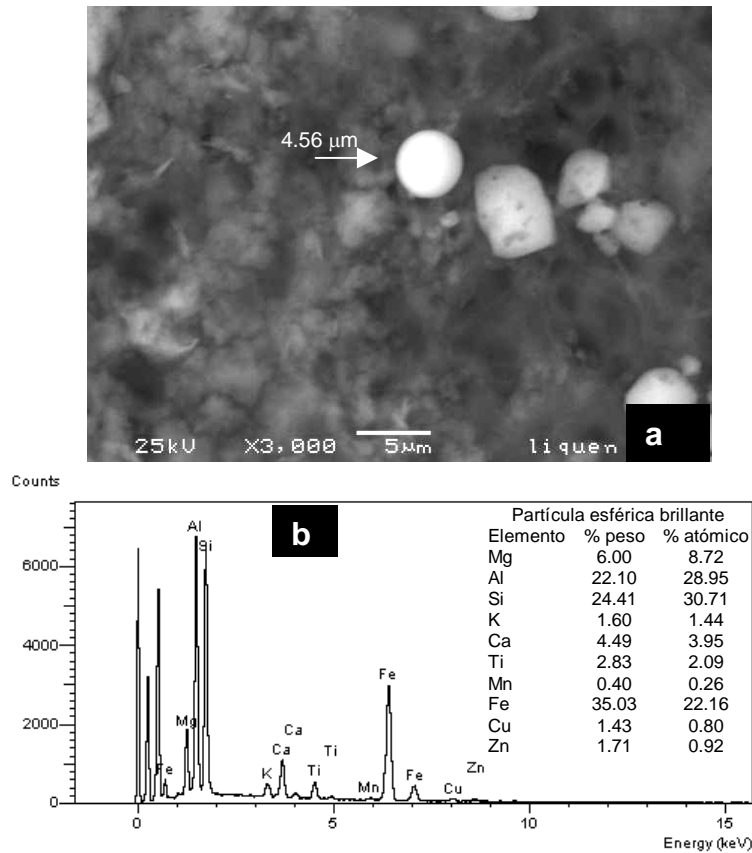


Figura 5.1. a) Partícula esférica brillante (→) con diámetro de 4.56 μm a 3000X, b) espectro de EDS y composición química .

La figura 5.2. a) muestra la micrografía de una partícula de geometría irregular brillante a una amplificación de 2000X de 3.56 μm, en b) se muestra el espectro de EDS y la composición elemental de la misma, donde se identifican los siguientes elementos, Ce(41.99%/w), P(20.95%/w), Ca(15.08%/w), Zn(5.02%/w), Cu(4.58%/w), Si(3.60%/w), Al(3.54%/w), Na(2.31%/w), K(1.83%/w) y Fe(1.1%/w).

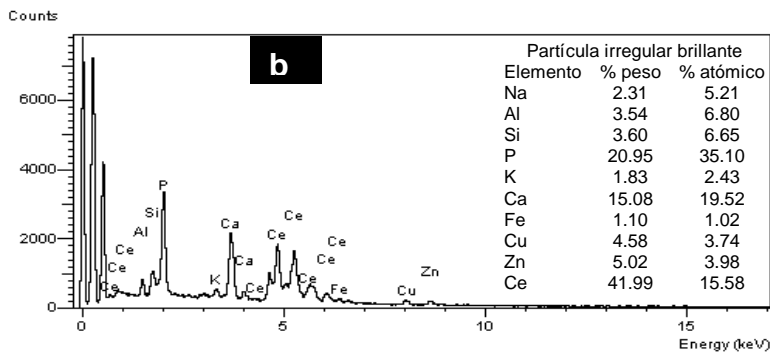
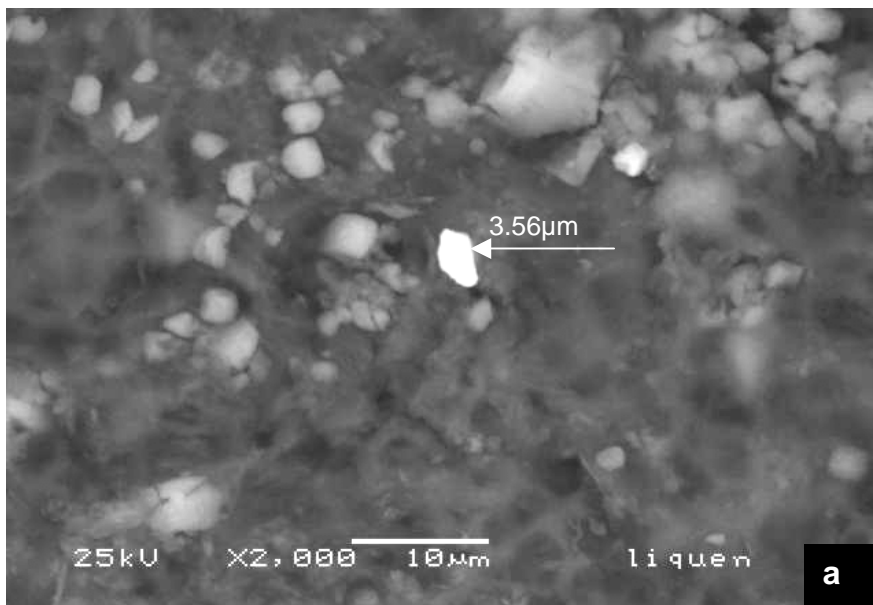


Figura 5.2. a) Partícula brillante de geometría irregular; b) espectro de EDS y composición química.

La micrografía de la figura 5.3 a) muestra gran cantidad de partículas de geometría cuadrada y tonalidades gris oscuro sobre la superficie del liquen a una amplificación de 2000X, nótese que las dimensiones de éstas partículas, en promedio, son mayores a 5 μm , en b) se muestra el espectro de EDS y la composición química de la misma, identificándose Ca(91.84%/w), K(3.54%/w), P(1.35%/w), S(1.26%/w), Si(1.01%/w), y Al(0.99%/w)

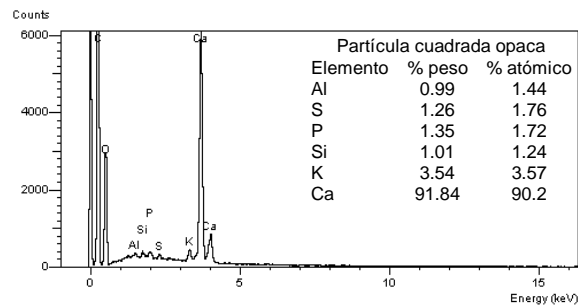
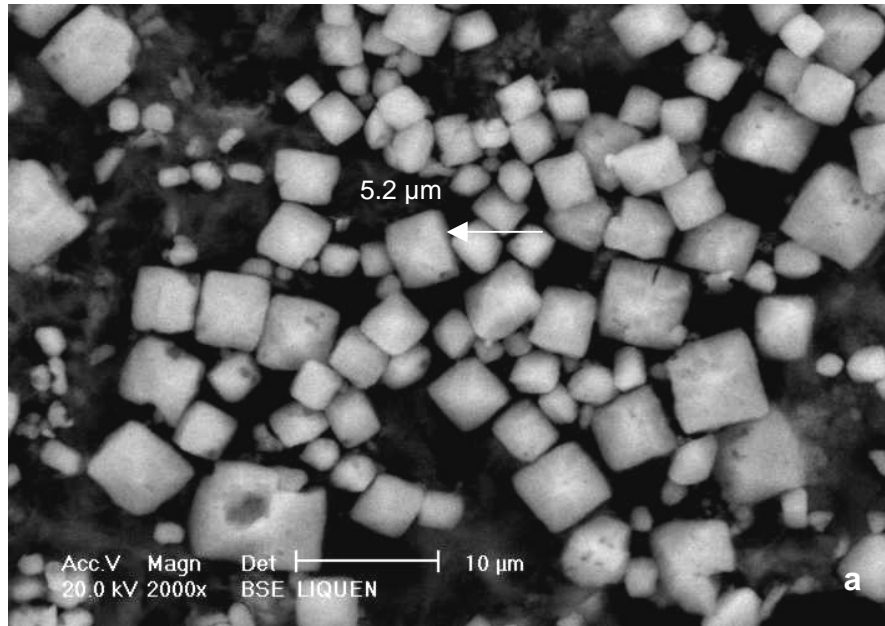


Figura 5.3 .a) Partículas opacas de geometría cuadrada, 2000x, b) espectro de EDS y composición química.

En la micrografía a) de la figura 5.4 es posible apreciar la diferencia de tonalidades en escala de grises de las partículas presentes, ventaja que nos da el utilizar electrones retrodispersos: partículas de geometría irregular brillantes (1) y una de geometría cuadrada opaca (2), resultado de las diferencias químicas de los elementos presentes en cada partícula, También se observa una diferencia sustantiva en cuanto a tamaño de partícula, siendo la partícula brillante de 1.73 μm y la partícula opaca de 5.8 μm , b) muestra el espectro de EDS y la composición de la partícula irregular brillante (1) con un contenido predominantemente metálico, determinándose: Ti (78.88%/w); Ca(9.86%/w), Zn(2.88%/w), Cu(2.67%/w), Si(2.33%/w), Al(1.4%/w), K(1.35%/w), Fe(0.42%/w) y

Cl(0.17%/w); c) muestra el espectro de EDS y la composición de la partícula opaca (2): la composición esta constituida por Ca (90.95%/w) y cantidades menores de Zn(4.25%/w), Cu(3.51%/w) y K(1.29%/w).

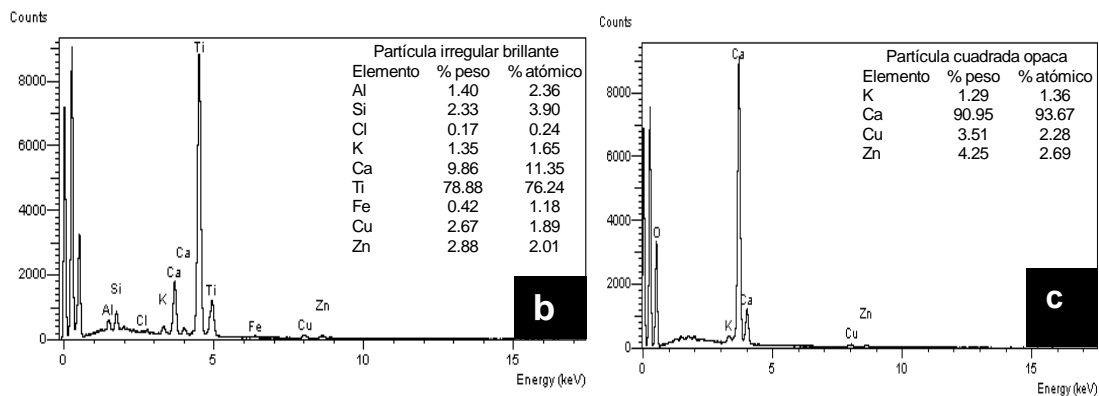
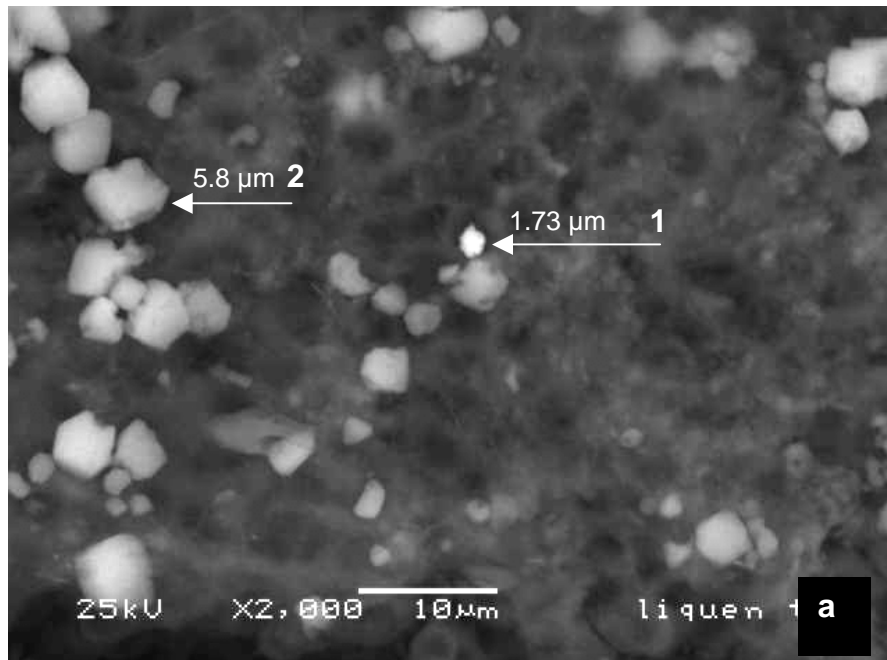


Figura 5.4. a) Micrografía que muestra la diferencia de tonalidades entre los diferentes tipos de partículas (2000X); b) espectro de EDS y análisis elemental de partícula irregular brillante (1); c) espectro de EDS y análisis elemental de partícula cuadrada opaca (2).

En el corte transversal ya no se observan geometrías definidas, se encuentran partículas de geometría irregular difundidas en la estructura de la muestra, las cuales tienen un tamaño menor a $5\ \mu\text{m}$ y composición química variada, encontrándose las partículas con contenidos metálicos de elementos como Fe, Cu, Zn en algunos casos trazas de Ni, Cr y Mn, así como partículas con concentraciones de Ca y Si predominantes. A continuación se muestran algunos ejemplos representativos. La figura 5.5 muestra la micrografía obtenida a una amplificación de 850 X, del corte transversal del líquen, la cual tiene un ancho de 1.4 mm, donde se observa la presencia de partículas difundidas dentro de la estructura interna

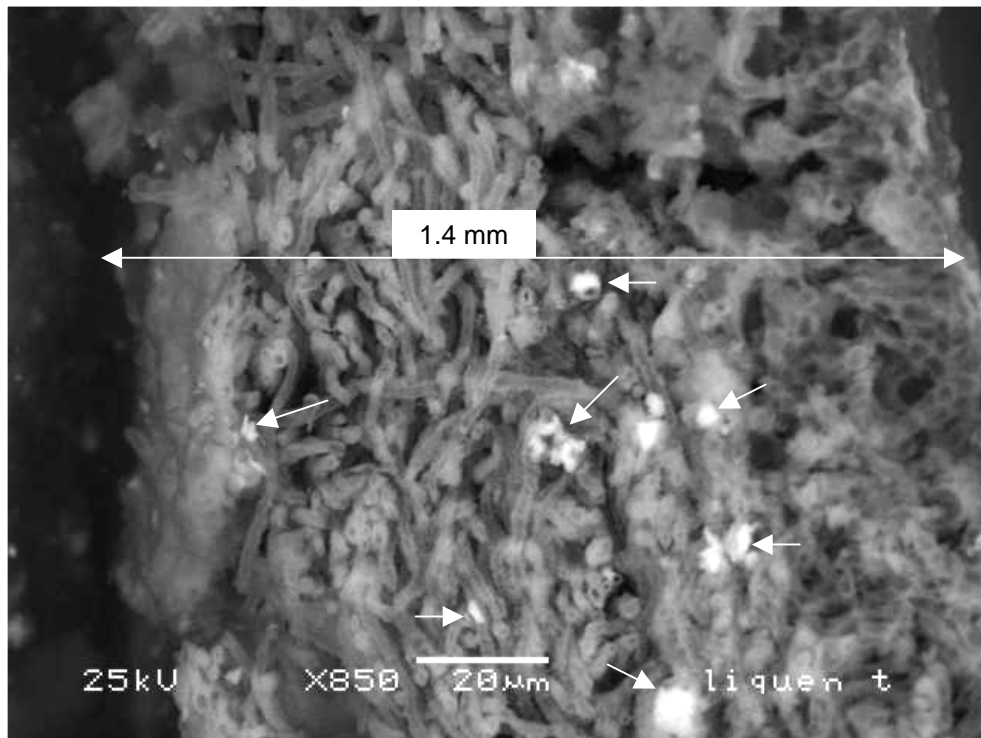


Figura 5.5. Corte transversal del líquen Xanthoparmelia subsidigera

La micrografía a) de la figura 5.6 muestra un corte transversal del líquen a 5000X se observa una partícula de geometría irregular brillante de $2.7\ \mu\text{m}$ cuyo análisis elemental y espectro de EDS, b) muestra un gran contenido de Cu(51.99%/w),

Zn(43.6%/w) y porcentajes menores de Ca(2.06%/w), Al(0.96%/w), Si(0.64%/w), K(0.43%/w) y S(0.32%/w).

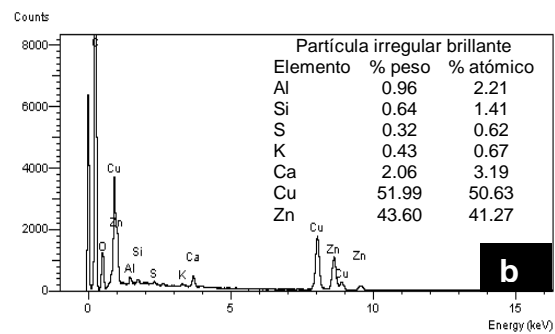
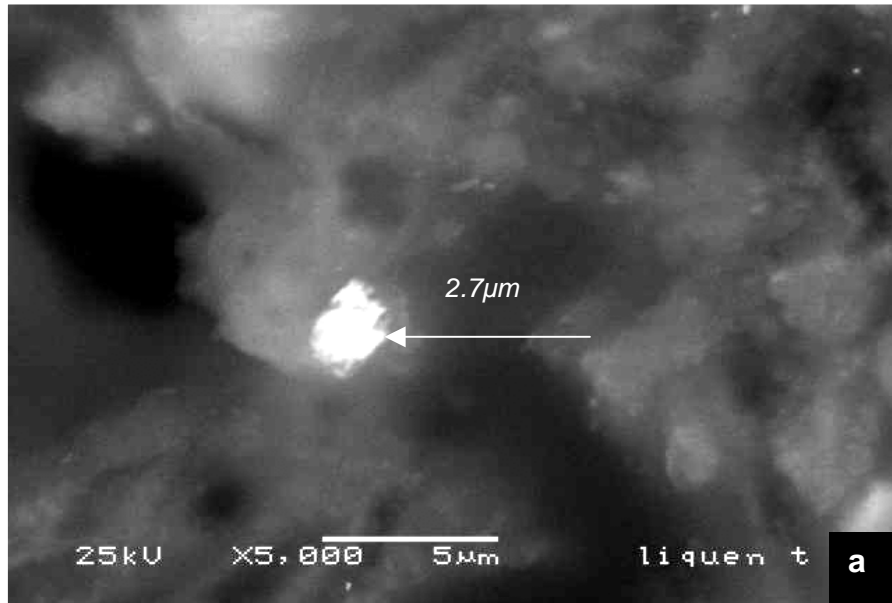


Figura 5.6. a) micrografía del corte transversal del liquen a 5000X donde se observa una partícula irregular brillante; b) espectro de EDS y análisis elemental.

La figura 5.7 a) muestra la partícula de geometría irregular difundidas en el liquen a una amplificación de 5000X de 2.84 μm ; b) muestra el espectro de EDS y el análisis elemental, la cual esta constituida principalmente por S(31.24%/w),

Ca(35.2%/w), K(28.1%/w) y trazas de P(1.69%/w), Al(0.96%/w), Si(0.94%/w), Na(0.85%/w) y Mg(0.64%/w).

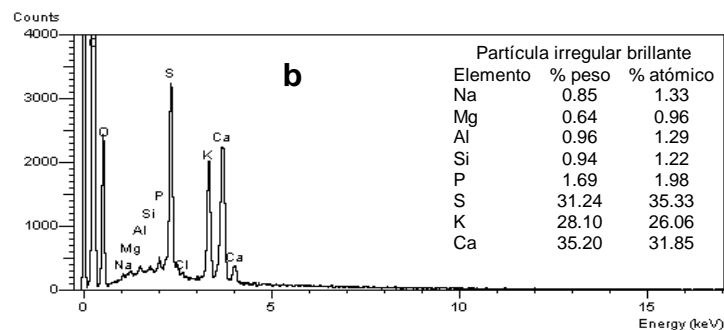
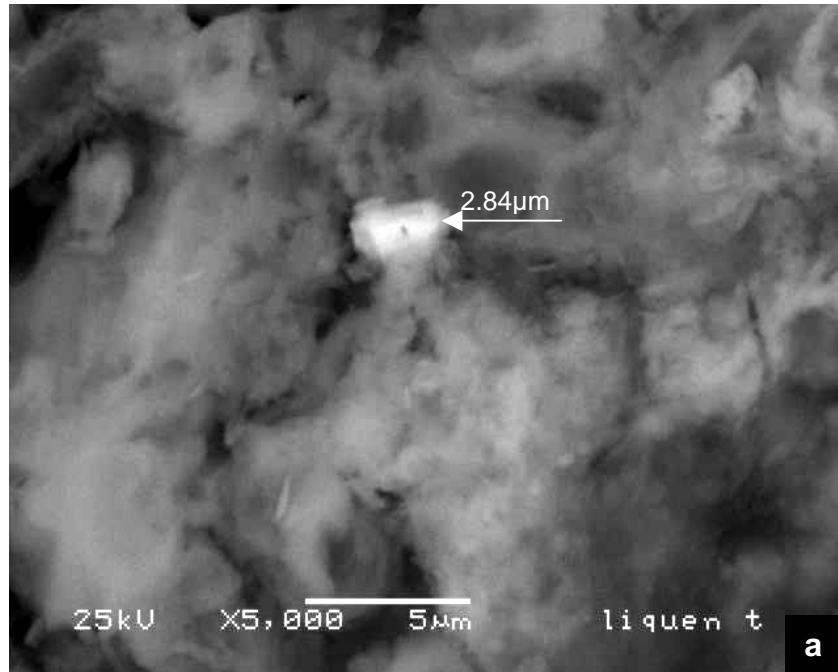


Figura 5.7. a) Micrografía de corte transversal, 5000X, b) Espectro de EDS y análisis elemental de la partícula irregular brillante cuyo diámetro es de 2.84 μm

La figura 5.8 a) muestra, la parte constituida por las hifas del hongo, una micrografía a una amplificación de 1000X, donde se observa claramente que las partículas se encuentran difundidas dentro de esta estructura, b) nos muestra una

amplificación de la zona punteada, a 2000X; c) nos muestra el análisis elemental por EDS de la partícula analizada, la cual está constituida principalmente por Ca (91.84%/w) además de K(3.54%/w), así como P(1.35%/w), Si(1.26%/w), S(1.01%/w) y Al(0.99%/w).

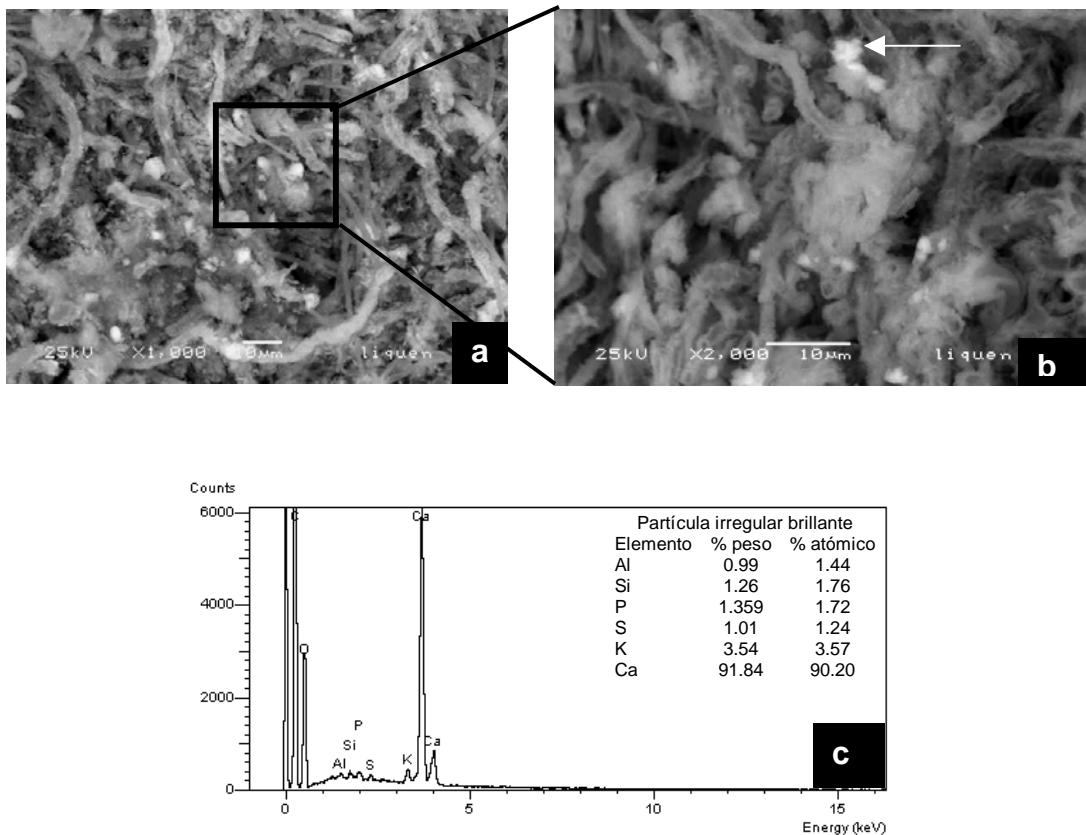


Figura 5.8 a) Micrografía de corte transversal del liquen, b) amplificación a 2000X de la zona del recuadro, c) espectro de EDS y análisis elemental de la partícula irregular opaca

La figura 5.9 a) presenta la micrografía del corte transversal del liquen, se observa una partícula irregular brillante a una amplificación de 7000X, con una longitud de 1.3µm, b) se presenta el espectro y análisis elemental por EDS hallándose gran

cantidad de Fe(45.01%/w), Ca(11.12%/w), Cr(9.76%/w), K(8.36%/w), Al(4.19%/w), Ni(7.71%/w), P(2.91%/w), S(2.88%/w), Si(2.08%/w), Cl(2.08%/w) Mg(1.96%/w), y Mn(1.93%/w).

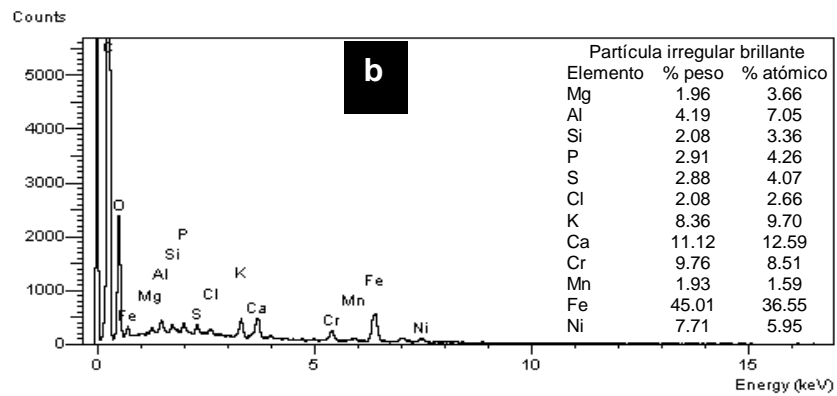
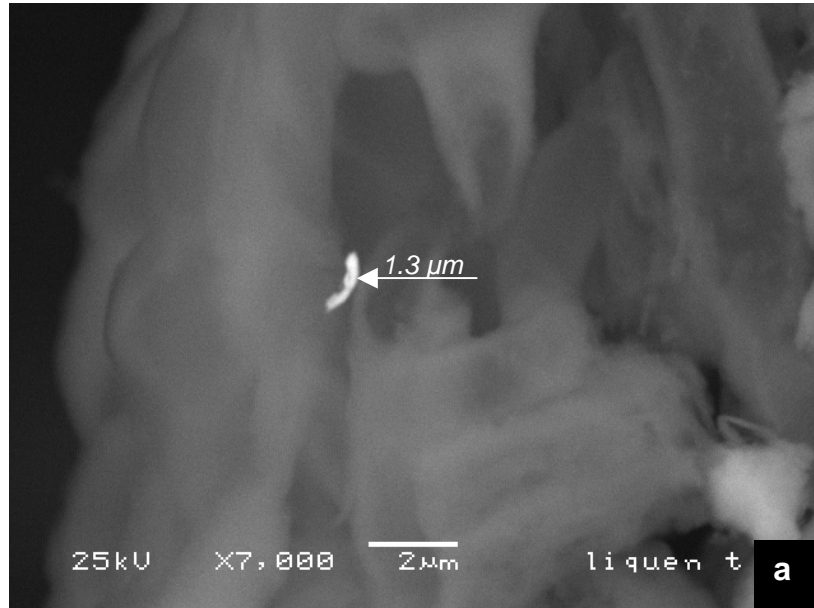


Figura 5.9. a) Micrografía del corte transversal del líquen (7000X), b) análisis elemental y espectro de una partícula irregular brillante

5.2. Distribución de tamaños

Un parámetro importante a medir en lo que respecta a la contaminación del aire es el material particulado menor a 10 micras (PM10), el tamaño es un parámetro muy importante para caracterizar su comportamiento, ya que de él depende la capacidad de penetración y retención en diversas regiones de las vías respiratorias; también determina su tiempo de residencia en la atmósfera y por ende la concentración a la que puede estar expuesta la población. Para llevar a cabo ésta tarea se realizaron micrografías de MEB en la superficie del líquen y con

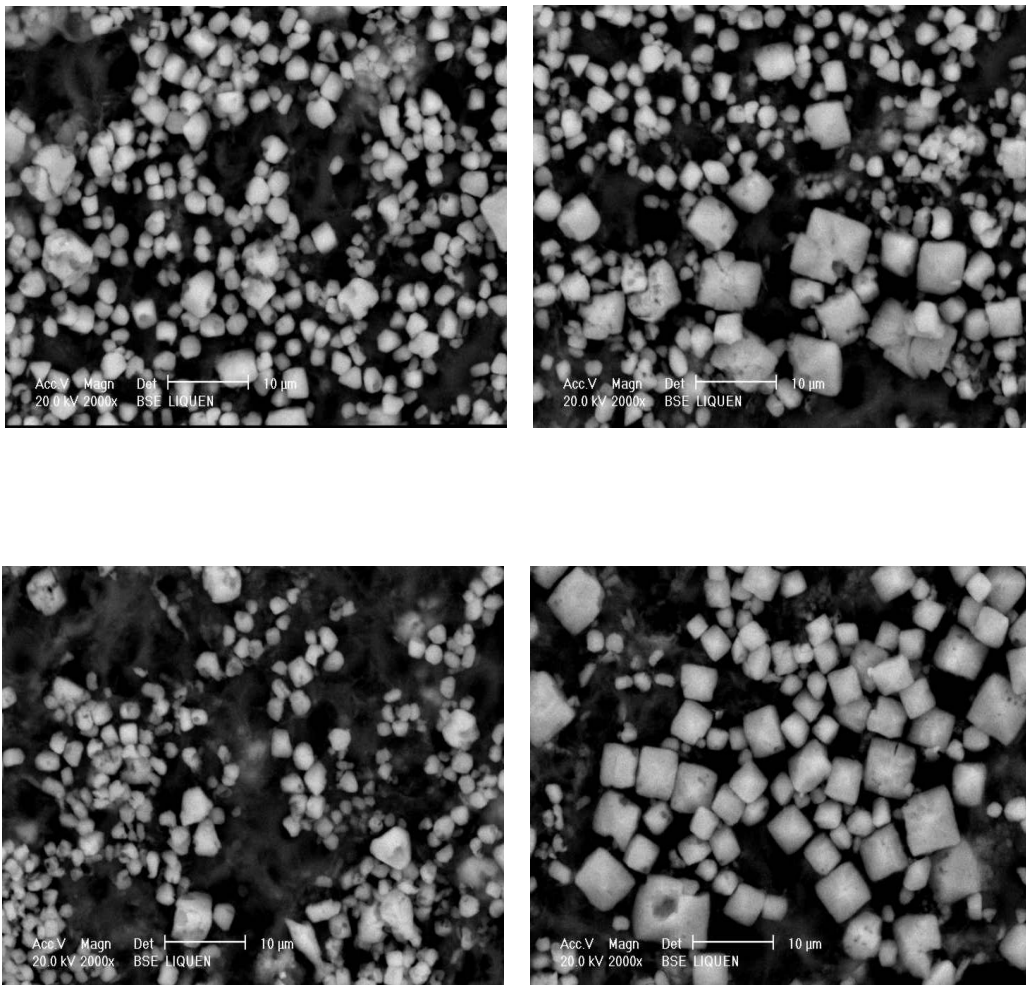
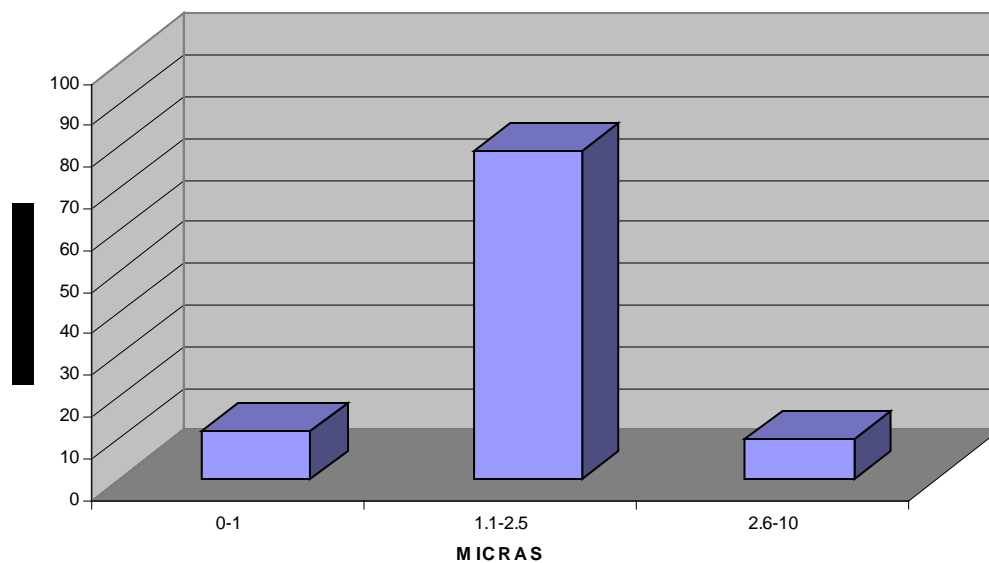


Figura 5.10. Micrografías a 2000 x de diferente zonas superficiales del líquen, las partículas observadas son de diferente geometría y composición química .

las cuales se analizaron 2000 partículas en diferentes zonas de la muestra. Se utilizó la técnica de micrografía en negativo, utilizando el programa Microsoft Photo Editor. Las mediciones se llevaron a cabo con el programa CRISP. Posteriormente se realizó la evaluación de las mismas.

Las micrografías de la figura 5.10 son ejemplos de las partículas encontradas en la muestra, las cuales muestran la diversidad de tamaños presentes, y la gráfica 5.1 muestra la distribución de tamaños. En la gráfica 5.1 es posible observar los resultados de este análisis mostrando que el 11.3% son menores a 1 μm , pertenecientes a la fracción ultrafina; el 79% entre 1.1 y 2.5 μm , pertenecientes a la fracción fina; el 9.7% entre 2.6 y 10 μm pertenecientes a la fracción gruesa. Siendo las partículas finas que van de 1.1 a 2.5 μm las más abundantes posiblemente debidas a las emisiones vehiculares en la zona de muestreo.



Gráfica 5.1. Distribución de tamaños de material particulado, dividida en fracción ultrafina $<1\mu\text{m}$; fracción fina $>1-2.5\mu\text{m}$; fracción gruesa $>2.5-10\mu\text{m}$

5.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

El análisis por microscopía electrónica de transmisión se llevó a cabo en un Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL 1010, con voltaje de aceleración de 100 keV. El objetivo principal de utilizar primero este microscopio fue localizar las zonas donde posiblemente se ubicaran los sitios de almacenamiento de partículas, y así poder preservar las estructuras. Posteriormente se utilizó el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010, con voltaje de aceleración de 200 kV, equipado con sonda para análisis elemental cualitativo de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) marca Noran.

El análisis por MET proporcionó información relevante acerca de la estructura celular de la *Xanthoparmelia subisidiigera* ya que se comprueba que existe una incorporación de las partículas dentro de ésta. Se lograron identificar cúmulos de partículas de tamaño nanométrico en zonas de la pared y membrana celular. Por EDS se identificaron elementos como Fe, Ti, Si, Ca, Cu y en algunos casos trazas de Zr, Cl, S, K, P, Al, y Mg; mediciones realizadas en las micrografías, muestran que el tamaño de éstas varía entre 10 y 61 nm.

A continuación se muestran algunos ejemplos de estas observaciones:

En la figura 5.11 a) se muestra la micrografía del corte transversal del líquen a una amplificación de 250X aumentos, de aproximadamente 90 nanómetros de espesor y el ancho de la muestra es de 1.3 μm , la cual se encuentra colocada en una rejilla de 3 mm de diámetro de 200 mesh. Se pueden apreciar claramente, la zona ocupada por el alga y la zona del hongo. En las micrografías b), c) y d) se muestran diversas zonas de la muestra, en las cuales se puede observar que las estructuras celulares están bien conservadas por el método de preparación seguido.

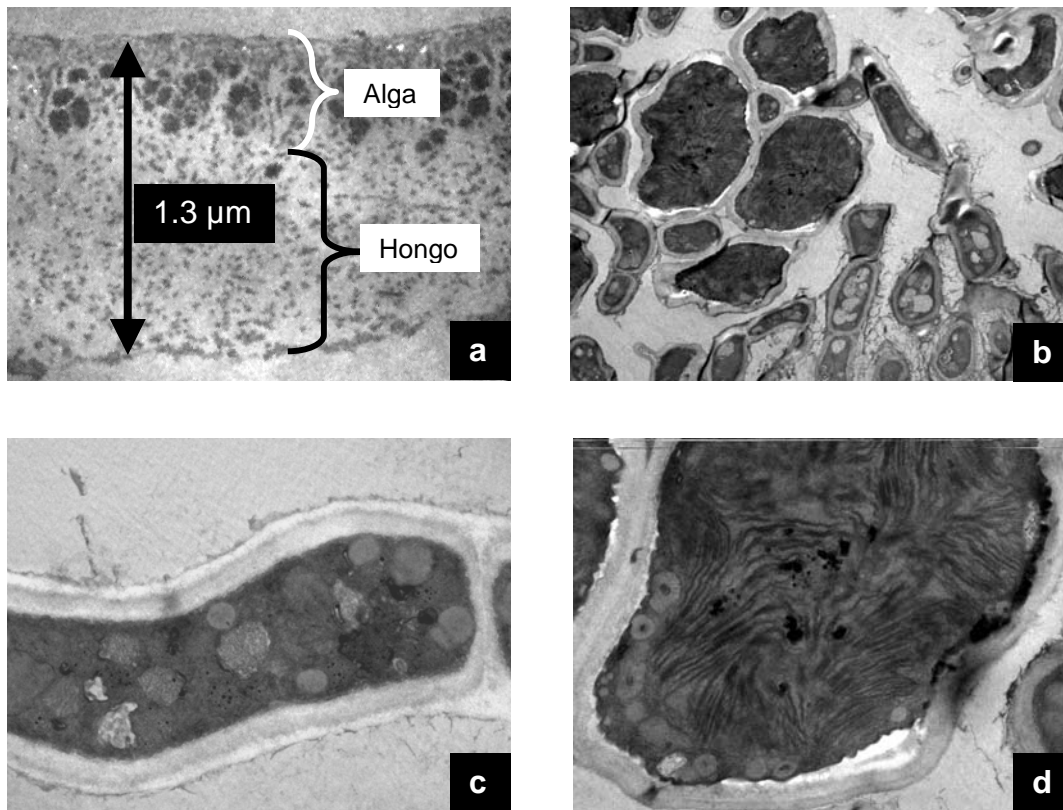


Figura 5.11. Micrografía de MET, se presentan diferentes zonas del líquen *Xanthoparmelia subsidiigera*.

La figura 5.12 a) muestra una micrografía a 25,000X aumentos, donde se pueden observar las estructuras celulares y una gran cantidad de partículas oscuras dentro de la pared celular y otras adheridas a la superficie de la misma. La micrografía b) es una amplificación de la imagen anterior la cual muestra el área encerrada en el recuadro a 100,000X aumentos, donde se muestra una variedad de partículas nanométricas de tonalidad oscura, éstas partículas miden de 15 a 61 nm. Al no ser posible obtener patrones de difracción electrónica de las partículas por el tamaño fino de sus cristales y la inestabilidad de la muestra a altas amplificaciones, se realizó el análisis elemental cualitativo por EDS, c) muestra el espectro de dichas partículas, el tamaño del haz para el análisis elemental es de un área de 25 nm^2 , de estos resultados se determina la presencia

de Mg, Al, Si, Pb, K, Fe y Cu. Se identifica el pico de Pb que fue utilizado como medio de contraste.

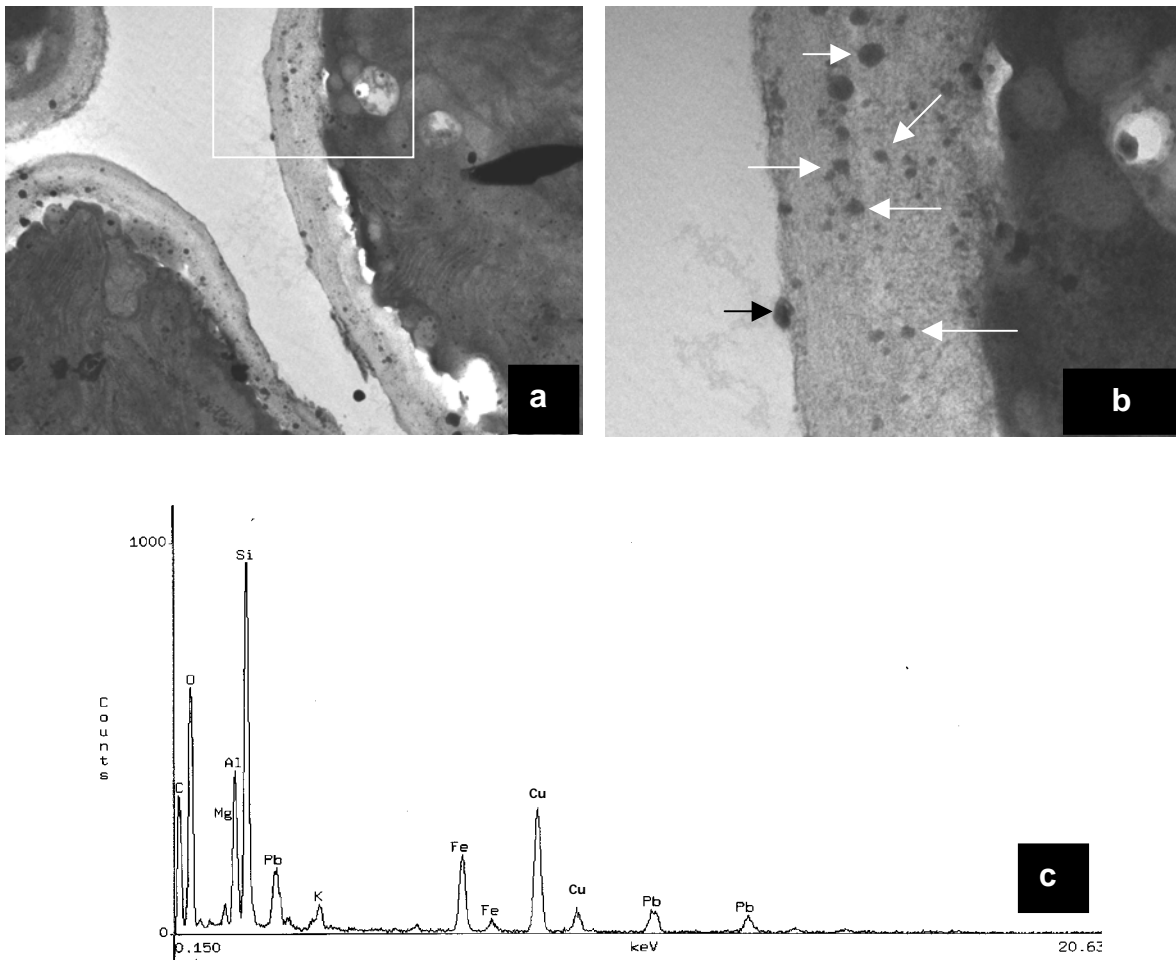


Figura 5.12. Micrografías de MET, a) 25,000x, b) 100,000x, c) Espectro de EDS de partículas oscuras en un área de 25nm^2 .

La figura 5.13 a) muestra la micrografía de la pared celular a 6000X aumentos; donde se localiza gran cantidad de cúmulos de partículas; b) muestra la amplificación del área del círculo mostrada en a) de uno de los cúmulos a 100,000X aumentos, donde se localizan partículas de diversos tamaños (partículas oscuras), las cuales tienen diámetros entre 9.1 y 1.8 nm; c) muestra el espectro de EDS de las partículas acotadas por el círculo con la letra i) en la micrografía b) donde se localizan metales como Ti, Cr Cu y Si. También se identifican los picos de U y Pb que fueron utilizados como medios de contraste; en

d) se presenta el espectro de EDS de las partículas acotadas con la letra ii) en la micrografía b), en la cual se identifican Si, Zr, Cr, Fe y Cu.

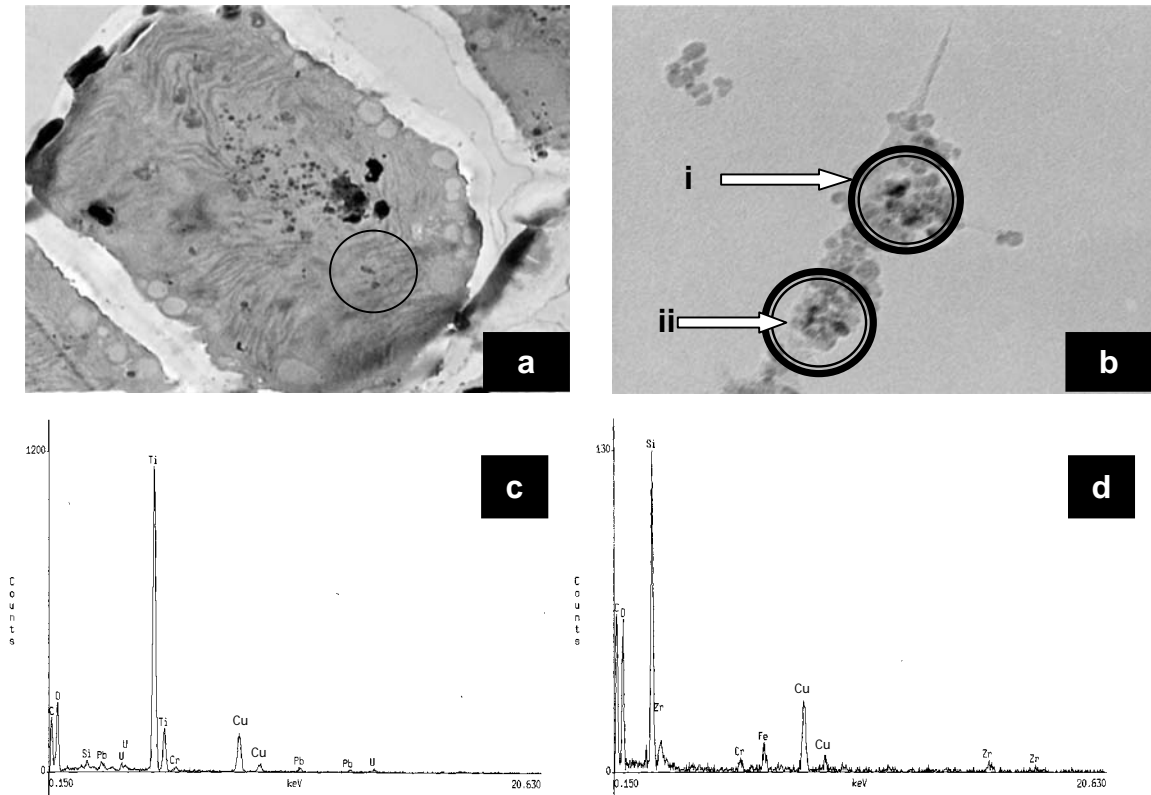


Figura 5.13. Micrografías de MET de la estructura celular; a) 6000x, b) 100,000x en cuyo interior se observan partículas oscuras entre 9.1 a 18.2 nm de diámetro; c) y d) espectros de EDS correspondientes a las partículas señaladas con i) y ii).

La figura 5.14 a) muestra la micrografía de la estructura celular a 15,000X aumentos, se pueden apreciar gran cantidad de cúmulos oscuros, b) muestra la misma región que a), aumentada a 20,000X se pueden observar las cúmulos dentro del interior de la célula; una amplificación mayor permitió distinguir una serie de aglomerados dentro de la estructura celular, micrografías c) y d), a 50,000X donde se hallan las partículas nanométricas de 35 y 17.5 nm de diámetro

respectivamente. Los espectros de EDS c') muestra el análisis elemental de la partícula de la micrografía c) en donde se identifican Ti, Cu, Cr, Cl y Si, en el espectro d') muestra el análisis elemental de la partícula de la micrografía d), en donde se identifican Cu, Fe, Si, Cl, S y Ti. En ambos espectros se identifica el pico correspondiente a Pb que se adiciono a la muestra como medio de contraste.

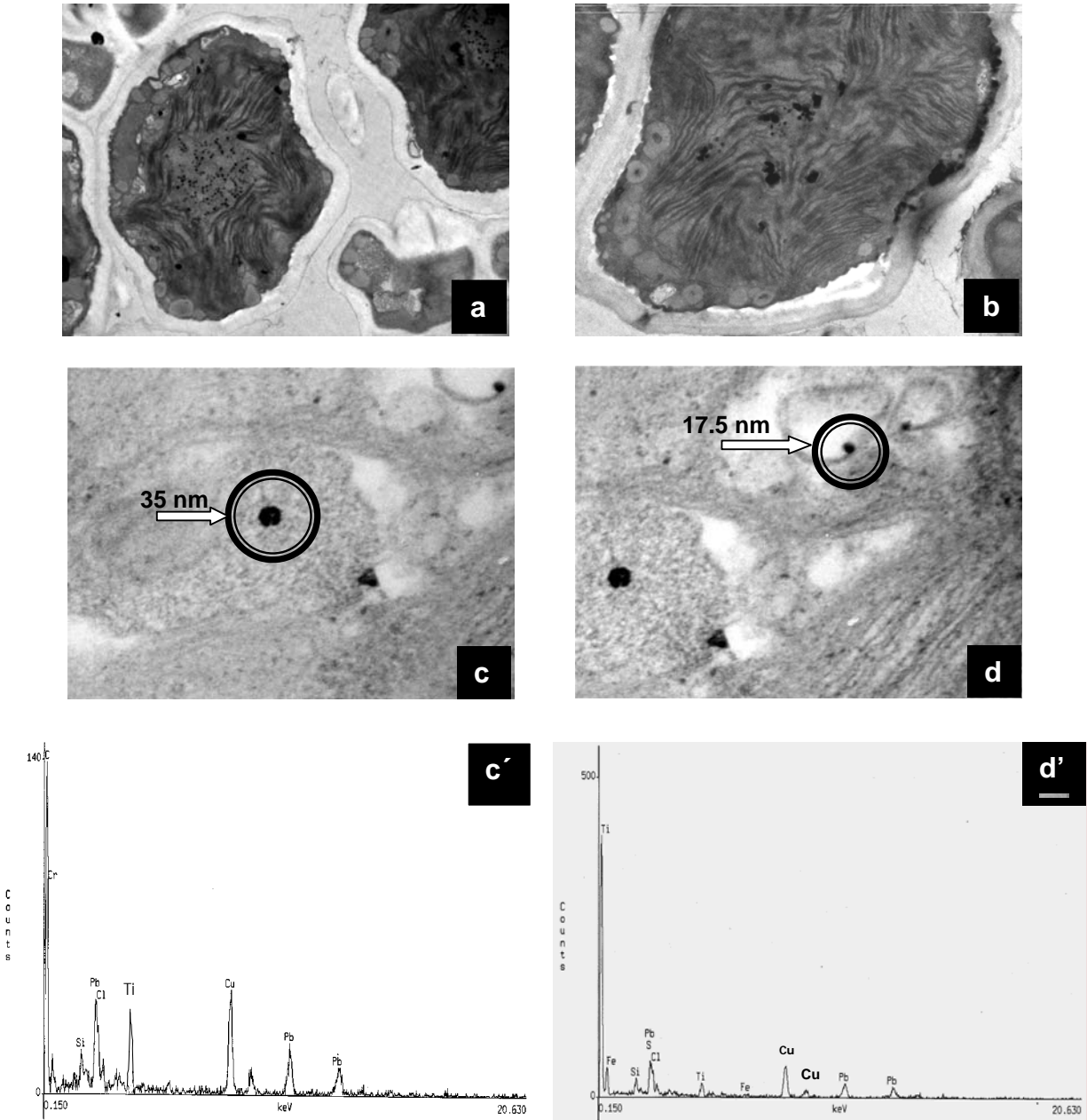


Figura 5.14. Micrografías de estructura celular, a) 15,000X, b) 20,000X, c) y d) 50,000X. Espectros de EDS de las partículas oscuras(c' y d') en el interior de la célula.

La figura 5.15 muestra las micrografías a) y c) a 80,000x aumentos donde se observan pequeños cúmulos de partículas de tamaño nanométrico dispersos en el interior de la célula, cuyos diámetros son 52.3 y 19.7 nm respectivamente; b) muestra el análisis elemental por EDS de la partícula en la micrografía a), identificándose Fe, Cu, Si, P y Cl, además Pb que fue adicionado como contraste; d) análisis elemental por EDS de la partícula señalada en la micrografía c) en el cual se identifica: Ti, Cu, Ca y Si, lo que hace evidente que hay una incorporación de metales dentro de la estructura celular del líquen.

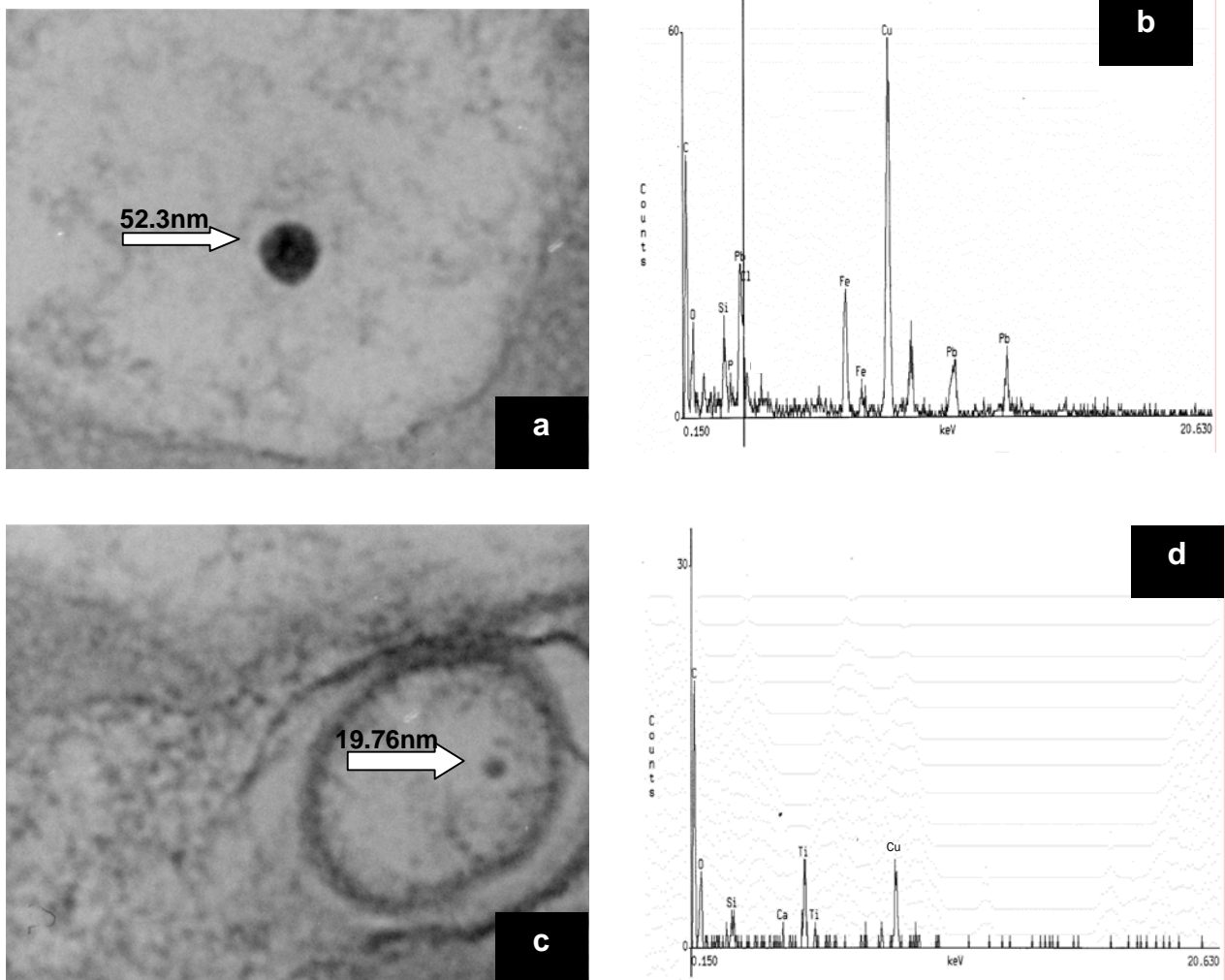


Fig. 5.15 a) y c) micrografías a 80,000X de partículas oscuras en el interior de la célula, cuyos diámetros son 52.3 y 19.7 nm. b) y d) análisis elemental por EDS correspondientes cuyo resultado obtenido refleja la acumulación de metales en la célula.

Conclusiones

El trabajo presentado contiene las investigaciones realizadas en la caracterización de material particulado depositado en la especie del líquen *Xanthoparmelia subisidiigera*. Concretamente se planteó caracterizar las partículas depositadas en la superficie de la muestra (conocer su morfología, composición química y tamaño), así como conocer si existe incorporación de estas partículas en la estructura celular de la muestra, utilizando como técnicas de caracterización microscopía electrónica de barrido y transmisión. El estudio muestra la capacidad de la *Xanthoparmelia subisidiigera* para la acumulación y retención de partículas con contenidos metálicos de la atmósfera.

Los resultados obtenidos se pueden resumir de la manera siguiente:

1. Se encuentran partículas depositadas en la superficie de la muestra presentando una composición química metálica con morfología definida, ya sea esférica, cuadrada e irregular, se identifican Ca, Si, y O en todas las partículas y específicamente como elementos mayoritarios en partículas de geometría cuadrada. Las partículas de geometría esférica e irregular presentan contenidos metálicos, identificándose elementos como Fe, Al, Si, Mg, Cu Zn y Ti
2. En el corte transversal desaparecen las geometrías definidas y se encuentran únicamente partículas de geometría irregular, de tamaños menores a 5 μm difundidas dentro de la muestra y composición química variada, encontrándose partículas con contenidos metálicos de elementos como Fe, Cu, Zn en algunos casos trazas de Ni, Cr y Mn, así como partículas con concentraciones de Ca y Si predominantes.
3. Del análisis de distribución de tamaño de partículas localizadas en la superficie de la muestra se encuentra que el 9.7% tienen un tamaño de 2.6 y 10 μm , el 79% tiene un tamaño entre 1.1 y 2.5 μm , y el 11.3 % son menores a 1 μm , por lo que estas partículas representan un alto riesgo de

toxicidad, ya que las partículas menor o iguales a $2.5 \mu\text{m}$ penetran fácilmente en el organismo humano.

4. Mediante el análisis por MET se lograron identificar cúmulos de partículas de tamaños nanométricos en zonas de la pared y membrana celular del líquen, identificándose elementos como Fe, Ti, Si, Ca, Cu, y en algunos casos trazas de Cl, S, K, Al y Mg, observándose coincidencia con los elementos encontrados en la superficie y corte transversal, lo que sugiere que existe una incorporación de éstos en la estructura celular de la muestra, mediciones realizadas en las micrografías, muestran que el tamaño de éstas varía entre 15 y 61nm.

Este estudio permite caracterizar satisfactoriamente material particulado de la contaminación ambiental, utilizando microscopía electrónica y de esta manera se contribuye en la investigación y estudio sobre los efectos de ésta en la salud humana.

Bibliografía

1. Banco Mundial (1996).. Desarrollo y medio ambiente, Informe sobre el desarrollo mundial. Ciencia de la tierra y medio ambiente, Washington D. C, Author.
2. Butterworth, Frank M., Corkum, Lynda D., Guzmán Rincón J., Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental change, Plenum Press, New York, 1995.
3. Caselli, Maurizio, La Contaminación Atmosférica, Causa y Fuentes. Efectos sobre el clima , la vegetación y los animales, Editorial siglo XXI, 1998, 5ª Edición.
4. Correa García, Armando, Contaminantes atmosféricos en la zona metropolitana de la Ciudad de México, Edición UAM-IPN, México 2004.
5. Chamberlain, A. C., 1970. Deposition and uptake by Cuttle of airborne particles. Nature 225, 99-100.
6. Díaz Carretero, I., Landa Cánovas, A. R., Otero-Díaz, L. C., Técnicas de Análisis y Caracterización de Materiales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España, 2002.
7. Durán y Pascual, Los hongos, algas y líquenes, FAPA Ediciones, España, 1997.
8. Edington, J. W., Electron Diffraction in the electron microscope, Phillips Technical library, Monographs in practical electron microscopy in materials science, Germany, 1974.
9. Falcón Barcenás, T., Estudios de los granulos de Lacandonia durante la

mitosis por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), Tesis de Maestría, Fac. de Ciencias, UNAM, México 2002.

10. Falcón , Y., "Contaminación atmosférica de origen fotoquímico", Ciencia y Desarrollo 15(88); 67-73, México 1989.

11. Farango, M.E., Mehra, A.,(1992). Metal compounds in environment and life, Merian, E., Haerdi, W., 4.Interrelation between Chemistry and Biology (pp163-169). Northwood, Science and Technology letters.

12. Hayat, M. A., Basic techniques for Transmission Electron Microscopy, Academic Press Inc, London 1986.

13. José Yacamán, M., Reyes Gasga, J., Microscopía Electrónica, Una visión del microcosmos. Fondo de Cultura Económica, México 1995.

14. Hicks, B. B., Hosker, R. P., Meyers, T. P., Womack, J. D. (1991). Dry deposition interferential measurement techniques. I. Design and tests of a prototype meteorological and chemical system for determining dry deposition. Atmospheric Environment 25A, pp. 2345-2359.

15. Landa-Cánovas, Á. R., Otero-Díaz, L. C., Difracción de electrones en el microscopio electrónico. I Modo Convencional. Consejo Superior de investigaciones Científicas, Madrid, España, 2000.

16. Marcano, J.E. Educación ambiental en la República Dominicana. Documento: <http://www.jmarcano.com/index.html>

17. Market, Bernd, Instrumental element and Multielemental analysis of plant samples, Methods and applications. John Wiley and Sons, England, 1996.

18. Rossbach, M., Jayasekera, R., Kniewald G., Large scale air monitoring: biological indicators versus air particulate matter, IEAE, technical document 1152.

19. Sánchez-Vélez, A., García-Núñez, R. M. Biomonitoreo de ríos en la gestión de cuencas; una aproximación introductoria, IX Congreso Nacional de Irrigación. Simposio 4 Manejo Integral de Cuencas Hidrológicas, Octubre 1999.

20. Vázquez Nin, Gerardo, Echeverría Olga, Introducción a la Microscopía Electrónica aplicada a las Ciencias Biológicas, Fondo de Cultura Económica, México, 2000.

21. Williams, David B, Carter C. Barry, Transmission Electron Microscopy Plenum Press, New York, 1996.

22. Wolterbeek, H. T., Garty, J., Reis, M.A. and Freitas, M. C. Biomonitors in use: lichens and metal air pollution, Bioindicators and biomonitors, B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, editors, Elsevier science 2002.

Índice de Tablas y Figuras

Tablas		Página
Tabla 1.1	Contaminantes naturales del aire	6
Tabla 1.2	Principales focos antropogénicos de emisiones primarias	6
Tabla 1.3	Focos de emisión	7
Tabla 1.4	Principales contaminantes atmosféricos, características, fuentes y efectos sobre la salud	16
Tabla 4.1	Características del microscopio electrónico de barrido de bajo vacío	43
Tabla 4.2	Características de los microscopios electrónicos de transmisión utilizados	43
Figuras		
Figura 1.1	Vehículos automotores. Contaminantes de tipo antropogénico	5
Figura 1.2	Principales fuentes primarias de contaminación ambiental	5
Figura 2.1	Diversas especies de líquen son usadas como biomonitores. Heterodermia pseudospediosa	17
Figura 2.2	Tabla periódica de los elementos con indicaciones en los elementos que son esenciales y aquellos que han sido determinados cuantitativamente en las plantas	19
Figura 2.3	Detalle del corte transversal de un líquen, se aprecia la zona ocupada por las algas y la zona ocupada por las hifas del hongo	21
Figura 3.1	Representación esquemática del concepto de resolución Δr	25
Figura 3.2	Diagrama en el cual se muestra en la parte izquierda la trayectoria de los rayos en un microscopio óptico. A la derecha se representa en forma rectilínea, muy simplificada, la trayectoria de los electrones en un	28

	microscopio electrónico de transmisión	
Figura 3.3	Tipos de señales que se producen durante la interacción del haz electrónico con la muestra	29
Figura 3.4	Patrón de difracción electrónico de un material monocristalino	30
Figura 3.5	Los rayos X emitidos por la muestra se pueden caracterizar analizando sus energías o sus longitudes de onda. El espectrómetro más empleado para la resolución de problemas biológicos es el de dispersión de energía	32
Figura 3.6	Ilustración de la penetración de electrones secundarios y retrodispersos dentro de la muestra en un MEB	34
Figura 4.1	<i>Xanthoparmelia Subisidiigera</i>	41
Figura 5.1	a) Partícula esférica brillante (→) con diámetro de 4.56 μm a 3000X, b) espectro de EDS y composición química	45
Figura 5.2	a) Partícula brillante de geometría irregular; b) espectro de EDS y composición química	46
Figura 5.3	a) Partículas opacas de geometría cuadrada, 2000X, b) espectro de EDS y composición química	47
Figura 5.4	Micrografía que muestra la diferencia de tonalidades entre los diferentes tipos de partículas (2000X); b) espectro de EDS y análisis elemental de partícula irregular brillante (1); c) espectro de EDS y análisis elemental de partícula cuadrada opaca (2)	48
Figura 5.5	Corte transversal del líquen <i>Xanthoparmelia subisidiigera</i>	49
Figura 5.6	a) Micrografía del corte transversal del líquen a 5000X donde se observa una partícula irregular brillante; b) espectro de EDS y análisis elemental	50
Figura 5.7	a) Micrografía de corte transversal, 5000X, b) espectro de EDS y análisis elemental de la partícula irregular brillante cuyo diámetro es de 2.84 μm	51
Figura 5.8	a) Micrografía de corte transversal del líquen; b) espectro de EDS y análisis elemental	52

	amplificación a 2000X de la zona del recuadro; c) espectro de EDS y análisis elemental de partícula irregular opaca	
Figura 5.9	a) Micrografía del corte transversal del líquen (7000X), b) análisis elemental y espectro de una partícula irregular brillante	53
Figura 5.10	Micrografías a 2000X de diferentes zonas superficiales del líquen, las partículas observadas son de diferente geometría y composición química	54
Figura 5.11	Micrografía de MET, se presentan diferentes zonas del líquen <i>Xanthoparmelia subisidiigera</i>	57
Figura 5.12	Micrografías de MET, a) 25,000X, b) 100,000X, c) Espectro de EDS de partículas oscuras en un área de 25nm ²	58
Figura 5.13	Micrografías de MET de la estructura celular , a) 6000X, b) 100,000X en cuyo interior se observan partículas entre 9.1 a 18.2 nm de diámetro; c) y d) espectros de EDS correspondientes a las partículas señaladas con i) y ii)	59
Figura 5.14	Micrografías de estructura celular, a) 15,000X, b) 20,000X, c) y d) 50,000X. c')y d') espectros de EDS de las partículas oscuras en el interior de la célula	60
Figura 5.15	a) y c) micrografías a 80,000X de partículas oscuras en el interior de la célula, cuyos diámetros son 52.3 y 19.7 nm, b) y d) análisis elemental por EDS correspondientes cuyo resultado obtenido refleja la acumulación de metales en la célula	61
Gráficas		
Grafica 5.1	Distribución de tamaños de material particulado, dividida en fracción ultrafina <1 µm; fracción fina >1- 2.5 µm; fracción gruesa > 2.5 – 10 µm	55