



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA EXTRACCIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP) EN LA LECHUGA
TIPO ITALIANA Y SANGRÍA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
CABRERA GUZMÁN LEONARDO



MÉXICO, D.F.,

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente	Prof. ERNESTINA CERVERA FLORES
Vocal	Prof. MA. DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ
Secretario	Prof. MARISELA BERNAL GONZÁLEZ
1er suplente	Prof. ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ
2do suplente	Prof. LANDY IRENE RAMÍREZ BURGOS

Lugar donde se desarrolló la investigación:

Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQA Y QA), Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema

Dra. Marisela Bernal González

Supervisor técnico

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

Sustentante

Leonardo Cabrera Guzmán

DEDICATORIAS

A Dios, por darme la oportunidad de cumplir este sueño y porque EXISTEN muchos otros por REALIZAR.

A mis padres, Candida Guzmán Núñez y Leonardo Cabrera Ríos, por su gran amor, aunque difícil de entender, a veces. Gracias Mamá por ser un gran ejemplo de superación y sacrificio, por ser la número uno en lo que haces... Gracias Papá por tu dedicación y tu esfuerzo diario, por tu honestidad y rectitud en muchas situaciones importantes. Gracias a ambos por mantener encendida la flama de la esperanza. Los amo.

A mi esposa Elizabeth. Sabes que eres la persona más importante en mi vida. Tú eres quien me ilumina con una sonrisa, quien me guía con un consejo, quien me inspira con una palabra, quien me calma con un beso... En fin, la lista es muy larga. Gracias por ser mi amiga, mi compañera, mi amante, mi cómplice. Gracias, también, por tu gran amor y por hacer de mi vida una gran aventura. Te amo.

A mis hermanas Elisa y Claudia, por su gran espíritu de competencia para lograr lo que se proponen. Las quiero y las admiro.

A mi abuelita Francisca (abuelita Chica), por inspirar siempre un gran amor. Te llevo en el corazón.

A mi tía Ulda, por tantos momentos compartidos en todos estos años. Gracias tía por todo tu cariño y apoyo, por estar ahí siempre que necesité de ti. Eres muy especial para mí. Te quiero mucho.

A mi tío José Juan (tío Chito), por ser un gran ejemplo para mí. Nunca te lo he dicho (talvez), pero te admiro porque en ti veo la prueba de que todo es posible. Gracias por todos tus consejos.

A mi tío Felipe de Jesús (tío Toño), por todo tu interés en mis proyectos y en mi vida. Es bueno saber que siempre cuento contigo. Gracias por tu apoyo y tu confianza.

A mis tías Martina y Juana, por todo su apoyo y sus valiosos consejos a lo largo de mi vida. Por cuidar de mí.

A mis primos y primas: Juan Francisco, Fabiola y Alejandra, por todos los momentos compartidos a lo largo de nuestras vidas. Pero especialmente a Ulda, Laura Luz, Antonio de Jesús, Erick, y ahora Regina; espero que este logro los motive a alcanzar sus metas y a hacer realidad sus sueños.

A toda la familia Díaz Rico, por aceptarme tal como soy. Sr. Margarito, gracias por compartir conmigo todas sus experiencias y su sabiduría. Sra. María Luisa, gracias por aconsejarme y alentarme a ser un hombre de bien. Argelia, gracias por tu colaboración.

A la banda de la Unidad Torres Tlalpan, que más que amigos, los considero parte importante de mi familia. Sin ningún orden en particular: Alfredo, Luis Gerardo, Narmer, Claudia, Mónica, Gilgamesh, Arturo, Arizvee, Mirna, Fabiola. Por todas las aventuras y desventuras, por las risas y las lágrimas, pero sobre todo, por el largo camino que nos queda por recorrer juntos. Gracias a todos por demostrar que existe la verdadera amistad.

A la banda de la secundaria 125 “Pablo Casals” que aún siguen vigentes: Marco Antonio, Claudia, Laura Yolanda, Hilda Judith y especialmente a mis carnales Misael, José Alberto y Francisco Galindo. Gracias por sus demostraciones de afecto y amistad, y por hacer que esto crezca y perdure hasta nuestros días.

A la banda de la Facultad de Química, con mucho cariño: Erick Vázquez Alcántara, Fernando Ramírez Domínguez, Francisco Pliego López, Jorge E. Miranda Calderón, Roberto Gaspariano Lorino, por todo el tiempo compartido, las penas y las alegrías, los triunfos y los fracasos, las cartas y las borracheras, por sus valiosos conocimientos. Una experiencia a parte son Irma Hernández Casco, Viviana Ramírez Mungía y Emilio Díaz Torres. Gracias por enseñarme el valor de ser auténticos, en toda la extensión de la palabra. Extraño la sensación de estar con ustedes, fue muy chido.

A Adrian Maya, por hacer cada día distinto dentro del PIQA y QA.

A mis colegas de MSD, sin ningún orden en particular: Lucina Boyzo, Juan Jesús Gómez, Leticia Hernández (Chinos), Isela Ledesma, Ricardo Blanco, Rebeca Bautista, Saúl Jiménez y don Rafael Hernández. En especial menciono a Karina Rodríguez, Raúl Ortega y Antonio Cruz, esperando que este logro los motive a llegar a la meta. Gracias a todos por su gran compañerismo y amistad.

A Ollín Vishana Vicu, por el milagro de entregarnos todo su ser día con día.

A mí mismo, porque al ser hoy una mejor persona, el mundo es un poco mejor que ayer.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por darme la oportunidad de convertirme en profesionista y así poder ser útil y servir a la sociedad.

A la Facultad de Química, por todas las enseñanzas adquiridas y por todas las valiosas experiencias dentro de sus aulas y laboratorios. Por darme la oportunidad de experimentar y demostrar el comportamiento de las cosas.

Al PIQA y QA (ahora LIQA y QA), por abrirme sus puertas y ayudarme a complementar mi formación profesional.

A la Dra. Marisela Bernal y al M. en C. Rolando García por todo su apoyo y confianza para la realización de ésta tesis. Mil gracias por todo.

A la Dra. Ma. del Carmen Durán de Bazúa y a la M. en A. Landy Irene Ramírez Burgos, por sus valiosos comentarios y aportaciones para mejorar la calidad de este trabajo.

A todo el personal del PIQA y QA que colaboró conmigo durante mi estancia en sus instalaciones: Sra. Irene, Sra. Julia, Sr. Servando y Lorena Núñez. Gracias por facilitarme las cosas.

A los miembros del jurado por la atención brindada para la revisión de esta tesis.

Sólo de la virtud nos llega la verdadera felicidad

"Tú", me dices, "andas siempre amonestándome. Pero, ¿ya te has amonestado a ti mismo, ya has tratado de corregirte para preocuparte tanto de la enmienda de los demás?" No soy tan desvergonzado como para meterme a hacer curaciones estando enfermo; antes puedo decir que, yaciente en la misma enfermería, hablo contigo del mal de ambos y te comunico los remedios.

Escúchame, pues; es como si hablase conmigo mismo.

Te admito a escuchar mi secreto, hago mi examen delante de ti. Voy clamándome: "Cuenta tus años y te avergonzarás de querer las mismas cosas que anhelabas de niño, de tener los mismos proyectos". Hazte por fin este servicio antes del día de tu muerte; perezcan tus vicios antes que tú. Abandona estos turbios placeres, caros de expiar, pues no solamente nos pueden hacer daño los actos que podamos realizar en el futuro, sino también los del pasado.

*SÉNECA
CARTAS MORALES
CARTA XXVI*

ÍNDICE

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. PROBLEMÁTICA	2
1.1 Panorama general	2
1.2 Breve marco histórico	3
1.3 Acumulación en vegetales	4
1.4 Contaminación en suelo vs vegetación	6
1.5 Relación de la contaminación atmosférica contra la vegetación	7
1.6 OBJETIVOS	10
1.6.1 Objetivo general	10
1.6.2 Objetivos particulares	10
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS	11
2.1 Breve historia	11
2.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	12
2.2.1 Formación	12
2.2.2 Fuentes	13
2.2.3 Propiedades fisicoquímicas	13
2.3 Toxicología	14
2.3.1 Mecanismo de toxicidad	15
2.3.2 Activación	15
2.3.3 Mecanismo de reacción	15
2.3.4 Reactividad	16
2.3.5 Eliminación	16
2.3.6 Acumulación	16
2.3.7 Bioseguimiento	17
2.3.8 Propiedades toxicológicas	17
2.4 Introducción de los HAP en la cadena alimenticia	17
2.5 Hortalizas	18
2.5.1 Propiedades nutrimentales	19
2.5.2 Presencia de HAP en hortalizas	19
2.5.3 Concentraciones encontradas de HAP en vegetales	21
2.5.4 Contribuciones de HAP en la dieta aportada por el consumo de vegetales	22
CAPÍTULO 3. FUNDAMENTOS ANALÍTICOS	24
3.1 Tratamiento de la muestra	24
3.1.1 Liofilización	24
3.1.2 Técnica de extracción por Soxhlet	24
3.1.3 Concentración de los extractos	25
3.1.4 Agentes secantes	25
3.1.5 Cromatografía de adsorción	25
3.2 Cromatografía de gases (CG)	26
3.2.1 Gas portador	27
3.2.2 Introducción de la muestra	27

3.2.3	Columnas cromatográficas	28
3.2.4	Fase estacionaria	28
3.2.5	Programación de temperatura	29
3.2.6	Detectores en CG	30
3.2.7	Identificación y cuantificación	30
3.3	Espectrometría de masas (EM)	30
3.3.1	Sistema de generación de vacío	31
3.3.2	Fuente de ionización	31
3.3.3	Analizador de masas	32
3.3.4	Detector	32
3.3.5	Espectros de masas	33
3.4	Sistema acoplado cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM)	33
3.4.1	Modos de operación	33
3.4.2	Interfase directa	34
3.4.3	Consideraciones en CG/EM	35
 CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA		 36
4.1	Área de estudio	36
4.1.1	Localización	36
4.1.2	Descripción	36
4.1.3	Suelos	36
4.1.4	Clima	38
4.1.5	Hidrología	38
4.1.6	Método de cultivo	38
4.1.7	Sistema de riego	39
4.1.8	Producción	39
4.1.9	Consumo de hortalizas en fresco	39
4.2	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	40
4.2.1	Características generales	40
4.2.2	Composición y usos	41
4.2.3	Cosecha y almacenamiento	42
4.3	Metodología general	43
4.3.1	Equipos y reactivos	43
4.3.2	Tratamiento de la muestra	44
4.3.2.1	Obtención	44
4.3.2.2	Determinación del contenido de humedad	44
4.3.2.3	Molienda y homogeneizado	45
4.3.2.4	Liofilización	45
4.3.2.5	Almacenamiento	46
4.3.3	Desarrollo experimental	46
4.3.3.1	Extracción de los HAP en las muestras	46
4.3.3.2	Limpieza y fraccionamiento de los HAP	46
4.3.3.3	Análisis de HAP por CG/EM	47
4.3.3.4	Identificación	48
4.3.3.5	Cuantificación	48
4.3.3.6	Precisión	49
4.3.3.7	Límite de detección	49
4.3.3.8	Determinación de los porcentajes de recobro o recuperación	49

4.4 Análisis de varianza	50
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1 Contenido de humedad	53
5.2 Precisión y límites de detección del sistema cromatográfico	53
5.3 Curvas de calibración de los estándares de HAP	55
5.4 Cromatogramas y espectros de masas de los estándares y de las muestras de lechuga	56
5.5 Recuperación de los HAP de la columna cromatográfica y de las muestras de lechuga	59
5.6 Análisis de HAP en las muestras de lechuga	61
5.7 Comparación de los porcentajes de recuperación en las muestras de lechuga mediante análisis de varianza	63
5.8 Contribución	65
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
6.1 Conclusiones	66
6.2 Recomendaciones	67
ANEXO A. Presencia de HAP en vegetación	69
ANEXO B. Fórmulas para realizar el análisis de varianza	72
ANEXO C. Datos y gráficas de calibración para los cinco HAP estudiados	74
ANEXO D. Cromatogramas y espectros de masas correspondientes a cada uno de los estándares y a las muestras bajo estudio	76
ANEXO E. Tratamiento y disposición de los residuos	80
BIBLIOGRAFÍA	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Propiedades fisicoquímicas de los HAP en estudio	14
Tabla 2.2 Propiedades toxicológicas de los HAP en estudio	18
Tabla 2.3 Valor nutritivo de hortalizas de hoja de mayor consumo en México	20
Tabla 2.4 Contenido de HAP en hortalizas de hoja que crecen en una zona industrial	21
Tabla 4.1 Clasificación taxonómica de la lechuga	41
Tabla 4.2 Composición nutritiva de 100 g de parte comestible de tres tipos de lechuga	42
Tabla 4.3 Equipos empleados	43
Tabla 4.4 Reactivos empleados	43
Tabla 4.5 Condiciones de operación óptimas para deshidratar las muestras de lechuga	46
Tabla 4.6 Rampa de temperatura en el cromatógrafo de gases	48
Tabla 4.7 Condiciones de operación en el espectrómetro de masas	48
Tabla 5.1 Porcentaje de humedad en los diferentes tipos de lechuga fresca	53
Tabla 5.2 Precisión del sistema cromatográfico	54
Tabla 5.3 Límites de detección para los HAP en estudio	54
Tabla 5.4 Datos de la curva de calibración de los estándares de HAP	55
Tabla 5.5 Tiempos de retención (t_r) y iones moleculares (m/z) de los HAP analizados por CG/EM	56
Tabla 5.6 Estudio de retención de los HAP por los adsorbentes en la columna	60
Tabla 5.7 Estudio de retención de los HAP en lechuga sangría	60
Tabla 5.8 Estudio de retención de los HAP en lechuga italiana	60
Tabla 5.9 Porcentajes de recuperación promedio en ambas muestras de lechuga	63
Tabla 5.10 Resultados del análisis de varianza para comparar los porcentajes de recuperación de los HAP estudiados en las muestras de lechuga	64
Tabla 5.11 Comparación entre el valor de F calculada (F_c) y el valor de F de tablas (F_t) para la recuperación de los compuestos en estudio	64
Tabla A.1 Contenido de HAP en algunas muestras de vegetación	69
Tabla B.1 ANDEVA para una comparación de medias	73
Tabla E.1 Tratamiento y disposición de los residuos	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Interacción entre el 7,8-diol-9,10-epóxido benzo[a]pireno y el grupo amino de la guanina	16
Figura 4.1 Mapa de la delegación Xochimilco y su ubicación en el Distrito Federal	37
Figura 4.2 Detalle de las hojas y raíces de una planta de lechuga	40
Figura 4.3 Tratamiento de la muestra	51
Figura 4.4 Desarrollo experimental	52
Figura 5.1 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares	57
Figura 5.2 Cromatograma de una muestra de L. sangría adicionada con cinco estándares	57
Figura 5.3 Cromatograma de una muestra de L. italiana adicionada con cinco estándares	57
Figura 5.4 Espectro de masas del fenantreno identificado en la mezcla de cinco estándares	58
Figura 5.5 Espectro de masas del fluoranteno identificado en la mezcla de cinco estándares	58
Figura 5.6 Espectro de masas del pireno identificado en la mezcla de cinco estándares	58
Figura 5.7 Espectro de masas del criseno identificado en la mezcla de cinco estándares	59
Figura 5.8 Espectro de masas del benzo[a]pireno identificado en la mezcla de cinco estándares	59
Figura C.1 Curva de calibración del fenantreno	74
Figura C.2 Curva de calibración del fluoranteno	74
Figura C.3 Curva de calibración del pireno	74
Figura C.4 Curva de calibración del criseno	75
Figura C.5 Curva de calibración del benzo[a]pireno	75
Figura D.1 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [5 ppm]	76
Figura D.2 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [4 ppm]	76
Figura D.3 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [3 ppm]	76
Figura D.4 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [2 ppm]	77
Figura D.5 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [1 ppm]	77
Figura D.6 Cromatograma de una muestra de L. sangría adicionada con cinco estándares	77
Figura D.7 Cromatograma de una muestra de L. italiana adicionada con cinco estándares	78
Figura D.8 Espectro de masas del fenantreno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares	78
Figura D.9 Espectro de masas del fluoranteno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares	78
Figura D.10 Espectro de masas del pireno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares	79
Figura D.11 Espectro de masas del criseno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares	79
Figura D.12 Espectro de masas del benzo[a]pireno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares	79
Figura E.1 Residuos generados durante el desarrollo experimental de esta investigación	80

SIGLAS Y ABREVIACIONES EMPLEADAS

α	Nivel de significancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
COS	Compuestos orgánicos semivolátiles
CPG	Cromatografía de permeación en gel
CV	Coefficiente de variación. Se conoce también como desviación estándar relativa (DER)
DC	Corriente continua, por sus siglas en inglés
DCM	Diclorometano
EM	Espectrometría de masas
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés)
eV	Electrón-Volt
F_c	Constante de Fisher calculada o relación de variación por muestras
F_t	Constante de Fisher de tablas o valor crítico para Fisher
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
H_1	Hipótesis alterna
H_0	Hipótesis nula
IE	Impacto electrónico
K_{oa}	Coefficiente de partición octanol-aire
K_{ow}	Coefficiente de partición octanol-agua
M.S.N.M.	Metros sobre el nivel del mar
m/z	Relación masa/carga de un ión molecular
$\mu\text{g}/\text{kg}$	Microgramos por kilogramo de muestra, equivalente a ppb
mg/kg	Miligramos por kilogramo de muestra, equivalente a ppm
mmHg	Milímetros de mercurio
Na_2SO_4	Sulfato de sodio anhidro
ppb	Partes por billón ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
ppm	Partes por millón (mg/kg)
RF	Radiofrecuencia
rpm	Revoluciones por minuto
SCAN	Modo de barrido en el espectrómetro de masas, por la palabra en inglés
S_N2	Sustitución nucleofílica tipo 2
SSI	Modo de seguimiento selectivo de iones en el espectrómetro de masas (SIM, por sus siglas en inglés)
torr	Unidad de presión equivalente a 6.894 kPa y a 1 atm
UMA	Unidades de masa atómica
UNEP	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, (United Nations Environment Programme, por sus siglas en inglés)

RESUMEN

El consumo de hortalizas, tanto en México como en todo el mundo, es recomendado ampliamente en la dieta diaria por su apreciable contenido de vitaminas, minerales y fibra dietética. No obstante, dada la problemática ambiental que acontece en nuestros días, es de crucial importancia constatar el grado de contaminación en hortalizas de consumo directo, no sólo en cuanto a los posibles vectores de enfermedades gastrointestinales a las que son susceptibles, sino de acumulación de sustancias o compuestos orgánicos semivolátiles tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP o PAH, por sus siglas en inglés) que son depositados en ellas provenientes sobre todo de las industrias aledañas al área de cultivo y/o de la combustión incompleta de compuestos orgánicos como son los combustibles fósiles. Se ha demostrado que los HAP son por sí mismos químicamente inertes e hidrofóbicos; sin embargo al penetrar en organismos superiores sufren una activación metabólica en las células mamíferas, resultando en diol-epóxidos, los cuales se unen covalentemente a las moléculas celulares incluyendo al ADN, causando errores en su replicación y conduciendo a mutaciones que dan origen al proceso carcinogénico. El ingreso de HAP a las plantas ocurre principalmente desde la atmósfera vía deposición en fase gaseosa y particulada, sirviendo su determinación también como un índice de exposición a los contaminantes que han sido acumulados en ellas con la finalidad de estimar los riesgos correspondientes a su carcinogenicidad. Debido a lo anterior, en este trabajo se propuso el montaje de una metodología de extracción encaminada a la identificación y cuantificación a nivel de “trazas” de cinco HAP en muestras de dos tipos de lechuga de amplio consumo: lechuga tipo italiana y lechuga tipo sangría, las cuales fueron adquiridas de la zona chinampera del pueblo de San Gregorio Atlapulco, delegación Xochimilco, D.F. Una vez adquiridos los dos lotes de hortalizas, fueron trasladados a los Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental de la Facultad de Química (LIQA y QA) en bolsas oscuras y en hieleras para mantener la temperatura entre 2-5°C y evitar la descomposición de las muestras. Una vez que llegaron al laboratorio, se procedió a la extracción de los cinco HAP encontrados en mayores cantidades en el ambiente (fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno y benzo[a]pireno), mediante una extracción Soxhlet siguiendo el método de la EPA-3540C para, posteriormente, separarse mediante una cromatografía en columna de separación según lo establecido por el Método UNEP-7, realizando algunas modificaciones. La técnica analítica de CG es una opción viable para identificar y cuantificar selectivamente a cada uno de los HAP en estudio. Por medio de la metodología empleada fue posible recuperar a los cinco HAP, obteniendo concentraciones de $3.922^{\pm 0.007}$, $4.215^{\pm 0.043}$, $4.003^{\pm 0.020}$, $4.170^{\pm 0.031}$ y $4.440^{\pm 0.107}$ mg/kg, valores que corresponden a los siguientes porcentajes de recuperación para lechuga sangría: $78.05^{\pm 0.140}$, $83.05^{\pm 0.849}$, $80.05^{\pm 0.402}$, $83.28^{\pm 0.610}$ y $87.92^{\pm 2.127}$ %. Asimismo, para lechuga italiana se recuperaron las siguientes concentraciones: $4.179^{\pm 0.096}$, $3.991^{\pm 0.125}$, $4.106^{\pm 0.075}$, $4.383^{\pm 0.158}$ y $4.527^{\pm 0.088}$ mg/kg que a su vez corresponden a los siguientes porcentajes de recuperación: $83.16^{\pm 1.905}$, $78.64^{\pm 2.468}$, $82.12^{\pm 1.503}$, $87.53^{\pm 3.155}$ y $89.64^{\pm 1.749}$ % para fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno y benzo[a]pireno. Se espera que este estudio sirva de antecedente en trabajos posteriores relacionados con la presencia de compuestos orgánicos semivolátiles en plantas comestibles y/o en vegetación en general, como una forma para evaluar el grado de exposición humana, o bien, para indicar cualitativamente los niveles de contaminación atmosférica en un sitio determinado.

CAPÍTULO 1. PROBLEMÁTICA

1.1 Panorama general

Las ciudades y centros urbanos a lo largo del mundo, con una población altamente concentrada y un alto consumo energético debido al transporte y a las actividades industriales, tienden a contribuir en gran medida a los problemas de contaminación ambiental. La disposición de los residuos domésticos, municipales e industriales y la contaminación atmosférica generada en las zonas urbanas afectan a las áreas rurales circundantes. En este rubro, los “agroecosistemas” reciben aportaciones de contaminantes por el uso de fertilizantes y agroquímicos, por la aplicación de desechos al suelo y por la deposición atmosférica; por supuesto, estas entradas varían en importancia de acuerdo con la sustancia de que se trate. Las contribuciones vía deposición atmosférica a largo plazo son grandes y, sin duda, constituyen un gran aporte a todos los sistemas suelo-vegetación; en contraste, la aplicación de lodos y aguas residuales a la tierra contribuye también a la contaminación de los suelos (Simonich y Hites, 1995). Los compuestos orgánicos semivolátiles (COS) han sido detectados especialmente en aire, agua, suelo, sedimentos y alimentos y es este último rubro, el que mayor impacto ha tenido en la ecología y en la salud humana (Nollet, 1996). Muchos contaminantes del aire, como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) depositados en el suelo o en el agua, entran a la cadena alimenticia; por consiguiente, son clasificados como causantes de cáncer por los alimentos y no por el aire contaminado (Zakrzewski, 1997).

Durante las últimas décadas, la Ciudad de México ha experimentado un crecimiento desmedido en su población y, en consecuencia, se ha incrementado el número de industrias y transportes, agravando así los problemas de contaminación. Después del ozono, las partículas suspendidas son el segundo problema más importante en el deterioro de la calidad del aire en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, siendo las áreas de mayor emisión de partículas las que se localizan en el norte y este de la ciudad, debido a que es ahí donde se concentra gran parte de la actividad industrial. Por este motivo, la zona noreste es la que históricamente ha presentado los mayores índices de contaminación por arriba de la normativa; sin embargo, la dirección predominante de los vientos (norte-sur) ocasiona que los contaminantes generados en las zonas de mayor actividad urbana, industrial, de servicios y de transporte público sean distribuidos en todo el resto de la

mancha urbana, especialmente en dirección al sur de la Ciudad, donde aún es posible encontrar tierras en las que se cultivan diversos productos hortícolas (Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México, 1996).

Uno de los principales componentes que se derivan de las emisiones, tanto industriales como vehiculares, así como de cualquier proceso de combustión incompleta de cualquier material de tipo orgánico, son los HAP, los cuales se encuentran en fase gaseosa o asociados a partículas. Algunos de estos compuestos presentan suficiente evidencia de carcinogenicidad, ya que una vez metabolizados dentro del organismo, pueden unirse al ADN, lo que resulta en disrupciones bioquímicas y daño celular que conduce a mutaciones y, en consecuencia, pueden desarrollarse tumores, malformaciones y cáncer (Hoffman y col., 2003).

Por otra parte, el ingreso de HAP a las plantas ocurre principalmente desde la atmósfera vía deposición en fase gaseosa y particulada. En el caso de las hortalizas, su determinación sirve para evaluar el grado de exposición a los contaminantes que han sido acumulados a fin de estimar los riesgos correspondientes a su carcinogenicidad, pues debido a sus características lipofílicas, pueden almacenarse en tejido adiposo y permanecer así indefinidamente, produciendo, con el tiempo, manifestaciones típicas de una intoxicación crónica, tales como la producción espontánea de tumores malignos. De hecho, los estudios advierten que el consumo frecuente de hortalizas y otros productos vegetales puede constituir el principal factor de exposición en la dieta humana (Helferich y Winter, 2001).

1.2 Breve marco histórico

La presencia de HAP ha sido demostrada en una gran variedad de plantas provenientes de diversas fuentes (Phillips, 1999; Bi y col., 2001; Müller y col., 2001; Hwang y col., 2003), así como en una amplia gama de muestras de suelo procedentes de diversos ambientes (Agarwal y Shridhar, 2009; Maliszewska-Kordybach y col., 2009). Varias hipótesis surgieron a partir de estas observaciones; algunas de ellas postulaban la síntesis endógena de estos compuestos por las plantas en presencia o ausencia de luz, otras, la translocación de los HAP de suelos contaminados a las diversas partes de las plantas, e inclusive se pensó que los HAP encontrados en el suelo provenían de la síntesis bacteriana de los microorganismos que lo habitan. En la década de los 60 del siglo XX se sugirió que los

hallazgos encontrados indicaban que las plantas comestibles podrían ser las fuentes primarias de HAP ingeridos, aún por encima de los productos ahumados, tostados o asados que hasta entonces eran las fuentes más sospechosas. Por otra parte, en la década de los 70 del siglo XX, los investigadores notaron que una fuerte relación parecía existir entre la contaminación del aire y la presencia del benzo[a]pireno en granos y hortalizas (Kipopoulou y col., 1999; Bi y col., 2001). De hecho, fue en este mismo periodo que comenzaron a darse cuenta de que el grado de contaminación en el aire influía directamente en las cantidades halladas en todos los vegetales analizados. Asimismo, se formularon varias hipótesis respecto a las posibles rutas que siguen los HAP en su ingreso a las plantas, las cuales son: 1) deposición del aire, 2) absorción del suelo y 3) síntesis, siendo la primera de ellas la considerada más importante. De acuerdo con esta hipótesis, los HAP penetran en el suelo principalmente por el contacto con el aire y pasan a formar parte de las capas superficiales del mismo; razón por la cual, se creyó, erróneamente, que junto con el agua, estos compuestos pasaban directamente hacia las plantas, el forraje y finalmente a la cadena alimenticia (Howard y Fazio, 1980). Fue a partir de este punto que surgieron diversas teorías e investigaciones acerca del ingreso de los HAP vía aire y suelo; asimismo, se desmintió la hipótesis acerca de la biosíntesis por parte de las plantas (Simonich y Hites, 1995; McLachlan, 1999; Chiou y col., 2001; Collins y col., 2006).

1.3 Acumulación en vegetales

Pese a que las plantas sólo pueden actuar como depósitos temporales puesto que viven por un periodo limitado, en algunos estudios (Howsam y col., 2000; Alfani y col., 2001; Müller y col., 2001) donde se supone a la vegetación como una sola unidad, se ha visto que el proceso de partición vegetación-atmósfera a largo plazo está gobernado, principalmente, por la concentración atmosférica en fase gaseosa y por la temperatura. Por tanto, a bajas temperaturas (otoño e invierno), los compuestos tienden a concentrarse en la vegetación; en cambio, a altas temperaturas (primavera y verano), los HAP de bajo peso molecular son volatilizados nuevamente y entonces regresan a la atmósfera. Por otra parte, los HAP en fase partícula también pueden acumularse en las plantas; sin embargo, este proceso no es dependiente de la temperatura, pues estos compuestos tienden a encontrarse más estrechamente unidos a las partículas que a la vegetación. Si se considera que el 80% de los suelos terrestres están cubiertos con vegetación y que ésta, generalmente tiene de 6 a 14

veces una mayor área superficial que el suelo en el cual se encuentra creciendo, entonces la vegetación probablemente juega un papel significativo en el ciclo anual de muchos COS. Por consiguiente, el incremento de HAP detectado en el aire a altas temperaturas se debe, seguramente, a la volatilización de los compuestos contenidos en la vegetación circundante y en el suelo, predominando la deposición en fase gaseosa (Simonich y Hites, 1994).

Con base en lo anterior, se puede observar que la vegetación presenta un gran potencial para acumular compuestos orgánicos lipofílicos. De hecho, es el principal depósito de contaminantes atmosféricos y puede emplearse para evaluar el grado de exposición humana a los contaminantes presentes en plantas comestibles. No obstante, el uso de la vegetación, en general, constituye una valiosa herramienta para indicar cualitativamente los niveles de contaminación atmosférica, para estimar su extensión y para identificar los puntos donde se origina (Maliszewska-Kordybach y col., 2009). También se observa que los HAP de mayor peso molecular (más pesados e hidrofóbicos) son depositados, adheridos a partículas, cerca de la fuente que los produce. Por su parte, los compuestos de bajo peso molecular (más ligeros y menos hidrofóbicos), con una proporción alta en fase vapor, se hallan más ampliamente dispersos (Alfani y col., 2001).

Se calcula que aproximadamente 4.6×10^6 kg/año de HAP son emitidos a la atmósfera por diversas fuentes dentro de la región noreste de los Estados Unidos. Asimismo, se estima que la vegetación capta $44 \pm 18\%$ de los HAP atmosféricos liberados en dicha zona, mientras que el restante es removido por deposición a los cuerpos de agua y suelo, o bien, es transportado a mayores distancias. Por lo tanto, la estructura física de un ecosistema es fundamental: a este nivel, los investigadores han propuesto que los bosques son efectivos filtros de aire, pues tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de contaminantes orgánicos en comparación con otros sistemas terrestres, impidiendo su retorno al ambiente mediante su posterior incorporación al suelo de forma permanente.

Por último, cabe destacar que la vegetación es el vínculo entre la atmósfera y la fuente de alimento para consumo humano. Por consiguiente, es preciso entender aquellos procesos en los cuales los contaminantes entran a este componente ambiental (Agarwal y Shridhar, 2009).

1.4 Contaminación en suelo vs vegetación

La deposición atmosférica ha sido una fuente de contaminantes orgánicos a los sistemas del suelo. Algunos de los compuestos de interés ambiental, pueden encontrarse en el ambiente provenientes de fuentes naturales; sin embargo, las aportaciones antropogénicas afectan sustancialmente las concentraciones que se encuentran en los suelos. Es en este nivel donde se encuentran a los HAP: la contribución de los HAP a causa de los mecanismos de deposición varía marcadamente debido a factores como son el aumento poblacional hacia las áreas rurales y la edificación de industrias que contaminan, por deposición aérea, a parcelas y a tierras de cultivo (Agarwal y Shridhar, 2009). Adicionalmente, el suelo también se contamina por el tratamiento con lodos, aguas residuales, y por el uso de abonos y fertilizantes, lo que incrementa a la vez, el contenido de material orgánico (Lipnick y col., 2001). Respecto a los cultivos, estos son esencialmente transitorios puesto que son cosechados y removidos del suelo a intervalos regulares; de esta manera indican las variaciones de contaminación atmosférica a corto plazo. En contraste de esto, los suelos se encuentran sujetos a cambios a largo plazo debido a la deposición acumulativa (Kipopoulou y col., 1999).

La extensión a la cual un contaminante orgánico entra a las raíces de las plantas, a partir de un suelo contaminado, depende de su solubilidad en agua y de su coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}). Por ejemplo, mediante algunos modelos matemáticos, se ha podido calcular que para compuestos con un $K_{ow} \leq 10$, el nivel de un contaminante dado, encontrado en la fase acuosa interna de las raíces de la planta, es de más del 85% del total ingresado por la raíz; asimismo, para compuestos con un $K_{ow} = 100$, el ingreso asociado a la fase acuosa y a la fase lipídica de la raíz contribuye, cada una, alrededor del 50% del ingreso total; y para compuestos con un $K_{ow} > 1000$, el ingreso total a la raíz está dado, predominantemente, por la fase lipídica. Por lo tanto, la fase acuosa en la planta actúa como el principal reservorio para contaminantes altamente solubles en agua. Del mismo modo, los lípidos en una planta, aún si se encuentran en pequeñas cantidades, son generalmente el principal reservorio para contaminantes altamente insolubles en agua (Chiou y col., 2001). En este sentido, muchas especies vegetales han sido examinadas tanto en experimentos de exposición controlada como en experimentos de campo: los estudios (Wild y col., 2005) demuestran que el ingreso de contaminantes orgánicos lipofílicos a través de las raíces no

constituye una vía significativa de acumulación. En el caso de los HAP, una vez absorbidos a las raíces, no pueden ser translocados al resto de la planta debido a que no poseen las propiedades fisicoquímicas adecuadas para lograrlo (Mikes y col., 2009).

Otro factor que limita significativamente el ingreso de HAP a las plantas, es su gran potencial de absorción con la materia orgánica del suelo. No obstante, se ha visto que el viento puede transportar partículas contaminadas del suelo directamente a la superficie de las plantas; asimismo, algunos contaminantes pueden pasar al estado gaseoso mediante el efecto “splash”, es decir, la volatilización de los compuestos a partir del suelo al aire circundante (Lipnick y col., 2001; Mikes y col., 2009).

Finalmente, gracias a los estudios realizados y a la información disponible (Speer y col., 1990; Kipopoulou y col., 1999; Hwang y col., 2003), en la actualidad se considera que prácticamente la totalidad de los HAP detectados en plantas terrestres provienen de la atmósfera como resultado de la deposición en fase gaseosa y particulada, por lo que son independientes de las concentraciones del suelo (Orecchio y col., 2008). En cambio, la muerte de la vegetación provoca que los HAP sean depositados sobre la superficie y esparcidos por todo el terreno (Hoffman y col., 2003).

1.5 Relación de la contaminación atmosférica con la vegetación

El análisis de micro-contaminantes en organismos naturales ha mostrado ser un método adecuado para evaluar la contaminación atmosférica; de manera que es válido usar a la vegetación como indicador cualitativo de contaminantes por compuestos orgánicos atmosféricos, siempre y cuando se considere el mecanismo de acumulación en la planta (Orecchio y col., 2008). El ingreso de COS a las plantas ocurre principalmente desde la atmósfera vía deposición en fase gaseosa y particulada. La deposición gaseosa es un proceso que depende de factores entre los que sobresalen los siguientes: 1) la concentración gaseosa durante el periodo total de crecimiento de la planta, 2) la edad de la vegetación, 3) la velocidad del viento, 4) la estabilidad atmosférica, 5) la estructura de la planta y 6) la textura superficial de las hojas (McLachlan, 1999). Por su parte, la deposición particulada se encuentra en función de: 1) la concentración de partículas en la atmósfera, 2) la distribución del tamaño de partícula, 3) la cantidad en que se encuentran, 4) la frecuencia e intensidad de la precipitación, y 5) la habilidad de la planta para retener estas partículas en su superficie (St-Amand y col., 2009). Al mismo tiempo, cada uno de estos procesos es

gobernado por ciertos parámetros ambientales y fisicoquímicos como son la temperatura, el contenido orgánico del suelo, su lipofiliidad, su solubilidad en agua y su presión de vapor respectivamente. Por último, existen marcadas diferencias entre las especies vegetales debido a la cantidad de lípidos y al área superficial de las hojas, las cuales también repercuten en el grado de acumulación de los contaminantes. Por ello, es recomendable que la concentración de los compuestos detectados en plantas sea normalizada con respecto al contenido lipídico o al área superficial, minimizando así dichas variaciones (Rey-Salgueiro y col., 2008).

Tanto la deposición gaseosa como la deposición particulada se encuentran reguladas por la partición vapor/partícula del compuesto, es decir, que con la disminución de la volatilidad, las sustancias orgánicas muestran una fuerte tendencia a la partición de la fase gaseosa hacia las partículas atmosféricas, lo cual resulta en un incremento de la importancia de la deposición particulada comparada con la deposición gaseosa (Agarwal y Shridhar, 2009).

En general, los HAP más volátiles (2 y 3 anillos) existen principalmente en fase gaseosa y tienden a acumularse en las plantas vía deposición en fase gaseosa; en cambio, los HAP menos volátiles (5 y 6 anillos) se depositan en la superficie de la planta asociados a partículas. Para los compuestos de presión de vapor intermedia (HAP de 4 anillos) ocurre una partición vapor/partícula dependiente de la temperatura, de tal manera que están sujetos a depositarse, tanto en fase gaseosa como asociados a partículas (Orecchio y col., 2008).

En cuanto al ingreso, se ha visto que los HAP de bajo peso molecular (fase gaseosa) penetran en la planta más fácilmente que aquellos con alto peso molecular, puesto que las partículas, cuando se depositan sobre el follaje, pueden adherirse a la superficie, reaccionar químicamente con ella o bien, pueden ser rebotadas sin mayor consecuencia (Kipopoulou y col., 1999). Así, las plantas cuyas hojas presentan vellosidad son mucho más eficientes para acumular partículas que aquellas cuyas hojas son lisas. Contrariamente, la repelencia al agua, debido a la rugosidad de la cutícula, parece ser una propiedad importante en determinar la capacidad que tienen las hojas para limpiarse a sí mismas de las partículas alojadas, lo cual se traduce en una reducida adhesión sobre su superficie (Howsam y col., 2000).

La cutícula es una membrana extracelular no viva y lipídica que forma la interfase entre la atmósfera y la planta protegiéndola de la desecación y de los ataques de hongos e insectos.

Generalmente se caracteriza por la presencia de dos clases específicas de lípidos: ceras solubles y poliésteres insolubles. La cutícula no es homogénea, pues se compone de una serie de capas las cuales varían en sus propiedades de acuerdo con la especie, edad de la planta y condiciones ambientales. Esto significa que, independientemente de su espesor, la permeabilidad de la cutícula se encuentra determinada por la composición y por el arreglo de las ceras cuticulares (Lipnick y col., 2001). En efecto, muchos compuestos orgánicos lipofílicos, incluyendo a los HAP que se encuentran depositados sobre las hojas de una planta, son capaces de adsorberse a la superficie y/o de pasar a través de la cutícula mediante su solubilidad en las capas cerosas, por lo que cinéticamente se concluye que la vegetación es un buen integrador de contaminantes atmosféricos (Wild y col., 2004).

El coeficiente de partición octanol-aire (K_{oa}) es un parámetro clave en el entendimiento de la absorción de sustancias orgánicas en las superficies de las hojas. Se define como una medida de la afinidad de un compuesto encontrado en fase vapor por el octanol (o la cera de la planta) sobre el aire y es fuertemente dependiente de la temperatura, por lo que las variaciones al respecto deben ser consideradas cuando se investigan los procesos de absorción. Los estudios de exposición controlada y los estudios en condiciones de campo indican que el K_{oa} es un buen predispositor sobre la acumulación de contaminantes lipofílicos en las hojas. En general, los contaminantes en fase gaseosa con un K_{oa} grande son preferentemente acumulados (Cousins y Mackay, 2001).

Dada la problemática anterior, en este estudio se escogieron a dos variedades de lechuga *Lactuca sativa L.*: lechuga tipo italiana y lechuga tipo sangría, debido al grado de exposición de los contaminantes, a la abundancia en el área de estudio (zona chinampera de la Delegación Xochimilco) y en cuanto a su distribución en el mercado, para determinar HAP en ellas. Se analizaron cinco de los HAP más reportados en cuanto a incidencia en vegetales, de acuerdo con los siguientes autores: Speer y col. (1990), Kipopoulou y col. (1999), Phillips (1999), Bi y col. (2001). Los cinco compuestos a evaluarse fueron los siguientes: fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno y benzo[a]pireno, los cuales, por sus características fisicoquímicas, pueden tener rendimientos mayores a 70% usando los métodos de extracción y purificación adecuados. Para ello, se planteó el siguiente objetivo general enmarcado dentro de los siguientes objetivos particulares.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

Determinar el grado de extracción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos de mayor incidencia e importancia toxicológica adicionados a dos variedades de las hortalizas de mayor distribución en la zona “chinampera” de Xochimilco mediante técnicas cromatográficas para su identificación y cuantificación.

1.6.2 Objetivos particulares

- Determinar el contenido de humedad de las muestras para verificar su efecto en el grado de extracción de los contaminantes empleando para ello la metodología propuesta en el Compendio de Métodos Oficiales de la AOAC (2001).
- Adaptar la metodología descrita en los métodos EPA-3540C (EPA, 1996a) y UNEP-7 (UNEP/IOC/IAEA, 1993) para evaluar la extracción, limpieza, identificación y cuantificación de los HAP en hojas de lechuga tipo italiana y tipo sangría.
- Correlacionar los porcentajes de recuperación de los contaminantes obtenidos con los reportados en la literatura.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS

2.1 Breve historia

La relación entre los limpiadores de chimeneas (deshollinadores) y la incidencia de cáncer escrotal, así como las observaciones de los efectos de la exposición crónica al hollín se hicieron en Inglaterra hacia el año 1775 por Sir Percival Pott, cirujano londinense. A principios del siglo XX, el hollín, el alquitrán y el tizne fueron conocidos como potentes carcinógenos humanos (Tarcher, 1992). Posteriormente, en la década de los 30 del siglo XX, se logró aislar al benzo[a]pireno del alquitrán de carbón y mediante la experimentación con animales determinó su alto potencial carcinogénico. Para los años 70 más de 30 HAP y algunos derivados de estos compuestos se habían reportado por sus efectos carcinogénicos, haciendo de ellos la mayor clase de carcinógenos químicos hasta hoy conocidos (Tuominen y col., 1988). En esa misma década se demostró que varios tipos de cáncer humano podrían atribuirse a los carcinógenos ambientales, especialmente a través de la dieta cotidiana (Nollet, 1996).

No fue sino hasta hace poco tiempo que las investigaciones se orientaron hacia el estudio de la formación y a los mecanismos de acción a nivel bioquímico. Al respecto, fue en la década de los 50 del siglo XX cuando se sugirió que la conversión metabólica a epóxidos puede ser el paso esencial en dicha carcinogenicidad. Por otra parte, a finales de los años 60, se demostró por primera vez que la carcinogenicidad de los HAP depende de su unión a los ácidos nucleicos, una vez que estos han sido metabolizados (Zakrzewski, 1997).

En cuanto a la caracterización química de las fuentes de emisión de sustancias y de todos los compuestos orgánicos encontrados en el aire, los HAP son quienes han recibido la mayor atención. Así, el benzo[a]pireno fue uno de los primeros componentes orgánicos en ser encontrado en las partículas atmosféricas y en ser medido rutinariamente; sin embargo, hoy la información cuantitativa de las emisiones de HAP de fuentes tanto naturales como antropogénicas sigue siendo limitada (Tarcher, 1992).

Finalmente, en cuanto a la vegetación, es en los últimos veinte años cuando mayores avances ha habido en el estudio de la acumulación de contaminantes orgánicos en las plantas. En nuestros días, estas investigaciones se realizan en todo el mundo (Collins y col., 2006).

2.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

Los compuestos aromáticos son una clase de hidrocarburos que pueden tener uno o varios anillos de benceno en su estructura: los aromáticos mononucleares como el tolueno, el cumeno y los xilenos que son compuestos de un solo anillo, mientras que los aromáticos policíclicos como el antraceno, el fluoranteno y/o el pireno son sistemas de anillos fusionados entre sí. Los HAP se encuentran formados de dos, tres o más anillos bencénicos fusionados en arreglo lineal, angular o de racimo y contienen solamente carbono e hidrógeno. Estos compuestos van desde el naftaleno ($C_{10}H_8$, 2 anillos) hasta el coroneno ($C_{24}H_{12}$, 7 anillos). Se encuentran considerados como contaminantes del medio ambiente y son importantes dada la amplia variedad de fuentes, tanto naturales como antropogénicas, así como por sus efectos adversos en la salud (Rey-Salgueiro y col., 2008).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency, EPA, en inglés) considera especialmente a 16 HAP como los contaminantes prioritarios en agua potable y en agua residual, subsecuentemente referidos en la literatura como los “16 HAP prioritarios de la EPA”, los cuales abarcan a los siguientes compuestos:

2 anillos: naftaleno.

3 anillos: acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno.

4 anillos: fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno y criseno.

5 y 6 anillos: benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]periteno e indenopireno.

2.2.1 Formación

Muchos HAP se forman mediante un proceso de descomposición térmica o formación de radicales libres (pirólisis) y una recombinación subsecuente (pirosíntesis) de moléculas orgánicas condensadas. La combustión incompleta de la materia orgánica produce HAP cuando las temperaturas son altas (500 a 800°C), en este punto los enlaces C-H y C-C se rompen para formar radicales libres. Todas las formas de combustión, aunque reducida con el uso de gases flamables perfectamente mezclados con aire, producen HAP, los cuales son liberados al medio ambiente (Finlayson-Pitts y Pitts, 1986).

Mediante estudios más amplios acerca de su formación, se sabe que la cantidad de compuestos producidos y la relación entre las concentraciones de sustancias individuales de este grupo de contaminantes dependen del tipo de material o combustible empleado, así

como de las condiciones inherentes de presión y de temperatura en los procesos de combustión (Agarwal y Shridhar, 2009).

2.2.2 Fuentes

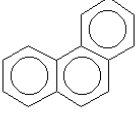
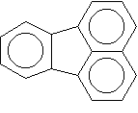
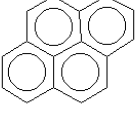
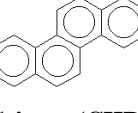

Las fuentes naturales de HAP incluyen los incendios forestales y las erupciones volcánicas principalmente. Las fuentes antropogénicas son las más importantes; incluyen múltiples actividades como la refinación de petróleo, la generación de energía eléctrica, la incineración de basura, el uso de combustibles en el hogar, la producción de coque, carbón negro, alquitrán de carbón y de asfalto. Además, en estas fuentes, se incluyen a las emisiones de automotores y al humo del tabaco. Adicionalmente, dichas fuentes antropogénicas se clasifican en estacionarias, las cuales consisten en el uso de combustibles en el hogar, la industria, la generación de energía y la incineración; y en móviles, que se refieren a los vehículos, transportes y dispositivos que funcionan con motores a gasolina o diesel (Hoffman y col., 2003). Los procesos de combustión involucrados en esta gran variedad de fuentes generan enormes cantidades de contaminantes orgánicos, los cuales son responsables de los altos niveles de contaminación atmosférica existente en la actualidad.

2.2.3 Propiedades fisicoquímicas

Como el benceno, muchos de los HAP poseen una gran estabilidad química natural y una geometría plana. Estructuralmente revelan la ausencia de sitios de alta reactividad química; asimismo, tienen una gran resistencia a la descomposición por lo cual son compuestos muy persistentes en el medio ambiente (Tarcher, 1992; Baird, 1995). En la Tabla 2.1 se enlistan las propiedades fisicoquímicas más representativas de los compuestos bajo estudio.

Las características fisicoquímicas de los HAP se ven altamente influenciadas por su peso molecular; es decir, conforme se incrementa el volumen molecular, la solubilidad decrece, el punto de fusión y de ebullición aumenta y la presión de vapor disminuye. De la misma forma, la presión de vapor es altamente dependiente de la temperatura, ya que cuando ésta descende, la presión de vapor decrece marcadamente. Esta propiedad es la que determina que los HAP se encuentren en fase gaseosa o en fase particulada según su peso molecular.

Tabla 2.1 Propiedades fisicoquímicas de los HAP en estudio (Finlayson-Pitts y Pitts, 1986; Patnaik, 1992; Merck Index, 2001)

Compuestos	MM	Fórmula	P.f. (°C)	P.eb. (°C)	Solubilidad en agua a 25°C (µg/L)	Presión de vapor a 25°C (mmHg)	Características
 Fenantreno (PHE)	178	C ₁₄ H ₁₀	100	340	1290	1.2x10 ⁻⁴	Cristales incoloros. Soluble en benceno, tolueno y DCM
 Fluoranteno (FLU)	202	C ₁₆ H ₁₀	120	367	260	9.2x10 ⁻⁶	Agujas coloreadas. Soluble en éter, benceno y otros disolventes orgánicos
 Pireno (PYR)	202	C ₁₆ H ₁₀	156	404	135	4.5x10 ⁻⁶	Cristales incoloros. Altamente soluble en los disolventes orgánicos
 Criseno (CHR)	228	C ₁₈ H ₁₂	254	448	2.0	6.4x10 ⁻⁹	Láminas blancas. Moderadamente soluble en disolventes orgánicos
 Benzo[a]pireno (BaP)	252	C ₂₀ H ₁₂	179	311	0.05	5.6x10 ⁻⁹	Cristales amarillentos. Soluble en benceno, tolueno, xileno y DCM

MM: Masa molecular; P.f: Punto de fusión; P.eb: Punto de ebullición; DCM: Diclorometano

Los HAP comúnmente poseen bajas solubilidades en agua; sin embargo, cuando se oxidan transformándose en especies más polares, se incrementará notablemente su solubilidad. Esto tiene mayores implicaciones cuando se considera la distribución de los HAP y sus derivados a través del aire ↔ agua ↔ suelo (Mikes y col, 2009). No obstante, debido a su liposolubilidad, estos compuestos tienden a acumularse en el tejido adiposo de los organismos.

2.3 Toxicología

Muchos de los HAP pueden causar cáncer, pues afectan una gran variedad de organismos y tejidos; mas sin embargo, el benzo[a]pireno es el compuesto más ampliamente estudiado debido a su alto potencial carcinogénico en humanos, siendo el resto probados en animales

de laboratorio y se ha evidenciado su carcinogenicidad. En general, los HAP de cuatro, cinco y seis anillos tienen un mayor potencial carcinogénico que los HAP de dos, tres y siete anillos (Patnaik, 1992).

2.3.1 Mecanismo de toxicidad

El mecanismo de toxicidad se reporta como una interferencia con la función de la membrana celular y los sistemas enzimáticos asociados con ella. La mayor preocupación con relación a esta clase de compuestos es la habilidad de los reactivos metabólicos –epóxidos y dihidrodioles– de unirse a las proteínas celulares y al ADN, lo que resulta en disrupciones bioquímicas y daño celular que conduce a mutaciones; en consecuencia, pueden desarrollarse tumores, malformaciones y cáncer (Hoffman y col., 2003).

2.3.2 Activación

Los HAP son biológicamente inertes (procarcinógenos), pero son activados por una forma inducible de oxidasas de función mixta: la hemoproteína citocromo P₄₅₀, principalmente localizada en la membrana del retículo endoplásmico y conocida también como P₄₅₀1A1. De igual manera, la presencia de estos compuestos causa la inducción de P₄₅₀1A1, por lo cual se eleva el grado de activación de los HAP y a su vez se incrementa el grado de formación de aductos de ADN; lo cual puede causar errores en su replicación, aumentando así la tasa de mutaciones químicamente inducidas (Walker y col., 1997).

2.3.3 Mecanismo de reacción

La activación del benzo[a]pireno resulta en la formación de un metabolito diol-epóxido, es decir, el 7,8-diol-9,10-epóxido benzo[a]pireno. Tal como se ilustra en la Figura 2.1, dicho metabolito es el que inicia el complejo proceso de mutagénesis y carcinogénesis al unirse covalentemente al ADN (Tarcher, 1992) mediante la siguiente reacción de tipo S_N2: el anillo de guanina en el ADN (nucleófilo) ataca al anillo de tres miembros que forma el grupo epóxido (electrófilo), éste último se abre para dar lugar al enlace C-N entre el C-10 del benzo[a]pireno y el nitrógeno exocíclico de la guanina (Zakrzewski, 1997).

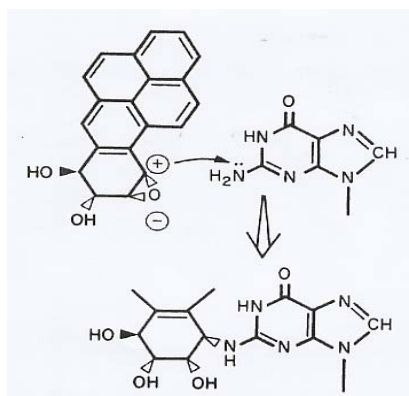


Figura 2.1 Interacción entre el 7, 8-diol-9,10-epóxido benzo[a]pireno y el grupo amino de la guanina (Zakrzewski, 1997)

2.3.4 Reactividad

Por otro lado, existe evidencia que indica que la unión con el ADN generalmente ocurre en el anillo epóxido a través del átomo de carbono adyacente a la región bahía de la molécula activada, por lo que los metabolitos más carcinogénicos de cualquier hidrocarburo dado parecen provenir de precursores de dihidrodiol o de epóxidos que estructuralmente presentan una región bahía (Bjørseth y Ramdahl, 1985), la cual se encuentra formada por una ramificación en la secuencia de anillos bencénicos. Dicha organización en el arreglo de los átomos de carbono le imparte un alto grado de reactividad bioquímica a los HAP (Baird, 1995).

2.3.5 Eliminación

Otra reacción involucrada en el metabolismo de los HAP es la conjugación enzimática de los intermediarios oxigenados con ácido glucorónico, sulfatos y glutatión. Estos conjugados solubles en agua son fácilmente removidos del organismo a través de la bilis, las heces y la orina, por lo que se consideran productos de detoxificación (Bjørseth y Ramdahl, 1985).

2.3.6 Acumulación

Debido a sus características lipofílicas, los HAP pueden acumularse en tejido adiposo y permanecer así indefinidamente; no obstante, la ingesta continua de alimentos contaminados a niveles de ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) representa un peligro potencial para la salud humana, pues con el tiempo las personas pueden revelar manifestaciones típicas de una intoxicación crónica, tales como la producción espontánea de tumores malignos (Helferich y Winter, 2001).

2.3.7 Bioseguimiento

El seguimiento de la formación de aductos HAP-ADN constituye, actualmente, la técnica más apropiada para determinar la presencia de HAP en un organismo. La estabilidad de los aductos significa que la evidencia de exposición a los compuestos permanece aún después de que han sido eliminados en el cuerpo (Walker y col., 1997). Por lo tanto, los biomarcadores validados para evaluar la exposición alimentaria a los HAP son los aductos HAP-ADN, generalmente detectados en muestras de linfocitos. Precisamente, es a través de estos procedimientos como se confirma la hipótesis referente a que la dieta es la principal fuente de exposición a los HAP en el caso de los no fumadores (Phillips, 1999).

2.3.8 Propiedades toxicológicas

La Tabla 2.2 muestra las propiedades toxicológicas más relevantes de los compuestos bajo estudio.

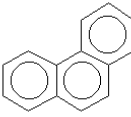
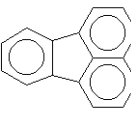
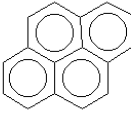
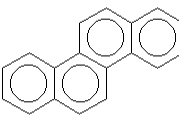
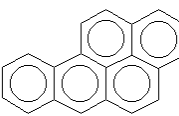
Pese a los estudios toxicológicos, no se cuenta con un conocimiento concreto acerca de los límites en que estos materiales llegan a ser carcinogénicos, pues sus efectos se hacen presentes en el sitio de aplicación. En experimentos con animales a los cuales les fue aplicado el compuesto superficialmente en la piel, la concentración efectiva fue de 10-100 µg/kg de peso (Fellenberg, 1999).

2.4 Introducción de los HAP en la cadena alimentaria

La presencia de COS en las plantas es motivo de preocupación, ya que éstas constituyen un importante punto de entrada a la cadena alimentaria de los animales y de las personas. La exposición de la población humana a los contaminantes orgánicos se da, preferentemente, en las zonas altamente industrializadas describiendo la siguiente trayectoria: atmósfera → vegetación → ganado → leche y/o productos lácteos, carne → seres humanos, la cual presenta a la exposición atmosférica como la ruta más significativa de contaminación por HAP en las plantas terrestres. Además del consumo directo de vegetales incluidos en la dieta humana, se sabe que las plantas juegan un papel crucial en la acumulación de sustancias dentro de las cadenas alimenticias agrícolas: la grasa animal, en forma de leche o carne (básicamente en el músculo), es la principal fuente de exposición indirecta a muchos

contaminantes orgánicos persistentes en las poblaciones de prácticamente todo el mundo (Müller y col., 2001).

Tabla 2.2 Propiedades toxicológicas de los HAP en estudio (Finlayson-Pitts y Pitts, 1986; Patnaik, 1992; Merck Index, 2001)

Compuesto	MM	DL ₅₀ (mg/kg)	Datos de toxicidad	Actividad carcinogénica
 Fenantreno (PHE)	178	700	Puede causar tumores en la piel en el sitio de aplicación. Puede causar fotosensibilización de la piel	0
 Fluoranteno (FLU)	202	2000	Leve toxicidad oral y cutánea. Puede causar tumores en la piel en el sitio de aplicación	+
 Pireno (PYR)	202	2700	La inhalación o ingesta causa irritación de los ojos, excitación y contracción muscular	0
 Criseno (CHR)	228	99	Toxicidad oral baja. Produce tumores y cáncer en la piel, en el sitio de aplicación	+
 Benzo[a]pireno (BaP)	252	4095	Suficiente evidencia de carcinogenicidad por todas las vías de exposición	++

MM: Masa molecular; DL₅₀: Dosis letal media

+: Evidencia limitada; hay una interrelación de causa de cáncer, pero no ha sido probada

++: Suficiente evidencia de carcinogenicidad en humanos

2.5 Hortalizas

El consumo de hortalizas en México es ampliamente recomendado por su apreciable contenido de vitaminas, minerales y fibra dietética. Las hortalizas son plantas herbáceas de ciclo anual o bienal (excepcionalmente perenne) y de prácticas agronómicas intensivas cuyos productos son usados en la alimentación humana al estado natural o procesados. Presentan una elevada proporción de agua (>70%), un bajo contenido energético (<100 cal/100 g), y una vida útil corta en poscosecha que varía desde unos pocos días hasta unos

cuantos meses. Dentro de las hortalizas y verduras de mayor consumo, destacan aquellas plantas herbáceas útiles que se ingieren ya sea de manera natural, cocidas o tratadas por otros procedimientos. Según la parte de la planta que se emplea para su consumo, es conveniente separarlas en raíces y tubérculos, entre las que se encuentran las zanahorias, remolacha, rábanos y nabo, entre otras; existen las denominadas bulbos como las cebollas; las hojas y tallos tiernos se ejemplifican con las espinacas, espárragos, lechuga, acelgas, cilantro y perejil; finalmente, se encuentran las flores (flor de calabaza) y frutos de hortalizas como son los tomates, pepinos, berenjenas, calabazas y pimientos (Catsberg y Kempen-Van Dommelen, 1990).

2.5.1 Propiedades nutrimentales

Las verduras u hortalizas, en general, son una importante fuente de vitaminas C y B, β -caroteno, minerales y celulosa; preferentemente, deben ingerirse en crudo puesto que la mayoría de las vitaminas se ven alteradas o destruidas por la acción del calor. El color verde que presentan se debe a la clorofila, compuesto nutritivo que poseen las plantas y en la que por influjo de la luz solar, los sustratos vegetales son transformados en productos energéticamente útiles. Esta función vital les confiere a las hojas verdes varias virtudes o propiedades para la nutrición del hombre, entre las que destacan las siguientes: 1) contribuyen a la regeneración sanguínea y de los glóbulos rojos, 2) ayudan a la asimilación de proteínas, 3) presentan una acción reguladora de la nutrición y de la tensión arterial y, por último, 4) influyen en el equilibrio ácido-base del organismo (Chávez, 2003). En la Tabla 2.3 se presentan los principales componentes en las hortalizas de hoja de mayor consumo en México.

2.5.2 Presencia de HAP en hortalizas

Las hortalizas, al igual que el resto de la vegetación, tienen la propiedad de acumular diferentes sustancias orgánicas que se encuentran en la atmósfera. Su determinación sirve, pues, para evaluar el grado de exposición a los contaminantes presentes en las plantas comestibles; sin embargo, debido a la complejidad de este tipo de estudios, en la actualidad no ha sido posible estimar con precisión el impacto que tiene el consumo de estos productos en la dieta, sobre la salud humana. En la Tabla 2.4 se citan los resultados derivados del análisis de algunas hortalizas que crecen en zonas industriales de Alemania y

Grecia. Asimismo, a modo de comparación, en el Anexo A se describe la presencia de los HAP en algunas muestras de vegetación.

Tabla 2.3 Valor nutritivo de hortalizas de hoja de mayor consumo en México (Muñoz y Ledesma, 2003)

<i>Cantidades por 100 g de porción comestible</i>	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Porción comestible (%)	82	67	82	70	72	82	69	55	83	82
Elementos principales										
Energía (kcal)	39	22	33	25	32	22	25	17	66	41
Agua (%)	87.53	93.6	90.50	89.50	91.40	91.80	95.00	96.00	82.30	91.00
Fibra dietética (g)	2.50	1.50	0.90	4.20	1.80	4.00	1.50	1.50	1.80	0.80
Hidratos de carbono (g)	4.80	4.20	2.90	2.60	5.40	1.70	4.10	2.70	10.90	4.90
Proteínas (g)	4.25	0.80	3.60	2.60	2.30	2.90	1.40	1.00	3.10	2.30
Lípidos totales (g)	0.32	0.20	0.80	0.50	0.10	0.40	0.30	0.20	1.10	1.30
Ácidos grasos										
Saturados (g)	NR	0.03	0.03	NR	0.02	0.03	0.04	0.03	NR	NR
Monoinsaturados (g)	NR	0.02	0.01	NR	0.00	0.01	0.01	0.01	NR	NR
Poliinsaturados (g)	NR	0.06	0.01	NR	0.03	0.01	0.05	0.11	NR	NR
Minerales										
Calcio (mg)	67.50	52.00	59.00	101.00	38.00	66.00	25.00	16.00	176.00	86.00
Fósforo (mg)	5.34	26.00	40.00	55.00	23.00	469.00	39.00	56.00	NR	NR
Hierro (mg)	3.00	1.40	0.60	6.10	1.40	4.40	0.60	0.40	7.20	1.90
Magnesio (mg)	74.31	12.00	44.00	26.00	13.00	39.00	11.00	8.00	41.00	68.00
Sodio (mg)	0.65	88.00	13.00	34.00	20.00	130.00	9.00	11.00	45.00	45.00
Potasio (mg)	279.00	284.00	209.00	619.00	233.00	130.00	264.00	290.00	727.00	494.00
Zinc (mg)	0.68	0.17	0.15	0.20	0.18	0.50	0.50	0.50	0.73	NR
Vitaminas										
Vitamina A (µg)	183.00	11.00	500.00	384.00	33.00	542.00	44	44	673.33	NR
Ácido ascórbico (mg)	6.00	8.00	51.00	11.00	38.00	40.00	6.00	7.00	146.00	13.00
Tiamina (mg)	0.05	0.02	0.13	0.12	0.10	0.10	0.14	0.05	0.10	0.02
Riboflavina (mg)	0.23	0.04	0.20	0.06	0.06	0.16	0.05	0.03	0.31	0.10
Niacina (mg)	0.50	0.40	1.50	1.00	0.06	0.50	0.30	0.03	1.60	0.60
Piridoxina (mg)	NR	0.03	0.13	NR	0.10	0.18	0.06	NR	0.16	NR
Ácido fólico (µg)	90.00	12.00	200.00	NR	57.00	140.00	34.00	36.00	183.00	NR

I: Acelga (*Beta vulgaris* var *cicla*); II: Apio (*Apium graveolens*); III: Berro (*Roripa nasturtium-aquaticum*); IV: Cilantro (*Coriandrum sativum* L.); V: Col blanca (*Brassica oleracea* var *capitata*); VI: Espinaca (*Spinacia oleracea* L.); VII: Lechuga orejona (*Lactuca sativa* L.); VIII: Lechuga romana (*Lactuca sativa* L.); IX: Perejil (*Petroselinum sativum*); X: Verdolaga (*Portulaca oleracea* L.); NR: No reportado

Tabla 2.4 Contenido de HAP en hortalizas de hoja que crecen en una zona industrial en $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Speer y col., 1990; Kipopolou y col., 1999)

Muestra	PHE	FLU	PYR	CHR	BaP	ΣHAP Mín – Máx (Med)	Masa seca o masa fresca	Referencia
Perejil sin lavar	40.1	14.8	7.8	4.9	2.4	NR	Masa fresca	Speer y col., 1990
Perejil lavado	21.3	6.9	3.8	1.8	0.4	NR		
Hojas de zanahoria	41.3	13.7	3.7	1.9	0.2	NR		
Col verde sin lavar	31.1	35.2	23.6	13.9	1.0	NR		
Hojas de colinabo	6.9	6.2	1.3	2.2	0.2	NR		
Espinaca sin lavar	9.7	10.6	5.8	3	1.9	NR		
Espinaca lavada	6.7	5	1.9	0.8	0.2	NR		
Lechuga lavada	0.8	0.6	0.4	0.3	0.1	NR		
Repollo (Col)	18	3.0	3.9	0.6	0.1	25 – 108 (42)	Masa seca	Kipopolou y col., 1999
Lechuga	58	34	20	3.9	0.28	40 – 294 (161)		
Escarola	43	44	13	3.9	0.24	112 – 239 (155)		

PHE, fenantreno; FLU, fluoranteno; PYR, pireno; CHR, criseno; BaP, benzo[a]pireno
 ΣHAP , HAP totales; Med, Mediana
 NR: No reportado

2.5.3 Concentraciones encontradas de HAP en vegetales

Se sabe que el grado de contaminación es gobernado por el lugar donde los vegetales crecen, es decir, aquellos situados cerca de vías altamente transitadas y/o próximos a zonas industriales que seguramente exhibirán una mayor carga de contaminantes.

De acuerdo con las condiciones en que se encuentran los cultivos, muchas especies vegetales pueden presentar, relativamente, altas concentraciones de HAP, incluyendo a las hortalizas de hojas amplias. Un estudio en Finlandia determinó niveles en el rango de 4.8-94 ppb en lechuga fresca (Phillips, 1999), mientras que los valores de benzo[a]pireno más frecuentes oscilan entre 2-12 $\mu\text{g/kg}$ de masa seca (Kipopolou y col., 1999). En conformidad con algunos autores, niveles de 2.85-24.5 ppb de benzo[a]pireno son típicos

en todas las muestras de vegetales comestibles; inclusive, en algunos casos, las cantidades son mayores que aquellas encontradas en muestras de carne asada (Phillips, 1999).

Cabe destacar que los HAP de baja masa molecular, en fase gaseosa, contaminan la superficie de cultivos de frutas, hortalizas y granos, pero sólo una pequeña proporción de estos compuestos pueden ser removidos por lavado debido, probablemente, a su incorporación a las ceras superficiales de las hojas o a la penetración en los tejidos de la planta. En cuanto a las partículas, se ha visto que el lavado de la lechuga con agua elimina una cantidad considerable de HAP de alta masa molecular. En general, debe tomarse en cuenta, como una medida preventiva, que el pelado de las frutas y hortalizas, o la remoción de las hojas externas de especies como col y lechuga, son acciones que tienden a reducir su contenido de HAP (Tarcher, 1992; Lipnick y col., 2001).

Por otro lado, los aceites vegetales también son una fuente sustancial de HAP en la dieta. Por ejemplo, las concentraciones en Finlandia promedian 23 ppb y en los olivos italianos se han encontrado niveles de 7 ppb en promedio, aunque algunas muestras superan los 15 ppb (Ignesti y col., 1992). Esto es importante, ya que los productos hechos de aceites o grasas vegetales pueden estar más contaminados que los productos equivalentes de origen animal (Phillips, 1999).

2.5.4 Contribuciones de HAP en la dieta aportada por el consumo de vegetales

En un análisis de HAP realizado en el Reino Unido (Dennis y col., 1983) se encontró que las mayores contribuciones provienen de los cereales (cerca de un tercio) y de los aceites y grasas (también un tercio); las frutas y hortalizas contribuyen con el resto. Inesperadamente, las aportaciones de carne, pescado, leche y bebidas fueron comparativamente menores. Con base en un consumo diario de 1.46 kg de alimentos y bebidas, la carga total de HAP en la dieta cotidiana fue calculado en 3.70 µg/día. Un estudio similar de la dieta en Alemania (De Vos y col., 1990) estimó un ingreso diario promedio de entre 5 y 17 µg/día; los compuestos para los cuales existe al menos alguna evidencia de actividad carcinogénica contabilizan alrededor de la mitad del total. Este estudio también concluye que los cereales, junto con las hortalizas y demás productos vegetales, son la principal fuente de HAP. Sorpresivamente, pese a las diferencias en los hábitos de alimentación actuales entre las poblaciones del norte y del sur de Europa, el

análisis de la dieta en Italia (Lodovici y col., 1995) mostró niveles y proporciones similares de HAP, pues las grandes contribuciones al ingreso diario total provinieron de los cereales, hortalizas y frutas, por lo que en este estudio, la ingestión total se estimó en 3 µg/día, de los cuales, cerca de la mitad son compuestos carcinogénicos. Finalmente, en Nueva Zelanda (Thomson y col., 1996), un país medianamente industrializado, se estimó un ingreso promedio en la dieta de 1.2 µg/día. Con base en este tipo de investigaciones, algunos autores concluyen que una dieta vegetariana, si es alta en hortalizas de hoja y en granos no refinados, puede resultar en el ingreso de mayores cantidades de HAP, comparadas con las de una dieta promedio (Baird, 1995; Phillips, 1999).

En Italia (Lodovici y col., 1995), la vía de exposición a los HAP por medio de la dieta (3 µg/día) evidencia un ingreso significativamente mayor que el alcanzado a través de la respiración de aire contaminado (370 ng/día). En un estudio realizado en los Estados Unidos (Lioy y Greenberg, 1990), el cual usó al benzo[a]pireno como compuesto representativo de todos los HAP, se estimó que la exposición semanal al benzo[a]pireno derivado del consumo de alimentos es, comúnmente, del 70%. En general, los análisis señalan que el ingreso promedio a través de la dieta constituye cerca del 70-90% de la exposición diaria total en el caso de los individuos no fumadores (Menzie y col., 1992; Phillips, 1999). Asimismo, los estudios de bioseguimiento indican que de todas las rutas posibles de exposición humana a los HAP, la ingesta es la que predomina (Phillips, 1999).

CAPÍTULO 3. FUNDAMENTOS ANALÍTICOS

3.1 Tratamiento de la muestra

Puesto que las distintas muestras ambientales representan mezclas complejas de compuestos orgánicos, es necesario realizar una limpieza y concentración de los compuestos de interés. Para ello, se realizan una serie de tratamientos tales como deshidratación o liofilización, extracción en fase sólida y purificación a fin de obtener los compuestos lo más limpios posibles, lo cual permita llevar a cabo su cuantificación de manera confiable.

3.1.1 Liofilización

Se define como el proceso de deshidratación que permite remover agua de matrices congeladas a través de la aplicación de energía en forma de calor, eliminando el contenido de humedad, gracias a la sublimación directa del hielo bajo una presión reducida.

El proceso de liofilización consiste esencialmente en dos etapas: congelación rápida y secado. Esta segunda operación, a su vez, se divide en dos partes: la primera de ellas es la sublimación del hielo bajo vacío, el cual sublima cuando se suministra la energía correspondiente al calor latente; la etapa secundaria comienza cuando se ha agotado el hielo en el producto y la humedad proviene del agua parcialmente ligada en el material que se está secando.

Los productos liofilizados que han sido tratados adecuadamente pueden ser almacenados durante tiempos ilimitados, reteniendo la mayoría de las propiedades físicas, químicas, biológicas y sensoriales de su estado fresco (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado, 2000).

3.1.2 Técnica de extracción por Soxhlet

Según la EPA, la extracción por Soxhlet es un método adecuado para obtener COS provenientes de matrices ambientales sólidas. Esta técnica se basa en un reflujo de solvente que cae repetidas veces sobre la muestra, proceso que normalmente se realiza por un largo periodo de tiempo (periodos de 6, 12, 18 o 24 horas). El sistema es muy eficiente debido a que la muestra es extraída muchas veces, lo que a su vez proporciona un extracto usando, relativamente, un volumen moderado de disolvente.

3.1.3 Concentración de los extractos

Los extractos grandes y medianos de compuestos semivolátiles son concentrados rutinariamente en un evaporador rotatorio (rotoevaporador) conectado al vacío con el fin de reducir la cantidad de calor requerido para remover el disolvente (<50°C). Es recomendable usar líquidos de bajo punto de ebullición como hexano o diclorometano (DCM), los cuales se eliminan fácilmente; por tanto, disminuye la probabilidad de perder analitos volátiles y se minimiza la degradación térmica.

3.1.4 Agentes secantes

Los extractos crudos, incluso los disolventes no polares, pueden contener cantidades traza de agua perjudicial para la cromatografía. Los extractos de volúmenes grandes o medianos son secados normalmente a través de un tratamiento con sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro, granular o en polvo. Ésta es una técnica conveniente debido a la poca reactividad y a la alta capacidad de adsorción de dichos agentes secantes.

3.1.5 Cromatografía de adsorción

Para mezclas complejas de compuestos orgánicos contenidos en un extracto, es necesario realizar algún grado de separación por cromatografía en columna. Se usa un adsorbente adecuado como fase estacionaria y algún disolvente no polar (hexano, DCM o una mezcla de ambos) como fase móvil; si se requiere, puede variarse la polaridad en orden creciente. Asimismo, el orden de elución se basa en la polaridad de los compuestos, por lo que las moléculas polares serán fuertemente adsorbidas y eluirán lentamente por la columna. Éste procedimiento permite la obtención de las especies deseadas relativamente libres de compuestos, los cuales podrían interferir en el análisis subsecuente.

En el caso de los HAP se sabe que, a mayor número de anillos aromáticos en su estructura, la polaridad es menor, por lo que se espera que a mayor número de anillos aromáticos disminuya la retención de estos en los adsorbentes usados: gel de sílice y alúmina, durante su paso por la columna de separación.

En efecto, las fases normales más utilizadas en cromatografía de adsorción son el gel de sílice y la alúmina: ambos se caracterizan por tener una gran área superficial, una porosidad considerable y un alto índice de retención. El gel de sílice posee una gran superficie activa que consiste en una capa de grupos silanol distribuidos aleatoriamente; el mecanismo de

adsorción se da por la interacción de los grupos silanol superficiales con los grupos funcionales polares presentes en las moléculas de soluto. Por su parte, la superficie de la alúmina es capaz de exhibir diferentes tipos de interacciones soluto-adsorbente; esto puede atribuirse a los campos positivos alrededor del átomo de Al^{3+} , los cuales permiten la interacción con moléculas fácilmente polarizables. Asimismo, la presencia de sitios básicos (probablemente O^{2-}) permite la interacción con donadores de protones (Braithwaite y Smith, 1999).

El contenido de agua en el adsorbente es particularmente importante: sin la desactivación de los fuertes sitios activos se corre el riesgo de obtener tiempos de retención no reproducibles, o bien, puede ocurrir la adsorción irreversible de los solutos. Por lo tanto, antes de iniciar, el adsorbente es secado y una cantidad específica de agua es adicionada a éste mientras se agita, entonces se deja reposar por 8-16 horas para permitir el equilibrio y la distribución de la misma. Así pues, la actividad de un adsorbente se relaciona con la cantidad de agua que contiene (Cazes, 2001).

3.2 Cromatografía de gases (CG)

Es una técnica analítica para separar sustancias volátiles y semivolátiles pasando una corriente gaseosa (gas portador) a través de una fase estacionaria con el fin de identificar, cuantificar y colectar a los componentes de una mezcla (McNair, 1981). En general, la cromatografía de gases (CG) tiene una muy alta resolución, de modo que más de 100 compuestos pueden separarse en una corrida; asimismo, se trata de un método simple, rápido, flexible, robusto y relativamente barato (Millar y Haynes, 1998).

El proceso de CG se basa en la selectividad de la fase estacionaria hacia los compuestos de una muestra en función de sus coeficientes de distribución (McNair, 1981). No obstante, se requiere que cada componente tenga una presión de vapor apreciable a la temperatura de operación de la columna y una estabilidad térmica suficiente para soportar las condiciones del análisis (Braithwaite y Smith, 1999).

En un cromatógrafo de gases, el gas portador pasa a través de una columna capilar –que contiene a la fase estacionaria– instalada dentro de un horno. La muestra es introducida en un inyector caliente donde es rápidamente vaporizada. La fase móvil acarrea el vapor hacia la columna, ahí los componentes son repartidos entre la fase estacionaria orgánica y el gas

portador inerte. Conforme la temperatura se eleva, los analitos pasan a la fase vapor y son arrastrados a lo largo de la columna a diferentes velocidades. Posteriormente emergen entrando al detector en distintos tiempos (Watson, 1997; Millar y Haynes, 1998).

Un registro de la respuesta del detector respecto al tiempo produce un cromatograma (gráfica de señal vs tiempo).

3.2.1 Gas portador

El gas portador ideal debe ser no reactivo, no tóxico, no flamable y de costo accesible, puesto que su única función es arrastrar a los compuestos a través de la columna. Gases con pequeños coeficientes de difusión como el hidrógeno y el helio darán mejores eficiencias de separación que los de mayor peso molecular como el nitrógeno y el dióxido de carbono. Por esta razón, el helio es el gas portador más ampliamente usado al proporcionar la mejor resolución cuando los analitos eluyen sobre un amplio rango de temperaturas (Braithwaite y Smith, 1999).

3.2.2 Introducción de la muestra

El ingreso de la muestra en un cromatógrafo de gases es la primera etapa del proceso cromatográfico y su eficiencia se refleja en todo el procedimiento, así como en la precisión y exactitud de los resultados cualitativos y cuantitativos.

En CG, las muestras líquidas se inyectan mediante una microjeringa atravesando un septo de goma de silicón localizado dentro del inyector caliente que contiene un tubo de vidrio “silanizado” (“liner”). Aquí los componentes se evaporan y son arrastrados por el gas portador hacia la columna.

Precisamente, el propósito de usar un inyector es introducir una pequeña pero representativa porción de la muestra en la columna sin que ésta se sature. Así que de acuerdo con la cantidad disponible, el modo de inyección puede tener dos variantes: “split” (dividida) y “splitless” (sin dividir). El modo “split” se usa cuando la cantidad de analito es grande, requiriendo de una alta velocidad de vaporización para lograr que sólo una fracción menor de la muestra sea introducida en la columna; mientras que la mayor parte fluye hacia fuera del inyector a través de una válvula de división. En cambio, la inyección en el modo “splitless” se usa cuando la concentración se encuentra a niveles de ppb. La válvula de división permanece cerrada de tal forma que la totalidad de los compuestos son acarreados

a la columna. El disolvente de la muestra generalmente es de bajo punto de ebullición y la temperatura del inyector es menor que en la inyección “split” (~220°C). Esto es porque la muestra pasa mucho más tiempo en el inyector a fin de evitar que se descomponga térmicamente (Jennings y Mittlefehldt, 1997; Braithwaite y Smith, 1999).

Debido a los rangos de concentración que se manejan en este trabajo (0.5 – 5 ppm), los HAP se analizaron en el modo “splitless” usando una temperatura en el inyector de 220°C. Cabe mencionar que todos los puntos de ebullición de los compuestos en estudio son superiores a 220°C, por lo que de esta manera se evita la descomposición térmica de dichos componentes.

3.2.3 Columnas cromatográficas

La columna es el corazón del cromatógrafo. Entre los sistemas de CG, el funcionamiento de las columnas capilares se acerca a lo que sería un proceso de separación ideal: el volumen óptimo de inyección, la película fina de fluido y el gran tiempo de contacto se aproximan a las condiciones de equilibrio para la separación eficiente de los componentes (Jennings y Mittlefehldt, 1997). Sus dimensiones varían de 15-50 m de longitud con un diámetro interno de 0.1-0.3 mm y un grosor de la fase estacionaria del orden de 0.25 µm.

Las columnas capilares de sílice, por sus características de fabricación, ofrecen importantes ventajas tales como resistencia física, una reactividad mucho menor frente a los compuestos de la muestra y gran flexibilidad (Skoog y Leary, 1994). Dentro de este tipo, la DB-5 es una columna ampliamente usada, la cual se caracteriza por su baja polaridad y por su fase estacionaria –5% difenil y 95% dimetil polisiloxano– químicamente unida al soporte a fin de reducir su tendencia a “sangrar” cuando las temperaturas son elevadas (Braithwaite y Smith, 1999).

3.2.4 Fase estacionaria

La selección de una fase estacionaria adecuada depende de las propiedades físicas y químicas de las sustancias a ser analizadas, ya que las interacciones entre los grupos funcionales de ambas determinarán la separación de compuestos con presiones de vapor similares. Éstas incluyen interacciones no polares de tipo van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, uniones hidrógeno e interacciones entre anillos aromáticos, que conjuntamente se traducen en fenómenos de adsorción y desorción a lo largo de la

columna. Por lo tanto, los componentes de la muestra avanzan solamente cuando se encuentran en fase gaseosa, siendo retenidos aquellos que presentan una mayor afinidad por el adsorbente (Millar y Haynes, 1998).

Los polímeros de dimetil siloxano tienen varias propiedades que son deseables en las fases estacionarias: son térmicamente estables, su viscosidad es afectada ligeramente por la temperatura, son fácilmente entrelazables y pueden unirse covalentemente a la superficie del soporte, por lo que las columnas hechas de estos polímeros generalmente presentan niveles menores de “sangrado” que otros tipos de fases estacionarias. El dimetil polisiloxano es relativamente no polar, pero su polaridad y selectividad pueden ser manipulados al sustituir otros grupos funcionales (fenil, vinil o cianopropil) por algunos grupos metilo (Jennings y Mittlefehldt, 1997).

Para los HAP se ha reportado el uso de las siguientes columnas para cromatografía de gases: SE-52 (Bi y col., 2001), DB-5 (Speer y col., 1990) y HP-5MS (Alfani y col., 2001).

3.2.5 Programación de temperatura

La fuerza motriz en CG es la temperatura. Se sabe que el coeficiente de partición es una propiedad que depende de ella, por lo que un incremento de 30°C puede reducir a la mitad al coeficiente de partición del analito, aumentando al doble su velocidad de migración. Con la programación de la temperatura se puede mejorar, simplificar o acelerar la separación, identificación y determinación de los componentes de una muestra (McNair, 1981). Consiste en elevar la temperatura de la columna durante la separación para así aumentar la presión de vapor de los solutos y de ese modo disminuir los tiempos de retención de los componentes que se eluyen, lo cual se traduce en un análisis más rápido y versátil (Skoog y Leary, 1994).

Físicamente, el incremento de energía afecta las posiciones de los equilibrios de distribución de los analitos entre el gas portador y la fase estacionaria, así como la rapidez con que se establecen. Cuando se eleva la temperatura de la columna, se acelera la elución y se alcanza más rápido el equilibrio entre la fase móvil y la estacionaria. El aumento de temperatura en el curso de la separación se denomina gradiente de temperatura y éste se optimiza tomando en cuenta la resolución necesaria y la reducción de los tiempos de retención (Rubinson y Rubinson, 2000).

Para establecer el gradiente de temperatura óptimo para el experimento fue necesario hacer varias pruebas a fin de determinar las variaciones de tiempo de retención de los cinco HAP en estudio y la resolución entre los isómeros fluoranteno y pireno. En varias de las pruebas se obtuvo el mismo perfil cromatográfico, sin embargo, el gradiente de temperatura óptimo se estableció al obtener un tiempo de retención más corto para todos los compuestos en estudio.

3.2.6 Detectores en CG

El detector es un dispositivo que indica la presencia y mide la cantidad de los componentes separados que eluyen de la columna, generando una respuesta proporcional a la concentración o al flujo de masa del componente eluído (McNair, 1981). Para la vasta mayoría de las aplicaciones en química ambiental se utiliza el espectrómetro de masas, el cual es sensible y espectralmente específico, por lo que es un detector cromatográfico altamente eficiente y universal (Skoog y Leary, 1994).

3.2.7 Identificación y cuantificación

La información cuantitativa contenida en un cromatograma de gases se expresa, preferentemente, en función de las áreas bajo la curva de los picos y no de sus alturas, ya que estas últimas varían por diversos factores, entre los que se encuentran la velocidad de inyección, la velocidad de flujo y la temperatura. El análisis cuantitativo comúnmente se realiza empleando curvas de calibración, las cuales requieren de estándares para prepararse. El análisis cualitativo se efectúa mediante la información que proporcionan los tiempos de retención de cada compuesto, es decir, el tiempo que tarda un analito en recorrer la columna cromatográfica. La coincidencia entre los tiempos de retención de un estándar y un pico desconocido no aporta evidencia contundente para establecer la identidad de una sustancia (Skoog y Leary, 1994), razón por la cual la espectrometría de masas es ampliamente usada como una técnica auxiliar en la identificación rutinaria de los compuestos eluídos.

3.3 Espectrometría de masas (EM)

Es una técnica analítica que se emplea para medir las masas de los iones y su abundancia en fase gaseosa. La determinación de masas incluye la generación de moléculas en forma de

vapor, la ionización de las mismas y la separación según sus masas, las cuales se realizan por distintos métodos. Su vasta aplicación se debe a la diversidad tan grande de las capacidades de las tres secciones fundamentales de un espectrómetro de masas: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector (Rubinson y Rubinson, 2000).

La espectrometría de masas (EM) constituye un método analítico altamente sensible, sin embargo, la sensibilidad es dependiente de la muestra examinada y de la instrumentación empleada. Consiste en bombardear con un haz de electrones a las moléculas del compuesto bajo estudio dentro de un sistema a alto vacío, provocando su ruptura en varios fragmentos iónicos. Cada ión positivo (catión) formado presentará una relación masa a carga (m/z), y puesto que la mayoría de los iones tienen una sola carga, m/z es equivalente a la masa del ión en unidades de masa atómica (UMA). Finalmente, los cationes son acelerados y separados registrándose una señal para cada valor según su m/z , de tal manera que la intensidad de la señal reflejará la abundancia relativa del fragmento ionizado o del ión molecular que la genera (Millar y Haynes, 1998).

3.3.1 Sistema de generación de vacío

Los espectrómetros de masas operan bajo un sistema de generación de vacío adecuado para su buen funcionamiento (10^{-6} - 10^{-5} torr). Desafortunadamente, las presiones arriba de 10^{-5} torr en la región ocupada por la fuente de ionización, el filtro de masas y el detector conducen al deterioro de la resolución o al ensanchamiento del haz de iones debido a las excesivas colisiones ión-molécula. Por lo tanto, el sistema de alto vacío contribuye a optimizar la sensibilidad del equipo, ya que proporciona a los iones una trayectoria libre de colisiones, extendiendo a su vez el tiempo de vida del filamento (Watson, 1997).

3.3.2 Fuente de ionización

El sistema de ionización más empleado es el de impacto electrónico (IE). Las moléculas de la muestra en fase vapor son bombardeadas con un haz de electrones de alta energía –generalmente 70 eV– provenientes de un filamento caliente de tungsteno o renio; la colisión producida expulsa un electrón de la molécula y se genera un catión radical conocido como ión molecular. Debido a que el potencial de ionización de los compuestos orgánicos típicos es menor a 15 eV, el bombardeo de electrones imparte 50 eV (o más) de energía excesiva al ión molecular recién formado; ésta es disipada mediante el rompimiento

de enlaces covalentes (en caso de que el ión molecular sea inestable), los cuales tienen energías de entre 3 y 10 eV. Conforme a la estructura y a la estabilidad molecular, el rompimiento de enlaces conducirá a producir un patrón de fragmentación característico para cada compuesto en particular (Cazes, 2001).

3.3.3 Analizador de masas

El dispositivo que separa la mezcla de iones generados en iones de masas individuales para obtener un espectro, constituye el corazón de un espectrómetro de masas.

El analizador de masas cuadrupolar es ampliamente utilizado en los estudios de rutina. Consiste en un conjunto de cuatro barras cilíndricas de metal, paralelas, que sirven como electrodos del filtro de masas (las barras opuestas se conectan juntas). Al aplicar un voltaje de corriente continua (DC), modificado por uno de radiofrecuencia (RF), se genera un campo oscilante entre las barras. Cuando un ión ingresa en el campo del cuadrupolo, comenzará a oscilar entre las barras; y si su masa es tal que sus oscilaciones son estables, entonces se moverá a través del analizador hacia el detector. Iones con otros valores de m/z sufrirán oscilaciones inestables, por lo que incrementarán su amplitud hasta desviarse fuera del campo (Braithwaite y Smith, 1999).

Técnicamente, se llama barrido a la variación de los voltajes de DC y de RF, manteniéndose constante la relación entre ambos a fin de producir un efecto de masas lineal. En la práctica, la rapidez del analizador es tal que todo el intervalo de masas (m/z 30-800) puede ser barrido en menos de un segundo (Millar y Haynes, 1998).

En general, los espectrómetros de masas cuadrupolares proveen alta sensibilidad y buena resolución.

3.3.4 Detector

El multiplicador de electrones es el detector elegido en la mayoría de los análisis de rutina. Está formado por una serie de dínodos, cada uno de los cuales se mantiene a un potencial más alto que el anterior. El cátodo y los sucesivos dínodos tienen superficies de cobre-berilio de las que se emiten ráfagas de electrones al ser alcanzados por iones o electrones de elevada energía; de esta manera es amplificada la señal. Un requisito en los analizadores de masas cuadrupolares es que el haz de iones debe acelerarse a varios miles de electronvolts antes del primer choque con el detector, pues es necesario que los iones posean suficiente

energía cinética para expulsar electrones de la primera zona del dispositivo. En general, los multiplicadores de electrones son robustos, seguros y son capaces de suministrar ganancias de corriente elevadas (10^7) y tiempos de respuesta de nanosegundos (Skoog y Leary, 1994).

3.3.5 Espectros de masas

En la mayoría de los casos, el término espectrometría de masas se refiere a la técnica de espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE), puesto que las principales “bibliotecas” o “librerías” y bases de datos de los espectros de masas, algunos de los cuales contienen arriba de 100,000, fueron obtenidos mediante esta técnica. Por otro lado, la abundancia de fragmentos producidos por EM-IE, en un patrón altamente reproducible para un compuesto orgánico dado, provee un espectro de masas que sirve para identificar a dicho compuesto. Sin embargo, algunas precauciones son necesarias cuando se analizan isómeros cuyos espectros pueden ser muy similares entre sí (Millar y Haynes, 1998).

3.4 Sistema acoplado cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM)

Este método, como su nombre lo indica, es una combinación de dos técnicas analíticas complementarias entre sí: CG, una técnica de separación, y EM, una técnica de identificación; juntas constituyen una de las herramientas más versátiles y poderosas del análisis químico y su capacidad indudablemente supera las limitaciones derivadas del uso de cada técnica por separado. Si se logra una buena resolución cromatográfica de los componentes de una mezcla, entonces se obtienen la identificación cualitativa a través del espectro de masas de los compuestos eluidos y la medida cuantitativa del área bajo la curva correspondiente a cada pico en el cromatograma. Ciertamente, el análisis de una muestra impura por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM) consiste en separar a las impurezas del analito y producir los espectros de masas de cada uno de los componentes obtenidos individualmente (White y Wood, 1986; Watson, 1997).

3.4.1 Modos de operación

Para obtener los datos espectrales, el espectrómetro debe ser capaz de evaluar la escala completa de iones (modo de barrido o SCAN), o bien, seleccionar los iones deseados (seguimiento selectivo de iones o SSI).

En el modo SCAN, el filtro de masas se programa para operar secuencialmente en todo un intervalo de masas, por lo que disminuye la sensibilidad debido a que muchos de los iones golpean las barras del cuadrupolo mientras avanzan hacia el detector. Este modo se emplea para identificar especies desconocidas contenidas en una muestra; aunque en la mayoría de los casos, su uso solamente es necesario para establecer la presencia de un componente en particular o de una clase de compuestos en general. En tal situación, no se requiere un espectro de masas completo puesto que los tiempos de retención y sus espectros de masas correspondientes indican que la especie es conocida. Por lo tanto, es suficiente confirmar la presencia o ausencia de los compuestos de interés mediante un seguimiento selectivo.

En el modo SSI, el analizador de masas establece el paso de ciertos iones hacia el detector conforme a una prioridad (selectividad). Este procedimiento es muy sensible, por lo que se usa en las determinaciones cuantitativas permitiendo seleccionar un ión molecular o un ión fragmento representativo de la especie a examinar. A menudo, la extensión del método para evaluar dos o más iones aumenta la probabilidad de identificar correctamente un componente en la mezcla (White y Wood, 1986; Skoog y Leary, 1994).

3.4.2 Interfase directa

Pese a que los requerimientos difieren en cada instrumento, la conexión entre ambos es relativamente sencilla, pues siempre que el tamaño de la muestra y la velocidad de flujo de la columna capilar lo permita, el cromatógrafo de gases puede acoplarse directamente al espectrómetro de masas. Típicamente, una columna abierta que mide 25 m de longitud por 0.25 mm de diámetro interno permite un flujo de 1-2 mL/min (velocidad del gas portador de ~30 cm/s) dentro de la cámara de ionización, lo cual no afecta significativamente a la presión de vacío. Por el contrario, se observa que el ensanchamiento de los picos cromatográficos debido a la presión reducida de la columna es mínimo y que la rapidez del análisis es mayor. Adicionalmente, el acoplamiento directo con columnas capilares de sílice fundida minimiza las pérdidas por absorción y reduce la descomposición de compuestos termolábiles.

En la actualidad, casi todos los sistemas de CG/EM usan exclusivamente columnas capilares e interfases directas que mantienen una buena resolución cromatográfica; además, pueden transferir la totalidad de los analitos a la fuente de ionización, lo que proporciona una máxima sensibilidad (White y Wood, 1986).

3.4.3 Consideraciones en CG/EM

Vapores provenientes de la fase estacionaria de la columna o del septo (o ambas) pueden entrar a la cámara de ionización: en este punto los residuos sufren ionización y rompimiento continuos, de manera que su patrón de fragmentación característico estará presente en cada corrida. Este espectro basal puede interferir con el reconocimiento, en el espectro de masas, de los componentes minoritarios de una mezcla. Puesto que la presión de vapor de la fase estacionaria depende de la temperatura, el grado de contaminación en una fuente de ionización conectada a una columna capilar aumentará conforme a la permanencia de las altas temperaturas del horno durante cada aplicación. Frecuentemente, el espectro basal de este tipo limita la buena sensibilidad del sistema de CG/EM (Watson, 1997).

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

4.1 Área de estudio

4.1.1 Localización

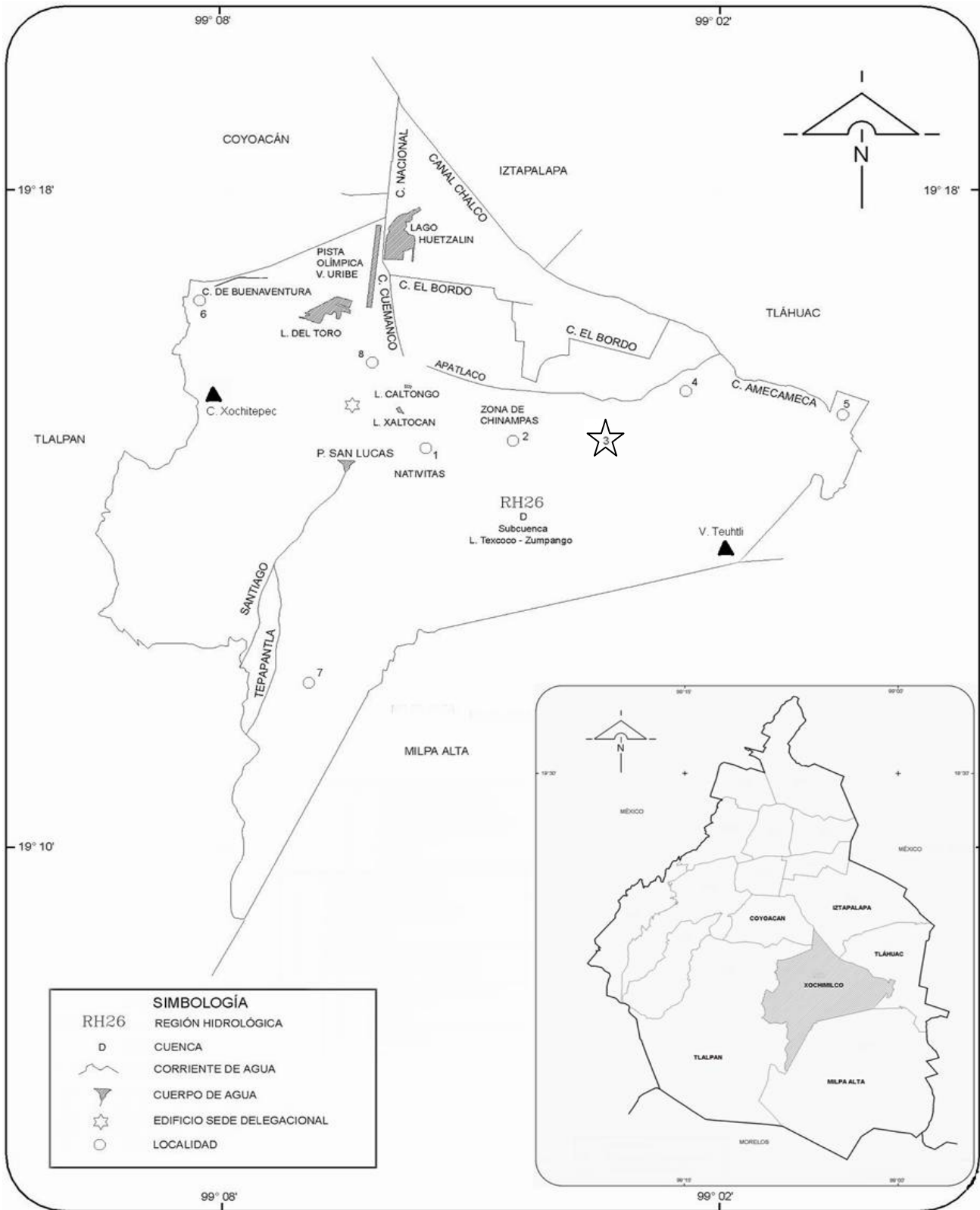
El área de estudio se encuentra ubicada en la Delegación Xochimilco, localizada al sur-orientado de la Ciudad de México. Esta demarcación ocupa el tercer lugar en extensión entre las 16 delegaciones ya que presenta una extensión territorial de 128.1 km², abarcando el 8.9% de la superficie total del Distrito Federal. Sus límites son: al norte con las delegaciones Coyoacán, Iztapalapa y Tláhuac; al sur con la de Milpa Alta; al orientado con la de Tláhuac y al poniente con la de Tlalpan. Su sistema orográfico se encuentra dividido en tres sectores principales: Sierra del Ajusco, Tlalpan-Xochimilco y del Valle. Las elevaciones en estas zonas van de los 2000 a los 2500 metros sobre el nivel del mar (M.S.N.M.), destacando por su altura el volcán Teuhtli y el cerro de Xochitepec (Herrera, 1997).

4.1.2 Descripción

Específicamente, el estudio –donde se tomaron las muestras– se llevó a cabo en el pueblo de San Gregorio Atlapulco, perteneciente a la delegación Xochimilco. Este lugar se sitúa 21 km al sureste del centro de la Ciudad de México, siendo uno de los 14 pueblos que conforman dicha demarcación. La altitud aproximada es de 2238 M.S.N.M.; colinda por la parte norte con la Delegación Tláhuac, por el sur con la Delegación Milpa Alta y por el este con el pueblo de San Luis Tlaxialtemalco. Tanto el pueblo de San Gregorio como Xochimilco en general, constituyen una zona tradicionalmente chinampera (Becerril, 1993). En la Figura 4.1 se expone un mapa de la Delegación Xochimilco en la cual es posible observar su ubicación en el Distrito Federal, así como la zona de canales, la zona de chinampas y el área donde fueron tomadas las muestras.

4.1.3 Suelos

Los suelos al sur de la cuenca del Valle de México son de origen volcánico y se han clasificado fundamentalmente como fozem puesto que son muy ricos en materia orgánica, nitrógeno y fósforo (Chávez, 2003).



☆ ÁREA DE ESTUDIO

Figura 4.1 Mapa de la Delegación Xochimilco y su ubicación en el Distrito Federal (INEGI, 2006) 1: Santa María Nativitas; 2: Santa Cruz Acalpexca; 3: San Gregorio Atlapulco; 4: San Luis Tlaxialtemalco; 5: Tulyehualco; 6: Tepepan; 7: San Francisco Tlalnepantla; 8: Xochimilco.

4.1.4 Clima

El clima de San Gregorio Atlapulco, según la carta climática de escala 1:50000 en la entonces Secretaría de Programación y Presupuesto (SPP, 1970 en Chávez, 2003) se clasifica como C(W₁) (W) b(1), es decir, clima templado-húmedo, el cual es considerado como el más seco de los templados subhúmedos con lluvias en verano. La temperatura media anual en la zona es de 12.7-13.6°C con máximas hasta de 31°C. Por otra parte, la precipitación es de 891 mm anuales en promedio (Chávez, 2003).

4.1.5 Hidrología

Por las características de infiltración del suelo, el pueblo de San Gregorio Atlapulco poseía manantiales que agregaban sus aguas a los canales de la zona chinampera; sin embargo, la explotación desmedida ha llevado al agotamiento y consecuentemente a la disminución del nivel apropiado de las aguas. No obstante, como se aprecia en la Figura 4.1, en la región todavía existen algunos canales como el de Apatlaco, el de Tezhuila, el de San Sebastián, el de Chalco y el del Bordo, sirviendo este último de división entre la chinampería y los terrenos del ejido de San Gregorio Atlapulco. Actualmente, estos canales reciben agua proveniente de las plantas de tratamiento de aguas residuales de San Luis Tlaxialtemalco y del Cerro de la Estrella con el objeto de mantener su nivel (Becerril, 1993).

4.1.6 Método de cultivo

La mayor parte de los vegetales cultivados en esta zona se siembran inicialmente en almácigo, el cual se hace habitualmente en el extremo de la chinampa, junto al canal. Primero se forma una capa de vegetación acuática y se deja secar; luego, sobre esta, el chinampero forma otra capa de cieno de 6 a 8 cm de espesor, se deja endurecer 2 o 3 días y entonces se corta en pequeños bloques llamados chapines. Posteriormente, con el dedo se hace un hoyo en el centro de cada chapín, donde se depositan las semillas cubriéndolas con estiércol. El almácigo se riega regularmente, sobre todo durante los meses de sequía. Una vez que la plántula se ha desarrollado, los chapines se desgajan para ser transportados a la chinampa en la que serán plantados (Chávez, 2003). Antes de empezar, el agricultor coloca una capa de paja sobre el suelo con el fin de que funcione como filtro, así la tierra no podrá ensuciar las plantas a la hora de ser regadas.

4.1.7 Sistema de riego

Una chinampa en condiciones óptimas no necesita ser irrigada debido a la rápida infiltración del agua a través del suelo poroso, manteniéndolo constantemente húmedo. Empero, hoy en día no se cuenta con los niveles adecuados de agua, por lo que se requiere de la irrigación, sobre todo en los meses de sequía. La intensidad y número de riegos depende de factores como la altura de la chinampa sobre el agua, la edad, las condiciones del suelo y el grado de precipitación. El sistema de riego más usado en esta zona es el de aspersión, el cual consiste en la distribución uniforme del agua (tomada del mismo canal) en forma de lluvia (Herrera, 1997).

4.1.8 Producción

Actualmente, en la Delegación Xochimilco se trabajan 25 verduras diferentes y varias flores originarias de todo el mundo. En las parcelas se siembran diversas especies que se van alternando según la temporada, por lo que la producción es constante y abundante (Chávez, 2003). En los últimos años, sin embargo, y gracias a los avances tecnológicos en materia agrícola, la lechuga –en sus distintas variedades– es la hortaliza más cultivada en las chinampas de San Gregorio Atlapulco, pues es la que genera mayores ganancias a los agricultores.

4.1.9 Consumo de hortalizas en fresco

En una encuesta realizada el mes de mayo de 2001 en el conocido “Mercado del Centro de Xochimilco” y aplicada a un conjunto de 200 personas en forma aleatoria, se encontró que la hortaliza de mayor consumo en fresco (sin cocción u otro procesamiento) es precisamente la lechuga (*Lactuca sativa*) con el 30%; le siguen el cilantro (*Coriandrum sativum*), la espinaca (*Spinacia oleracea*), las acelgas (*Beta vulgaris*) y el perejil (*Petroselinum sativum*) con el 28, 20, 12.5 y 9.5%, respectivamente (Chávez, 2003). Es importante mencionar que una parte de la producción chinampera se comercializa en los mercados locales y es consumida por la población local; en contraste, la otra parte es distribuida a través de intermediarios mayoristas que han logrado colocar estos productos en las grandes cadenas de supermercados.

4.2 Lechuga (*Lactuca sativa*)

La zona chinampera de la Ciudad de México goza del clima templado que es ideal para producir casi todo tipo de hortalizas. En todos los casos, el agua es esencial para la producción hortícola. Adicionalmente, la lechuga, por su sistema radical no muy extenso, prefiere suelos con buena capacidad de retención de humedad pero bien drenados, preferentemente con alto contenido de materia orgánica. En consecuencia, las chinampas ofrecen las condiciones adecuadas para la producción de esta planta.

4.2.1 Características generales

La lechuga es una planta herbácea de tallo muy corto, no ramificado, del cual salen las raíces y las hojas. Como se aprecia en la Figura 4.2, la raíz es pivotante con ramificaciones finas y cortas desarrollándose en los primeros 25 cm del suelo (Andrade y col., 2005). Las hojas son grandes, brillantes, lisas o crespas, y de color verde, pasando por el amarillo hasta el rojo. Su disposición en el tallo es variable puesto que en algunas especies las hojas se mantienen desplegadas y abiertas; y en otras, en cierto momento de su desarrollo, las hojas se expresan de tal manera que forman una cabeza o cogollo mas o menos consistente y apretada (Anónimo, 2006).



Figura 4.2 Detalle de las hojas y raíces de una planta de lechuga (Anónimo, 2006)

Como planta anual, la lechuga produce un tallo floral en un mismo ciclo, normalmente hacia el final de la temporada, después de haber formado las hojas o cabeza. La temperatura es el factor que tiene más influencia en adelantar la formación y elongación del tallo floral. Sus flores son amarillas manchadas de violeta, y sus frutos son grises con un pico prominente. De esta manera ocurre la polinización y la posterior propagación a través de la

producción de semillas (Andrade y col., 2005). En la Tabla 4.1 se enlistan los principales niveles de clasificación de la lechuga.

Tabla 4.1 Clasificación taxonómica de la lechuga (Andrade y col., 2005)

Nombre científico:	<i>Lactuca sativa L.</i>
Sistemática	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Cichorioideae
Tribu:	Lactuceae
Género:	Lactuca
Especie:	Sativa L.

4.2.2 Composición y usos

Actualmente, la lechuga constituye un ingrediente básico en la mayor parte de las ensaladas y también en las dietas bajas en calorías. Sus hojas presentan variantes novedosas cuya forma recortada o tintes rojizos son apetecidos para dar realce a ciertos platos (Andrade y col., 2005). De hecho, existe una gran diversidad dada principalmente por los diferentes tipos de hojas y hábitos de crecimiento de las plantas. Esto llevó a la distinción de variedades botánicas en la especie, existiendo varias que son importantes como cultivo hortícola en distintas regiones del mundo (Anónimo, 2006). En México se conocen variedades como la lechuga romana, francesa, italiana, sangría y orejona principalmente, aunque existen otros tipos muy exclusivos y sus precios fluctúan, a veces considerablemente, de acuerdo con el lugar, la época del año y el método de producción.

Por otra parte, las hortalizas de hoja deben consumirse o prepararse tan pronto sea posible después de ser cosechadas, pues pierden la humedad rápidamente y se marchitan, volviéndose poco atractivas (Catsberg y Kempen-Van Dommelen, 1990). Desde el punto de vista nutricional, es importante que la lechuga se consuma cruda a fin de garantizar su aporte promedio de vitamina A (300 UI) y de minerales como calcio (3 mg), hierro (1.5 mg), magnesio (7 mg), fósforo (25 mg) y potasio (100 mg), por cada 100 g de producto

consumido (Quintero y col., 2000). La composición nutritiva que se presenta en la Tabla 4.2 no permite señalar otros factores que se destaquen en comparación con otras hortalizas, con excepción del contenido de vitamina A, bastante variable entre tipos.

Tabla 4.2 Composición nutritiva de 100 g de parte comestible de tres tipos de lechuga (Anónimo, 2006)

Componente	Lechuga italiana	Lechuga francesa	Lechuga romana
Agua (%)	96.00	96.00	94.00
Carbohidratos (g)	2.04	1.20	2.10
Proteínas (g)	0.93	1.20	1.60
Lípidos (g)	0.16	0.20	0.20
Calcio (mg)	18.92	40.00	68.00
Fósforo (mg)	20.04	31.00	45.00
Hierro (mg)	0.50	1.10	1.10
Potasio (mg)	158.07	270.00	400.17
Sodio (mg)	9.09	10.00	9.00
Vitamina A (UI)	330.24	1200.00	2600.00
Tiamina (mg)	0.05	0.07	0.10
Riboflavina (mg)	0.03	0.07	0.10
Niacina (mg)	0.19	0.20	NR
Ácido ascórbico (mg)	3.90	9.00	24.00
Valor energético (cal)	13.00	15.00	NR

NR: No reportado

4.2.3 Cosecha y almacenamiento

Las hojas y parte del tallo constituyen el órgano de consumo de la lechuga, es decir, se utiliza la parte aérea completa de la planta, de tamaño máximo y cabeza compacta en variedades que la forman, pero antes que se inicie la elongación del tallo floral o que las hojas se tornen amarillas (Anónimo, 2006). Por consiguiente, después del periodo de siembra, la lechuga se cosecha cortando toda la planta a ras del suelo con un cuchillo, haciendo un corte limpio y final en el mismo campo para no llevar hojarasca innecesaria.

En cuanto a su cuidado, se recomiendan temperaturas de almacenamiento de 0-5 °C con 90-95% de humedad relativa, pues estas condiciones tienen un efecto determinante en la reducción de la respiración y transpiración de la planta, lo cual garantiza el mantenimiento de la calidad durante tres semanas en lechuga de cabeza y dos semanas en lechuga de hojas (Quintero y col., 2000).

4.3 Metodología general

4.3.1 Equipos y reactivos

Los equipos y los reactivos empleados durante el desarrollo experimental de esta investigación se presentan en las Tablas 4.3 y 4.4.

Tabla 4.3 Equipos empleados

Equipos	Especificaciones
Termobalanza	OHAUS; Mod. MB200, capacidad: 200 g.
Liofilizadora	Labconco; Mod. Freezone 4.5. P=133x10 ⁻³ mBAR, T=-40°C
Horno	Precision Scientific; Mod. 100A. T: 0-260°C
Mufla	Furnace; Mod. 4800. T: 0-1200°C
Equipo de purificación de agua	Modulab Analytical; Mod. LBPUO 1002
Sonicador	Branson S.A.; Mod. Branson-3210. 0-60
Balanza analítica	Mettler Toledo; Mod. AG-245. 0-200 g.
Rotoevaporador	Büchi; Mod. 461. T: 30-100°C, 0-230 rpm
Refrigerador	Whirlpool; Mod. EV150N*W*O
Cromatógrafo de gases con detector de masas	CG: Fissons, Mod. GC 8000 series, EM: Carlo Erba, Mod. MD 800
Columna cromatográfica capilar	Zebtron, DB-5: (30 m; 0.25 mm d.i., 0.25 µm espesor de película)

Tabla 4.4 Reactivos empleados

Reactivos	Especificaciones
Jabón extrán Hyclin-Plus	Hycel de México, S.A. de C.V.
Agua desionizada	Grado HPLC, tomada del equipo de purificación de agua
Gel de sílice para cromatografía	Merck, tamaño de partícula: 0.063-0.200 mm
Alúmina (Al ₂ O ₃) para cromatografía	Merck, tamaño de partícula: 0.063-0.200 mm
Sulfato de sodio anhidro (Na ₂ SO ₄)	J.T. Baker, pureza: 100%
Aire comprimido extraseco	Infra, S.A. de C.V.
Helio grado cromatográfico	Infra, S.A. de C.V.; pureza: 99.998%
Diclorometano	Fisher Scientific, grado cromatográfico; pureza: 99.9%
Hexano	Fisher Scientific, grado HPLC; pureza: 99.9%
Acetona	J.T. Baker, grado reactivo; pureza: 99.7%
Estándares: fenantreno ^A , fluoranteno ^B , pireno ^B , criseno ^B y benzo[a]pireno ^C	Sigma-Aldrich; pureza = A: 99.5%, B: 98%, C: 97% contenidos en frascos individuales.

4.3.2 Tratamiento de la muestra

4.3.2.1 Obtención

En el área de estudio se produce mayoritariamente lechuga de las siguientes variedades: italiana, sangría, francesa y orejona. Específicamente, el terreno donde se extrajeron las muestras tiene una superficie de 5000 m² en forma rectangular (250 m de largo por 20 m de ancho) y se encuentra rodeado, en tres de sus lados, por los canales de riego característicos de esta zona chinampera. Cerca de tres cuartas partes de la extensión total del terreno se encuentran cultivadas con las variedades italiana y sangría en partes iguales, el resto se encuentra sembrado con las variedades francesa y orejona.

Con base en la encuesta realizada por Chávez (2003), en donde la lechuga es consumida por el 30% de los encuestados, y tomando en cuenta que las variedades italiana y sangría son las más abundantes en el lugar, se adquirieron las muestras de ambas seleccionando los mejores ejemplares de cinco puntos diferentes (los cuatro extremos y el centro). Una vez escogidas, las lechugas –de un mes y medio de ser plantadas– fueron cortadas enteras por el tallo e introducidas individualmente en bolsas de plástico, para finalmente ser colocadas dentro de una hielera con el propósito de que se conserven en buen estado durante su traslado hacia los Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQA y QA) de la Facultad de Química de la UNAM, donde se llevó a cabo la investigación. Ahí las muestras se mantuvieron en refrigeración para ser tratadas al día siguiente.

4.3.2.2 Determinación del contenido de humedad

La determinación de humedad se basa en la pérdida de masa por temperatura. Se colocan 3 g de la muestra fresca (por duplicado) en pesafiltros previamente pesados, y puestos a masa constante. La muestra se seca dentro de una termobalanza (OHAUS) a 110°C hasta que la masa no presente variaciones por un lapso de 10 minutos. El porcentaje de humedad se calcula con la Ecuación 4.1:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{masa inicial} - \text{masa final}}{\text{masa de la muestra}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (4.1)$$

4.3.2.3 Molienda y homogeneizado

La lechuga debe consumirse o prepararse tan pronto sea posible después de ser cosechada, pues sus hojas pierden humedad rápidamente y se marchitan, lo que reduce la calidad del producto. Con base en esta premisa, se procedió a dividir a las lechugas en dos lotes: el de las lechugas italianas y el de las lechugas sangrías. Puesto que en la mayor parte de la literatura consultada se omite el lavado de las hojas para así evaluar la deposición atmosférica total, en el presente trabajo también se decidió omitir este paso. Por consiguiente, cada pieza de lechuga fue deshojada y limpiada manualmente sin agua, retirando las partes malas y las impurezas visibles. Una vez limpias, las hojas se picaron finamente por medio de una picadora eléctrica perfectamente limpia, obteniendo una sola muestra homogénea para cada lote.

4.3.2.4 Liofilización

La deshidratación mediante el proceso de liofilización permite que las muestras de lechuga puedan ser almacenadas durante el tiempo requerido para realizar la siguiente fase del experimento; asimismo, son conservadas la mayoría de las propiedades físicas, químicas, biológicas y sensoriales de su estado fresco.

Después de que han sido perfectamente picadas, y dado el estado en que se encuentran las lechugas, es necesario actuar con rapidez para que las muestras permanezcan en condiciones adecuadas. Por lo tanto, se procede a efectuar el proceso de liofilización, que en este caso consiste en empacar las muestras en los frascos propios del equipo, teniendo cuidado de distribuir las por todas las paredes del recipiente. Los frascos se tapan perfectamente y se congelan a -20°C durante 72 horas como lo requiere el equipo. Si es necesario, se puede usar nitrógeno líquido a fin de hacer el proceso más eficiente. Por último, los frascos congelados se colocan en la liofilizadora previamente acondicionada y se inicia el vacío hasta que el equipo se estabilice, permaneciendo la muestra de 36 a 48 horas según la matriz y el sistema empleado. A continuación, en la Tabla 4.5, se enlistan las condiciones de operación de la liofilizadora (Labconco) utilizada en este trabajo.

4.3.2.5 Almacenamiento

El producto liofilizado tiene la apariencia de una hierba seca, muy ligera, y no necesita molerse nuevamente. Este material se transfiere a frascos ámbar de vidrio y se almacena a menos 10°C para su posterior análisis y cuantificación.

Tabla 4.5 Condiciones de operación óptimas para deshidratar las muestras de lechuga

Liofilizadora Labconco
Temperatura: -40°C
Presión: -5 atm
Tiempo aproximado: 36 h

4.3.3 Desarrollo experimental

4.3.3.1 Extracción de los HAP en las muestras

La extracción por Soxhlet es un método ampliamente recomendado por la EPA y por otros organismos internacionales relacionados con la protección del medio ambiente, pues está demostrada su eficiencia para obtener COS provenientes de matrices ambientales sólidas. Para el presente estudio, la técnica de extracción se basa en las recomendaciones del método EPA-3540C (EPA, 1996a), en donde 5 g de las muestras de lechuga liofilizadas se mezclan con una cantidad igual de Na₂SO₄ anhidro y se introducen en los cartuchos para extracción. Enseguida, cada cartucho es colocado en el interior de la cámara de extracción del aparato, donde se conecta un matraz que contiene 250 mL de DCM grado cromatográfico, así como el refrigerante. El solvente se calienta cuidadosamente usando una mantilla de calentamiento y la muestra es mantenida bajo reflujo durante 8 horas. Los extractos obtenidos son concentrados en un evaporador rotatorio al vacío de laboratorio Büchi hasta un volumen de 3 mL y se almacenan en viales color ámbar bajo refrigeración a -10°C, para ser tratados posteriormente.

4.3.3.2 Limpieza y fraccionamiento de los HAP

La técnica para efectuar la limpieza y el fraccionamiento de los extractos se basa en el método UNEP-7, en donde se usan simultáneamente dos adsorbentes polares: gel de sílice y alúmina, de acuerdo con las recomendaciones del método EPA-3600C (EPA, 1996b).

A fin de aislar a los HAP, se emplearon columnas cromatográficas de vidrio de 30 cm de largo por 2 cm de diámetro interno. El procedimiento consiste en colocar un pequeño tapón

de lana de vidrio en el fondo de cada columna con el objeto de empacar los adsorbentes. Posteriormente se agregan 10 g de alúmina, primero; y después 10 g de gel de sílice (activados a 200°C durante 8 horas y parcialmente desactivados con agua ultrapurificada al 5% p/p) con ayuda de un vaso de precipitado de 250 mL, empleando como eluyente hexano cromatográfico. Aunque el método UNEP-7 indica 4 g de cada adsorbente, es razonable usar alrededor de 10 g de adsorbente en función del grado de impurezas que pueda presentar la muestra, como en este caso. Por último, se adiciona 1 g de Na₂SO₄ anhidro para eliminar la humedad residual proveniente de las muestras.

Una vez transferido el extracto concentrado, la elución de la fracción alifática se lleva a cabo usando 20 mL de hexano (fracción 1). La fracción 2, en donde se encuentran los hidrocarburos aromáticos, se obtiene eluyendo una mezcla de hexano:DCM en diferentes proporciones: 30 mL de una mezcla de hexano:DCM 9:1 + 20 mL de una mezcla de hexano:DCM 1:1. Finalmente, para la última parte de esta fracción se utilizan otros 20 mL de DCM a fin de aumentar la polaridad. Las fracciones obtenidas se concentran en un “rotavapor” o “rotoevaporador” (como se conoce al evaporador rotatorio al vacío de laboratorio) hasta tener un volumen de 3 mL, y se almacenan en viales color ámbar bajo refrigeración a -10°C para su posterior análisis por CG/EM.

4.3.3.3 Análisis de HAP por CG/EM

Para la identificación y cuantificación de los HAP en estudio, se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG: Fissons, EM: Carlo Erba). Los compuestos fueron analizados en el modo “splitless” (sin dividir) con una temperatura en el inyector de 220°C. Se empleó una columna capilar tipo DB-5 (5% difenil y 95% dimetil polisiloxano, lo que le confiere una baja polaridad) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. El cromatógrafo se operó con una rampa de temperatura que se muestra en la Tabla 4.6, la cual permitió una mejor separación de los componentes. El detector de masas se operó en el modo SSI (SIM por sus siglas en inglés) a fin de tener una mayor sensibilidad, y las condiciones de operación se indican en la Tabla 4.7.

Tabla 4.6 Rampa de temperatura en el cromatógrafo de gases

Temperatura del horno (°C)	Velocidad (°C/min)	Tiempo (min)
90	8	11.0
180	5	24.0
245	3	51.0
300	---	57.0

Tabla 4.7 Condiciones de operación en el espectrómetro de masas

Emisión	500
Temperatura de la fuente	200°C
Temperatura de la interfase	250°C
Presión de análisis	-4 psi
Modo de operación	SSI
Tiempo de análisis	45 min

4.3.3.4 Identificación

Los HAP se identifican al comparar los tiempos de retención de los estándares con las muestras. Adicionalmente, para confirmar las observaciones, es necesario determinar los iones moleculares correspondientes a cada pico en el cromatograma.

4.3.3.5 Cuantificación

Para la cuantificación de los HAP se utilizó la técnica de estándar externo, en donde se elaboró una curva de calibración inyectando por triplicado una mezcla de los analitos en estudio a diez diferentes concentraciones (de 0.5 a 5 ppm). Con las áreas bajo la curva obtenidas para cada concentración, se hace un tratamiento de regresión lineal mediante el cual se comprueba la calidad de la línea recta que justifica la linealidad del método para cada compuesto, indicado por el coeficiente de correlación. Del mismo modo, se obtienen los valores de pendiente y ordenada al origen de la recta que sirven para calcular la concentración de los HAP identificados en las muestras, a partir de la Ecuación 4.2:

$$y = mx + b \quad \dots\dots\dots (4.2)$$

donde:

y = área bajo la curva

m = pendiente de la recta

x = concentración de la muestra

b = ordenada al origen

4.3.3.6 Precisión

Para evaluar la precisión, en términos de repetibilidad, se inyectó cinco veces una mezcla estándar de concentración conocida (2.5 ppm) al sistema de CG/EM. El grado de concordancia entre los resultados individuales se expresa en términos del coeficiente de variación (CV), el cual indica qué tan desviados están los resultados respecto del valor promedio. Para que un análisis por CG sea adecuado, $CV \leq 5.0\%$.

4.3.3.7 Límite de detección

El límite de detección del equipo para la mezcla estándar de los cinco HAP fue determinado inyectando soluciones cada vez más diluidas de la misma hasta que el detector de masas fuera capaz de presentar alguna señal. La concentración límite se consideró como aquella en la que el pico de cada compuesto aparecía pero no se podía integrar.

4.3.3.8 Determinación de los porcentajes de recobro o recuperación

Un punto importante en todo método analítico que pretenda identificar y cuantificar compuestos inmersos en alguna matriz, es el que se refiere a la extracción del analito, así como a su limpieza y fraccionamiento. Por consiguiente, antes del análisis final de las muestras, se requieren determinar las pérdidas de los analitos durante todo el proceso, tanto en los adsorbentes como en la matriz de prueba. Los datos producidos constituyen la base en la cual se sustentan los resultados definitivos derivados del método analítico en cuestión. Para determinar el porcentaje de recobro de los compuestos en los adsorbentes, se preparó, por duplicado, una mezcla con los estándares a una concentración conocida (3 ppm), la cual se adicionó sobre el cartucho de celulosa (placebo adicionado) y se siguió el procedimiento de extracción y limpieza establecidos. La recuperación para cada compuesto se determinó a través del análisis por CG/EM.

De igual forma, el porcentaje de recobro tanto en la muestra de lechuga italiana como en la de lechuga sangría se hizo contaminando estas matrices, por triplicado, con una solución de concentración conocida (3 ppm) de una mezcla de los estándares correspondientes a los

compuestos en estudio. Posteriormente, los HAP se extrajeron y cuantificaron por medio de la metodología antes citada.

4.4 Análisis de varianza

Como su nombre lo indica, la técnica de análisis de varianza consiste en identificar las variables independientes importantes en un estudio y así determinar cómo afectan a la respuesta (Wackerly y col., 2002). El supuesto fundamental en que se basan los procedimientos de prueba y estimación para el análisis de varianza es el siguiente: “La variación total de un número de datos es igual a la variación entre grupos más la variación dentro de los grupos. La variación dentro de los grupos son variaciones al azar” (Montgomery, 1991). Al igual que en las pruebas de hipótesis para estimar la diferencia entre dos medias, en esta técnica estadística se efectúa un análisis simple de varianza para comprobar la hipótesis según la cual dos o más muestras (seleccionadas al azar y con una varianza común) son iguales. Finalmente, el tratamiento matemático que se aplica a los datos iniciales mediante las fórmulas del Anexo B, da origen a una prueba F para comparar dos medias; y ésta, a su vez, equivale a una prueba t para dos muestras pequeñas (Wackerly y col., 2002).

Puesto que no se obtuvo ningún resultado en los análisis de las muestras, se decidió realizar un análisis de varianza para cada compuesto con el fin de determinar si existe diferencia entre la cantidad de analito recuperado (porcentaje de recobro) y el tipo de lechuga muestreada. Para tal efecto, se establecen las siguientes hipótesis:

$$\text{Hipótesis nula } H_0: \mu_{LS} = \mu_{LI}$$

$$\text{Hipótesis alterna } H_i: \mu_{LS} \neq \mu_{LI}$$

donde:

μ_{LS} = media aritmética del porcentaje de recobro en lechuga sangría

μ_{LI} = media aritmética del porcentaje de recobro en lechuga italiana

Entonces se procede a efectuar las pruebas confrontando F calculada (F_c) con F de tablas (F_t) bajo el siguiente criterio:

- Si $F_c < F_t \Rightarrow H_0$ se acepta, lo que significa que no hay suficiente evidencia que indique una diferencia entre las medias.

- Si $F_c > F_t \Rightarrow H_0$ se rechaza y H_i se acepta, es decir, hay suficiente evidencia para concluir que existe diferencia entre las medias.

En la Figura 4.3 se describe la secuencia de pasos a seguir para llevar a cabo el tratamiento para la conservación de las muestras previas al análisis.

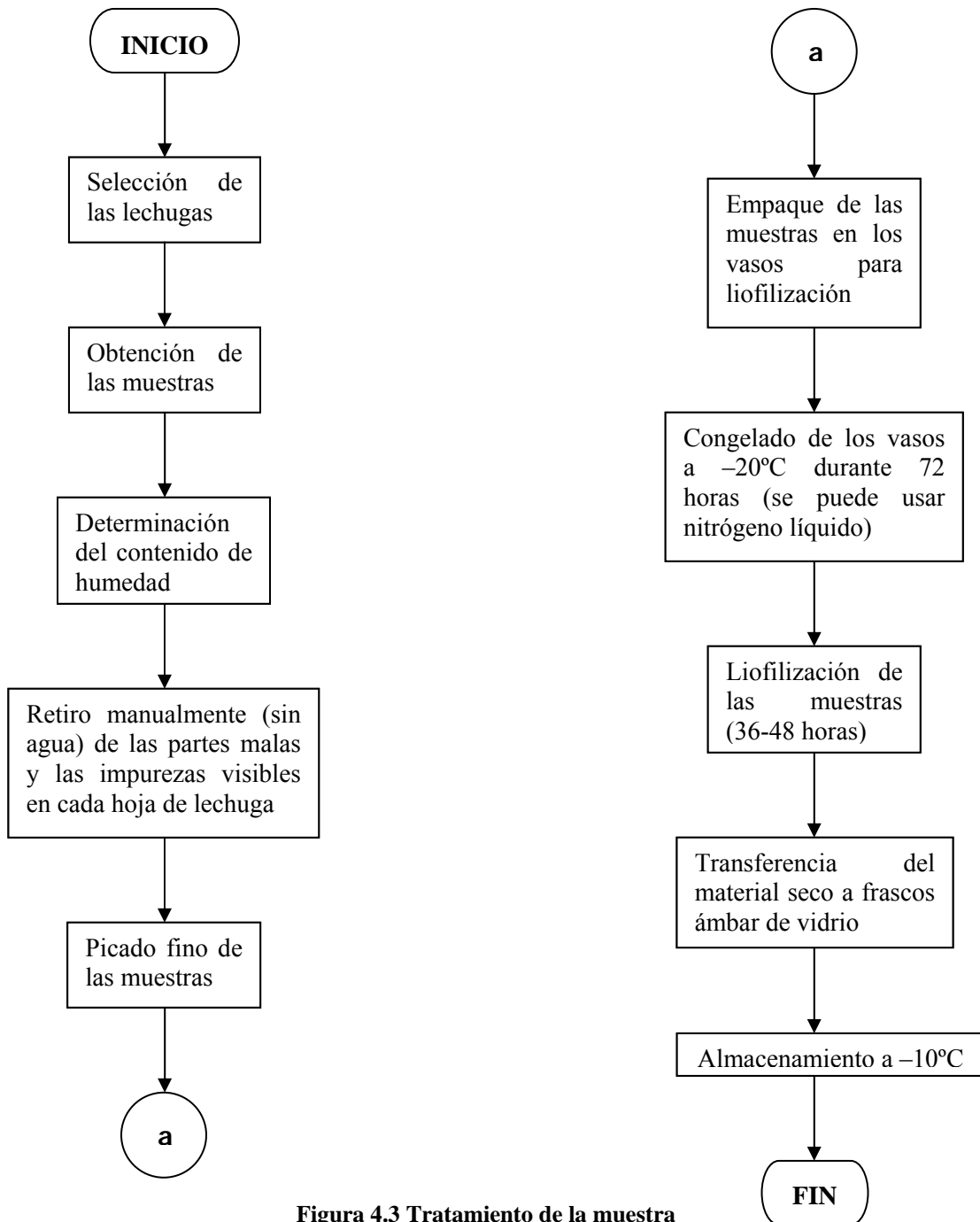


Figura 4.3 Tratamiento de la muestra

Por su parte, en la Figura 4.4 se presenta la metodología propuesta para el desarrollo experimental de este trabajo.

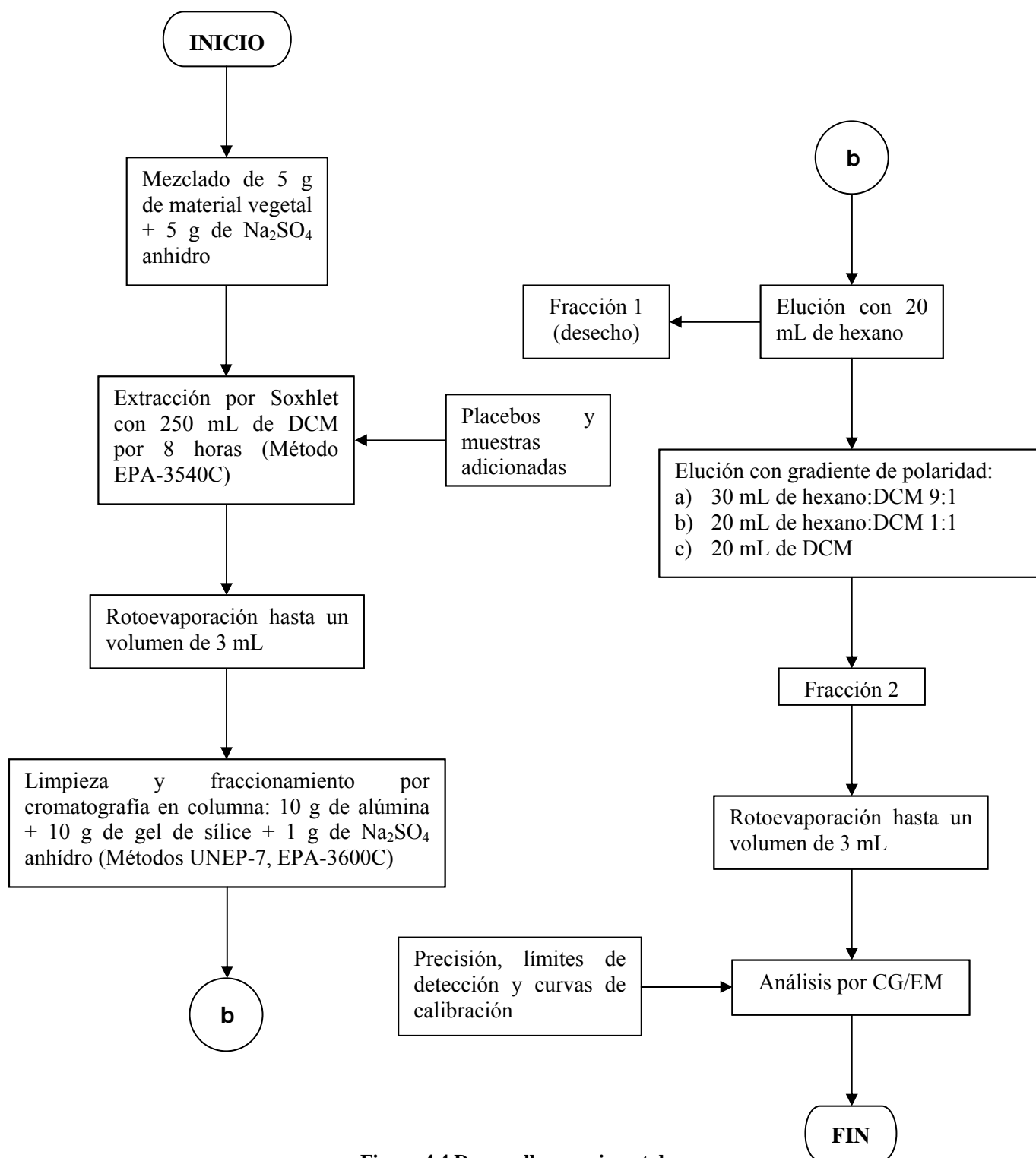


Figura 4.4 Desarrollo experimental

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Contenido de humedad

Debido a que las muestras de lechuga no fueron sometidas a ningún tipo de procesamiento previo a la realización de este trabajo, se decidió omitir las pruebas correspondientes a la caracterización química de dichas muestras, pues existen numerosas tablas donde es posible encontrar los valores correspondientes al contenido total de cenizas, grasa y proteína en prácticamente todas las hortalizas crudas (ver Tablas 2.3 y 4.2).

Una ventaja importante es que el bajo contenido de grasa en las muestras permite prescindir de un tratamiento de saponificación, pues a estos niveles (~200 mg/100 g de lechuga), las grasas son eliminadas en la primera fracción del proceso de limpieza y las interferencias por este tipo de sustancias son mínimas (Speer y col., 1990). Por otro lado, es importante saber el contenido de humedad para conocer el estado en que se encuentran las lechugas, ya que esto puede representar una variable adicional para el desarrollo de este trabajo. Además, éste es un dato que debe tomarse en cuenta para darles un adecuado tratamiento de secado a las muestras, ya que el análisis de HAP sólo es eficiente en ausencia de humedad. En la Tabla 5.1 se observan los valores experimentales del contenido de humedad en ambos tipos de lechuga determinados en una termobalanza y también se incluyen los datos encontrados en la literatura a modo de comparación. Como se puede ver, todos los valores son prácticamente iguales, es decir, no se aprecia una diferencia notable en el contenido de humedad de los distintos tipos de lechuga.

Tabla 5.1 Porcentaje de humedad en los diferentes tipos de lechuga fresca

Tipo	Resultados experimentales		Valores reportados en la literatura				
	L. sangría	L. italiana	L. orejona	L. romana	L. italiana	L. francesa	L. romana
Humedad (%)	92.9 ^{±0.354}	93.6 ^{±0.141}	95.0	96.0	96.0	96.0	94.0
Fuente	Muñoz y Ledesma, 2003			Anónimo, 2006			

5.2 Precisión y límites de detección del sistema cromatográfico

Los CV obtenidos al inyectar una mezcla estándar de los cinco HAP a una concentración de 2.5 ppm se presentan en la Tabla 5.2. Se observa que con excepción del benzo[a]pireno,

todos los CV se encuentran entre 2.0 y 4.0%, indicando que el sistema es preciso para los compuestos en estudio. Sin embargo, debido a que el benzo[a]pireno se encuentra muy cerca de su límite de detección, éste presenta una mayor variación (CV=6.34%), por lo que en este caso no se cumple con el criterio de precisión requerido para este compuesto en particular. Por lo tanto, el sistema cromatográfico permite obtener resultados reproducibles para fenantreno, fluoranteno, pireno y criseno en el rango de concentraciones de este trabajo.

Tabla 5.2 Precisión del sistema cromatográfico

Compuesto	CV (%)*
Fenantreno	2.23
Fluoranteno	2.78
Pireno	2.11
Criseno	3.66
Benzo[a]pireno	6.34

$$CV = S/\bar{X}(100)$$

* Valores relativos a los datos de área

Por otra parte, los límites de detección se determinaron inyectando soluciones cada vez más diluidas de la mezcla estándar de HAP. Las concentraciones límite para cada compuesto se presentan en la Tabla 5.3. Puesto que el nivel de ruido aumenta conforme disminuye la concentración de la mezcla estándar, la concentración límite se consideró aquella en la que el pico del analito aparece pero no se puede integrar.

Tabla 5.3 Límites de detección para los HAP en estudio

Compuesto	Límites de detección (ppm)
Fenantreno	< 0.3
Fluoranteno	< 0.3
Pireno	< 0.3
Criseno	0.5
Benzo[a]pireno	1.5

Como se puede ver, los altos valores de límite de detección impiden el análisis de los compuestos de interés a los niveles traza que son requeridos. No obstante, se intentó disminuir la intensidad del ruido modificando las condiciones de operación del detector de masas, sin obtener un resultado más favorable.

Cabe mencionar que cada compuesto presenta un factor de respuesta diferente en el detector de masas. Esto explica la variabilidad de la intensidad de cada pico a una misma concentración y, por ende, los distintos valores del límite de detección para cada compuesto, siendo el del benzo[a]pireno y el del criseno de 1.5 y 0.5 ppm respectivamente, a las condiciones de operación del equipo.

5.3 Curvas de calibración de los estándares de HAP

Debido a que los niveles esperados de HAP en las lechugas son muy pequeños y, considerando los altos valores de límite de detección para cada compuesto, se realizó una curva de calibración inyectando, por triplicado, una mezcla estándar de los analitos en estudio a diez diferentes concentraciones (de 0.5 a 5 ppm). Las curvas se construyen relacionando el área de cada compuesto (en el eje de las ordenadas) con su respectiva concentración (en el eje de las abscisas). Finalmente, mediante un tratamiento de regresión lineal se determina la línea recta que mejor se ajusta a la secuencia de puntos, obteniéndose los valores de pendiente y de ordenada al origen, así como los coeficientes de correlación que para un caso ideal deben ser igual a 1. Los coeficientes de correlación (r^2) para los HAP analizados se encuentran entre 0.9920-0.9969, demostrándose así una respuesta lineal del detector para fenantreno, fluoranteno, pireno y criseno; sin embargo, el benzo[a]pireno, aunque también con una tendencia lineal, presenta una mayor dispersión de sus puntos indicado por un $r^2=0.9316$, lo cual significa que en el rango de concentración determinado (1.5-5 ppm), este compuesto se comporta de forma irregular. Los resultados de la calibración de cada uno de los HAP se muestran en la Tabla 5.4 y el conjunto de datos y gráficas de calibración se presentan en el Anexo C.

Tabla 5.4 Datos de la curva de calibración de los estándares de HAP

Compuesto	r^2	m	b
Fenantreno	0.9956	232659.828	29010.000
Fluoranteno	0.9969	290316.095	-21882.400
Pireno	0.9935	208124.497	142989.933
Criseno	0.9920	194608.572	39960.867
Benzo[a]pireno	0.9316	172058.051	-208078.939

r^2 : Coeficiente de correlación; m: Pendiente de la recta; b: Ordenada al origen

5.4 Cromatogramas y espectros de masas de los estándares y de las muestras de lechuga

El uso de un sistema acoplado de CG/EM representa una ventaja respecto al uso de otros detectores, ya que con estos sólo se confirma la identidad de los picos según sus tiempos de retención. Se sabe que los sistemas de anillos fusionados, como los HAP, tienen poca tendencia a fragmentarse debido a que la aromaticidad de las estructuras cíclicas le confieren una gran estabilidad a estas moléculas. Por esta razón, el espectro de masas es dominado por el pico del ión molecular (Watson, 1997). En la Tabla 5.5 se presentan los tiempos de retención y los iones moleculares correspondientes a cada uno de los HAP a las condiciones de operación establecidas.

Tabla 5.5 Tiempos de retención (t_r) e iones moleculares (m/z) de los HAP analizados por CG/EM

Compuesto	MM	t_r (min) [*]	m/z
Fenantreno	178	17.444 ^{±0.028}	178
Fluoranteno	202	22.781 ^{±0.032}	202
Pireno	202	23.795 ^{±0.033}	202
Criseno	228	30.556 ^{±0.044}	228
Benzo[a]pireno	252	38.953 ^{±0.051}	252

MM: Masa molecular

* Es el promedio de cuatro determinaciones

En la Figura 5.1 se aprecia el cromatograma correspondiente a una mezcla estándar con los cinco HAP en estudio a una concentración de 10 ppm, y los tiempos de retención obtenidos para cada uno de ellos. Se observa que los tiempos de retención se incrementan conforme aumenta la masa molecular de los HAP. Asimismo, los cromatogramas de las muestras de lechuga adicionadas con la mezcla estándar a una concentración de 5 ppm se aprecian en las Figuras 5.2 y 5.3 correspondientes a lechuga sangría y lechuga italiana respectivamente. En ellos se observa un mayor nivel de ruido presumiblemente originado por las interferencias co-extraídas, es decir, compuestos propios de la muestra que no fueron eliminados durante la fase de limpieza. Sus espectros de masas, en donde se confirma la presencia de estos compuestos, se muestran en las Figuras 5.4 a 5.8. Finalmente, los cromatogramas y los espectros de masas correspondientes a cada uno de los estándares y a las muestras se exponen en el Anexo D.

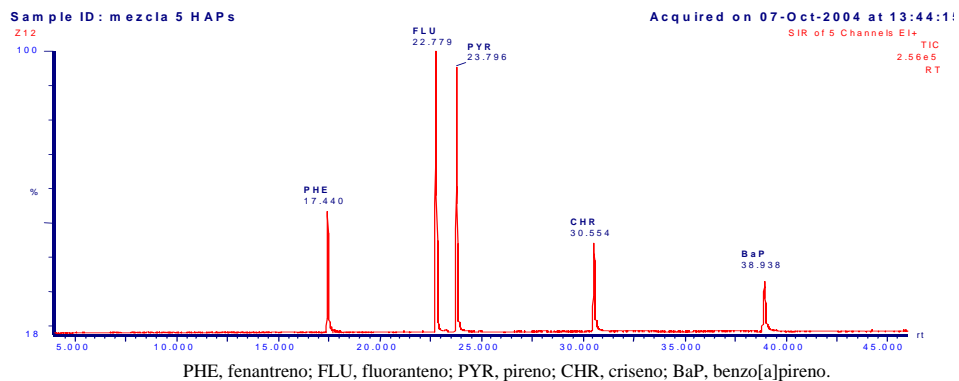


Figura 5.1 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares

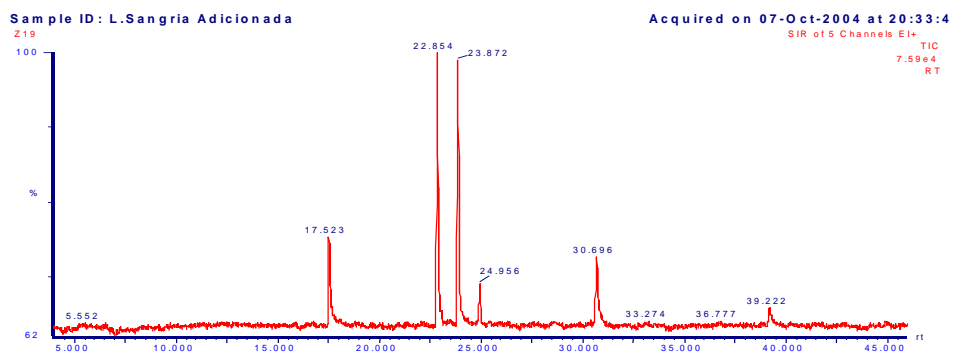


Figura 5.2 Cromatograma de una muestra de L. sangría adicionada con cinco estándares

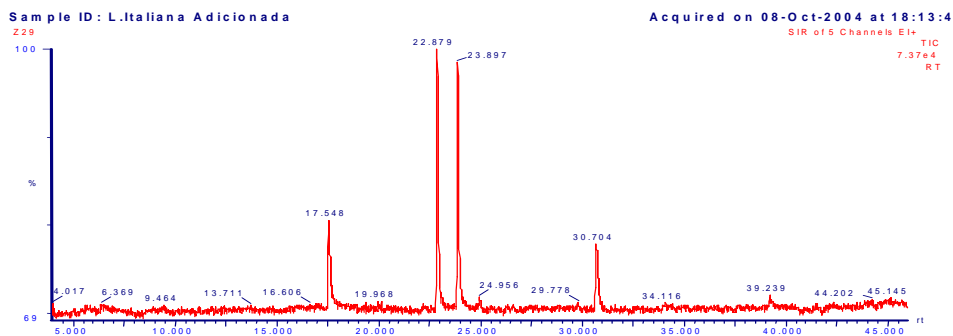


Figura 5.3 Cromatograma de una muestra de L. italiana adicionada con cinco estándares

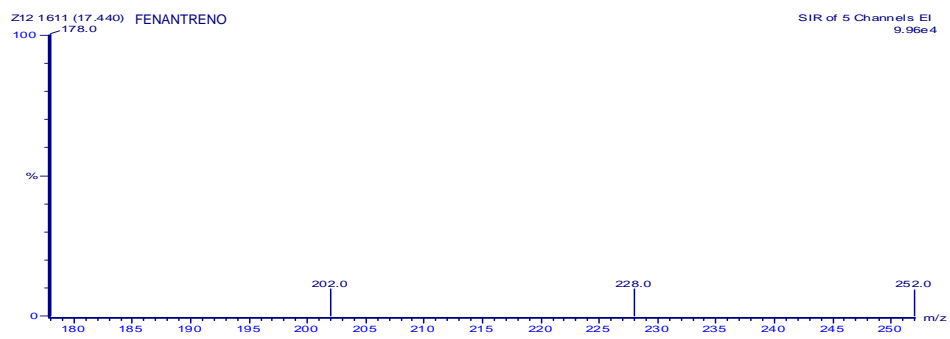


Figura 5.4 Espectro de masas del fenantreno identificado en la mezcla de cinco estándares

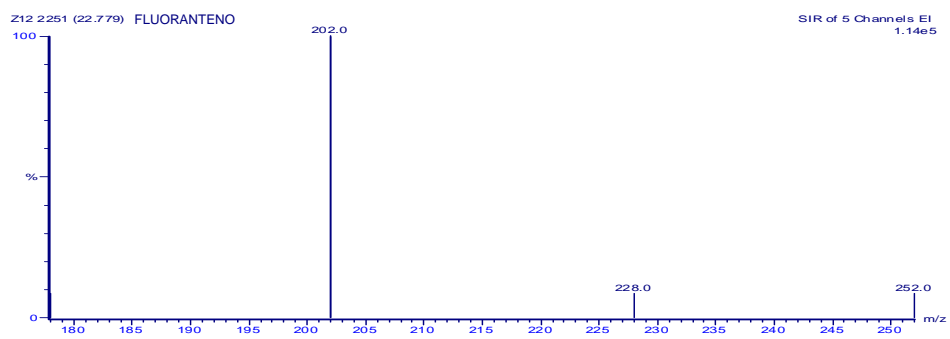


Figura 5.5 Espectro de masas del fluoranteno identificado en la mezcla de cinco estándares

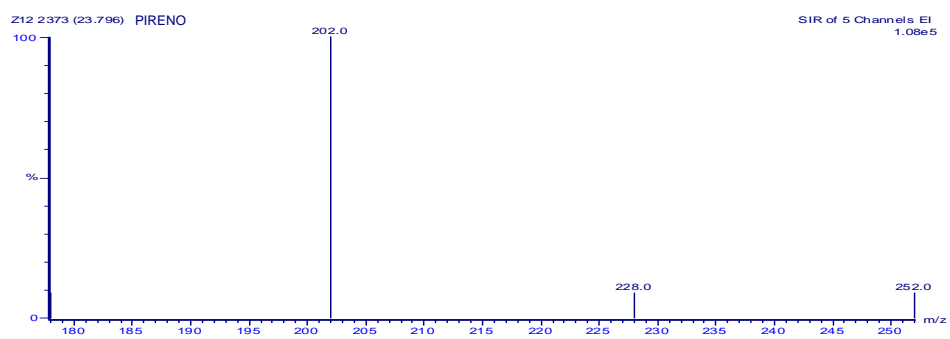


Figura 5.6 Espectro de masas del pireno identificado en la mezcla de cinco estándares

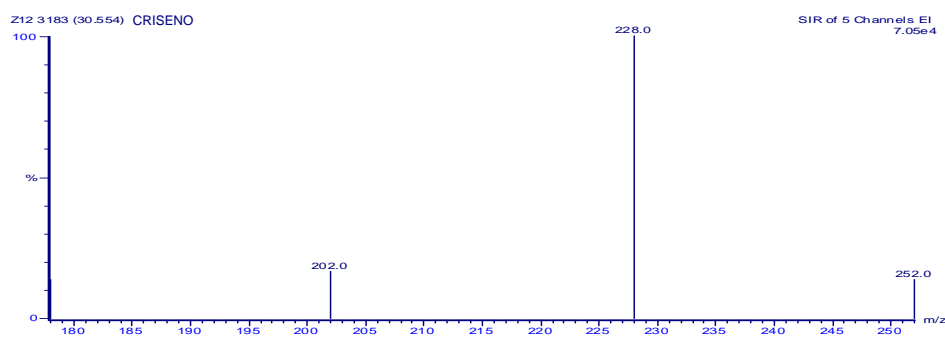


Figura 5.7 Espectro de masas del criseno identificado en la mezcla de cinco estándares

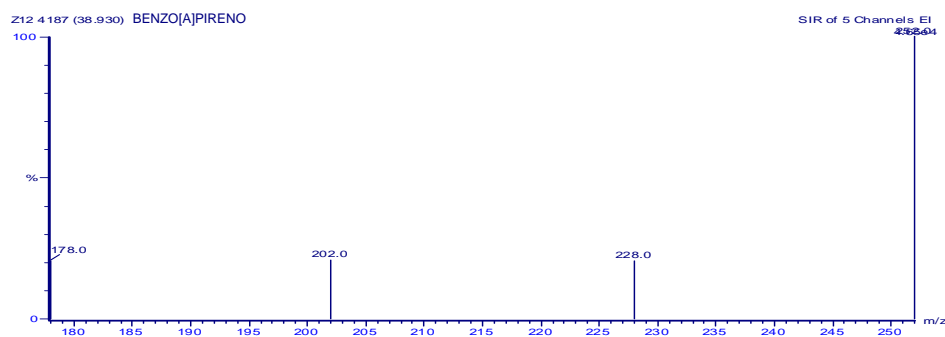


Figura 5.8 Espectro de masas del benzo[a]pireno identificado en la mezcla de cinco estándares

5.5 Recuperación de los HAP de la columna cromatográfica y de las muestras de lechuga

Para este estudio se hicieron dos experimentos: el primero, por duplicado, consistió en pasar por la columna un volumen de la mezcla de estándares de concentración conocida, eluyéndola conforme a lo descrito en el método UNEP-7. El segundo experimento, por triplicado, consistió en contaminar las dos muestras con una cantidad conocida de estándares, para posteriormente ser tratadas de acuerdo con lo descrito en los métodos EPA-3540C y UNEP-7. Los porcentajes de recuperación y retención para cada compuesto, tanto en los adsorbentes como en las lechugas, se aprecian en las Tablas 5.6, 5.7 y 5.8.

Tabla 5.6 Estudio de retención de los HAP por los adsorbentes en la columna

Compuesto	mg/kg adicionados	mg/kg recuperados	mg/kg retenidos	% Recuperación	% Retención
Fenantreno	5.025	4.051 ^{±0.152}	0.975	80.61 ^{±3.026}	19.39
Fluoranteno	5.075	4.202 ^{±0.074}	0.874	82.79 ^{±1.464}	17.21
Pireno	5.000	3.837 ^{±0.042}	1.164	76.73 ^{±0.834}	23.27
Criseno	5.008	4.513 ^{±0.098}	0.496	90.12 ^{±1.959}	9.88
Benzo[a]pireno	5.050	4.283 ^{±0.159}	0.768	84.80 ^{±3.154}	15.20

Tabla 5.7 Estudio de retención de los HAP en lechuga sangría

Compuesto	mg/kg adicionados	mg/kg recuperados	mg/kg retenidos	% Recuperación	% Retención
Fenantreno	5.025	3.922 ^{±0.007}	1.103	78.05 ^{±0.140}	21.95
Fluoranteno	5.075	4.215 ^{±0.043}	0.860	83.05 ^{±0.849}	16.95
Pireno	5.000	4.003 ^{±0.020}	0.997	80.05 ^{±0.402}	19.95
Criseno	5.008	4.170 ^{±0.031}	0.838	83.28 ^{±0.610}	16.72
Benzo[a]pireno	5.050	4.440 ^{±0.107}	0.610	87.92 ^{±2.127}	12.08

Tabla 5.8 Estudio de retención de los HAP en lechuga italiana

Compuesto	mg/kg adicionados	mg/kg recuperados	mg/kg retenidos	% Recuperación	% Retención
Fenantreno	5.025	4.179 ^{±0.096}	0.846	83.16 ^{±1.905}	16.84
Fluoranteno	5.075	3.991 ^{±0.125}	1.084	78.64 ^{±2.468}	21.36
Pireno	5.000	4.106 ^{±0.075}	0.894	82.12 ^{±1.503}	17.88
Criseno	5.008	4.383 ^{±0.158}	0.625	87.53 ^{±3.155}	12.47
Benzo[a]pireno	5.050	4.527 ^{±0.088}	0.523	89.64 ^{±1.749}	10.36

Evidentemente, aunque no de manera clara, se observa un ligero incremento en los porcentajes de recuperación conforme aumenta el número de anillos aromáticos que componen a los HAP, lo cual también se relaciona con la polaridad, pues a mayor número de anillos, menor polaridad y, por lo tanto, menor retención en la columna cromatográfica. En el caso de los adsorbentes, se logra un porcentaje de recuperación que oscila entre 76.73^{±0.834} para el pireno y 90.12^{±1.959}% para el criseno. En el caso de las muestras en estudio, se observa que el porcentaje de recuperación para la lechuga sangría va de 78.05^{±0.140} para el fenantreno a 87.92^{±2.127}% para el benzo[a]pireno, y para la lechuga

italiana los valores se encuentran entre $78.64^{\pm 2.468}$ para el fluoranteno y $89.64^{\pm 1.749}$ % para el benzo[a]pireno. Si se comparan los valores de porcentaje de recuperación en la columna y en ambas muestras de lechuga para cada uno de los HAP, se ve que, en general, los valores son parecidos, lo que significa que todos los HAP analizados presentan muy poca afinidad con la lechuga, a razón de su bajo contenido de grasa. En resumen, la extracción por Soxhlet y la subsecuente limpieza y fraccionamiento de los HAP en las muestras tienen un porcentaje de recuperación que va de $78.05^{\pm 0.140}$ a $89.64^{\pm 1.749}$ %, por lo que el procedimiento es confiable a los niveles de concentración de este trabajo.

Por otra parte, todos los valores en su conjunto reflejan un porcentaje de retención que oscila entre $9.88^{\pm 1.959}$ y $23.27^{\pm 0.834}$ %, lo cual significa que, además de quedar retenidos, una parte de los compuestos probablemente se pierde en el proceso, como puede ser la volatilización de los compuestos durante la concentración de los extractos a presión reducida. También es probable que existan pérdidas dentro del sistema que pueden deberse a la septa, a algún componente del inyector o a la columna cromatográfica (procesos de adsorción o descomposición de los analitos dentro del cromatógrafo), principalmente (McNair, 1981).

5.6 Análisis de HAP en las muestras de lechuga

El análisis de HAP en vegetales y hortalizas es un procedimiento complicado que requiere de materiales especiales (fases estacionarias) para la purificación efectiva de los extractos y así eliminar las interferencias como son los aceites esenciales, las ceras y los pigmentos vegetales –que incluyen a los carotenos, xantofilas y clorofilas–, los cuales también son coextraídos, encontrándose, a veces, en mayores cantidades que los compuestos de interés (Speer y col., 1990; Scheer, 1991). Precisamente, la literatura reporta concentraciones de HAP detectados en hortalizas que oscilan entre 1 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa seca (Speer y col., 1990; Kipopoulou y col., 1999; Phillips, 1999; Bi y col., 2001): a estos niveles (ppb) es muy importante eliminar la mayor parte de los pigmentos antes del análisis final por CG/EM, pues se ha visto que éstas son las sustancias que más afectan en las determinaciones (Nollet, 1996).

En los cromatogramas obtenidos se aprecia que a pesar de lograr porcentajes de recuperación aceptables, la limpieza con gel de sílice y alúmina no es suficiente para

eliminar las sustancias no polares coextraídas, lo que dificulta la detección de los HAP y una apropiada integración de sus picos, sobre todo a concentraciones de 1 y 0.5 ppm. Debido a lo anterior, es posible inferir que la evaluación de los recobros de HAP en las muestras de lechuga tiende a ser poco confiable a medida que disminuye la concentración. Relacionado con lo anterior, los cromatogramas de las muestras dejan ver bastante ruido a lo largo de toda la línea basal, generado por la elevada carga de sustancias extrañas presentes en los extractos finales. Ello explica la reducida sensibilidad del detector y, por lo tanto, los altos límites de detección que impiden el análisis de los HAP a los niveles traza en que son requeridos (Helferich y Winter, 2001).

Los resultados en su conjunto, por consiguiente, señalan la baja efectividad del método propuesto para aislar los compuestos de las muestras de lechuga, por lo que es necesario utilizar procesos de purificación más eficientes aplicados a los extractos antes del análisis. La cromatografía de permeación en gel (CPG) es un procedimiento ampliamente recomendado para limpiar extractos de muestras vegetales, ya que es capaz de separar sustancias en función de su tamaño molecular y, por su rapidez, es ideal como una técnica previa a la estimación del grado de contaminación por HAP (Nollet, 1996). De hecho, varios autores reportan su uso (junto con la cromatografía de adsorción) en el análisis tanto de hortalizas como de muestras vegetales en general (Speer y col., 1990; Howsam y col., 2000; Bi y col., 2001; Müller y col., 2001; Hwang y col., 2003). Adicionalmente, con el objeto de detectar las bajas concentraciones de HAP (ppb), se propone usar un método de extracción mediante el cual se puedan manejar grandes tamaños de muestra (Nollet, 1996). Un ejemplo es la extracción del material por contacto directo con el disolvente, seguido de una o varias particiones líquido-líquido con el fin de ir separando a los compuestos de interés (Ignesti y col., 1992; Bi y col., 2001). Otra alternativa rápida y fácil de llevar a cabo es la extracción por sonicación, la cual asegura el contacto íntimo de la matriz con el solvente de extracción. Con esta técnica pueden tratarse, tanto muestras grandes como pequeñas, dependiendo de la concentración de los analitos.

A través de la metodología desarrollada en esta investigación se logran porcentajes aceptables de recuperación de los analitos de interés a niveles de 3 a 5 ppm. Dicha técnica puede ser mejorada al escalar las cantidades de muestra para analizar, de manera que se logre aproximar la concentración de los analitos a los de este trabajo. Sin embargo, sería

conveniente enfocar subsiguientes investigaciones a la limpieza y purificación de los extractos a partir de matrices vegetales, reduciendo así el nivel de interferencias presentes y de esta manera permitir un análisis eficiente en el rango de concentraciones encontradas en este trabajo o incluso menores.

5.7 Comparación de los porcentajes de recuperación en las muestras de lechuga mediante análisis de varianza

Puesto que no se obtuvo ningún resultado en los análisis de las muestras, y dada la importancia de determinar a los HAP en las hortalizas y demás productos alimentarios, se decidió hacer una prueba de análisis de varianza a fin de comparar los porcentajes de recuperación para cada uno de los compuestos en estudio según el tipo de lechuga. En la Tabla 5.9 se presentan los porcentajes de recuperación promedio para ambas muestras de lechuga. Al compararlos se puede ver que los valores son distintos para cada compuesto; no obstante, la disparidad de sus desviaciones estándar podría indicar lo contrario.

Tabla 5.9 Porcentajes de recuperación promedio en ambas muestras de lechuga

Compuesto	Lechuga sangría	Lechuga italiana
Fenantreno	78.05 ^{±0.140}	83.16 ^{±1.905}
Fluoranteno	83.05 ^{±0.849}	78.64 ^{±2.468}
Pireno	80.05 ^{±0.402}	82.12 ^{±1.503}
Criseno	83.28 ^{±0.610}	87.53 ^{±3.155}
Benzo[a]pireno	87.92 ^{±2.127}	89.64 ^{±1.749}

Los resultados obtenidos del análisis de varianza para cada compuesto se presentan en la Tabla 5.10; y en la Tabla 5.11 se comparan los valores de F_c y F_t para cada uno de los compuestos. En todos los casos, F_t al 0.05 de nivel de significancia (α) es igual a 7.71. Asimismo, al 0.01 de α , F_t es igual a 21.20.

Los resultados de la prueba de análisis de varianza indican que en el caso del pireno, criseno y benzo[a]pireno, no hay suficiente evidencia que señale una diferencia entre los porcentajes de recuperación en ambos tipos de lechuga. En cambio, el fenantreno se recupera en mayor cantidad en lechuga italiana que en lechuga sangría, ya que cuando se rechaza H_0 , significa que hay suficiente evidencia para decir que existe diferencia entre los valores de recuperación para ambos tipos de lechuga.

Tabla 5.10 Resultados del análisis de varianza para comparar los porcentajes de recuperación de los HAP estudiados en las muestras de lechuga

Compuesto	Fuente de variación	Grados de libertad (g.l.)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	F calculada (F _c)
Fenantreno	Tratamientos	1	39.118	39.118	21.43
	Error	4	7.299	1.825	
	Total	5	46.417	F _t ⇒ F _{1,4,0.05} =7.71; F _{1,4,0.01} =21.20	
Fluoranteno	Tratamientos	1	29.173	29.173	8.57
	Error	4	13.622	3.406	
	Total	5	42.795	F _t ⇒ F _{1,4,0.05} =7.71; F _{1,4,0.01} =21.20	
Pireno	Tratamientos	1	6.407	6.407	5.30
	Error	4	4.841	1.210	
	Total	5	11.248	F _t ⇒ F _{1,4,0.05} =7.71; F _{1,4,0.01} =21.20	
Criseno	Tratamientos	1	27.094	27.094	5.25
	Error	4	20.653	5.163	
	Total	5	47.747	F _t ⇒ F _{1,4,0.05} =7.71; F _{1,4,0.01} =21.20	
Benzo[a]pireno	Tratamientos	1	4.455	4.455	1.18
	Error	4	15.165	3.791	
	Total	5	19.62	F _t ⇒ F _{1,4,0.05} =7.71; F _{1,4,0.01} =21.20	

F_t: F de tablas

Tabla 5.11 Comparación entre el valor de F calculada (F_c) y el valor de F de tablas (F_t) para la recuperación de los compuestos en estudio

Compuesto	Nivel de significancia (α)	F _c vs F _t	Criterio
Fenantreno	0.05	>	H ₀ se rechaza; H _i se acepta
	0.01	>	
Fluoranteno	0.05	>	H ₀ se rechaza; H _i se acepta
	0.01	<	H ₀ se acepta
Pireno	0.05	<	H ₀ se acepta
	0.01	<	
Criseno	0.05	<	H ₀ se acepta
	0.01	<	
Benzo[a]pireno	0.05	<	H ₀ se acepta
	0.01	<	

H₀: Hipótesis nula; H_i: Hipótesis alterna

Finalmente, para el caso del fluoranteno, H_0 se rechaza cuando $\alpha=0.05$; y por el contrario, cuando $\alpha=0.01$ se ve que H_0 se acepta, puesto que a este valor de α , la prueba es menos rigurosa.

Ahora bien, a pesar de que los resultados del análisis de varianza son definitivos, no es posible asegurar que existe suficiente evidencia para concluir que los porcentajes de recuperación para el fenantreno y el fluoranteno son distintos respecto al tipo de lechuga. Basta considerar que, en general, los compuestos presentan la misma tendencia, es decir, que tanto los valores promedio como las desviaciones estándar son numéricamente mayores en lechuga italiana que en lechuga sangría. Ello contribuye a que los porcentajes de recobro sean estadísticamente iguales en ambas variedades. Además, se debe tomar en cuenta que ambas muestras de lechuga fueron tomadas del mismo terreno, en cinco puntos diferentes (los cuatro extremos y el centro), y en los mismos días. Igualmente, bajo condiciones más estrictas, podrían considerarse otros factores como la composición de ambas muestras, pero sobre todo, es importante la variación en el contenido de lípidos y ceras debido a que los HAP presentan una gran afinidad por este tipo de sustancias, haciendo más difícil su extracción.

5.8 Contribución

En este trabajo se puede ver que no existe una diferencia significativa en cuanto a los rendimientos de extracción de HAP en ambos tipos de lechuga, más bien se observa que son estadísticamente similares para la mayoría de los compuestos en estudio. Por lo tanto, a través de esta investigación se puede inferir que usando una técnica de extracción apropiada, es posible obtener buenos rendimientos de HAP a partir de matrices vegetales.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

De acuerdo con el objetivo de esta investigación, que era determinar el grado de extracción de cinco hidrocarburos aromáticos policíclicos, los de mayor incidencia e importancia toxicológica, adicionados a dos variedades de lechuga, que es una de las hortalizas de mayor distribución en la zona “chinampera” de Xochimilco, mediante técnicas cromatográficas para su identificación y cuantificación, destacan los siguientes puntos:

- La técnica analítica de CG/EM es una opción viable para identificar y cuantificar selectivamente a cada uno de los cinco HAP en estudio. No obstante, el desarrollo de un adecuado protocolo de preparación de muestra es fundamental –en el caso de muestras vegetales– para obtener extractos con la mínima cantidad de interferencias coextraídas, de manera que sea posible obtener tanto porcentajes de recuperación como límites de detección aceptables a los niveles de concentración requeridos.
- Por medio de la metodología empleada fue posible obtener a los cinco HAP adicionados, lográndose porcentajes de recuperación de $78.05^{\pm 0.140}$, $83.05^{\pm 0.849}$, $80.05^{\pm 0.402}$, $83.28^{\pm 0.610}$ y $87.92^{\pm 2.127}$ % en lechuga sangría; mientras que en lechuga italiana se encontraron valores de $83.16^{\pm 1.905}$, $78.64^{\pm 2.468}$, $82.12^{\pm 1.503}$, $87.53^{\pm 3.155}$ y $89.64^{\pm 1.749}$ % correspondientes, en ambos casos, a fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno y benzo[a]pireno, respectivamente. Sin embargo, la limpieza con gel de sílice y alúmina no fue suficiente para eliminar las sustancias no polares coextraídas, por lo que el procedimiento tiende a ser poco confiable a medida que disminuye la concentración.
- Los resultados de la prueba de análisis de varianza indican que en el caso del pireno, criseno y benzo[a]pireno, $F_c < F_t$, por lo que H_0 se acepta, lo que significa que no hay suficiente evidencia que señale una diferencia entre los porcentajes de recuperación en ambos tipos de lechuga. En cambio, para el fenantreno y el fluoranteno no se puede decir lo mismo, ya que aquí $F_c > F_t$, por lo que H_0 se rechaza y H_1 se acepta. Lo anterior sugiere que estos resultados no son concluyentes, pues basta considerar a las desviaciones estándar para intuir que todos los porcentajes de recuperación promedio tienden a ser estadísticamente iguales. Por lo tanto, se requiere contar con un mayor número de datos.

Con respecto al primer objetivo particular, que era determinar el contenido de humedad de las muestras para verificar su efecto en el grado de extracción de los contaminantes, se encontraron valores muy cercanos a los reportados en las fuentes consultadas (95% aproximadamente): $92.9^{\pm 0.354}\%$ para lechuga sangría y $93.6^{\pm 0.141}\%$ para lechuga italiana. Con base en lo anterior se eligió el método de liofilización para deshidratar las muestras a fin de conservar la mayoría de las propiedades físicas, químicas, biológicas y sensoriales de su estado fresco, y al mismo tiempo optimizar el análisis de HAP, ya que éste sólo es eficiente en ausencia de humedad.

Con respecto al segundo objetivo particular, en este estudio se adaptaron los métodos EPA-3540C y UNEP-7 para evaluar la extracción, limpieza, identificación y cuantificación de los HAP en hojas de lechuga italiana y sangría; sin embargo, los resultados del análisis de cinco HAP en muestras de lechuga fueron dominados en su totalidad por valores muy por debajo de los límites de detección, cuya causa directa es la elevada carga de sustancias extrañas presentes en los extractos finales. Cabe recordar que las concentraciones esperadas en hortalizas oscilan entre 1 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa seca, reflejando el carácter transitorio de los cultivos. Estos son cosechados y removidos del suelo a intervalos regulares, de manera que indican las variaciones de contaminación atmosférica a corto plazo.

Con respecto al tercer objetivo particular, se observa que el porcentaje de recuperación para la lechuga sangría va de $78.05^{\pm 0.140}$ para el fenantreno a $87.92^{\pm 2.127}\%$ para el benzo[a]pireno, y para la lechuga italiana los valores se encuentran entre $78.64^{\pm 2.468}$ para el fluoranteno y $89.64^{\pm 1.749}\%$ para el benzo[a]pireno. Estos resultados son similares a los observados en la literatura, aunque con algunas variaciones en las metodologías: 71 – 92% (Kipopoulou y col., 1999), 84 – 96% (Bi y col., 2001), 76 – 100% (Howsam y col., 2000). De lo anterior se concluye que el procedimiento es confiable a los niveles de concentración de este trabajo.

6.2 Recomendaciones

- Para aumentar la eficiencia del análisis, se propone que inmediatamente después de realizar el procedimiento de limpieza con gel de sílice y alúmina, se efectúe otra limpieza de los extractos usando CPG o extracción en fase sólida con diferentes adsorbentes a base de sílice (NH_2 ó C_{18}), a fin de eliminar las interferencias como son

las ceras, carotenos, xantofilas y clorofilas. Ello deberá reflejarse en un menor nivel de ruido a lo largo de toda la línea basal en los cromatogramas, mejorando también los límites de detección. Adicionalmente, con el objeto de detectar las bajas concentraciones de HAP (ppb), se propone usar un método de extracción mediante el cual se puedan manejar grandes tamaños de muestra; por ejemplo, la extracción del material por contacto directo con el disolvente y la extracción por sonicación constituyen una buena alternativa.

- Se sugiere tener especial cuidado con el consumo elevado de hortalizas provenientes de zonas densamente pobladas y/o altamente industrializadas. Algunos estudios señalan que es posible reducir la contaminación por HAP en hortalizas mediante el lavado completo o el retiro de las cáscaras según sea el caso.
- Debido a la falta de normativa respecto de los límites máximos permisibles de HAP en hortalizas cultivadas dentro de zonas altamente contaminadas, es imperante evaluar el grado de exposición humana a estos compuestos y así determinar la repercusión en la salud a un corto, mediano y largo plazos por la ingesta de HAP, pues como los estudios indican, las hortalizas y los cereales constituyen la principal fuente de estos contaminantes en la dieta.
- Es necesario implementar tecnologías de control más eficientes aplicadas a las diversas fuentes de contaminación, con la finalidad de reducir y controlar la emisión de sustancias contaminantes a la atmósfera de la Ciudad de México. Esto es importante debido a que el aire es el principal medio de transporte para los HAP y demás compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles.

ANEXO A

Presencia de HAP en vegetación

A diferencia de los vegetales de consumo humano, la vegetación en su conjunto funciona como un filtro acumulando distintas sustancias orgánicas atmosféricas. Conforme a su composición y a sus propiedades, las plantas pueden utilizarse como bioindicadores del aire contaminado, ya que la vegetación integra a los contaminantes a través del tiempo y las muestras son mucho más fáciles de coleccionar que las muestras de aire. Sin embargo, debido a la gran diversidad en la vegetación, las concentraciones encontradas suelen ser muy variables, como se muestra en la Tabla A.1.

Tabla A.1 Contenido de HAP en algunas muestras de vegetación ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

Muestra	PHE	FLU	PYR	CHR	BaP	Σ HAP Mín - Máx	Masa seca o masa fresca	Referencia
<i>P. maximartinezii</i> ^a (agujas de pino)	10.3	12	19.3	18.3	1.47	102	Masa fresca	Hwang y col., 2003
<i>P. maximartinezii</i> ^b (agujas de pino)	84.8	66.9	118	49.8	9.15	563		
<i>Q. ilex</i> “controles” (hojas de roble)	18.09	10.51	7.86	9.22	2.70	156.91	Masa seca	Alfani y col., 2001
<i>Q. ilex</i> “parques” (hojas de roble)	99.93	84.90	114.07	65.85	10.17	603.80		
<i>Q. ilex</i> “vías transitadas” (hojas de roble)	256.74	353.79	572.71	273.76	53.37	2418.55		
<i>M. leucadendra</i> (sitio 1)	130	22	29	7.7	0.54	180 – 240	Masa seca	Müller y col., 2001
<i>M. leucadendra</i> (sitio 2)	1200	340	1000	120	NR	2100 – 2600		
<i>M. leucadendra</i> (sitio 3)	390	240	490	88	53	850 – 1800		

PHE, fenantreno; FLU, fluoranteno; PYR, pireno; CHR, criseno; BaP, benzo[a]pireno

Σ HAP, HAP totales; NR, No reportado

a: Muestra tomada de una zona urbana-residencial de la Ciudad de México

b: Muestra tomada de una zona urbana-industrial de la Ciudad de México

Sitio 1: Reserva forestal. Brisbane, Australia

Sitio 2: Volumen de tránsito de 42000 vehículos/día. Brisbane, Australia

Sitio 3: Volumen de tránsito de 13000 vehículos/día. Brisbane, Australia

Se reporta que las concentraciones típicas en vegetación creciendo cerca de fuentes conocidas de HAP oscilan entre 20 y 100 $\mu\text{g/kg}$, con valores extremos cercanos a 1 mg/kg ;

asimismo, los niveles de benzo[a]pireno varían de 0.1 a 150 µg/kg, con valores típicos entre 1 y 10 µg/kg. Es importante resaltar que las cantidades en vegetación generalmente son menores que aquellas encontradas en los suelos donde ésta crece (Alfani y col., 2001).

En otro contexto, muestras de agujas de pino fueron colectadas en Corea, México y Estados Unidos con el fin de comparar las cargas y las fuentes de HAP. Las cantidades totales varían de 31 a 563 µg/kg de masa fresca y exhiben claras diferencias entre los sitios rurales (limpios) y los sitios urbanos e industrializados (contaminados). Las más bajas y las más altas concentraciones se encuentran en muestras tomadas de un sitio rural en Corea y de la parte norte de la Ciudad de México, respectivamente. Los patrones de distribución y la proporción de HAP específicos de combustión con respecto al total presente en las muestras de Corea y Estados Unidos fueron similares, implicando fuentes similares: en estos sitios los HAP de 3 anillos representan un rango de 63-73% del total, siendo el fenantreno el compuesto predominante. Las muestras de la Ciudad de México, en cambio, presentaron diferentes patrones y proporciones de HAP específicos de combustión: los HAP de 4 anillos predominaron (~50%), siendo el fluoranteno y el pireno los compuestos más abundantes (véase Tabla A.1). Lo anterior indica que las fuentes de contaminación prevalecientes son distintas, pues la evidencia sugiere que la contribución de motores operados a diesel es más significativa en las muestras de México, D.F. que en los otros sitios (Hwang y col., 2003).

En otro estudio, los HAP se determinaron en hojas de *Quercus Ilex L.*, una variedad de roble de hojas perennes, con el fin de evaluar el grado de contaminación en el sector más urbanizado de la Ciudad de Nápoles y entonces compararlo con algunos lugares remotos cercanos a dicha metrópoli (véase Tabla A.1). Los HAP totales contenidos en las muestras van de 106.6, en un punto remoto, a 4607.5 µg/kg de masa seca, junto a una vía con alto flujo vehicular. La contribución de HAP carcinogénicos fue elevado dentro del área urbana y se redujo conforme al tipo de sitio, variando de 21.3 a 6.7%. La concentración de HAP totales en las zonas remotas fue dominada por los compuestos de baja masa molecular, mientras que a lo largo de las vías grandemente transitadas, el fluoranteno, pireno y benzo[a]antraceno presentaron los valores más altos (Alfani y col., 2001).

Por último, en Brisbane, Australia, se analizaron las hojas maduras de un árbol nativo (*Malaleuca leucadendra*), provenientes de tres lugares distintos: el primero situado dentro

de una reserva forestal; el segundo localizado en la intersección principal de la ciudad, con un volumen de tránsito de 42000 vehículos/día; el tercer punto se ubicó cerca de una vía de tamaño mediano, con una densidad de tránsito de 13000 vehículos/día. En el primer sitio, la suma total de las concentraciones de HAP oscila entre 180-240 $\mu\text{g}/\text{kg}$; en el segundo, los HAP totales son sustancialmente elevados, variando de 2100 a 2600 $\mu\text{g}/\text{kg}$; y en el tercer sitio, las hojas de *Malaleuca*, expuestas por varios meses, exhiben concentraciones de HAP totales entre 850 y 1800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso seco (véase Tabla A.1). De acuerdo con los perfiles de concentración encontrados, los compuestos predominantes son el fenantreno, fluoranteno, pireno y criseno (Müller y col., 2001).

ANEXO B

Fórmulas para realizar el análisis de varianza (Montgomery, 1991)

El análisis de varianza es una técnica estadística que, con base en el principio de t de Student, permite estudiar si existe diferencia significativa entre la media de las calificaciones asignadas a dos o más muestras. A continuación se desglosan los pasos requeridos para hacer un análisis de varianza:

- Factor de corrección (C): se calcula cuadrando el gran total y dividiéndolo entre el número total de respuestas.
- Suma de cuadrados de los tratamientos (SCt): se calcula sumando el cuadrado del total de las calificaciones de cada muestra, dividido entre el número de juicios en cada muestra. Al resultado se le resta el factor de corrección.
- Grados de libertad de los tratamientos (k-1): se calculan restando uno del número de muestras.
- Suma de cuadrados total (SCT): se calcula sumando el cuadrado de cada calificación y restando el factor de corrección.
- Grados de libertad del total (N-1): se calculan restando uno del número total de respuestas.
- Suma de cuadrados del error (SCe): se calcula restando la suma de cuadrados total menos la suma de cuadrados de los tratamientos.
- Grados de libertad del error (N-k): se calculan restando el número total de respuestas menos el número de muestras.
- Cuadrados medios (CM): se calculan para los tratamientos y para el error dividiendo respectivamente la suma de cuadrados entre sus grados de libertad correspondientes.
- Relación de variación por muestras o F calculada (F_c): se calcula dividiendo el cuadrado medio para los tratamientos (CMt) entre el cuadrado medio para el error (CMe).
- F de tablas (F_t): se localizan en las tablas de valores críticos para Fisher de acuerdo con los grados de libertad de los tratamientos y del error al nivel de significancia (α) requerido.

Finalmente, ambos valores de F se comparan: si $F_c > F_t$, se establecerá que existe diferencia significativa entre las medias al 10, 5 o al 1%, según sea el caso.

La Tabla B.1 que a continuación se presenta es útil para visualizar los resultados del procedimiento de análisis de varianza.

Tabla B.1 ANDEVA para una comparación de medias

Fuente de variación	Grados de libertad (g.l.)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	F calculada (F_c)
Tratamientos	k-1	SC _t	CM _t = SC _t /k-1	CM _t /CM _e
Error	N-k	SC _e	CM _e = SC _e /N-k	
Total	N-1	SCT		

ANEXO C

Datos y gráficas de calibración para los cinco HAP estudiados

[ppm]	Área
0.5025	128998
1.005	248143
1.5075	404653
2.01	521040
2.5125	625054
3.015	714532
3.5175	827472
4.02	990829
4.5225	1043449
5.025	1216066

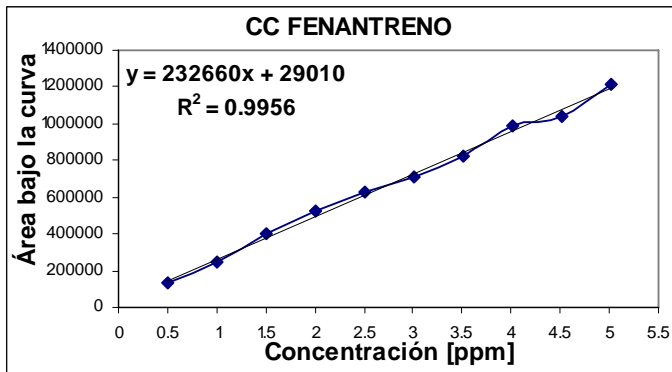


Figura C.1 Curva de calibración del fenantreno

[ppm]	Área
0.5075	103999
1.015	291805
1.5225	387097
2.03	592937
2.5375	738025
3.045	838675
3.5525	1048426
4.06	1148887
4.5675	1300027
5.075	1434746

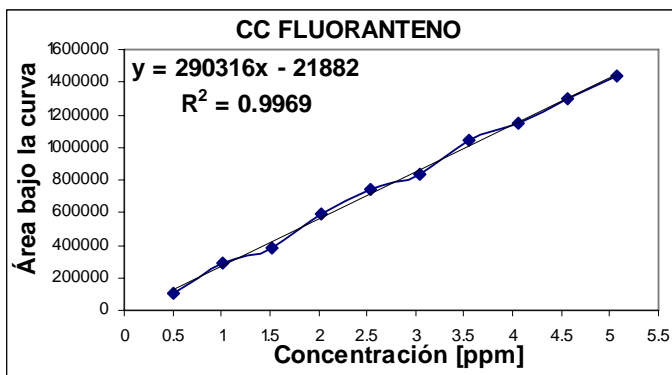


Figura C.2 Curva de calibración del fluoranteno

[ppm]	Área
0.5	260958
1	320022
1.5	482853
2	591554
2.5	636010
3	744323
3.5	856246
4	962943
4.5	1114759
5	1183655

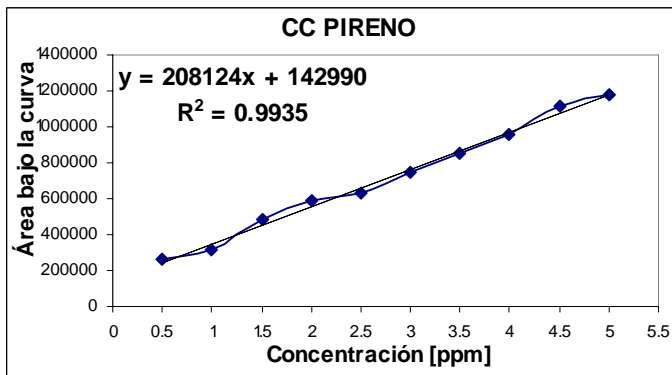


Figura C.3 Curva de calibración del pireno

[ppm]	Área
0.50075	121423
1.0015	271960
1.50225	314269
2.003	416491
2.50375	546202
3.0045	606590
3.50525	746531
4.006	780369
4.50675	952512
5.0075	1003025

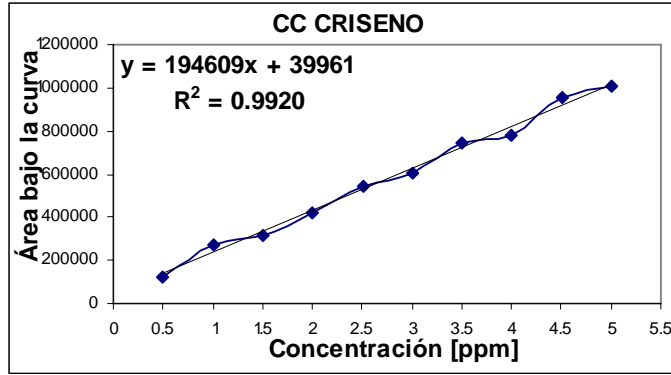


Figura C.4 Curva de calibración del criseno

[ppm]	Área
0.505	ND
1.01	ND
1.515	127455
2.02	147283
2.525	200053
3.03	244520
3.535	335893
4.04	501231
4.545	—
5.005	723253

ND: No detectado

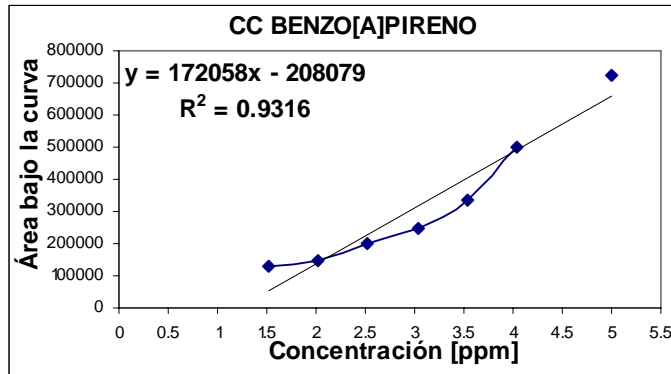


Figura C.5 Curva de calibración del benzo[a]pireno

ANEXO D

Cromatogramas y espectros de masas correspondientes a cada uno de los estándares y a las muestras bajo estudio

Cromatogramas de los estándares obtenidos a diferentes concentraciones

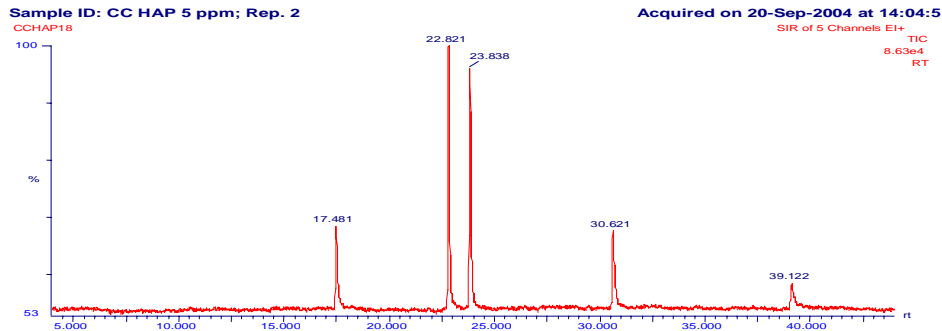


Figura D.1 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [5 ppm]

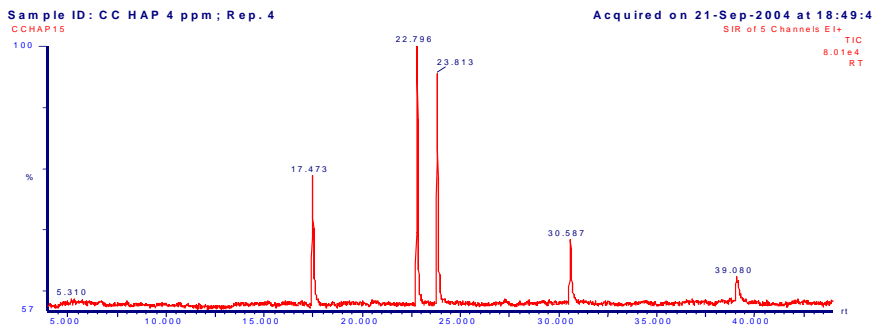


Figura D.2 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [4 ppm]

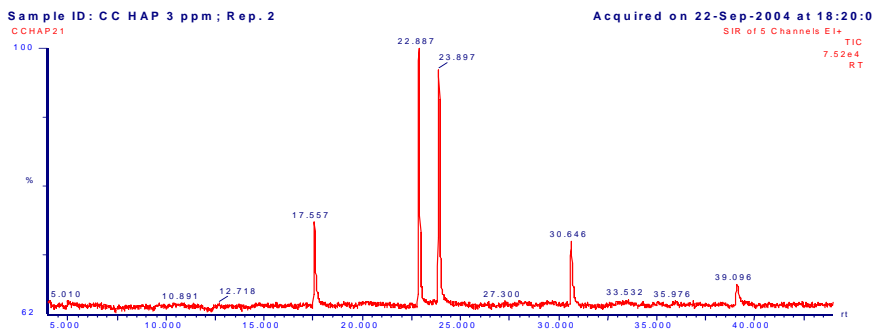


Figura D.3 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [3 ppm]

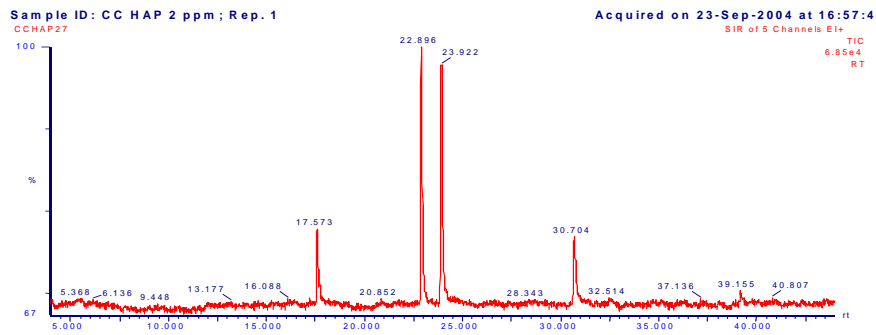


Figura D.4 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [2 ppm]

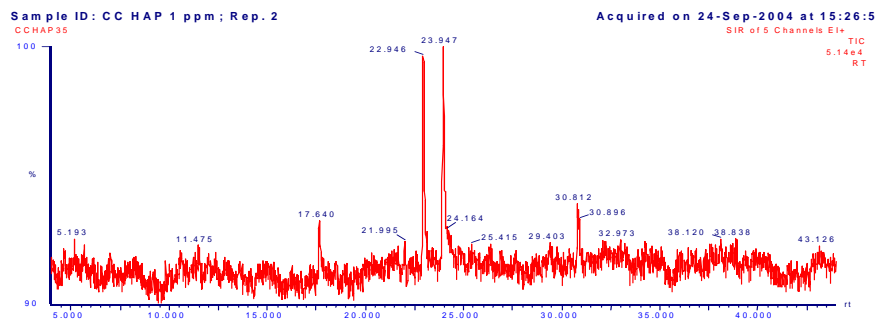


Figura D.5 Cromatograma de una mezcla de cinco estándares [1 ppm]

Cromatogramas de las muestras adicionadas

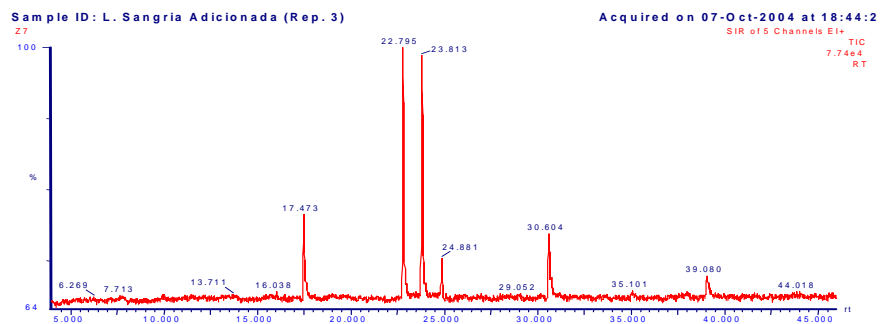


Figura D.6 Cromatograma de una muestra de L. sangría adicionada con cinco estándares

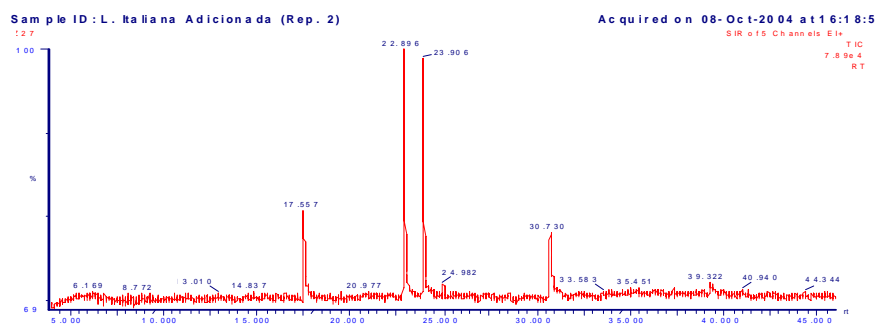


Figura D.7 Cromatograma de una muestra de *L. italiana* adicionada con cinco estándares

Espectros de las muestras bajo estudio

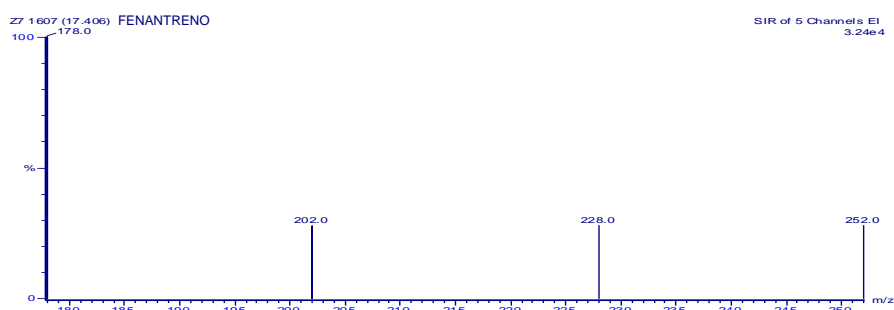


Figura D.8 Espectro de masas del fenantreno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares

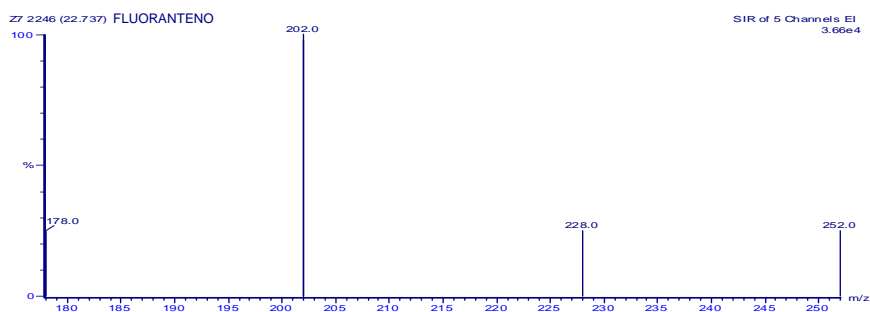


Figura D.9 Espectro de masas del fluoranteno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares

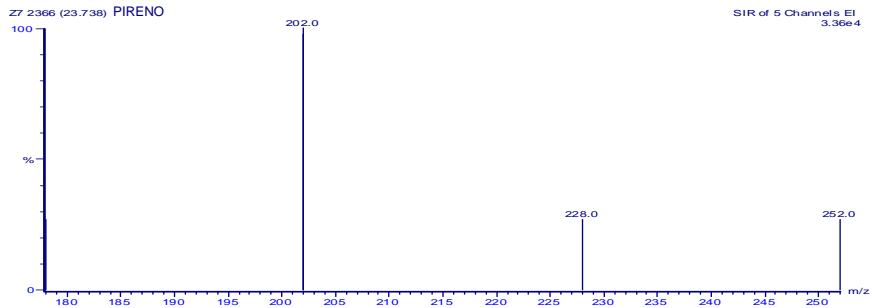


Figura D.10 Espectro de masas del pireno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares

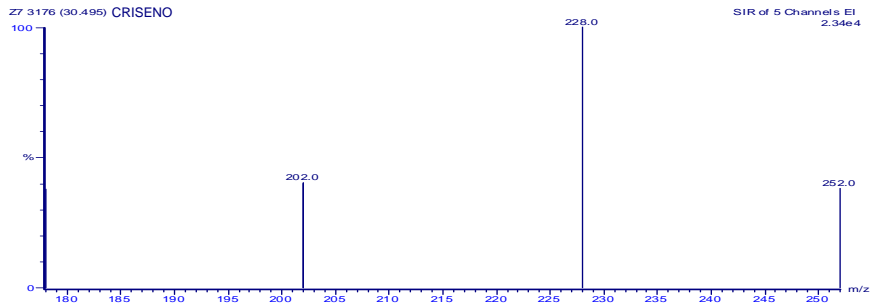


Figura D.11 Espectro de masas del criseno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares

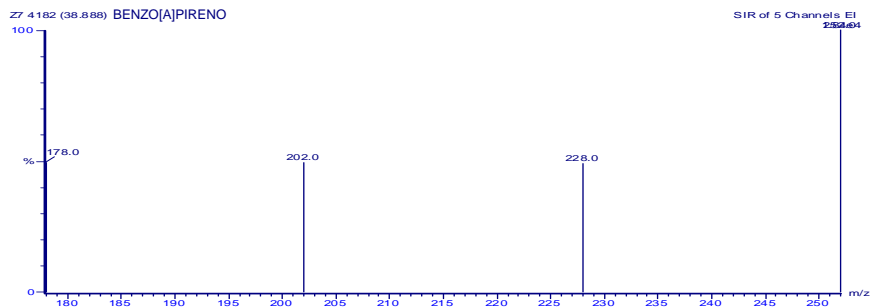


Figura D.12 Espectro de masas del benzo[a]pireno identificado en una muestra de lechuga adicionada con cinco estándares

ANEXO E

Tratamiento y disposición de los residuos

En la Figura E.1 se señalan los residuos generados en cada etapa del desarrollo experimental de esta investigación. En seguida, la Tabla E.1 indica el tratamiento y disposición de dichos residuos.

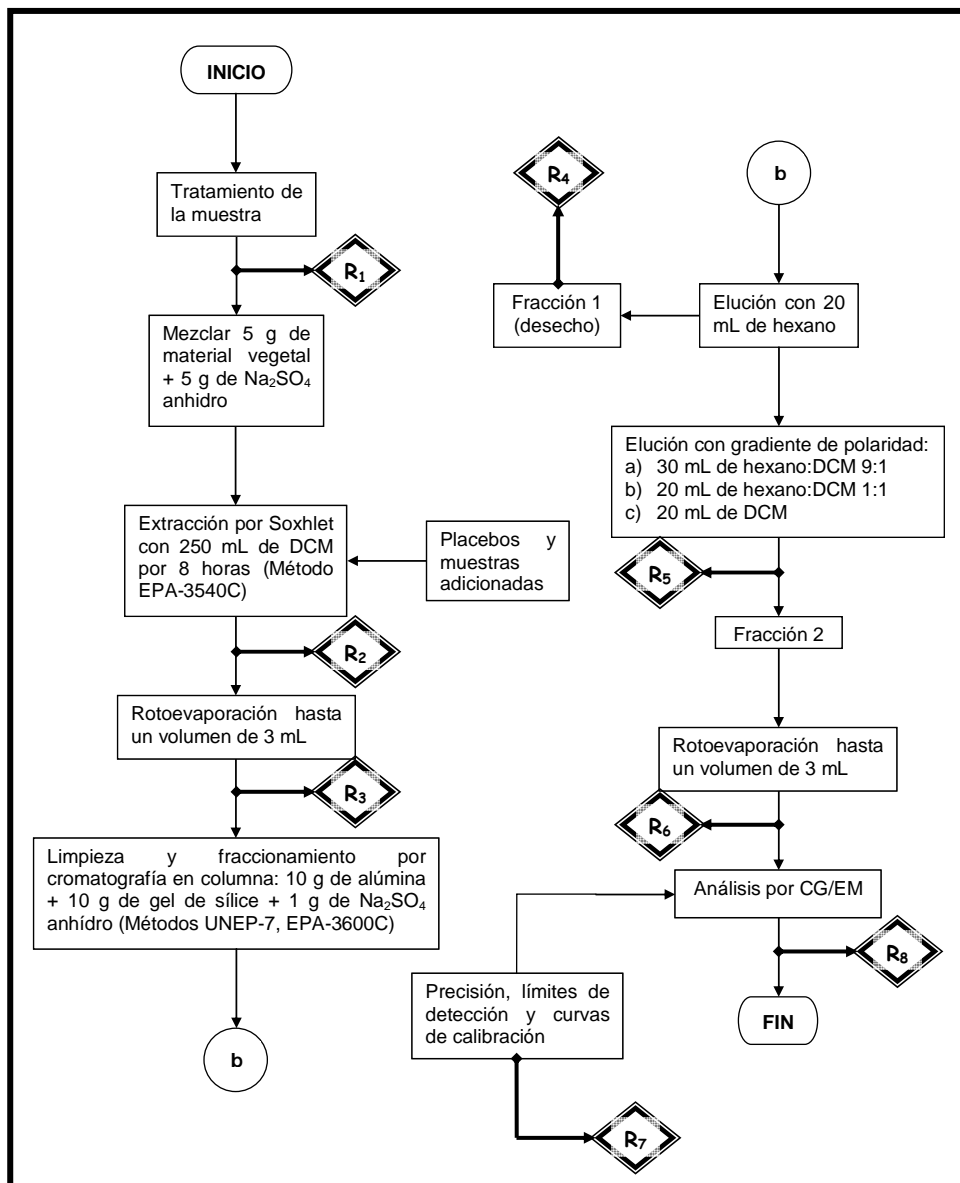


Figura E.1 Residuos generados durante el desarrollo experimental de esta investigación

Tabla E.1 Tratamiento y disposición de los residuos

Origen	Residuos	Tratamiento y/o disposición
R₁	Tierra, caracoles y partes dañadas de la planta	Basura orgánica
R₂	Cartuchos para extracción los cuales contienen material vegetal y Na ₂ SO ₄ contaminados con trazas de HAP	Se mandan a incineración
R₃	DCM	Destilación simple*
R₄	Hexano que contiene a los componentes menos polares de la muestra	Destilación simple para el hexano*. El remanente vegetal debe guardarse para su posterior incineración
R₅	Materiales adsorbentes, Na ₂ SO ₄ y fibra de vidrio	Se mandan a incineración
R₆	Hexano y DCM	Destilación fraccionada*
R₇	Hexano con los estándares de HAP, incluyendo a las soluciones madre	Destilación simple para el hexano*. Los HAP se almacenan para su posterior incineración
R₈	Hexano y DCM que contienen a los componentes vegetales y a los HAP	Destilación fraccionada*. Los HAP y el remanente vegetal se almacenan para su posterior incineración

Na₂SO₄: Sulfato de sodio; DCM: Diclorometano

* Los disolventes se pueden reutilizar para otros fines que no sean de investigación, pues ya no se consideran puros

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, T. y Shridhar, V. (2009). Pattern, sources and toxic potential of PAHs in the agricultural soils of Delhi, India. *J. Hazard. Mater.*, **163**: 1033-1039.
- Alfani, A.; Maisto, G.; Prati, M.V. y Baldantoni, D. (2001). Leaves of *Quercus ilex L.* as biomonitors of PAHs in the air of Naples (Italy). *Atmos. Environ.*, **35**: 3553-3559.
- Andrade, R.; Zurita, Y. y Pacheco, J. (2005). Boletín técnico: Cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). Ministerio de Agricultura de Bolivia. Pp. 2-11.
- Anónimo (2006). Tomado de las redes internacionales: http://www.uc.cl/sw_educ/hort0498/htm/p044.html
- AOAC (2001). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., EEUU.
- Baird, C. (1995). *Environmental chemistry*. Edit. W.H. Freeman and Company. EEUU. Pp. 272-280.
- Barbosa-Cánovas, G.V. y Vega-Mercado, H. (2000). *Deshidratación de alimentos*. Edit. Acribia. España. Pp. 203-208.
- Becerril, M. (1993). *Chinampas de San Gregorio Atlapulco*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F., México.
- Bi, X.H.; Chu, S.G. y Xu, X.B. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyl contamination in DaTong City, China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **67**: 141-148.
- Bjørseth, A. y Ramdahl, T. (1985). *Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Edit. Marcel Dekker. EEUU. Pp. 237-249.
- Braithwaite, A. y Smith, F.J. (1999). *Chromatographic methods*. Edit. Kluwer Academic Publishers. RU. Pp. 209-230.
- Catsberg, C.M.E. y Kempen-Van Dommelen, G.J.M. (1990). *Food Handbook*. Edit. Ellis Horwood. RU. Pp. 239-242.
- Cazes, J. (2001). *Encyclopedia of chromatography*. Edit. Marcel Dekker. EEUU. Pp. 365-371.
- Collins, C.; Fryer, M. y Grosso, A. (2006). Plant uptake of non-ionic organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, **40**: 45-52.
- Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México. (1996). *La contaminación atmosférica en el Valle de México. Acciones para su control 1988-1994*. México. Pp. 9-19.
- Cousins, I.T. y Mackay, D. (2001). Strategies for including vegetation compartments in multimedia models. *Chemosphere*, **44**: 643-654.

Chávez, J. (2003). *Determinación de la calidad microbiológica de hortalizas de mayor consumo en una zona de Xochimilco*. Tesis profesional. Facultad de Química, UNAM. México, D.F., México.

Chiou, C.T.; Sheng, G. y Manes, M. (2001). A partition-limited model for the plant uptake of organic contaminants from soil and water. *Environ. Sci. Technol.*, **35**: 1437-1444.

De Vos, R.H.; Van Dokkum, W.; Schouten, A. y De Jong-Berkhout, P. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem. Toxicol.*, **28**: 263-268.

Dennis, M.J.; Massey, R.C.; McWeeny, D.J.; Knowles, M.E. y Watson, D. (1983). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK total diet. *Food Chem. Toxicol.*, **21**: 569-574.

EPA (1996a). Method 3540C: Soxhlet extraction. Environmental Protection Agency. Washington, D.C., EEUU.

EPA (1996b). Method 3600C: Cleanup. Environmental Protection Agency. Washington, D.C., EEUU.

Fellenberg, G. (1999). *The chemistry of pollution*. Edit. John Wiley & Sons. RU. Pp. 113-119.

Finlayson-Pitts, B.J. y Pitts, J.N. (1986). *Atmospheric chemistry*. Edit. John Wiley & Sons. EEUU. Pp.870-883.

Helferich, W. y Winter, C.K. (2001). *Food toxicology*. Edit. CRC Press. EEUU. Pp. 203-216.

Herrera, L. (1997). *Estudio de las aguas del canal de Xochimilco para utilizarlas en una red de riego*. Tesis profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Acatlán, UNAM. Estado de México, México.

Hoffman, D.J.; Rattner, B.A.; Burton, G.A. y Cairns, J. (2003). *Handbook of ecotoxicology*. Edit. Lewis Publishers. EEUU. Pp. 342-360.

Howard, J.W. y Fazio, T. (1980). Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**: 1077-1104.

Howsam, M.; Jones, K.C. e Ineson, P. (2000). PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. *Environ. Pollut.*, **108**: 413-424.

Hwang, H.M.; Wade, T.L. y Sericano, J.L. (2003). Concentrations and source characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles from Korea, Mexico and United States. *Atmos. Environ.*, **37**: 2259-2267.

Ignesti, G.; Lodovici, M.; Dolara, P.; Lucia, P. y Grechi, D. (1992). Polycyclic aromatic hydrocarbons in olive fruits as a measure of air pollution in the Valley of Florence (Italy). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **48**: 809-814.

INEGI (2006). Tomado de las redes internacionales: <http://www.inegi.gob.mx>

Jennings, W. y Mittlefehldt, P.S. (1997). *Analytical gas chromatography*. Edit. Academic Press. EEUU. Pp. 97-103.

Kipopoulou, A.M.; Manoli, E. y Samara, C. (1999). Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environ. Pollut.*, **106**: 369-380.

Lioy, P.J. y Greenberg, A. (1990). Factors associated with human exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Ind. Health*, **6**: 209-223.

Lipnick, R.L.; Hermens, J.L.; Jones, K.C. y Muir, D.C. (2001). *Persistent, bioaccumulative and toxic chemicals*. American Chemical Society. EEUU. Pp. 218-232.

Lodovici, M.; Dolara, P.; Casalini, C.; Ciappellano, S. y Testolin, G. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Addit. Contam.*, **12**: 703-713.

Maliszewska-Kordybach, B.; Smreczak, B. y Klimkowicz-Pawlas, A. (2009). Concentrations, sources, and spatial distribution of individual polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils in the Eastern part of the EU: Poland as a case study. *Sci. Total Environ.*, **407**: 3746-3753.

McLachlan, M.S. (1999). Framework for the interpretation of measurements of SOCs in plants. *Environ. Sci. Technol.*, **33**: 1799-1804.

McNair, H. (1981). *Cromatografía de gases*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. EEUU. Pp. 140-160.

Menzie, C.A.; Potocki, B.B. y Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, **26**: 1278-1284.

Merck Index (2001). 30va edición. Merck & CO. EUA. Pp. 189, 391, 1293, 1425.

Mikes, M.; Cupr, P.; Trapp, S. y Klanova, J. (2009). Uptake of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides from soil and air into radishes (*Raphanus sativus*). *Environ. Pollut.*, **157**: 488-496.

Millar, J.G. y Haynes, K.F. (1998). *Methods in chemical ecology*. Edit. Kluwer Academic Publishers. EEUU. Pp. 86-140.

Montgomery, D.C. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica. México. Pp. 45-64.

Müller, J.F.; Hawker, D.W.; McLachlan, M.S. y Connell, D.W. (2001). PAHs, PCDD/Fs, PCBs and HCB in leaves from Brisbane, Australia. *Chemosphere*, **43**: 507-515.

Muñoz, M. y Ledesma, J.A. (2003). *Tablas de valor nutritivo de alimentos*. Edit. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp. 55-71.

- Nollet, L.M. (1996). *Handbook of food analysis*. Edit. Marcel Dekker. EEUU. Pp. 1641-1658.
- Orecchio, S.; Gianguzza, A. y Culotta, L. (2008). Absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pinus* bark: Analytical method and use for environmental pollution monitoring in the Palermo area (Sicily, Italy). *Environ. Res.*, **107**: 371-379.
- Patnaik, P. (1992). *A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances*. Edit. Van Nostrand Reinhold. EEUU. Pp. 429-444.
- Phillips, D.H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Res.*, **443**: 139-147.
- Quintero, I.; Zambrano, J.; Cabrita, M. y Gil, R. (2000). Evaluación en campo y postcosecha de nueve cultivares de lechuga *Lactuca sativa* L. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, **17**: 482-491.
- Rey-Salgueiro, L.; Martínez-Carballo, E.; García-Falcón, S. y Simal-Gándara, J. (2008). Effects of a chemical company fire on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant foods. *Food Chem.*, **108**: 347-353.
- Rubinson, J.F. y Rubinson, K.A. (2000). *Química analítica contemporánea*. Edit. Prentice Hall Hispanoamericana. México. Pp. 434-442.
- Scheer, H. (1991). *Chlorophylls*. Edit. CRC Press. EEUU. Pp. 90-109.
- Simonich, S.L. y Hites, R.A. (1994). Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, **28**: 939-943.
- Simonich, S.L. y Hites, R.A. (1995). Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environ. Sci. Technol.*, **29**: 2905-2914.
- Skoog, D.A. y Leary, J.J. (1994). *Análisis instrumental*. Edit. McGraw-Hill. México. Pp. 704-727.
- Speer, K.; Horstmann, P.; Steeg, E.; Kühn, T. y Montag, A. (1990). Zur analytik von polycyclen in gemüseproben. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **191**: 442-448.
- St-Amand, A.D.; Mayer, P.M. y Blais, J.M. (2009). Prediction of SVOC vegetation and atmospheric concentrations using calculated deposition velocities. *Environ. Int.*, doi: 10.1016/j.envint.2009.02.002.
- Tarcher, A.B. (1992). *Principles and practice of environmental medicine*. Edit. Plenum Medical Book Company. EEUU. Pp. 549-556.
- Thomson, B.; Lake, R. y Lill, R. (1996). The contribution of margarina to cancer risk from polycyclic aromatic hydrocarbons in the New Zealand diet. *Polycyclic Aromat. Compd.*, **11**: 177-184.
- Tuominen, J.P.; Pyysalo, H.S. y Sauri, M. (1988). Cereal products as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Agric. Food Chem.*, **36**: 118-120.

UNEP/IOC/IAEA (1993). Reference method No. 7: Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. United Nations Environment Programme (UNEP). París, Francia.

Wackerly, D.; Mendenhall, W. y Scheaffer, R. (2002). *Estadística matemática con aplicaciones*. Edit. Thomson. México. Pp. 628-634.

Walker, C.H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M. y Peakall, D.B. (1997). *Principles of ecotoxicology*. Edit. Taylor & Francis. RU. Pp. 171-185.

Watson, J.T. (1997). *Introduction to mass spectrometry*. Edit. Lippincott-Raven publishers. EEUU. Pp. 375-390.

Wild, E.; Dent, J.; Barber, J.L.; Thomas, G.O. y Jones, K.C. (2004). A novel analytical approach for visualizing and tracking organic chemicals in plants. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 4195-4199.

Wild, E.; Dent, J.; Thomas, G.O. y Jones, K.C. (2005). Direct observation of organic contaminant uptake, storage, and metabolism within plant roots. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 3695-3702.

White, F.A. y Wood, G.M. (1986). *Mass spectrometry. Applications in science and engineering*. Edit. John Wiley & Sons. EEUU. Pp. 202-221.

Zakrzewski, S.F. (1997). *Principles of environmental toxicology*. American Chemical Society. EEUU. Pp. 135-138.