



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA TIERRA  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA

**ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRECISIÓN DE LA PRUEBA DE  
BIOACCESIBILIDAD DE ARSÉNICO EN SUELOS CONTAMINADOS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA TIERRA

PRESENTA:

**Thalía García Rodríguez**

TUTOR

**Dra. Margarita Eugenia Gutiérrez Ruiz**

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Arturo Aguirre Gómez (FES-Cuautitlán, UNAM)

Dr. Mario Villalobos Peñalosa (Instituto de Geología, UNAM)

Dr. Francisco Martín Romero (Instituto de Geología, UNAM)

Dra. Águeda Elena Ceniceros Gómez (Facultad de Química, UNAM)

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., febrero 2017



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.



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.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme llevar a cabo mis estudios desde la preparatoria hasta el posgrado.

A la Dra. Margarita Eugenia Gutiérrez Ruiz por su apoyo y orientación en el desarrollo de la tesis, por integrarme en su grupo de trabajo desde que inicié el servicio social.

A la Dra. Águeda Ceniceros G. y la Dra. Ruth López S. por su orientación y sugerencias en este proyecto.

Al Dr. Francisco M. Romero y su equipo de trabajo, ya que me brindaron apoyo en el Laboratorio de Geoquímica del Instituto de Geología.

Al Dr. Mario Villalobos y al Dr. Arturo Aguirre por las correcciones y comentarios de la tesis, por su tiempo en la revisión de este trabajo y por sus valiosas aportaciones.

A la Dra. Teresa Pi Puig por la interpretación de resultados de difracción de rayos X (DRX).

A mi amigo Daniel Quiroz, por su apoyo en el desarrollo experimental y ser el principal colaborador en el diseño del equipo LABQA-2014.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo y recursos otorgados durante el desarrollo de este proyecto.

A Grupo México, a través de Industrial Minera México (IMMSA) por el apoyo.

## Dedicatorias

A mi familia, porque son parte fundamental de mi crecimiento en todos los aspectos, por su amor incondicional, ya que mis éxitos también son de ellos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental (LABQA): Reyna, Memo, Raquel, Zoila, Xavier, Alan, Fernanda, Betsabé, Tania, Ricardo, Daniel y Felipe; por hacer más ameno el tiempo y apoyarme en varios aspectos.

A mis amigos de Geología: Fabi, Inés, Daniel, Víctor, Javier, Milton y Katy, por su amistad y sus consejos.

A mis amigos de maestría: Mariana, Rodrigo, Arturo, Jairo, Lucía, Diana y Silvia; gracias por su amistad y apoyo en las clases, los quiero, admiro y estimo mucho.

A mi amigo Daniel Quiroz, por ser parte de este trabajo y hacer divertidos los momentos más difíciles, en los aspectos académico y personal.

A mi amiga Jennifer, por hacerme reír cuando más lo necesitaba y ver una perspectiva diferente de las situaciones desfavorables.

A la I.Q. Priscila López por su apoyo incondicional y ser mi mejor amiga.

A mis amigos de Consultoría e Investigación en Medio Ambiente S.C.: Gerardo, Ángel, Alfredo, Liz, Shariff, Leti, Chris y Gabi, gracias por integrarme en su grupo.

A la persona por quien inicié este aprendizaje, por haberme enseñado que mis metas deben ir más allá de un motivo sentimental y que los límites son relativos.

## Resumen

En México la industria minero-metalúrgica es una de las principales actividades económicas que ha promovido el desarrollo de bienes y servicios. Sin embargo, esta actividad ha causado la contaminación de la hidrosfera, la litosfera, la biosfera e inclusive de la estratosfera. Entre los impactos negativos, se encuentra la dispersión de elementos potencialmente tóxicos (EPT's) en los sistemas agua-suelo.

La fracción coloidal de los suelos y sedimentos afectados por la actividad minera, presentan cargas en su superficie, por lo que pueden retener a los iones de los EPT's, evitando su transporte a los cuerpos de agua, no obstante estos mecanismos de control tienen un límite, dependiendo de la cantidad de contaminantes, el tipo de suelo y el tiempo del impacto, entre otros factores. Por otra parte, las partículas más finas del suelo que contienen **los EPT's** pueden viajar a través del aire y afectar a los cuerpos de agua o ser inhalados por las poblaciones expuestas, incluyendo la humana. Es por ello que la norma ambiental mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (NOM-147) obliga a remediar los suelos de sitios contaminados.

En el caso de que haya población humana expuesta, la concentración de remediación de los suelos se calcula con base en un modelo de riesgo y, específicamente, para el caso del plomo (Pb) permite corregir el cálculo mediante el valor de la bioaccesibilidad, la cual se debe determinar utilizando el método señalado en la norma.

La bioaccesibilidad es una medición que se utiliza para determinar *in vitro* la biodisponibilidad, -que se mide *in vivo* utilizando diversos animales-, mediante la determinación de la cantidad soluble del contaminante, bajo condiciones similares a las que ocurren en el tracto gastrointestinal del ser humano. La biodisponibilidad indica la fracción de un contaminante que puede ser absorbida en el organismo humano y, por consiguiente, alcanza el torrente sanguíneo, reduciendo los largos lapsos y altos costos de la medición de la biodisponibilidad.

El método de bioaccesibilidad de la NOM-147 sólo considera la fase gástrica (estómago) del sistema digestivo y deriva del método PBET (por sus siglas en inglés Physiologically Based Extraction Test) que incluye las fases gástrica e intestinal. Asimismo, en esta norma solamente se permite determinar la bioaccesibilidad del plomo (Pb) y no incluye otros elementos peligrosos muy comunes en las minas polimetálicas, como es el arsénico (As). Este elemento de frontera es tóxico y muy abundante en México y otros países, por lo que es muy importante su control en sitios contaminados.

Por otra parte, el no considerar las dos fracciones del sistema gastrointestinal, como lo hace el método PBET, en donde además se utilizan reactivos similares a los existentes en el organismo humano, se considera podría magnificar la estimación de la cantidad absorbida, aunque existen razones para esta omisión y también para limitar la aplicación de la bioaccesibilidad al Pb. Especialmente, se debe a que existen publicaciones en que se muestra mayor correlación entre la fase gástrica *in vitro* con

los datos obtenidos *in vivo* para el Pb, aunque la magnitud entre ambos valores difiere en forma importante, lo que posiblemente magnifica la estimación de la absorción. Por otra parte, el método NOM-147 por ser más sencillo, se considera que es más preciso. Por lo tanto, se llevó a cabo este estudio cuyo objetivo es estudiar los principales factores que posiblemente afectan la precisión del método PBET que incluye las dos fases digestivas, utilizando un equipo de bajo costo diseñado ex-profeso que facilita la adición de reactivos y el control de pH, esperando aumentar la precisión de este método para el arsénico y así aportar datos que permitan incluir la bioaccesibilidad de este elemento en la NOM-147.

Dentro de las metas del estudio, se incluyó la determinación de la aceptabilidad del equipo LABQA-2014 (diseñado preliminarmente) y el grado de veracidad de los resultados obtenidos con el método PBET original, comparando los datos de un suelo estándar que también fue utilizado en determinaciones *in vivo* e *in vitro* por otros laboratorios internacionales. Además, se evaluó la viabilidad de la aplicación del método a escala comercial (n=83), cumpliendo los criterios de calidad del Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental (LABQA).

La precisión del equipo LABQA-2014 resultó similar a la del equipo NOM-147 (%C.V. = 4.8) y la repetibilidad al comparar todos los reactores del equipo cumplió los criterios del LABQA (%C.V. < 15). Respecto a la evaluación de la influencia del tipo de gas en la agitación (argón o aire) y de los reactivos orgánicos recomendados en el método PBET original, se concluyó que la precisión utilizando el equipo LABQA-2014 es aceptable. Al comparar las cartas control de los resultados obtenidos con el suelo estándar Montana 2711a, aplicando el método y equipo NOM-147 y los generados con el método PBET y el equipo LABQA-2014, se observó que en ambos casos se cumple con la máxima variabilidad aceptada en la bibliografía (media  $\pm$  2 s).

Los resultados de la comparación de la bioaccesibilidad de As del suelo estándar Montana 2710 calculada con el método y equipo NOM-147 (fase gástrica) y el método PBET (fases gástrica e intestinal)- equipo LABQA-2014, con la reportada internacionalmente utilizando cerdos y ratones, indican que: a) la cantidad de As bioaccesible (fase gástrica) calculada con el método NOM-147 fue mayor a la obtenida *in vivo*, lo que constituye una evidencia de que este método sobreestima la cantidad de As absorbida: b) aplicando el método PBET (fase gástrica) -equipo LABQA-2014, los datos obtenidos estaban comprendidos en el intervalo de As biodisponible en ratones y c) el As bioaccesible con el método PBET (fase intestinal) en el equipo LABQA-2014, fue menor a los valores reportados *in vivo*, tanto para cerdos como para ratones, aunque fue análogo a los reportados *in vitro* por la mayoría de los laboratorios.

Respecto a la aplicación a escala comercial del método PBET utilizando el equipo LABQA-2014 (n=83), se determinó que el equipo funcionó adecuadamente y facilitó la adición de los reactivos. Los valores de DPR fueron en mayoría menores al 20 % y cumplieron los controles de calidad de LABQA.

## Lista de Cuadros

Cuadro 1. Métodos para determinar la bioaccesibilidad, clasificados por su complejidad e indicando el país en que se desarrolló (Dabin <i>et al.</i> , 2012) .....	14
Cuadro 2. Valores de las variables de la ecuación de riesgo consideradas para el cálculo de la concentración aceptable de As en suelos.....	23
Cuadro 3. Caracterización de la muestra 015-14 .....	46
Cuadro 4. Valores generales de los suelos seleccionados para preparar las muestras compuestas: pH, potencial redox, C.E., As total y As geodisponible .....	47
Cuadro 5. Valores de (pH+pE) y estado de oxidación probable del As, en los suelos seleccionados para preparar las muestras compuestas .....	48
Cuadro 6. Valores promedio de los parámetros generales de las muestras compuestas calculados a partir de los datos de las muestras individuales.....	51
Cuadro 7. Valores promedio de los parámetros generales de las muestras compuestas, calculados a partir de las mediciones realizadas en el laboratorio.....	53
Cuadro 8. Coeficientes de correlación "r" de las concentraciones totales de las muestras compuestas .....	55
Cuadro 9. Concentraciones geodisponibles de As, Ca, K, S, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Cr y Cd en mg*L <sup>-1</sup> de las muestras compuestas (ICP-OES).....	55
Cuadro 10. Determinación de As en la muestra 015-14 utilizando todos los equipos y el método PBET modificado (fase gástrica) .....	58
Cuadro 11. Porcentajes del coeficiente de variación (%C.V.) en la determinación de As extraíble de la muestra C-4, con el método PBET modificado-fase gástrica, utilizando el equipo LABQA-2014.....	60
Cuadro 12. Determinación de As extraído con el método PBET modificado (fase gástrica), utilizando aire y argón en el equipo LABQA 2014.....	61
Cuadro 13. Comparación del %C.V. obtenido en la determinación del As extraído de la muestra C-4 por triplicado, durante la fase gástrica (métodos PBET original y PBET modificado), utilizando el equipo LABQA 2014 .....	62
Cuadro 14. Concentración de As extraído en la fase intestinal, con el método PBET original y modificado, en el equipo LABQA 2014 .....	63
Cuadro 15. Bioaccesibilidad de As, determinada con el método PBET original y equipo LABQA-2014, DPR y cálculo de las CE <sub>T</sub> de remediación .....	65
Cuadro 16. Bioaccesibilidad de As determinada con el método y equipo NOM-147, DPR y cálculo de las CE <sub>T</sub> de remediación .....	66
Cuadro 17. Coeficientes de correlación (r) de As total, As bioaccesible y As geodisponible de las muestras compuestas.....	69
Cuadro 18. Resultados de las pruebas de t-student, entre el As total, el As geodisponible y el As bioaccesible de las muestras compuestas.....	70
Cuadro 19. Valores de As bioaccesible (fracción gástrica) del suelo Montana 2711a, utilizando el método y el equipo señalado en la NOM-147 .....	71



Cuadro 20. Valores de As bioaccesible del suelo Montana 2711a, utilizando el método PBET y el equipo LABQA 2014 .....	73
Cuadro 21. Bioaccesibilidad de As del suelo Montana 2710, determinada con el método PBET y el equipo LABQA 2014 .....	75
Cuadro 22. Bioaccesibilidad de As del suelo Montana 2710, determinada con el método y equipo NOM-147 .....	75
Cuadro 23. Biodisponibilidad relativa ( <i>in vivo</i> ) del suelo Montana 2710, obtenida de Koch <i>et al.</i> , (2013) .....	76
Cuadro 24. Resultados de As bioaccesible del estándar de suelo Montana 2710, realizados en 14 laboratorios y compilados por Koch <i>et al.</i> , (2013) .....	77
Cuadro 25. Métodos de bioaccesibilidad que corresponden al intervalo de biodisponibilidad para cerdos y ratones, tanto para los resultados reportados por el Laboratorio Central como para los laboratorios independientes.....	80
Cuadro 26. Desviación porcentual relativa (DPR) de las determinaciones de As bioaccesible, en muestras seleccionadas (n=22) de los suelos de un sitio contaminado (n=83), utilizando el método PBET en el equipo LABQA 2014 .....	81
Cuadro 27. Concentraciones de referencia totales (CR <sub>T</sub> ) por tipo de uso de suelo de la NOM-147.....	97
Cuadro 28. Concentraciones solubles de referencia de contaminantes (CRs) que establece la NOM-147 .....	98
Cuadro 29. Criterios para evaluar la salinidad de un suelo, con base en la interpretación de su conductividad eléctrica según la NOM-021-SEMARNAT-2000 .....	98
<b>Cuadro 30. Coeficientes de correlación "r", entre parámetros de las muestras individuales que conforman las muestras compuestas .....</b>	<b>101</b>
Cuadro 31. Límites de FRX del Laboratorio Geoquímica Ambiental .....	102
Cuadro 32. Límites de detección y límites de cuantificación del ICP-OES en LABQA ..	102
Cuadro 33. Exactitud del Pb bioaccesible durante la fase gástrica (método PBET) del suelo Montana 2711 <sup>a</sup> en el equipo LABQA 2014.....	103
Cuadro 34. Resultados de As en mg*L <sup>-1</sup> , del método PBET modificado (fase gástrica), utilizando argón y aire en el equipo LABQA 2014 .....	104
Cuadro 35. Resultados de As en mg*L <sup>-1</sup> , de la fase gástrica y la fase intestinal del método PBET, obtenidos del equipo LABQA 2014 .....	105
Cuadro 36. Resultados de As en mg*L <sup>-1</sup> , de la fase gástrica del método PBET original y del método PBET modificado, obtenidos del equipo LABQA 2014.....	106
Cuadro 37. Comparación de tipo de prueba, segmentos digestivos, pH, temperatura, comida, uso de gas, cantidad de suelo y relación sólido líquido de los métodos PBET, IVG, DIN 19738 y RIVM en ayuno.....	107
Cuadro 38. Comparación de tipo de prueba, segmentos digestivos, pH, temperatura, comida, uso de gas, cantidad de suelo y relación sólido líquido de los métodos RIVM con alimento, UBM, FORHeST, SHIME, TIM, Farmacopea y MB/SR .....	108
Cuadro 39. Comparación de tamaño de partícula, tiempos de residencia, tiempo de manipulaciones, tiempo total, tipo de agitación, tratamiento de la muestra antes de analizar, tipo de recipiente, equipo, otros materiales, número de réplicas, controles analíticos y y comentarios de los métodos PBET, IVG, DIN 19738 y RIVM en ayuno .	109

Cuadro 40. Comparación de tamaño de partícula, tiempos de residencia, tiempo de manipulaciones, tiempo total, tipo de agitación, tratamiento de la muestra antes de analizar, tipo de recipiente, equipo, otros materiales, número de replicas, controles analíticos y comentarios de los métodos RIVM con alimento, UBM, FORHeST, SHIME, TIM, Farmacopea y MB/SR.....	110
Cuadro 41. Comparación de las características principales de los métodos PBET y RIVM, modificado de BARC, (2011) y Koch <i>et al.</i> , (2013) .....	111

## Lista de Figuras

Figura 1. Diversos mecanismos de sorción de un ion en la interfaz mineral-agua .....	4
Figura 2. Representación esquemática de la bioaccesibilidad (imagen modificada de Dabin <i>et al.</i> , 2012) .....	9
Figura 3. Representación esquemática del concepto de biodisponibilidad y bioaccesibilidad (imagen modificada de Dabin <i>et al.</i> , 2012) .....	11
Figura 4. Esquema experimental del método PBET (imagen modificada de Dabin <i>et al.</i> , 2012) .....	17
Figura 5. Esquema del método SBET, RBALP o NOM-147 (imagen modificada de Dabin <i>et al.</i> , 2012) .....	19
Figura 6. Diagrama para elegir la concentración objetivo de remediación según la NOM-147 .....	25
Figura 7. Equipo utilizado en el método PBET (imagen obtenida de Ruby <i>et al.</i> , 1996)	31
Figura 8. Equipo PBET del Laboratorio de Geoquímica Ambiental .....	32
Figura 9. Mangueras del equipo PBET del Laboratorio de Geoquímica Ambiental .....	32
Figura 10. Fluxómetros del equipo PBET .....	32
Figura 11. Diagrama del equipo NOM-147 (imagen tomada de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 .....	33
Figura 12. Equipo NOM 147 del Laboratorio de Geoquímica Ambiental .....	34
Figura 13. Equipo LABQA-2011 .....	34
Figura 14. Acumulación de sedimento en los reactores del equipo LABQA-2011 .....	35
Figura 15. Agitador orbital del equipo LIQ .....	35
Figura 16. Sistema de agitación del equipo LABQA-2014 .....	36
Figura 17. Diseño de los recipientes y el contenedor del equipo LABQA-2014 .....	37
Figura 18. Recipientes tradicionales, de izquierda a derecha se encuentran los recipientes de HDPE, PP, PC y PTF .....	37
Figura 19. Introducción de reactivos y muestras a través de embudos en el equipo LABQA-2014 .....	38
Figura 20. Imagen del equipo en funcionamiento .....	38
Figura 21. Control de la presión en cada reactor .....	39
Figura 22. Sistema de control de pH de la solución extractora .....	39
Figura 23. Toma de alícuota en el equipo LABQA-2014 .....	40
Figura 24. Imagen del equipo LABQA-2014 en funcionamiento .....	40
Figura 25. Valores de Eh (mV) y pH de las muestras individuales respecto al intervalo reportado para suelos no afectados (modificado de Baas-Becking, 1960) .....	49
Figura 26. Ubicación de los sitios de muestreo de los suelos utilizados para preparar las 5 muestras compuestas (imagen obtenida por Google Earth) .....	51
Figura 27. Gráfica de barras del As total y tendencia del pH en las muestras compuestas ácidas .....	52
Figura 28. Concentraciones totales de As, Fe, Ca y K en mg*kg <sup>-1</sup> obtenidas por FRX, de las muestras .....	54

Figura 29. Concentraciones totales de Pb, Zn, Cu, Mn, Cr y Cd en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ obtenidas por FRX, de las muestras compuestas de suelo .....	54
Figura 30. Difractograma de la muestra Compuesta 3, obtenido con el equipo Shimadzu XRD en el Instituto de Geología .....	56
Figura 31. Diagrama de Pourbaix para As (1 M). Se presentan los intervalos de valores de Eh', pH y las especies dominantes de arsénico, con los datos experimentales de las muestras compuestas (rombos) .....	57
Figura 32. Gráfica de columnas de las concentraciones geodisponibles de As, Ca y K en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para las muestras compuestas, obtenidas por ICP-OES.....	57
Figura 33. Gráfica de columnas de las concentraciones geodisponibles de Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Cr y Cd en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para las muestras compuestas, obtenidas por ICP-OES.....	58
Figura 34. Diagrama de barras de los valores promedio de As bioaccesible obtenidos con los equipos de agitación disponibles .....	59
Figura 35. Porcentajes de C.V. de la determinación del As bioaccesible, con los métodos PBET original y modificado (fases gástrica e intestinal) en el equipo LABQA 2014 .....	64
Figura 36. Tendencias de tres muestras compuestas en: a) bioaccesibilidad de As con dos métodos y equipos y b) $\text{CE}_T$ de remediación de acuerdo con la NOM-147 .....	67
Figura 37. Diagramas de barras: a) concentraciones de As bioaccesible por el método y equipo NOM-147, y el método PBET original y el equipo LABQA 2014 y b) concentraciones específicas totales para la remediación de suelos contaminados, calculadas con base en las concentraciones bioaccesibles .....	68
Figura 38. Carta control del suelo Montana 2711a al determinar la fase gástrica (método NOM-147) en el equipo NOM-147 .....	72
Figura 39. Carta control del suelo Montana 2711a al determinar la fase gástrica (método PBET) en el equipo LABQA 2014 .....	74
Figura 40. Carta control del suelo Montana 2711 <sup>a</sup> al determinar la fase intestinal (método PBET) en el equipo LABQA 2014 .....	74
Figura 41. Porcentajes de As biodisponible y As bioaccesible, determinados en el suelo estándar NIST Montana 2710, cuantificado por el Laboratorio Central de la Unidad de <b>servicios analíticos de la Queen's University Canadá por una serie de métodos</b> diferentes de bioaccesibilidad (imagen modificada de Koch <i>et al.</i> , 2013); y resultados obtenidos del mismo suelo en este estudio .....	78
Figura 42. Porcentajes de As biodisponible y As bioaccesible, determinado en el suelo estándar NIST Montana 2710, cuantificado por los laboratorios independientes que participaron con el Laboratorio Central de la Unidad de servicios analíticos de la <b>Queen's University Canadá</b> por una serie de métodos diferentes de bioaccesibilidad (imagen modificada de Koch <i>et al.</i> , 2013); y resultados obtenidos del mismo suelo en este estudio.....	79
Figura 43. Bioaccesibilidad de As con el método PBET (fases gástrica e intestinal) para tres muestras de Chihuahua 1.....	82
Figura 44. Concentraciones totales obtenidas por FRX de As, Pb, Fe, Ca, K y Zn en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de las muestras individuales que conforman las muestras compuestas .....	99

Figura 45. Concentraciones totales obtenidas por FRX de Cu, Mn, Sb, Cd y Ti en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de las muestras individuales que conforman las muestras compuestas .....	100
Figura 46. Concentraciones totales obtenidas por FRX de V, Ni, Co, Cr y Se en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de las muestras individuales que conforman las muestras compuestas.....	101
Figura 47. Concentración de As total en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del sitio Chihuahua 2, mediante ICP-OES .....	112
Figura 48. Concentración de As en la fase gástrica en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del sitio Chihuahua 2, con el método PBET en el equipo LABQA 2014 .....	112
Figura 49. Concentración de As en la fase intestinal en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del sitio Chihuahua 2, con el método PBET en el equipo LABQA 2014 .....	113
Figura 50. Concentración de As total en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de las muestras del sitio Chihuahua 3 .....	114
Figura 51. Concentración de As en la fase gástrica en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de las muestras del sitio Chihuahua 3 .....	114
Figura 52. Concentración de As en la fase intestinal en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de las muestras del sitio Chihuahua 3.....	115
Figura 53. Equipo utilizado en el método PBET modificado por Drexler (imagen obtenida de Dabin <i>et al.</i> , 2012) .....	126
Figura 54. Equipo utilizado en el método IVG (imagen obtenida de Dabin <i>et al.</i> , 2012) .....	126
Figura 55. Equipo utilizado en el método DIN 19738 (imagen obtenida de Dabin <i>et al.</i> , 2012).....	127
Figura 56. Equipo utilizado en el método SHIME (imagen obtenida de Dabin <i>et al.</i> , 2012).....	128
Figura 57. Equipo utilizado en el método TIM (imagen obtenida de Dabin <i>et al.</i> , 2012) .....	129

# Contenido

Resumen .....	I
Lista de Cuadros.....	III
Lista de Figuras .....	VI
Introducción .....	XII
1. Antecedentes .....	1
1.1 Mecanismos de atenuación de contaminantes en el suelo .....	1
1.1.1 Composición y funciones del suelo .....	1
1.1.2 Contaminación del suelo con EPT y sus consecuencias.....	2
1.1.3 Procesos de atenuación natural de los EPT (sorción y precipitación) .....	3
1.2 Concepto de riesgo.....	5
1.2.1 Rutas de transporte, vías de ingreso y toxicidad de los EPT's.....	5
1.2.2 Concepto de biodisponibilidad .....	7
1.2.3 Evaluación del riesgo a la salud humana .....	11
1.3 Métodos para determinar la bioaccesibilidad de los EPT en suelos.....	13
1.3.1 Fundamentos de los métodos de bioaccesibilidad .....	13
1.3.2 Método PBET para la determinación de la bioaccesibilidad en suelos contaminados con EPT's.....	15
1.3.3 Aplicación de la bioaccesibilidad a nivel internacional .....	19
1.3.4 Determinación de concentraciones de remediación a partir del modelo de riesgo.....	21
1.3.5 Norma oficial mexicana para la remediación de suelos y lineamientos para la aplicación de la bioaccesibilidad en la NOM-147 .....	23
2. Metodología .....	26
2.1 Hipótesis de trabajo, objetivo, metas y diagrama conceptual .....	26
2.2 Equipos utilizados para la medición del porcentaje de bioaccesibilidad del As ....	31
2.2.1 Equipos pre-existentes .....	31
2.2.2 Equipo LABQA-2014 .....	36
2.3 Parámetros de control de calidad analítica .....	40
2.3.1 Exactitud .....	40
2.3.2 Precisión.....	41
2.4 Materiales y métodos.....	43
2.4.1 Descripción y preparación de las muestras.....	43

2.4.2 Gases de agitación.....	43
2.4.3 Métodos y equipos analíticos para la caracterización general de los suelos ..	44
2.4.4 Métodos utilizados para la determinación de bioaccesibilidad.....	44
3. Resultados y discusión.....	46
3.1 Caracterización del suelo contaminado con baja concentración de arsénico.....	46
3.2 Análisis de los suelos utilizados para preparar las muestras compuestas .....	47
3.3 Preparación de las muestras compuestas .....	49
3.3.1 Características generales .....	49
3.3.2 Caracterización de las muestras compuestas.....	52
3.4 Determinación de la aceptabilidad del equipo LABQA-2014 .....	58
3.4.1 Comparación de la repetibilidad obtenida con los equipos de agitación (método PBET modificado fase gástrica) y selección de los equipos con mayor precisión.....	58
3.4.2 Evaluación de la repetibilidad del equipo LABQA-2014 utilizando todos los reactores .....	59
3.4.3 Evaluación de la influencia del gas y los reactivos orgánicos en la precisión (reproducibilidad) del equipo LABQA-2014: .....	60
3.4.4 Evaluación comparativa de la repetibilidad de la bioaccesibilidad de As en 3 muestras compuestas utilizando dos equipos y dos métodos .....	65
3.4.5 Cartas control para el As bioaccesible con el método y equipo NOM-147; y el método PBET (fases gástrica e intestinal) con el equipo LABQA-2014, utilizando el estándar Montana 2711a .....	70
3.5 Determinación del grado de veracidad de los resultados mediante la comparación de los datos obtenidos con el equipo y el método NOM-147, y con el equipo LABQA-2014 y el método PBET original, para el estándar de suelo Montana 2710 (reportado <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> por diferentes laboratorios internacionales). .....	75
3.6 Determinación de la viabilidad de aplicar el método PBET original en el equipo LABQA 2014, para determinar la bioaccesibilidad de As, a escalas típicas de casos reales.....	81
4. Conclusiones y recomendaciones .....	84
5. Bibliografía.....	87
6. Apéndice analítico .....	97
A.1 Caracterización de suelos .....	97
A.2 Límites de detección de los equipos utilizados.....	102
A.3 Pruebas estadísticas .....	102
A.4 Descripción de las características generales de los métodos de bioaccesibilidad .....	107

A.5 Concentraciones de As en las muestras del Norte de México .....	112
A.6 Descripción de los métodos analíticos utilizados .....	116
A.7 Métodos utilizados para medir la bioaccesibilidad .....	120
7. Anexo: Descripción de otros métodos que se utilizan en la prueba de bioaccesibilidad .....	126
Método <i>In vitro</i> Gastrointestinal Method (IVG) .....	129
Método estándar alemán DIN 19738.....	129
Método RIVM, por sus siglas en inglés: Digestion model develop by the Dutch National Institute for Public Health and the Environment.....	130
Método UBM, por sus siglas en inglés: Unified BARGE Method.....	130
Método FOREhST .....	131
Método SHIME, por sus siglas en inglés: Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem .....	131
<b>Modelo intestinal TNO's: prueba TIM</b> .....	132
Método US Farmacopea .....	132
Método de Balance de Masa (MB) y Recaptura de Suelo (SR).....	132
Método de digestión con pepsina (AOAC 2000) .....	132



# Introducción

A lo largo de la historia, la industria minero-metalúrgica ha sido una actividad de gran relevancia para el desarrollo económico de México. Las antiguas civilizaciones indígenas ya explotaban yacimientos de oro (Au), plata (Ag) y cobre (Cu); desde entonces la actividad minera solamente se ha visto interrumpida, por guerras y periodos de inestabilidad social.

En la época colonial, la minería fue la actividad económica fundamental. Muchas ciudades se fundaron en las zonas en las que se descubrieron yacimientos importantes, como fue el caso de San Luis Potosí, Guanajuato, Zacatecas y Taxco, entre otras. En años posteriores a la independencia, especialmente en el periodo de gobierno de Porfirio Díaz, fue el motor del crecimiento económico, promoviendo la creación o el desarrollo de diversos municipios como Cananea y Nacozari en el estado de Sonora desde el siglo XVII.

Especialmente, la minería es muy importante para el desarrollo económico regional, pues la demanda de bienes y servicios, desde la época de la colonia, ha sido un motor del desarrollo de industria local. Inclusive, la minería promovió la ciencia, pues la explotación de los yacimientos requería del conocimiento de su ubicación y el comportamiento de los minerales, así como del desarrollo de técnicas para su explotación, lo que llevó a que en 1792, las autoridades virreinales fundaran la Escuela de Minería (Coll-Hurtado *et al.*, 2002).

Actualmente, la minería sigue siendo muy importante para México, pues genera ingresos sólo superados por la industria petrolera. El producto interno bruto (PIB) del sector minero en el primer trimestre del 2015 fue de 6.6% y del sector petrolero fue de 7.3 % (INEGI, 2015). El monto de los salarios en la industria minera es superior al promedio nacional y los empleos se generan en zonas donde frecuentemente no existen otras actividades económicas importantes (SE, 2015); aunque el grado de integración de este sector económico a nivel nacional, es muy bajo.

A pesar de sus beneficios, la operación de las minas impacta al ambiente desde el subsuelo hasta la estratosfera, alterando acuíferos, subsuelo, suelos, biota y calidad del aire; como también sucede en las grandes urbes. Sin embargo, la magnitud de los daños no puede generalizarse, ya que depende de las características geográficas locales, de la composición del yacimiento, del tipo de proceso y de la capacidad de producción. En consecuencia, para valorar las afectaciones de la minería, se requiere considerar la composición del yacimiento, el tipo de tecnologías utilizadas, la vulnerabilidad de los sistemas agua-suelo, la riqueza y fragilidad de la biota, las poblaciones humanas expuestas, así como la composición y los volúmenes de las emisiones (gaseosas, líquidas y sólidas), los mecanismos de liberación al ambiente y su destino final (atmósfera, cuerpos de agua y suelos).

En todas las minas, las cantidades de residuos, cuya peligrosidad también es muy variable, son muy grandes, especialmente se producen grandes volúmenes de tepetates, terreros y jales. Cuando el yacimiento es polimetálico, los residuos contienen sulfuros de elementos potencialmente tóxicos (EPT's), conocidos genéricamente como "metales pesados". Los EPT's de los minerales, que se encuentran en el subsuelo, presentan muy baja solubilidad, pero cuando se extraen y se muelen, se reduce el tamaño de las partículas, aumentando su superficie reactiva, por lo que al contacto con el aire y el agua, los sulfuros tienden a oxidarse aumentando su solubilidad y liberando protones. Especialmente los sulfuros de hierro (pirita y arsenopirita), se oxidan formando una solución rica en ácido sulfúrico, que contiene iones y coloides de EPT's. La solución ácida formada, se conoce como "drenaje ácido" y representa un riesgo potencial para los cuerpos de agua y para los suelos. Sin embargo, hay diversos mecanismos de atenuación, como la neutralización del ácido por la reacción con minerales alcalinos y la precipitación de minerales insolubles, así como la sorción de los iones de EPT's en oxi-hidróxidos y/o en arcillas que presentan cargas en su superficie, los cuales principalmente se encuentran en los cauces por donde fluye la solución ácida. No obstante, puede ocurrir que los materiales en donde se retuvieron los EPT's sean dispersados por el viento, afectando el entorno, e inclusive, bajo condiciones físico-químicas diferentes, los EPT's se pueden volver a disponibilizar.

Las partículas finas de los residuos que contienen EPT's, ya sea en formas reducidas u oxidadas, al ser transportadas a zonas aledañas por la acción del aire, pueden ser inhaladas por las poblaciones humanas expuestas o depositadas en suelos y cuerpos de agua, en donde puede permanecer sin cambios, o reaccionar, disminuyendo o aumentando su solubilidad. Por ejemplo, pueden sufrir cambios por procesos de óxido-reducción o ácido-base, e inclusive por formación de compuestos de coordinación, ya sea con ligantes inorgánicos u orgánicos que están presentes en la materia orgánica natural. Cabe mencionar, que las reacciones de coordinación pueden ser catalizadas por sustancias que liberan los microorganismos<sup>1</sup>. Asimismo, como ya se comentó, los EPT's pueden quedar retenidos en la superficie de coloides formando complejos de esfera externa o interna, e inclusive ser absorbidos u ocluidos en las partes internas de estas pequeñas partículas sólidas.

Para proteger a la población humana y a la biota, cuando la cantidad de EPT se considera un factor de riesgo, la legislación ambiental de México obliga a remediar los suelos siguiendo lo señalado en la norma oficial NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (NOM-147). Esta regulación establece los criterios para determinar la concentración de

---

<sup>1</sup> Algunas especies de bacterias y hongos excretan compuestos orgánicos complejos que tienen una alta afinidad por el hierro, pudiendo actuar como agentes secuestrantes y utilizar el hierro de entornos donde no pueden sobrevivir otros organismos. Los compuestos excretados se coordinan con Fe(III) para formar quelatos octaédricos, el nombre genérico para estos quelatos es siderocromos, los cuales pueden servir para almacenamiento y transporte de hierro, en algunos casos como antibióticos (Ochiai, 1984).

remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y vanadio.

En la NOM-147 se presentan diversos criterios para determinar las concentraciones de remediación. En primer término, se pueden utilizar las denominadas **“Concentraciones Genéricas de Referencia (CGR)”** listadas en el Cuadro 31 del apéndice 1, que son valores muy conservadores utilizados en diversos países como límites precautorios que determinan cuándo es necesario realizar estudios específicos de algún sitio contaminado. Además, en esta regulación se permite calcular las **“Concentraciones Específicas de Limpieza (CEL)”** (por sus siglas en inglés soil cleanup goals/cleanup levels), que son determinadas específicamente para la zona que se quiere remediar. Cuando hay población humana expuesta, se debe calcular el valor denominado “Concentración Objetivo Total” (CO<sub>T</sub>) mediante un estudio de riesgo a la salud, mientras que en zonas sin población humana expuesta, se calculan las fracciones geodisponibles, que son las concentraciones solubles en agua meteórica, cuyos niveles máximos permisibles están reportados en la Tabla 2 de la misma norma (ver Cuadro 32 en el apéndice A.1).

Debido a que en los estudios de riesgo a la salud, se utilizan dosis de toxicidad determinadas en experimentos o en accidentes, donde los EPT's se encuentran en formas químicas solubles diferentes a las presentes en los suelos, se ha incluido un factor de corrección, que es la biodisponibilidad (medición *in vivo*) o la bioaccesibilidad (medición *in vitro*), valores que estiman la fracción del EPT ingerido que puede ser absorbido y pasar al torrente sanguíneo.

La fracción biodisponible de un contaminante en el suelo se define como la relación entre la cantidad de un EPT que ha alcanzado el torrente sanguíneo, respecto a la dosis ingerida; cuando se mide *in vivo* se utilizan animales, generalmente ratones y cerdos, lo que consume tiempo y recursos, además de que se daña a seres vivos. Por lo tanto, se desarrolló un parámetro alternativo para estimar la biodisponibilidad *in vitro*, simulando el sistema digestivo humano en el laboratorio que se conoce como bioaccesibilidad. Actualmente, hay diversos procedimientos para determinarla, entre los cuales sobresale el método Physiologically Based Extraction Test (PBET), que fue el primero en proponerse en 1993 y frecuentemente se aplica en estudios de suelos impactados por minas y plantas metalúrgicas (Dabin *et al.*, 2012).

En México, la NOM-147 solamente permite utilizar como factor de corrección de los valores de remediación de suelos, calculados con base en estudios de riesgo, la bioaccesibilidad del Pb en la fase gástrica. Este criterio restrictivo elimina de la prueba las condiciones del intestino donde se lleva a cabo la absorción de los EPT's, pero su aplicación se debe a que en el momento de emitir la norma, solamente se había mostrado una relación lineal entre las cantidades de Pb determinadas *in vivo* e *in vitro* en la fracción gástrica. Por otra parte, también apoyó este criterio limitante, el que la determinación de la fase gástrica del Pb es sencilla y los resultados presentan una

mayor reproducibilidad que los obtenidos con el método PBET, que incluye las fases gástrica e intestinal.

Cabe mencionar, que el limitar al Pb la medición de la bioaccesibilidad a la fase gástrica, sin incluir a otros elementos importantes por su toxicidad y abundancia en sitios contaminados, magnifica la estimación de la cantidad potencialmente absorbible, ya que la solubilidad de los EPT's generalmente aumenta en un medio ácido (estómago) y disminuye en un medio neutro (intestino) (García, 2013).

Cuando se magnifican concentraciones bioaccesibles calculadas con el método simplificado de la NOM-147, se puede causar un aumento importante del costo de la remediación, haciendo económicamente inviable el proyecto. Por lo tanto, es importante aportar datos científicos que avalen la revisión de dicha norma, y la inclusión de la medición de la bioaccesibilidad en las fases gástrica e intestinal de los EPT's que están presentes en los residuos de las minas polimetalicas, como es el caso del arsénico (As).

Especialmente es importante determinar si la complejidad del método PBET es la causa de que se le considere poco preciso, ya que utiliza un mayor número de reactivos y requiere de la adición de sustancias durante el proceso sin detener la agitación, lo cual no es una operación sencilla, especialmente cuando se utiliza el equipo recomendado en la NOM-147. Asimismo, es importante valorar la exactitud de este método, pues se considera que la inclusión de la etapa intestinal, aunque podría disminuir la precisión, mejora la simulación de lo que sucede en el sistema gastrointestinal humano. No obstante, no hay suficientes datos publicados para responder a estas interrogantes.

Esta tesis busca aportar información sobre la problemática antes descrita, especialmente en lo referente al efecto de los factores que se considera influyen en la baja precisión de las mediciones de bioaccesibilidad utilizando el método PBET, durante las fases gástrica e intestinal (etapas consecutivas). Los factores seleccionados fueron: a) tipo de equipo, b) gases de agitación (aire o argón) y c) métodos para determinar la bioaccesibilidad. Se seleccionó al As, como el elemento trazador, ya que su comportamiento químico es complejo y es abundante en diversas regiones de México, en las que es muy importante su control en los sistemas agua-suelo para la protección del ambiente y la salud de la población.

En este estudio se utilizó un equipo diseñado ex-profeso para el Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental (LABQA-2014), el cual permite la adición de reactivos sin detener la agitación, cuyo diseño fue el tema de una tesis de ingeniería química.

En resumen, el objetivo de este estudio fue evaluar la influencia del tipo de equipo, gases de agitación y métodos analíticos, en la precisión de la bioaccesibilidad de As (*in vitro*), aplicando el método PBET (fases gástrica e

intestinal) y un equipo diseñado ex-profeso (LABQA-2014)<sup>2</sup>. Asimismo, se buscó conocer el grado de veracidad de los resultados, y probar a escala comercial, la aplicabilidad del método PBET utilizando el equipo LABQA-2014.

Las metas establecidas, fueron:

- Preparación de muestras de suelo contaminadas con diferentes concentraciones de As proveniente de diferentes fuentes, para realizar las pruebas.
- Determinación de la aceptabilidad del equipo LABQA-2014, mediante la comparación con los equipos comerciales disponibles.
- Determinación de la precisión del método PBET y equipo LABQA-2014, comparando los resultados obtenidos con los del método y equipo de la NOM-147 (fase gástrica), bajo diferentes escenarios.
- Determinación del grado de veracidad de los resultados, utilizando los resultados obtenidos con un estándar de suelo, que preliminarmente fue analizado *in vivo* y *in vitro* por diversos laboratorios internacionales.
- Determinación de la viabilidad de la aplicación del método PBET utilizando el equipo LABQA-2014, a escala comercial.

---

<sup>2</sup> El diseño y construcción del nuevo equipo (LABQA-2014) se realizó con el apoyo del estudiante Daniel Quiroz Vivanco, quien realiza su tesis de licenciatura en ingeniería química.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Mecanismos de atenuación de contaminantes en el suelo

#### **1.1.1 Composición y funciones del suelo**

Debido a la complejidad del suelo y a la gran cantidad de funciones que realiza, el suelo se ha definido de diversas formas por las diferentes disciplinas que lo estudian. De acuerdo con la Sociedad de Ciencias del Suelo (1997), el suelo es un agregado de minerales no consolidados y de partículas orgánicas, producidos por la acción combinada del viento, el agua y los procesos de desintegración. Sposito (2008) señala que "los suelos son un medio poroso producido en la superficie de la corteza terrestre a partir de la roca madre, a través de procesos de intemperismo<sup>3</sup> generados por fenómenos geológicos, hidrológicos y biológicos". Este autor también señala que "los suelos difieren de la roca, en que los suelos muestran una estratificación vertical que forma horizontes, los cuales son consecuencia de la percolación del agua y de la actividad de los organismos vivos. Desde el punto de vista de la química, los suelos son sistemas biogeoquímicos, abiertos y multicomponente, que contienen sólidos, líquidos y gases".

La fase sólida está constituida de minerales inorgánicos y materia orgánica; la solución del suelo contiene iones y partículas sumamente pequeñas de naturaleza orgánica e inorgánica; y la fase gaseosa presenta una composición similar a la del aire, ya que está constituida por O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, vapor de agua y CO<sub>2</sub> éste último componente, se encuentra en mayores concentraciones en el suelo que en la atmósfera; los gases y la solución del suelo ocupan los poros en proporciones variables (Fitz, 1987).

Las principales funciones del suelo son: a) control del microclima; b) aporte de nutrimentos a las plantas (fertilidad); c) sostén físico de la vegetación; d) purificación y retención del agua; e) amortiguamiento del pH; f) protección del subsuelo y; g) hábitat de microorganismos (Sposito, *ibidem*). Desde el punto de vista biológico, el suelo es el ecosistema más diverso e importante que existe sobre la Tierra (Wardle *et al.*, 2004); ya que puede haber hasta 600 km de raíces y 500 x 10<sup>9</sup> bacterias en promedio, por cada kilogramo de material (Sposito, *ibidem*).

El suelo es un recurso natural no renovable, cuya formación es lenta, especialmente en lo referente a la fracción inorgánica químicamente activa (arcillas y oxi-hidróxidos), ya que su formación requiere de cientos a miles de años (Fitz, *ibidem*). El suelo es un reservorio muy importante de gran cantidad de elementos (metales, no metales y metaloides). Los elementos mayores que se encuentran en concentraciones superiores a los 100 mg\*kg<sup>-1</sup> son: O, Si, Al, Fe, C, K, Ca, Na, Mg, Ti, N, S, Ba, Mn, P, aunque en

---

<sup>3</sup> Intemperismo: es la descomposición superficial de las rocas, es el desgaste físico y alteración química de las rocas y minerales, en o cerca de la superficie de la Tierra (disgregación de las rocas).

algunos casos, se incluyen al Sr y al Zr (Sposito, *ibidem*). El resto de los elementos que se encuentran en concentraciones menores, se denominan elementos vestigiales, comúnmente denominados *traza*<sup>4</sup> que incluyen, al igual que los elementos mayores, a elementos esenciales para la vida, aunque en más bajas cantidades.

Todos los elementos, cuando superan una concentración límite en el sistema donde se encuentran, son potencialmente tóxicos para la vida, incluyendo los macroelementos. No obstante, la toxicidad de los elementos muy abundantes en los suelos inclusive de los que son solubles, es baja. Esto se debe a que los organismos vivos desechan fácilmente el exceso ingerido, mientras que para aquellos elementos menos abundantes y cuya disponibilidad natural es prácticamente nula, los mecanismos de eliminación son menos eficientes y, en consecuencia, su toxicidad es alta inclusive en concentraciones muy bajas (Gutiérrez *et al.*, 1997).

### **1.1.2 Contaminación del suelo con EPT y sus consecuencias**

La actividad volcánica, el hidrotermalismo, procesos naturales como es el intemperismo de las rocas y algunas actividades antropogénicas, como la minería y la generación de energía, pueden aumentar la concentración de los EPT<sup>5</sup> en los suelos, los cuales son el sumidero natural más importante de estos elementos.

Los EPT's provenientes de las actividades antropogénicas se depositan principalmente en los suelos, a través de la atmósfera, como polvos, aerosoles y gases, principalmente de fuentes industriales, incineradores de basura, y emisiones vehiculares. Otras fuentes antropogénicas de EPT's que afectan a los suelos, son los fertilizantes, plaguicidas, estiércoles, pilas, lámparas caducas, residuos electrónicos, desechos del cromado, etc. Los elementos más pesados como Pb, Cd, Zn, etc. se dispersan en los polvos, mientras que los más volátiles como el As y el Se, se encuentran en gases o aerosoles (Lara *et al.*, 2007). Sin embargo, las plantas de tratamiento de agua son también una fuente importante de estos elementos, que llegan al suelo a través del riego.

Dependiendo las propiedades de los **compuestos que contienen a los EPT's** y su reactividad en el suelo, estos elementos pueden quedar en formas insolubles, adsorbidos o solubles y, parcialmente, pueden ser transportados a los cuerpos de agua y/o ser absorbidos por las plantas o la edafobiota. En casos extremos, los EPT pueden llegar a los seres humanos a través de la cadena trófica, o simplemente por la ingestión de los suelos contaminados, especialmente durante las actividades

---

<sup>4</sup> Traza en español se refiere a un elemento que permite dar seguimiento (trazar), y huella o vestigial se refiere a los que se encuentran en baja concentración. Sin embargo, debido a la influencia del inglés se ha traducido literalmente trace como traza.

<sup>5</sup> EPT: elemento potencialmente tóxico, es un término propuesto por el Grupo de Biogeoquímica Ambiental de la UNAM, el cual ha sido ampliamente utilizado.

recreativas de los niños, o directamente por ingestión de los infantes que sufren de la enfermedad denominada "pica".

### **1.1.3 Procesos de atenuación natural de los EPT (sorción y precipitación)**

La sorción es el principal proceso geoquímico que controla el transporte y la **biodisponibilidad de los EPT's en los suelos y también en los sedimentos de los cuerpos de agua**. Se refiere a todos los fenómenos que suceden en las partículas sólidas que remueven los solutos de la solución (Sposito, 2008) y que conforman la fracción química activa, formada por coloides inorgánicos (arcillas, óxidos y oxihidróxidos) y orgánicos (humus).

Cuando la acumulación ocurre en la interfase sólido-líquido se denomina adsorción, cuando sucede dentro de la partícula, se conoce como absorción y cuando es el resultado de la incorporación a un sólido tridimensional en expansión se le llama precipitación en superficie. La adsorción presenta una cinética de reacción más rápida que la precipitación, por lo que es la **responsable de la remoción de los EPT's** de la solución, mediante enlaces con la superficie de los coloides<sup>6</sup> del suelo de diferente fuerza. Cuando los iones rodeados por moléculas de agua son atraídos a la superficie del sólido por fuerzas electrostáticas débiles (tipo van der Waals) se forman los "complejos de esfera externa". Este tipo de sorción se denomina adsorción física, porque solamente ocurren reacciones de intercambio. En cambio, cuando iones se unen directamente a la superficie del coloide mediante enlaces químicos de mayor fuerza, forman los denominados "complejos de esfera interna", que es un tipo de sorción que se conoce como adsorción química (Sparks, 2003).

Además de la adsorción, los otros mecanismos de sorción, son: a) la absorción, en la que los EPT's se transportan hacia los poros internos del coloide, en donde forman enlaces o simplemente quedan atrapados; y b) la precipitación en superficie, que ocurre cuando la cantidad del catión o anión sorbido en la superficie del coloide aumenta y la monocapa se transforma en una fase tridimensional. Los precipitados pueden originarse de los complejos metálicos poliméricos que se forman en las superficies minerales, a través de la sorción de polímeros acuosos (Chrisholm-Brause, 1990b en Sparks, 2003); o también pueden formarse como fase homogénea, cuando la solución se satura y la superficie actúa como un sitio de nucleación; o ser el resultado del incremento continuo de la adsorción que formó la monocapa, generando su crecimiento (Mc Bride 1991 en Sparks, 2003). Cuando ocurre la precipitación conjunta de especies químicas presentes en la solución y de las que se forman de la disolución del mineral, se forma un coprecipitado.

---

<sup>6</sup> Coloide: partícula dispersa en un sólido, un líquido o un gas, no puede ser sedimentada y su tamaño es de 0.01  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$



La precipitación que no está relacionada con la influencia de las partículas sólidas activas del suelo, por lo que no se considera como un fenómeno de sorción, es la que se produce como consecuencia de reacciones químicas de iones de la solución del suelo que se transforman en sólidos.

En la Figura 1 tomada textualmente de Charlet y Manceau, 1993 en Spark, 2005, "se presentan gráficamente los diferentes mecanismos de sorción de un ion en la interfaz suelo-agua: (a) adsorción física de un ion mediante la formación de complejos de esfera externa; (b) adsorción química mediante la formación de complejos de esfera interna con la pérdida de moléculas de hidratación; (c) sustitución isomórfica y difusión dentro de los minerales (absorción); (d) difusión lateral rápida y formación de un precipitado superficial; (e) adsorción en una cara del mineral (lo cual maximiza el número de uniones en el átomo); (f) coprecipitación o inclusión y; finalmente (g) retorno del ion adsorbido a la solución, como resultado de un equilibrio dinámico o mediante reacciones redox superficiales (desorción/disolución)".

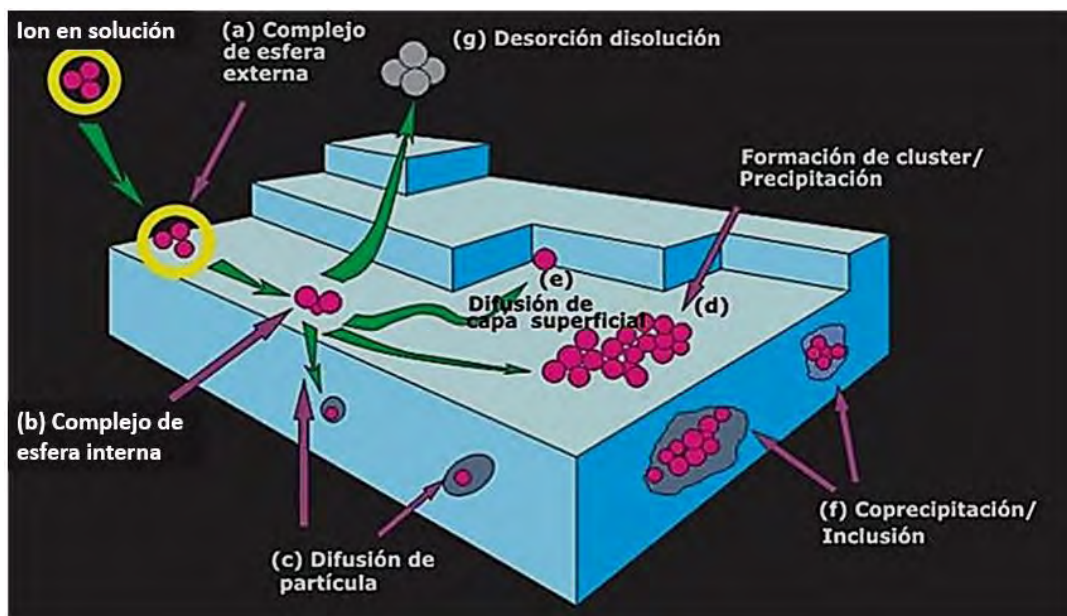


Figura 1. Diversos mecanismos de sorción de un ion en la interfaz mineral-agua

Para determinar el tipo de complejos que forman los metales en la superficie de los minerales se utilizan algunas técnicas analíticas espectroscópicas en escala molecular, tales como XAFS (absorción en estructura fina de rayos X, del inglés X-ray absorption fine-structure) y ATR-FTIR (Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier – reflectancia total atenuada, del inglés attenuated total reflectance–Fourier transform infrared) (Sparks, 2005).

## 1.2 Concepto de riesgo

### **1.2.1 Rutas de transporte, vías de ingreso y toxicidad de los EPT's**

Como ya se comentó, en el suelo los EPT's se acumulan principalmente en la fase sólida, pero bajo ciertas condiciones pueden encontrarse en la solución edáfica, como iones libres, iones complejos, coloides de minerales, o coordinados a ligantes orgánicos (Battelle and Exponent, 2000); por lo que pueden afectar directamente a la microbiota del suelo y las plantas. En sitios sin mucha vegetación, los EPT's pueden ser transportados como sólidos por el aire, pudiendo afectar a la biota y población humana expuesta, o contaminar otros suelos o cuerpos de agua, donde si las condiciones fisico-químicas son diferentes, su solubilidad y, en consecuencia, su disponibilidad pueden aumentar.

En casos extremos, los EPT's que afectaron a plantas o a la edafobiota pueden, a través de la cadena trófica, dañar a especies mayores, e inclusive a la población humana. Los EPT pueden ingresar por inhalación o ingestión y, ocasionalmente, por contacto dérmico. Dependiendo de las condiciones específicas de cada organismo, los elementos se distribuyen en diferentes tejidos, alterando los procesos vitales, e inclusive se pueden bioacumular. Los principales mecanismos, mediante los cuales los EPT's producen daños en los organismos, se relacionan con mecanismos de sustitución de ligantes, o del elemento central de las biomoléculas, o reacciones de óxido-reducción y/o de precipitación-disolución.

En el caso del As, aproximadamente el 95% se introduce en el ser humano a través del tracto gastrointestinal, un 2% por absorción dérmica y el resto por procesos de inhalación, vía el sistema respiratorio. Las partículas inhaladas pueden pasar directamente a la sangre y distribuirse rápidamente en el organismo. Entre 75 a 95 %. Solamente las partículas respirables (PM 2.5) son suficientemente pequeñas para alcanzar los alveolos y llegar al torrente sanguíneo. Las partículas gruesas tienden a ser removidas fácilmente en el tracto respiratorio por acción mucociliar que resulta en su relativamente rápido movimiento a la nasofaringe e ingestión. El As (III), la forma química más abundante del As en el aire, proviene de materiales de origen antropogénico (Palacios, 1997).

Aunque el As está clasificado como un elemento benéfico, e inclusive, diversos investigadores lo consideran esencial en concentraciones muy bajas (Jain C. K. y Ali I. 2000); desde la antigüedad se conoce que actúa como un elemento altamente tóxico. Las reacciones más importantes, relacionadas con daños al organismo humano, de acuerdo con lo publicado en la ATSDR<sup>7</sup> (por sus siglas en inglés Agency for Toxic Substances and Disease Registry), son las siguientes:

---

<sup>7</sup> [http://www.atsdr.cdc.gov/es/sem/arsenic/cambios\\_patogenicos.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/sem/arsenic/cambios_patogenicos.html)

- El As (III) presenta una alta afinidad por el azufre, por lo que fácilmente se une con los grupos sulfhídricos (-SH) de diversas enzimas, desactivándolas. A continuación se listan algunos de los efectos que produce:
  - inhibición de la ruta de oxidación del piruvato y del ciclo del ácido tricarboxílico,
  - afectación de la gluconeogénesis,
  - reducción de la fosforilación oxidativa,
  - afectación de los receptores hormonales que contienen tioles o sulfhidrilos, pues el arsénico tiende a unirse a estos grupos (López *et al.*, 1990; Kaltreider *et al.*, 2001).
  
- El As (V) en forma de arseniatos, compite con los fosfatos en diversas reacciones bioquímicas, especialmente en la relacionada con compuestos de alta energía como el ATP, afectando la respiración mitocondrial (Rosenman, 2007).

El efecto diabetogénico del arsénico, puede estar relacionado con su habilidad para unirse e inhibir la acción del receptor de la insulina (Rossman, 2007).

De la anterior información, se concluye que el estado de oxidación del As, y las propiedades del compuesto que lo contiene, especialmente su solubilidad, determinan su toxicidad.

A continuación se listan las diferentes formas químicas del As, con base en su toxicidad (Gorby, 1988):

- compuestos inorgánicos trivalentes,
- compuestos orgánicos trivalentes,
- compuestos inorgánicos pentavalentes,
- compuestos orgánicos pentavalentes y
- arsénico elemental.

Específicamente, es importante considerar que:

- El As-inorgánico es más tóxico que el As-orgánico. Las especies orgánicas presentes en ciertos mariscos, como los camarones (arsenobetaina y arsenocolina) presentan baja toxicidad, pero hay otros compuestos, tales como los metilo- y fenilo-arseniatos, que producen efectos adversos comparables con los generados por el As inorgánico (ATSDR 2007).
- Algunos estudios *in vitro*, sugieren que la absorción celular del As (III) es mayor que la del As (V) (Bertolero *et al.*, 1987; Dopp *et al.*, 2004).
- Existen diferencias en la toxicidad de las formas químicas del arsénico, en general el As (III) es mucho más tóxico que el As (V) (ATSDR 2007).
- El As (0) por ser insoluble en agua y en los fluidos corporales, se considera no tóxico.

### 1.2.2 Concepto de biodisponibilidad

El concepto de biodisponibilidad nació en el área de biofarmacia, en la que este término se refiere a la cantidad de un fármaco que llega a la circulación sanguínea, distribuyéndose en el organismo humano. En el área ambiental, la biodisponibilidad expresa el grado en que un contaminante se absorbe, es decir la relación receptor-contaminante, donde el receptor puede viajar desde la microbiota hasta los seres humanos. En el caso, de los EPT's, la biodisponibilidad depende de los siguientes factores: el compartimento natural contaminado (suelo, agua, aire); el tipo de compuesto que contiene al elemento tóxico, el estado físico (solubilidad y tamaño de partícula); las propiedades químicas que determinan la reactividad de los elementos dentro de los organismos y a los órganos a los que está referida la absorción, por ejemplo boca, estómago, intestino delgado o intestino grueso. Por lo tanto, existen diferentes definiciones específicas de biodisponibilidad, algunas de las cuales, que se consideran importantes, se presentan a continuación.

La *biodisponibilidad*, de acuerdo con la especificación técnica de la International Organization for Standardization (ISO/TS 11074, 2005), y del Bioaccessibility Research Group of Europe (ISO 17402, 2011), es **"el grado en el cual ciertas sustancias presentes en el suelo pueden ser absorbidas o metabolizadas por receptores humanos o ecológicos, y quedan disponibles para interactuar con sistemas biológicos"**.

El US National Research Council (NRC) define el parámetro de biodisponibilidad, como **"las interacciones físicas, químicas y biológicas que determinan la exposición de los organismos a sustancias asociadas con suelos y sedimentos"**.

En el caso de la ISO 17402 (2008) existen hay tres definiciones, una para cada etapa en las que divide la biodisponibilidad:

- ⇒ *Disponibilidad ambiental*. Es la fracción del contaminante que está potencialmente disponible para los organismos, como resultado de procesos fisicoquímicos de desorción<sup>8</sup>.
- ⇒ *Biodisponibilidad ambiental*. Es la fracción disponible de una sustancia en el ambiente, que puede ser absorbida por un organismo a través de los procesos fisiológicos.
- ⇒ *Biodisponibilidad toxicológica*. Es la concentración interna (en humanos, mamíferos u otros organismos) que se acumula o se libera para producir un efecto tóxico.

---

<sup>8</sup> En el Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental (LABQA) de la Facultad de Química de la UNAM, se utiliza un concepto similar, denominado geodisponibilidad que se refiere a la fracción del elemento contaminante que por sus características físicas y químicas, puede ser transportado por agua y/o por aire, y por lo tanto, puede entrar en contacto con las poblaciones expuestas (incluye a toda la biota).

Dada la amplitud que abarca el concepto de biodisponibilidad, antes de utilizar este término, es necesario especificar el contexto en el que se hace referencia. Inclusive, se debe aclarar si se trata de biodisponibilidad absoluta o relativa. A continuación se explican estos dos parámetros.

#### a) Biodisponibilidad y bioaccesibilidad absolutas

La biodisponibilidad absoluta que también se conoce como biodisponibilidad oral, es la fracción de un contaminante que llega al torrente sanguíneo, es decir, a la circulación sistémica. La fracción biodisponible de un contaminante en el suelo es definida como la relación, entre la cantidad que ha alcanzado el torrente sanguíneo respecto a la cantidad ingerida. Como esta relación no se determina respecto a un valor de referencia, se le denomina biodisponibilidad absoluta, y se expresa en porcentaje (INERIS, 2009).

$$\text{Biodisponibilidad absoluta (\%)} = \frac{\text{cantidad que llega al torrente sanguíneo}}{\text{cantidad ingerida}} \times 100$$

Cuando el porcentaje de la biodisponibilidad de un contaminante es 0 , se considera que el contaminante no alcanza la circulación sistémica, por lo que no se esperan efectos tóxicos de la sustancia en los "órganos blanco". Cuando el valor es 100 %, la dosis administrada alcanza en su totalidad la circulación sistémica, por lo que se esperan efectos tóxicos de la sustancia en los órganos blanco.

Por otra parte, cuando la biodisponibilidad se determina *in vitro*, se denomina *bioaccesibilidad*. La definición de este término se encuentra en la especificación técnica de la ISO/TS 17924 (2007), donde se asocia directamente con los humanos. La bioaccesibilidad incluye todos los procesos físicos, químicos y microbiológicos en el cuerpo humano, desde la masticación en la boca, hasta la precipitación de algunas sustancias en los intestinos.

INERIS (2009) se refiere a la *bioaccesibilidad ambiental*, como la fracción de una sustancia ambientalmente disponible, la cual puede ser absorbida a largo plazo, por organismos humanos o receptores ecológicos, incluyendo las fracciones inmediatamente disponibles y la que podría llegar a ser disponible. De la misma manera que la biodisponibilidad, el término se puede expresar en forma absoluta o relativa.

La bioaccesibilidad absoluta, también conocida como bioaccesibilidad oral, es la fracción disuelta de un contaminante que se extrae de una determinada matriz (alimentos, agua, suelo, etc.) y se encuentra disuelta en la saliva o en los jugos digestivos del tracto gastrointestinal. La fracción bioaccesible, se define como la relación entre la cantidad extraída y la cantidad ingerida; como no se determina en

relación a un valor de referencia, se denomina bioaccesibilidad absoluta, y se expresa en porcentaje:

$$\text{Bioaccesibilidad absoluta (\%)} = \frac{\text{cantidad extraída de la matriz de suelo en flúidos digestivos}}{\text{cantidad ingerida}} \times 100$$

De manera análoga a como se describió en la biodisponibilidad absoluta, cuando la bioaccesibilidad absoluta de un contaminante es 0 %, indica que no hay especies del contaminante disueltas en los flúidos biológicos ya que las partículas permanecen absorbidas en la matriz; de manera opuesta, cuando el valor es 100 %, la dosis o cantidad administrada está completamente disuelta en los jugos gástricos (ver Figura 2). Por lo tanto, la *fracción bioaccesible* de un contaminante, es la dosis máxima de una sustancia ingerida, que está disponible para ser absorbida (fracción disuelta) y que podría llegar a tener un efecto tóxico en el organismo humano.

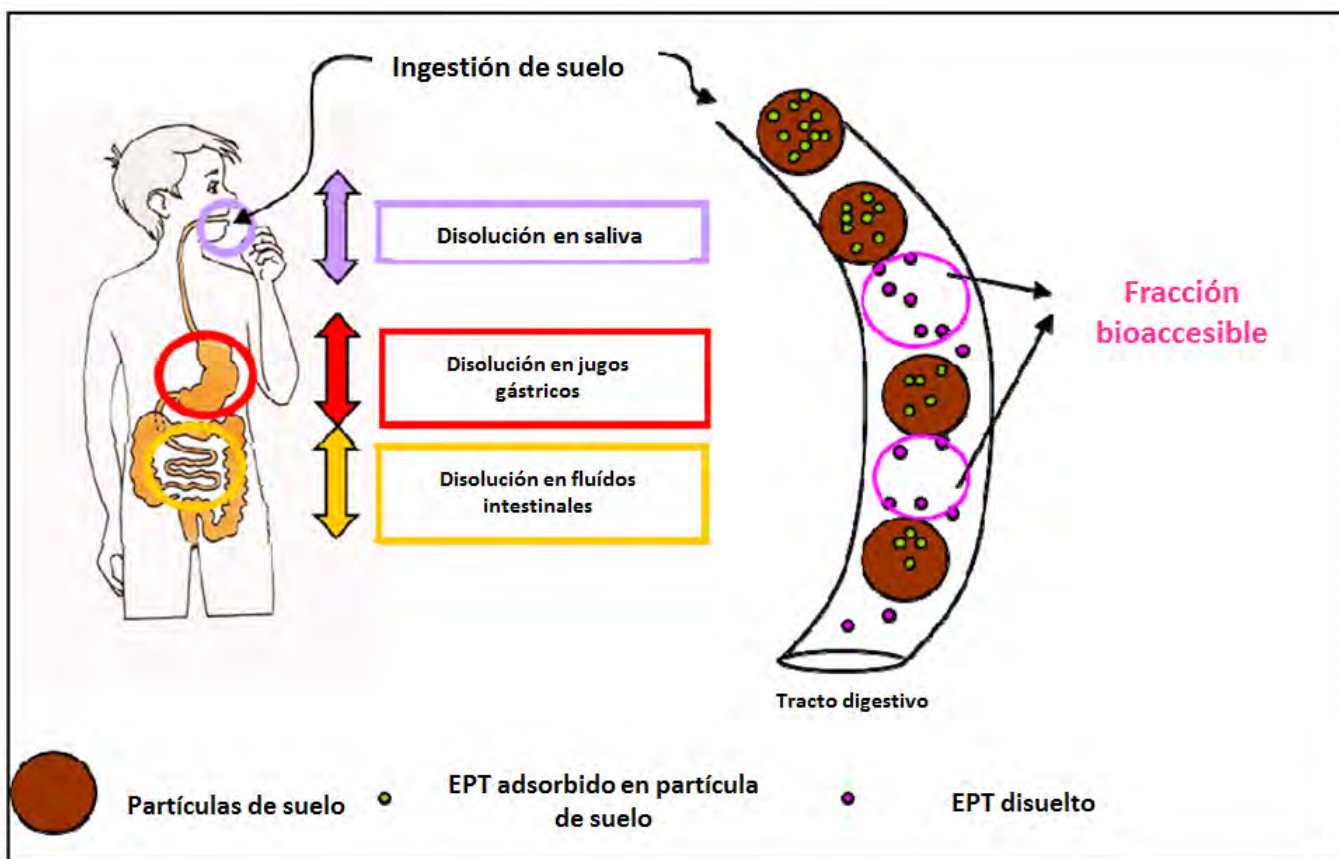


Figura 2. Representación esquemática de la bioaccesibilidad (imagen modificada de Dabin *et al.*, 2012)

## b) Bioaccesibilidad y biodisponibilidad relativas

Los términos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad relativas, son parámetros que permiten comparar la extracción de una sustancia, bajo dos especies o formas químicas diferentes, por ejemplo, As (III) o As (V); o la misma sustancia en la misma forma química, pero que se encuentra en dos matrices diferentes. Por ejemplo As (III) en agua y As (III) en suelo (Schoof, 2003).

La ecuación para calcular la bioaccesibilidad o la biodisponibilidad relativa es la siguiente:

$$B_{\text{relativa}} = B_{\text{a, absoluta}}/B_{\text{b, absoluta}}$$

Donde,

$B_{\text{relativa}}$  es la biodisponibilidad o bioaccesibilidad (B puede referirse a cualquiera de los dos términos)

$B_{\text{a}}$  es la biodisponibilidad o bioaccesibilidad en la matriz a, con la especie química a (la matriz o forma química utilizadas)

$B_{\text{b}}$  es la biodisponibilidad o bioaccesibilidad en la matriz b, con la especie química b (la matriz de referencia o la forma química de referencia)

Mientras que los términos absolutos pueden presentar valores que varían de 0 a 100%, los términos relativos de biodisponibilidad o bioaccesibilidad pueden ser mayores a 1. Los valores más grandes a la unidad se obtienen cuando las concentraciones en la **matriz "a" son mayores que las concentraciones encontradas en la matriz "b" de referencia. Cuando los valores entre "a" y "b" son los mismos**, bajo ambas condiciones de exposición, la biodisponibilidad/bioaccesibilidad relativa es 1 (Roberts, 2004). Particularmente, en la ISO/TR 17924 (2008) se nombró la determinación de biodisponibilidad relativa, como la Fracción de Absorción Relativa (RAF).

En 2008, la ISO/TR 17924 sugirió que la biodisponibilidad relativa o la Fracción de Absorción Relativa (RAF), era la mejor aproximación del factor que hace posible calcular la dosis de exposición, en función de una matriz de suelo (Ng *et al.*, 2010).

## c) Relación entre biodisponibilidad y bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad se mide *in vitro* para estimar la cantidad disuelta en el tracto gastrointestinal; lo cual puede ser mayor o igual al valor de biodisponibilidad, que es la cantidad de sustancia que llega a la circulación sistémica que se determina *in vivo*.

En la Figura 3, se presentan los tres mecanismos de la biodisponibilidad (Denys *et al.*, 2011):

- Disolución de la sustancia en la saliva, y en los jugos gástrico e intestinal (fracción bioaccesible)

- Absorción de la sustancia a través del epitelio intestinal
- Metabolismo hepático

La relación matemática entre estos dos parámetros, se presenta en la siguiente ecuación:

$$BAV_i = BAC_i \times AB_i \times M_i$$

Donde,

$BAV_i$  es la fracción biodisponible de la sustancia  $i$

$BAC_i$  es la fracción bioaccesible para la sustancia  $i$

$AB_i$  es la fracción de la sustancia  $i$ , que es absorbida a través de la pared intestinal

$M_i$  es la fracción de la sustancia  $i$  que no es metabolizada

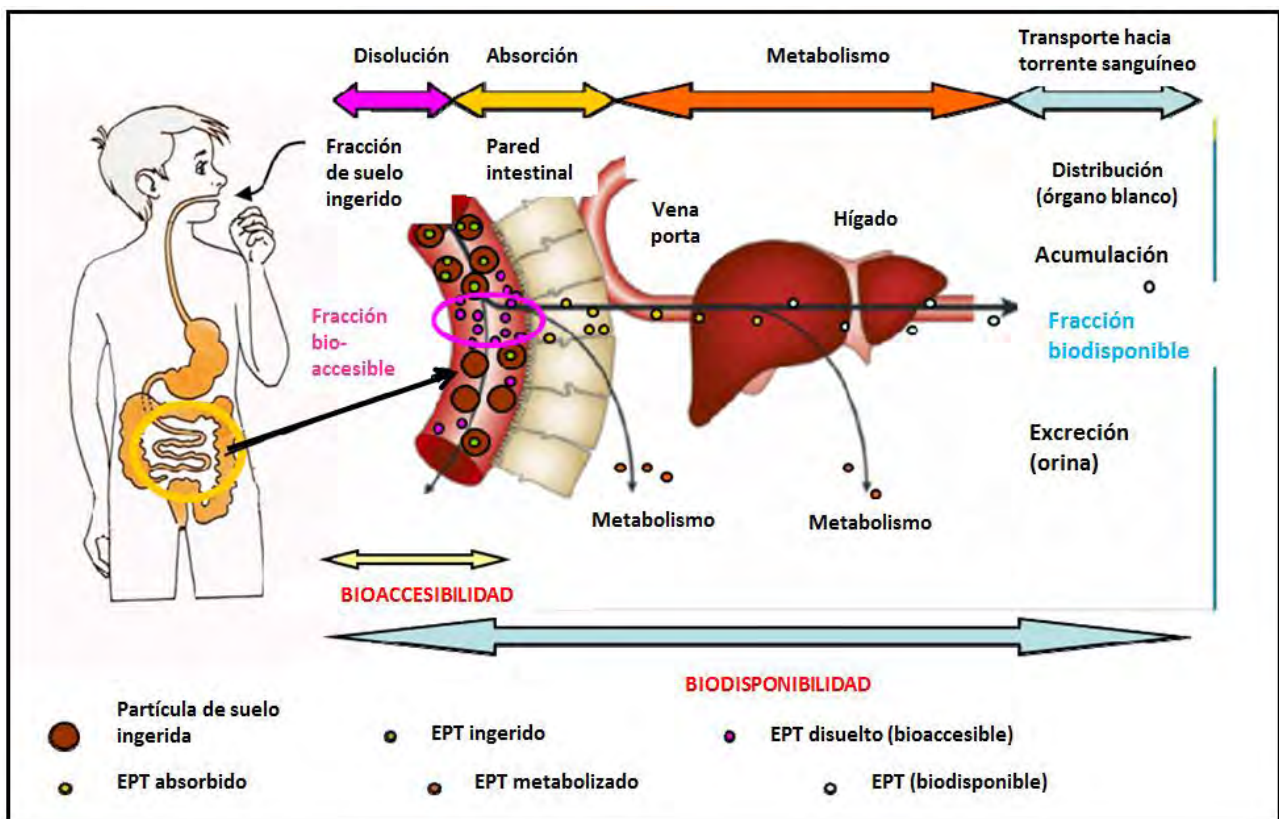


Figura 3. Representación esquemática del concepto de biodisponibilidad y bioaccesibilidad (imagen modificada de Dabin *et al.*, 2012)

### 1.2.3 Evaluación del riesgo a la salud humana

El riesgo a la salud humana se define como la probabilidad de sufrir un daño, lo cual es diferente del peligro, que es la capacidad que tiene una sustancia de hacer daño (La Grega *et al.*, 1996). La peligrosidad depende de la naturaleza química, cantidad y naturaleza física de la sustancia, de acuerdo con Gutiérrez R. (1998), mientras que el



riesgo es función de la peligrosidad y de la vulnerabilidad.

El procedimiento de evaluación de riesgo, fue desarrollado por la U.S. National Academy of Sciences (NAS) a principios de 1980 y, posteriormente, fue adoptado por la Unión Europea. Este procedimiento de evaluación del riesgo químico se divide en cuatro etapas (Dabin *et al.*, 2012):

- *Caracterización del contexto ambiental del sitio.* Incluye a las fuentes potenciales de contaminación, rutas de transporte, receptores y vías de ingreso.
- *Evaluación de la exposición:* En esta etapa se cuantifica la intensidad, la frecuencia y la duración de la exposición de las poblaciones expuestas, es decir las concentraciones o dosis de exposición diaria.
- *Evaluación de toxicidad.* Esta etapa se refiere a: 1) la identificación de peligros potenciales; 2) la determinación de efectos indeseables en humanos; 3) la estimación de relaciones dosis-efecto y; 4) la relación entre el nivel de exposición o la dosis, incidencia y severidad de los efectos.
- *Caracterización del riesgo,* es la etapa en que se lleva a cabo la evaluación cuantitativa o cualitativa del riesgo.

Los principales tipos de riesgo que se evalúan son el riesgo ecológico y el riesgo a la salud humana. El riesgo ecológico evalúa los efectos adversos causados al ambiente por las actividades humanas, en forma específica a un ecosistema (U.S. EPA, 1989 y 2000); mientras que el riesgo a la salud humana, evalúa los efectos adversos que las sustancias producen en los seres humanos, lo cual es producto de la exposición a un material o residuo peligroso. El modelo de riesgo para la salud humana se determina considerando dos escenarios: el cancerígeno y el no cancerígeno.

Las evaluaciones de riesgo a la salud humana utilizan dosis de referencia oral<sup>9</sup> medidas utilizando sustancias tóxicas muy solubles, que magnifican el efecto de muchas sustancias tóxicas en que los contaminantes se encuentran en compuestos menos solubles. Para corregir este sesgo, se introdujeron los valores de biodisponibilidad o bioaccesibilidad, discutidos en párrafos anteriores.

Las ecuaciones de riesgo que incluyen los factores de biodisponibilidad o bioaccesibilidad propuestas por la Environmental Protection Agency de Estados Unidos (U.S. EPA, 1989) y modificadas por el Departamento de Defensa de los Estados Unidos (U.S. DDF, 2003), son las siguientes:

#### *Ecuaciones de riesgo para el caso cancerígeno*

$$R = I * SF \text{ (U.S. EPA, 1989)}$$

---

<sup>9</sup> Las dosis de referencia oral se encuentran en bases de datos toxicológicas, tal como IRIS (Integrated Risk Information System).

$$R = I * SF * B \text{ (U.S. DDF, 2001)}$$

Donde,

R: Riesgo (adimensional)

SF: Pendiente de cáncer (kg peso corporal\*días/mg EPT)

I: Ingesta de suelos contaminados (mg EPT/kg peso corporal\*días)

B: Biodisponibilidad (adimensional)

#### *Ecuaciones de riesgo para el caso no cancerígeno*

$$HQ = \frac{I}{RfD} \text{ (U.S. EPA, 1989)}$$

$$HQ = \frac{I*B}{RfD} \text{ (U.S. DDF, 2001)}$$

Donde,

HQ: Cociente de peligro (adimensional)

RfD: Dosis de referencia oral (mg EPT/kg peso corporal\*día)

I: Ingesta de suelos contaminados (mg EPT/kg peso corporal\*día)

B: Biodisponibilidad (adimensional)

En el caso cancerígeno, el riesgo se expresa como R, donde el valor permitido de riesgo debe encontrarse entre  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-4}$ , que es la probabilidad de que menos de una persona, entre 1,000,000 de habitantes, presente cáncer dentro de una población. La pendiente de cáncer, se obtiene de curvas dosis-respuesta de pruebas toxicológicas. El valor de biodisponibilidad se expresa como factor adimensional, donde 1 representa la forma más conservadora (100 % de disponibilidad); lo que indica la cantidad de EPT que llega al torrente sanguíneo, es decir, que puede ser disponible en un sistema vivo, respecto a la concentración inicial del suelo.

En el caso no cancerígeno, el riesgo se expresa como el cociente de peligro (HQ). Si este valor es menor de 1, se considera aceptable, ya que significa que la ingesta de EPT es menor al valor de referencia oral.

### 1.3 Métodos para determinar la bioaccesibilidad de los EPT en suelos

#### **1.3.1 Fundamentos de los métodos de bioaccesibilidad**

Desde 1990, diferentes investigadores han propuesto diversos métodos para determinar la bioaccesibilidad. En el Cuadro 1 se presentan los principales métodos en orden cronológico, clasificándolos por su grado de complejidad. Los métodos sencillos constan solamente de la fase gástrica y utilizan pocos reactivos (HCl, glicina, fosfatos), mientras que los más complejos simulan las fases gástrica e intestinal ("con análogos gastrointestinales") y utilizan reactivos más complejos similares a los existentes en los organismos humanos, tales como sales biliares y enzimas.

Cuadro 1. Métodos para determinar la bioaccesibilidad, clasificados por su complejidad e indicando el país en que se desarrolló (Dabin *et al.*, 2012)

Número	Métodos	sencillo	complejo	País donde se desarrolló
1	Método PBET (Por sus siglas en inglés: Physiologically Based Extraction Test)		X	Estados Unidos
2	Método PBET modificado por Drexler		X	Estados Unidos
3	Métodos de extracción simple: SBET, RBALP <sup>10</sup> o NOM-147 y sus variantes con glicina y fosfato	X		Estados Unidos
4	Método IVG (Por sus siglas en inglés: <i>In vitro</i> Gastrointestinal)		X	Estados Unidos
5	Método Estándar alemán DIN 19738		X	Alemania
6	Método RIVM (Por sus siglas en holandés <sup>11</sup> del Instituto Nacional para la Salud Pública y el ambiente). El cual es un modelo desarrollado bajo condiciones de ayuno y con alimento		X	Países bajos en Europa
7	Método UBM (por sus siglas en inglés: Unified BARGE method, desarrollado por el Bioaccessibility Research Group of Europe)		X	Europa
8	Método FOREhST (por sus siglas en inglés Fed Organic Estimation Human Simulation Test)		X	Gran Bretaña
9	Método SHIME (por sus siglas en inglés: Simulator of the human intestinal microbial ecosystem)		X	Bélgica
10	Método TIM (por sus siglas en inglés: <b>TNO's intestinal model</b> )		X (una parte es dinámica)	Bélgica
11	Método de la Farmacopea de EUA (USP XII 1990)		X (todo es dinámico)	Estados Unidos
12	Método de Balance de masa (MB) y Recaptura de suelo (SR)		X	Estados Unidos
13	Método de digestión de la pepsina (AOAC 2000)		X	Estados Unidos

<sup>10</sup> El método SBET, por sus siglas en inglés (Simplified Bioaccessibility Extraction Test) y el método RBALP por sus siglas en inglés (Relative Bioaccessibility Leaching Procedure), son otras denominaciones con que se conoce el método NOM-147

<sup>11</sup> RIVM, siglas en holandés de Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieu, que significan Instituto Nacional para la Salud Pública y el Ambiente

Observaciones:

- Los métodos listados del 1 al 7 son los comúnmente utilizados
- Algunos métodos son modificaciones de los que se habían propuesto inicialmente
- Los métodos 11, 12 y 13 han sido poco utilizados, y se tienen pocos resultados de su aplicación
- Todos los métodos son estáticos, excepto el 9 y el 10, que se emplean en pruebas nutricionales. En éstos se introduce flora microbiana para hacer más representativo el tracto digestivo

En los Cuadros 37 y 38 de la sección A.4 del apéndice, se describen el tipo de prueba, los segmentos digestivos, el pH, la temperatura, el uso de comida, el tipo de gas, la cantidad de suelo y la relación sólido:líquido utilizada en las diferentes pruebas. Las principales observaciones son las siguientes:

La mayoría de los métodos son estáticos, sólo el método SHIME es dinámico. Los segmentos digestivos utilizados son boca (saliva), estómago, intestino delgado e intestino grueso (cólon). Los valores de pH considerados son 1.0, 2.0, 2.5, 6.0, 7.0 y 8.0. La temperatura establecida en todos los métodos es de 37°C. En cuanto al uso de comida, sólo los métodos RIVM y FORHeST ocupan alimento para bebé y el método DIN 19738 utiliza leche en polvo. En el tipo de agitación, los métodos emplean gas nitrógeno o argón. Las cantidades de suelo utilizadas son 0.15, 0.3, 0.4, 0.6, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 ó 10 gramos. Finalmente, las relaciones sólido:líquido se encuentran desde (1:5,000) hasta (1:5) de sólido:líquido.

En los Cuadros 39 y 40 de la sección A.4 del apéndice se comparan el tamaño de partícula, los tiempos de residencia, el tiempo de manipulación, el tiempo total de reacción, el tipo de agitación, el tratamiento de la muestra, el tipo de recipiente, el equipo, otros materiales utilizados, el número de replicas y los controles analíticos, así mismo se añaden algunos comentarios. El tamaño de partícula varía desde menor a 250 µm hasta menor a 1 mm. Los tiempos de residencia son 5 min en saliva; 0.5, 1.0, 1.5 ó 2.0 horas en estómago y 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 ó 6.0 horas en intestino. Se reporta que en 15 minutos se llevan a cabo todas las manipulaciones requeridas por los métodos. El tiempo total del experimento, según el método, puede ser 2 h, 4 h, 5 h, 8 h, 9 h, 1 día o hasta tres semanas cuando se incluye la actividad de las bacterias. Finalmente, el tipo de agitación puede ser por rotación, con gas, con propelas o por agitación magnética.

### **1.3.2 Método PBET para la determinación de la bioaccesibilidad en suelos contaminados con EPT's**

El método PBET, por sus siglas en inglés Physiologically Based Extraction Test, es uno de los primeros métodos desarrollados, por lo que ha sido la base de otros publicados posteriormente.

Ruby *et al.*, (1993) publicaron la primera prueba *in vitro* para determinar la bioaccesibilidad desarrollada en la Universidad de Colorado, específicamente para Pb y As contenidos en residuos mineros. Es un método rápido y no tan costoso como las pruebas *in vivo*.

El método PBET simula las fases estomacal (gástrica) e intestinal (intestino delgado) y se desarrolló después de determinar la biodisponibilidad del Fe en productos alimenticios. La prueba se diseñó para simular el estómago e intestino delgado de niños, de entre 2 y 3 años de edad (Dabin *et al.*, 2012) y permitió investigar las interacciones de varios factores para dilucidar el proceso de solubilidad de Pb(II).

En el procedimiento se utilizan soluciones con valores de pH específicos (ácido y neutro) que se preparan con enzimas digestivas. Pepsina para el caso del estómago y enzimas pancreáticas y ácidos biliares para la fracción que simula la actividad en el intestino delgado. Los reactivos se mezclan con el sustrato contaminado, para simular el comportamiento bajo las condiciones químicas del estómago y del intestino (Ruby *et al.*, 1993).

Uno de los principales problemas para el desarrollo del método PBET a resolver fue la selección de las concentraciones de enzimas digestivas que simularan la fisiología del estómago y del intestino delgado, ya que son muy variables. Inicialmente, se fijaron los valores de pH en 1.3 para simular el estómago, y 7.0 para el intestino, ya que fueron las condiciones de acidez identificadas en conejos **de la especie "New Zealand White"**. El proceso de mezclado fue diseñado para imitar los movimientos peristálticos del cuerpo humano, el cual fue correlacionado con experimentos de disolución de Pb (II). Para validar el modelo *in vitro* se realizó una comparación con experimentos *in vivo*, de las cantidades de Pb (II) disueltas en diferentes secciones del tracto gastrointestinal. Para establecer un escenario extremo, se dosificaron  $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  de peso del animal, ya que esta relación de suelo respecto al peso corporal es representativa de la que puede ingerir un niño que come suelo intencionalmente (enfermedad denominada pica). Las cantidades ingeridas pueden ser de hasta 10 g de suelo por día (Calabrese *et al.*, 1989 y Kimbrough *et al.*, 1984). El tamaño de partícula de suelo seleccionado fue la  $< 250 \mu\text{m}$ , ya que es la que se adhiere en las manos de los niños (Duggan *et al.*, 1985).

Aunque hay diferencias anatómicas y funcionales entre la digestión de los conejos y la de los seres humanos, como son la excreción biliar y el mecanismo de absorción de Pb durante el crecimiento, también hay factores comparables, como el pH, el proceso de mezclado y el tiempo de tránsito gastrointestinal, siendo estos tres últimos, los principales factores que controlan la disolución de Pb(II). Por lo tanto, el uso de los conejos como sujetos experimentales, ha sido considerado apropiado para evaluar la bioaccesibilidad del Pb en un niño expuesto a la ingestión de residuos mineros o suelos contaminados (Davis *et al.*, 1992).

## a) Procedimiento

El experimento se realiza en un baño de agua a 37 °C, utilizando gas argón para agitar y crear un ambiente anaerobio, el cual simula el movimiento peristáltico del tracto gastrointestinal. Las muestras se colectan después de cada fase (gástrica e intestinal), se centrifugan y se analizan. En la Figura 4 se ilustra el procedimiento experimental del método PBET.

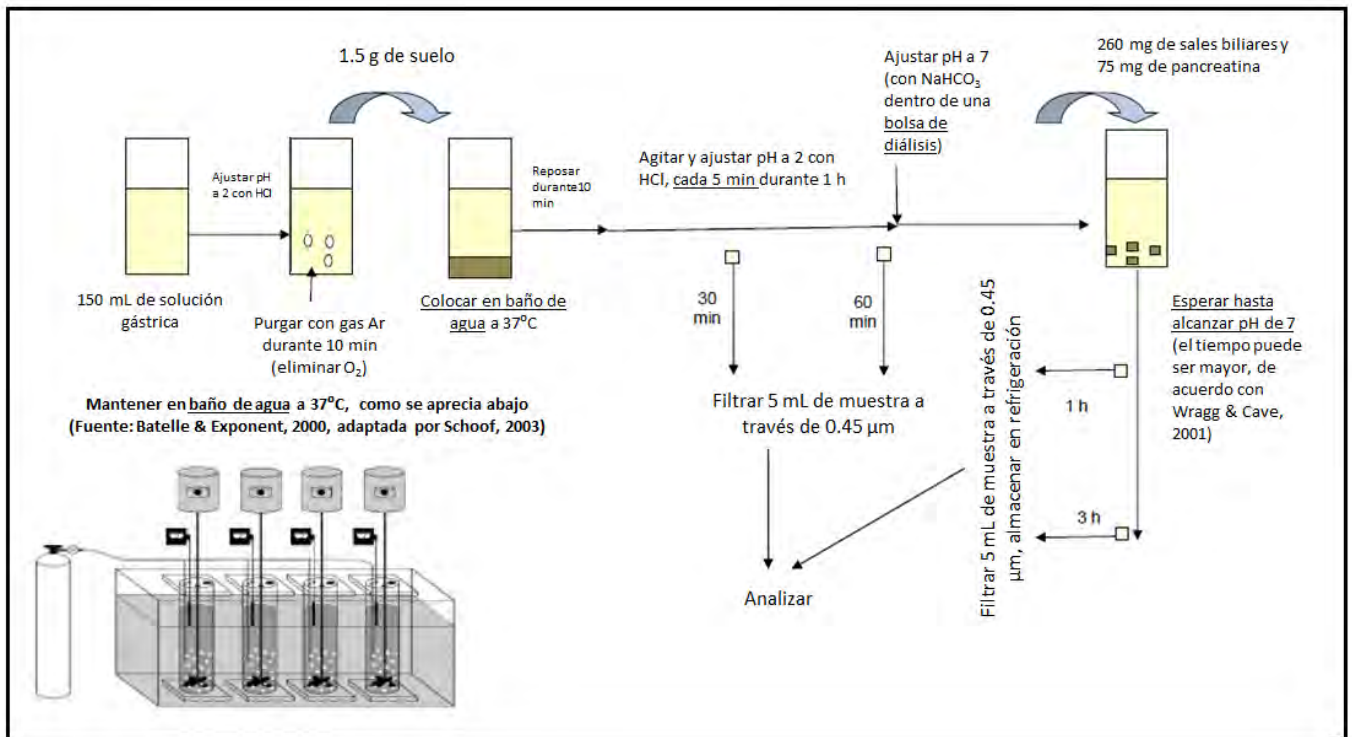


Figura 4. Esquema experimental del método PBET (imagen modificada de Dabin *et al.*, 2012)

## b) Limitaciones del método PBET original

Las limitaciones del método PBET cuando se utiliza el equipo recomendado por Ruby *et al.*, (1993) son las siguientes<sup>12</sup>:

- El uso de un saco de diálisis (retarda el aumento de pH en la fase intestinal)
- La adhesión de suelo en las paredes de los recipientes contenedores
- El control del pH. En la fase gástrica este parámetro debe ser verificado a los 5 min de iniciada la reacción y, posteriormente, cada 10 min (Ruby, 1996)

<sup>12</sup> Ver sección 2.3 del capítulo de metodología.

### **c) Métodos derivados del PBET original**

A partir del método publicado por Ruby *et al.*, (2003) se desarrollaron otros similares con algunas variantes. Las principales propuestas de modificación al método PBET original se describen en el Cuadro 43 de la sección A.4 del apéndice. Las diferencias más importantes entre los distintos métodos PBET están relacionadas con la velocidad de agitación (20 - 275 rpm), el pH en la fase gástrica (1.8-2.5), el tiempo de residencia (1-2 h en la fase gástrica y 3-5.5 h en la fase intestinal), la composición de las soluciones y el tratamiento de la solución extraída (filtración, centrifugación y almacenamiento).

Uno de los métodos PBET de mayor interés para este estudio es el método SBET (por sus siglas en inglés Simplified Bioaccessibility Extraction Test), ya que en México es el procedimiento establecido en la norma oficial mexicana, NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, para determinar la bioaccesibilidad del Pb, único elemento contemplado en esta regulación. El método SBET también es conocido como método RBALP (por sus siglas en inglés Relative Bioaccessibility Leaching Procedure) que fue desarrollado por el SBRC (Solubility/Bioavailability Research Consortium), por lo que algunos autores utilizan estas últimas siglas de para referirse a este método simplificado (Caboche *et al.*, 2009).

La principal diferencia del método simplificado (SBET, RBALP o NOM-147) con el método PBET original, es que solamente incluye la fase gástrica. La extracción se lleva a cabo en un agitador rotatorio, por lo que no requiere gas. La solución gástrica se prepara utilizando únicamente glicina y HCl, con el cual se ajusta el pH de la solución a  $1.50 \pm 0.50$ . La relación sólido-líquido es de 1.0 g de muestra en 100 mL de solución, y se agita durante una hora a una velocidad de 30 rpm en un agitador rotatorio, colocado dentro de un baño de agua a 37°C. Al final de la prueba, se mide el pH de las muestras que debe ser el mismo durante todo el procedimiento ( $1.5 \pm 0.5$ ). En caso de que no se haya mantenido el valor inicial, se debe repetir la prueba. El procedimiento se ilustra en la Figura 5.

Aunque el método antes descrito, se ha utilizado para determinar la bioaccesibilidad de Pb y As, para este último elemento la U.S. EPA (siglas de la agencia de protección ambiental en E. U.) no lo ha validado.

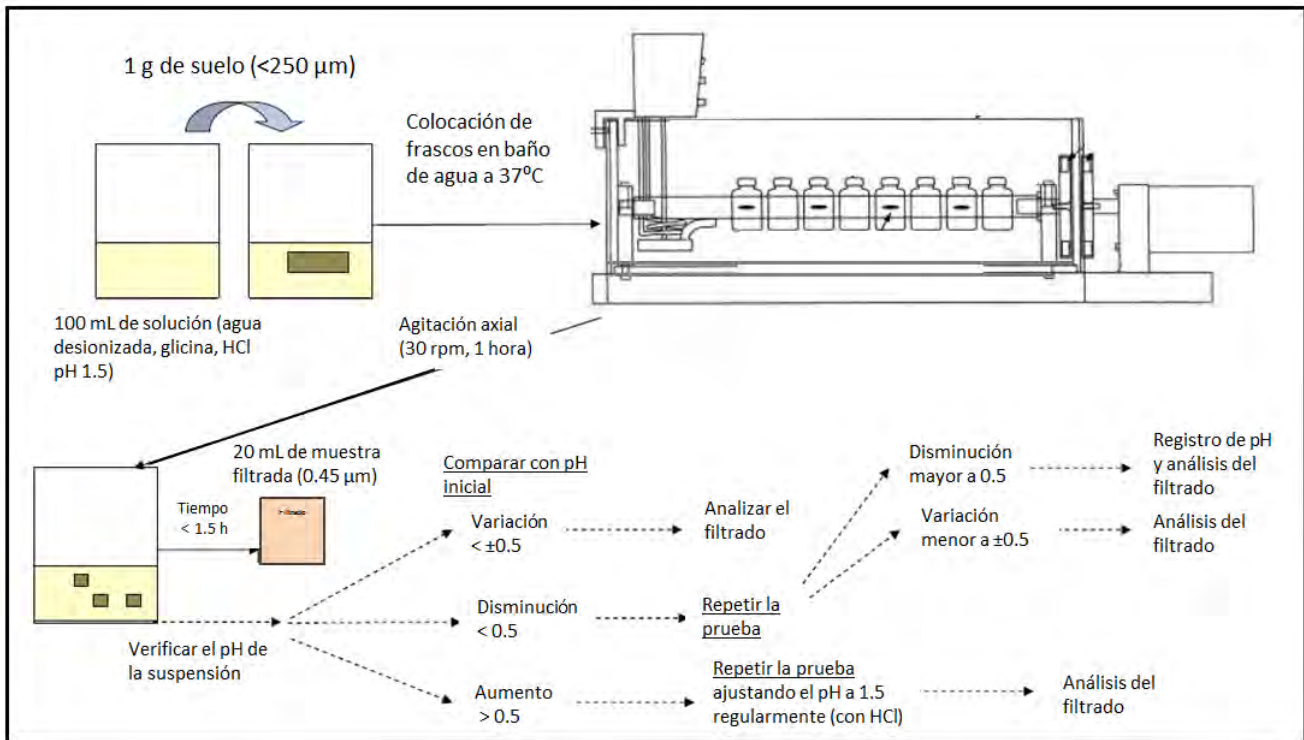


Figura 5. Esquema del método SBET, RBALP o NOM-147 (imagen modificada de Dabin *et al.*, 2012)

### 1.3.3 Aplicación de la bioaccesibilidad a nivel internacional

Dos organizaciones internacionales de normalización (ISO) han incluido métodos para determinar la bioaccesibilidad o biodisponibilidad, cuyos resultados se utilizan en evaluaciones de riesgo para suelos contaminados. La ISO 17402 (2011) establece los procedimientos de selección y aplicación de métodos para estimar la biodisponibilidad en estudios de caracterización de suelos contaminados; y la ISO/TS 17924 (2008) desarrolló una guía para elegir el procedimiento adecuado para estimar la biodisponibilidad o la bioaccesibilidad.

Las políticas para la aplicación de los factores de biodisponibilidad o bioaccesibilidad en estudios de riesgo varían ampliamente, como se muestra en los siguientes párrafos, en los cuales se describe brevemente la situación actual sobre este tema, en diferentes países.

#### *Australia*

Para estimar la bioaccesibilidad de As y Pb se utilizan dos métodos que simulan la fase gástrica de la digestión, aunque no se aplican los valores de biodisponibilidad y bioaccesibilidad en los procedimientos de evaluación de riesgo, debido a que no se ha llevado a cabo la validación y la estandarización de los métodos existentes. Por lo



tanto, el National Environmental Protection Agency Council aplica el criterio más conservador, que es el considerar una biodisponibilidad del contaminante del 100 % (BARC, 2011).

### *Canadá*

El grupo de investigación BioAccessibility Research Canada (BARC) trabaja en colaboración con el grupo BARGE de Europa (BioAccessibility Research Group in Europe) para lograr la aceptación de las entidades gubernamentales para incluir la bioaccesibilidad en las evaluaciones de riesgo a la salud. No obstante, solamente existe un documento oficial en la provincia de Ontario, en el que se indica que los valores de biodisponibilidad deben ser obtenidos directamente de datos *in vivo*, ya sea de información proveniente de humanos, o de pruebas realizadas en animales (Whitford, 2006).

### *Inglaterra*

El BioAccessibility Research Group in Europe (BARGE), -el cual es una entidad formada por varios institutos y laboratorios de investigación europeos-, desarrolló el Unified BARGE Method (UBM) con base en el protocolo experimental del método holandés RIVM (por sus siglas en holandés del Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente). El método BARGE de bioaccesibilidad, ha sido validado recientemente con mediciones de biodisponibilidad relativa, aunque para el caso del As y del Pb mostró un sesgo respecto a los resultados obtenidos *in vivo*, que varió del 3 al 5 % (Denys *et al.*, 2012).

### *Alemania*

El método estándar alemán DIN 19738 (2004) fue elaborado por el Comité de estandarización de dicho país. El método describe un protocolo experimental para determinar la bioaccesibilidad de sustancias orgánicas e inorgánicas en suelos contaminados. Sin embargo, debido a que la información disponible no se considera suficiente, todavía no se ha incorporado la bioaccesibilidad en las evaluaciones de riesgo a la salud.

### *Dinamarca*

Un documento emitido por el Dutch National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) autoriza el uso de la bioaccesibilidad de Pb y Cd, cuyos valores hayan sido obtenidos por el método estandarizado BARGE, bajo condiciones experimentales que simulen un escenario de ayuno (Hagens *et al.*, 2009). Sin embargo, el uso de la bioaccesibilidad en evaluaciones de riesgo es poco utilizado, inclusive en el sitio oficial de la Danish Environment Agency en la red, no se encuentran publicadas metodologías oficiales ni opiniones sobre avances en la aplicación de la biodisponibilidad como factor de corrección (<http://eng.mst.dk/>).

### *Países bajos*

El Instituto RIVM publicó un reporte en 2009, donde incluyó el factor de corrección para cuantificar la biodisponibilidad relativa del Pb (Hagens *et al.*, 2009) y en el mismo documento se hace énfasis sobre la importancia de considerar a este factor en las evaluaciones de riesgo. Sin embargo, en ningún documento gubernamental se incorpora oficialmente la medición de la biodisponibilidad para su aplicación en las evaluaciones de riesgo a la salud.

### *Francia*

En la metodología ministerial nacional de Francia no se menciona el uso de la bioaccesibilidad en las evaluaciones de riesgo a la salud (Gravellier, 2007). Sin embargo, algunas instituciones como el InVS (Institut de Veille Sanitaire), INERIS (**Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques**) y DRASS (Direction Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales), ocasionalmente, han incluido la biodisponibilidad y/o la bioaccesibilidad para algunas evaluaciones de riesgo a la salud.

El Instituto INERIS que es un líder en investigación del tema de biodisponibilidad y colaborador del grupo BARGE; es el único que recomienda ampliamente incluir la bioaccesibilidad en los estudios de exposición, sobre todo en el caso del As y del Pb. Los datos que reportan, los obtienen principalmente de pruebas de bioaccesibilidad *in vitro*.

### *Estados Unidos*

En 2008, la U.S. EPA publicó el procedimiento estándar de operación (SOP) para el ensayo *in vitro* de la bioaccesibilidad de Pb en muestras de suelo. Hasta ese año, era la única agencia gubernamental que había validado oficialmente un método para medir *in vitro*, la bioaccesibilidad de este elemento, con la finalidad de aplicar este valor en las evaluaciones de riesgo a la salud. Para este fin, se determinó la correlación de los datos de Pb obtenidos en pruebas *in vitro* con las obtenidas *in vivo*, utilizando 19 suelos contaminados con este elemento.

#### **1.3.4 Determinación de concentraciones de remediación a partir del modelo de riesgo**

La concentración objetivo de remediación (Cs) se obtiene de relacionar la ecuación de ingesta de suelo contaminado con la ecuación del modelo de riesgo a la salud. A continuación se presenta el cálculo de la concentración de remediación, considerando el modelo de riesgo para el caso cancerígeno, que es el que representa el escenario más vulnerable.

En primer término se considera la ecuación para el cálculo de la ingesta de suelo contaminado propuesta por la Environmental Protection Agency de Estados Unidos (U.S. EPA, 1989):

$$\text{Ingesta de suelo } \left( \frac{\text{mg EPT}}{\text{kg peso corporal} \cdot \text{día}} \right) = \frac{\text{Cs} \cdot \text{IR} \cdot \text{EF} \cdot \text{ED} \cdot \text{FI}}{\text{BW} \cdot \text{AT}}$$

Donde,

Cs: Concentración del EPT en suelos ( $\text{mg}_{\text{EPT}}/\text{kg}_{\text{suelo}}$ )

BW: Peso corporal (kg)

AT: Tiempo promedio de exposición (días)

IR: Tasa de ingesta de suelos ( $\text{kg}_{\text{suelo}}/\text{día}$ )

FI: Factor de ingesta de EPT (adimensional)

EF: Frecuencia de la exposición (días/año)

ED: Duración de la exposición (años)

Posteriormente, se despeja el valor de ingesta de suelo contaminado (I) de la ecuación de riesgo del caso cancerígeno (ver sección 1.2.3):

$$R = I * SF * BA \text{ (U.S. DDF, 2001)}$$

$$I = \frac{R}{SF * BA}$$

Donde,

R: Riesgo (adimensional)

SF: Pendiente de cáncer ( $\text{kg peso corporal} \cdot \text{días}/\text{mg EPT}$ )

I: Ingesta de suelos contaminados ( $\text{mg EPT}/\text{kg peso corporal} \cdot \text{días}$ )

BA: Biodisponibilidad (adimensional)

Se igualan las dos ecuaciones antes consideradas:

$$\frac{R}{SF * BA} = \frac{\text{Cs} * \text{IR} * \text{EF} * \text{ED} * \text{FI}}{\text{BW} * \text{AT}}$$

Y, finalmente, se despeja el valor de Cs que es la concentración objetivo de remediación del contaminante:

$$\text{Cs} \left( \frac{\text{mg EPT}}{\text{kg suelo}} \right) = \frac{R * \text{BW} * \text{AT}}{\text{SF} * \text{BA} * \text{IR} * \text{EF} * \text{ED} * \text{FI}}$$

A continuación, se presenta el cálculo de la concentración de As en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  que representa un riesgo aceptable para la población infantil, -que es la más vulnerable-, aplicando los datos de un escenario posible, los cuales se presentan en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Valores de las variables de la ecuación de riesgo consideradas para el cálculo de la concentración aceptable de As en suelos

VARIABLES DE LA ECUACIÓN	ABREVIATURA	VALOR
Concentración objetivo de remediación en suelos	Cs	$(\text{mg}_{\text{EPT}} / \text{kg}_{\text{suelo}})$
Riesgo cancerígeno	R	1.00E-04 (EPA-SSL, 2002)
Peso corporal	BW	15 kg (EPA-SSL, 2002)
Tiempo promedio para efectos Cancerígeno	AT	70 años = 25550 días (EPA-SSL, 2002)
Pendiente de cáncer	SF	$1.5 (\text{mg}_{\text{As}}/\text{kg}_{\text{peso corporal}} \cdot \text{días})^{-1}$ (EPA-SSL, 2002)
Tasa de ingesta de suelos	IR	$200 \text{ mg}_{\text{suelo}}/\text{día} = 2.0\text{E}-04 (\text{kg}_{\text{suelo}}/\text{día})$ (EPA-SSL, 2002)
Factor de ingesta	IF	1 (adimensional) (EPA-SSL, 2002)
Frecuencia de la exposición	EF	350 (días/año) (EPA-SSL, 2002)
Duración de la exposición	ED	6 años (EPA-SSL, 2002)
Bioaccesibilidad	BA	0.7

Al sustituir los valores, se obtiene una concentración de As en suelo (Cs) de  $86.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , que corresponde a la concentración objetivo para un riesgo aceptable de  $1 \times 10^{-4}$  (se acepta un caso de cáncer por cada 10,000 habitantes).

### **1.3.5 Norma oficial mexicana para la remediación de suelos y lineamientos para la aplicación de la bioaccesibilidad en la NOM-147**

En México, la norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (NOM-147) establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio (NOM-147).

El objetivo de la remediación de un sitio con suelos contaminados es disminuir el riesgo a la salud y al ambiente, a través de la reducción de la concentración total de los contaminantes, o su bioaccesibilidad y/o solubilidad, así como evitando la dispersión eólica del suelo o estableciendo controles institucionales (restricciones administrativas en el uso o acceso a un sitio o instalación).

Cuando existe la posibilidad de que el suelo potencialmente contaminado de lugar a la exposición de la población por otras vías de exposición diferentes de la ingestión de

suelo, la norma indica que deben identificarse las rutas de exposición a través de las cuales se produce el contacto, y llevarse a cabo acciones preventivas para interrumpir las rutas de exposición identificadas, en tanto se lleva a cabo el programa de remediación.

Para determinar la concentración objetivo a la que se debe remediar un suelo, la NOM-147 ofrece las siguientes alternativas: a) concentraciones totales de referencia (Tabla 1 de la NOM-147), b) concentraciones de fondo de los suelos de la zona donde se ubica el sitio contaminado, c) cálculo de la concentración específica total con base en modelos de riesgo a la salud humana, en sitios con población humana expuesta y d) concentraciones solubles en agua meteórica (geodisponibles) de referencia (Tabla 2), en sitios sin población humana expuesta (ver Cuadro 34 del apéndice A.1). En la Figura 6 se presenta el diagrama conceptual de la norma.

En el caso de que uno de los contaminantes sea Pb, la determinación de la concentración específica para este elemento se puede realizar mediante la evaluación de la bioaccesibilidad y la aplicación de la ecuación 1. Cabe mencionar que el mismo procedimiento se aplica, en la práctica, a otros **EPT's**, como es el caso del As.

$$CE_T = (CR_T/BA) \dots\dots\dots Ec. 1 (NOM-147)$$

Donde,

$CE_T$  = Concentración específica total en  $mg \cdot kg^{-1}$ , que es la concentración objetivo para la remediación del suelo contaminado

$CR_T$  = Concentración total de referencia (Tabla 1) para uso agrícola, residencial o comercial en  $mg \cdot kg^{-1}$ , según corresponda

$BA$  = Valor de bioaccesibilidad (adimensional), se obtiene de determinar la bioaccesibilidad del Pb en el suelo contaminado

El valor o factor de bioaccesibilidad, se obtiene a partir de la siguiente fórmula,

$$\text{Valor}^{13} \text{ de bioaccesibilidad} = \frac{\text{Concentración del extracto in vitro} \left(\frac{mg}{L}\right) * 0.1 L}{\text{Concentración en sólido}^{14} \left(\frac{mg}{kg}\right) * 0.001 kg}$$

Cabe mencionar que de acuerdo con García R. (2013), la ecuación 1 debe ser revisada, ya que toma como base la concentración total de referencia ( $CR_T$ ) y no la real del suelo, por lo que se obtienen concentraciones objetivo de remediación más exigentes para casos de suelos menos contaminados que para otros más contaminados.

<sup>13</sup> En la ecuación se denomina valor de la bioaccesibilidad, pero en esta tesis el término se refiere como factor o valor de bioaccesibilidad.

<sup>14</sup> La concentración en sólido se refiere a la concentración total del Pb en el suelo

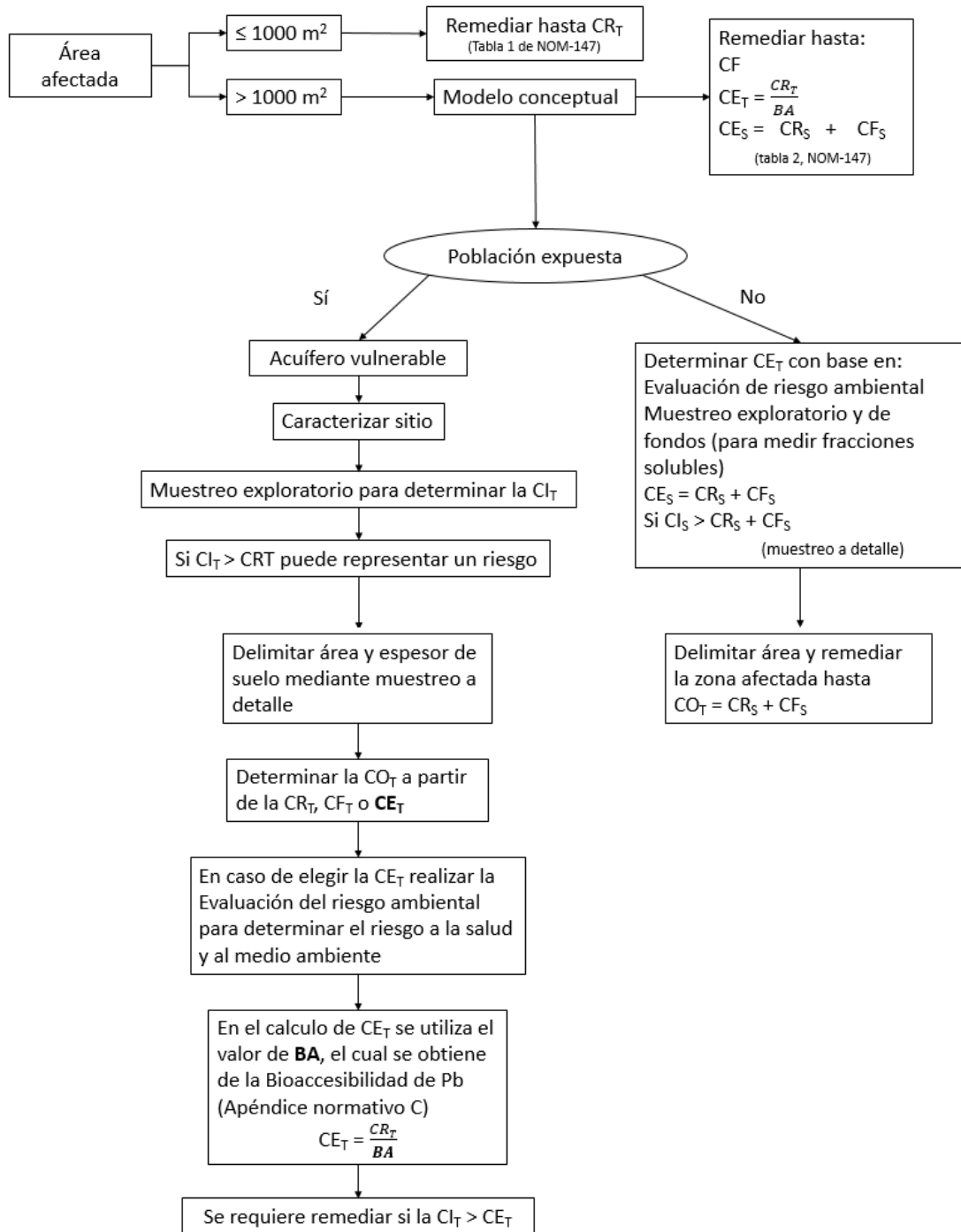


Figura 6. Diagrama para elegir la concentración objetivo de remediación según la NOM-147

Explicación de abreviaturas:

CF = concentración de fondo

CE<sub>T</sub> = concentración específica total

CR<sub>T</sub> = concentración de referencia total

BA = valor de bioaccesibilidad

CE<sub>S</sub> = concentración específica soluble

CR<sub>S</sub> = concentración de referencia soluble

CF<sub>S</sub> = concentración de fondo soluble

CI<sub>T</sub> = concentración inicial total

CO<sub>T</sub> = concentración objetivo total

## 2. Metodología

### 2.1 Hipótesis de trabajo, objetivo, metas y diagrama conceptual

Como ya se comentó, la normatividad ambiental mexicana relacionada con la determinación de las concentraciones objetivo para la remediación de suelos contaminados con EPT's, solamente contempla la determinación de bioaccesibilidad para el Pb, que se mide en fase gástrica utilizando un equipo de agitación axial. Sin embargo, los métodos más reconocidos para determinar la bioaccesibilidad incluyen adicionalmente la fase intestinal, ya que es en este órgano donde se absorben mayormente los EPT's. Además, no solamente se utiliza este valor para el Pb, sino también para otros elementos, como es el caso del arsénico (As). Este último EPT es muy abundante naturalmente en muchas zonas de México, por lo que hay acuíferos que lo contienen. Además, en donde se realizan actividades minero-metalúrgicas y de generación de energía geotérmica, ocurre frecuentemente la dispersión de As en el ambiente y la afectación de los sistemas agua-suelo, por lo que es muy importante medir el riesgo a la salud de la población expuesta a los suelos que contienen As.

Una de las razones por las que no se ha incluido en la normatividad de México la determinación de la bioaccesibilidad de otros EPT's, como es el caso del As, es la baja precisión de las mediciones, especialmente en la fase intestinal, así como la falta de datos de correlación entre los valores de bioaccesibilidad (*in vitro*) y biodisponibilidad (*in vivo*).

Se supone que la baja precisión en los valores de bioaccesibilidad del As, puede deberse en primer término, a que es un elemento de frontera (metaloide) cuyo comportamiento químico es complejo, pero también a problemas asociados a la naturaleza misma de los métodos y a limitaciones de los equipos. Especialmente, a que para adicionar reactivos durante el proceso de mezclado, para cambiar las condiciones gástricas a intestinales, se requiere detener la agitación y abrir los reactores.

Con la finalidad de resolver las limitaciones de los equipos disponibles, en el laboratorio de Biogeoquímica Ambiental (LABQA), se diseñó un equipo de bajo costo y tamaño reducido que permite la adición de reactivos, sin tener que detener la agitación ni abrir el equipo (proceso continuo)<sup>15</sup>. Con el objeto de determinar la viabilidad de utilizar este equipo -en el que la agitación se realiza mediante una corriente de gas-, denominado LABQA-2014, para determinar la bioaccesibilidad del As incluyendo las fases gástrica e intestinal con una precisión aceptable, se llevó a cabo este estudio. En primer término, se evaluó si el equipo LABQA-2014 cumple con los parámetros de calidad señalados por el sistema de calidad del LABQA y, posteriormente, se evaluó la precisión obtenida utilizando este equipo y el método PBET original publicado por Ruby *et al.*, (1996), que incluye las fases gástrica e intestinal, comparando los resultados con los obtenidos por otros métodos y equipos, especialmente el referido en la NOM-147 donde la agitación se realiza mecánicamente (axial).

---

<sup>15</sup> El diseño del equipo es el tema de una tesis de licenciatura en ingeniería química

Las variables estudiadas fueron: a) tipo de agitación (mecánica o gas), b) gases de agitación (aire o argón) y c) método aplicado. Asimismo, se determinó el grado de veracidad de los resultados, comparando los valores de bioaccesibilidad (*in vitro*) con los datos de biodisponibilidad (*in vivo*) para As, obtenidos en todos los casos utilizando el mismo suelo de referencia. Finalmente, se evaluó la factibilidad de aplicar el procedimiento a escala comercial.

Las metas y actividades establecidas fueron:

## 1. Preparación de muestras de suelo para realizar las pruebas

### 1.1 Selección y caracterización de suelos contaminados

- Selección de un suelo con baja concentración de As ( $< 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), para realizar pruebas comparativas entre el equipo LABQA-2014 y los equipos pre-existentes (equipo NOM-147, equipo PBET, equipo LIQ y equipo LABQA-2011)
- Caracterización del suelo con baja concentración de As, incluyendo los contenidos de As total y As geodisponible
- Selección de suelos contaminados con concentraciones bajas y altas de As ( $4,964\text{--}39,914 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) para la preparación de muestras compuestas
- Determinación de pH, conductividad eléctrica (C.E.), potencial redox (E), concentraciones totales y concentraciones geodisponibles en las muestras con concentraciones altas de As

### 1.2 Preparación de las muestras compuestas

- Selección de los parámetros para formar las muestras compuestas con características deseables para la determinación de la precisión
- Preparación de 5 muestras compuestas a partir de las muestras individuales con concentraciones altas de As

### 1.3 Caracterización de las muestras compuestas

#### *a. Parámetros generales y estadísticos*

- Determinación del pH, C.E., potencial redox, concentraciones totales por fluorescencia de rayos X (FRX) y geodisponibles
- Cálculo de los coeficientes de correlación entre las concentraciones totales de las muestras compuestas
- Cálculo de media, mediana, máximo, mínimo y desviación estándar de los parámetros generales

#### *b. Fracción geodisponible*

- Determinación de la geodisponibilidad de As, Ca, K, S, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Cr y Cd en las muestras compuestas
- Identificación por difracción de rayos X (DRX) de los minerales de As para analizar una posible relación con la geodisponibilidad del As



## 2. Determinación de la aceptabilidad del equipo LABQA-2014

2.1 Comparación de la precisión, medida como la repetibilidad obtenida con el equipo LABQA-2014, respecto a la lograda con los equipos de agitación pre-existentes

- Extracción del As con el método PBET modificado (fase gástrica) utilizando los equipos pre-existentes<sup>16</sup> y el equipo diseñado ex-profeso (LABQA-2014) utilizando la muestra de suelo de baja concentración de As (015-14)
- Comparación de los resultados de repetibilidad obtenidos

2.2 Evaluación de la influencia de las variables seleccionadas en la precisión obtenida (medida como reproducibilidad<sup>17</sup>), utilizando el método PBET modificado y el equipo LABQA-2014

### *a. Tipo de gas*

- Determinación de la reproducibilidad de las mediciones obtenidas con el método PBET modificado (fase gástrica) y el equipo LABQA-2014, utilizando dos gases (aire y argón) y las muestras de suelo con alta y baja concentración de As (131 y 10,648 mg\*kg<sup>-1</sup>)

### *b. Influencia de los reactivos orgánicos*

- Determinación de la reproducibilidad de las mediciones utilizando los métodos: PBET modificado (fases gástrica e intestinal) sin reactivos orgánicos y PBET original con reactivos orgánicos

2.3 Comparación de la precisión (medida como repetibilidad), con el método PBET-equipos LABQA-2014, y el método y equipo de la NOM-147

- Determinación de la repetibilidad con el método PBET original (fases gástrica e intestinal) en el equipo LABQA-2014, utilizando muestras compuestas seleccionadas
- Determinación de la repetibilidad con el método y equipo NOM-147, utilizando muestras compuestas seleccionadas
- Elaboración de cartas control de los resultados obtenidos con el método PBET original en el equipo LABQA-2014, y con el método y equipo de la NOM-147, utilizando el suelo estándar Montana 2711a.

---

<sup>16</sup> Los equipos pre-existentes fueron: equipo NOM-147, equipo PBET, equipo LIQ y equipo LABQA-2011

<sup>17</sup> La reproducibilidad se determinó en LABQA bajo ciertas condiciones (tipo de gas y reactivos orgánicos) con el método PBET

3. Determinación del grado de veracidad de los resultados
  - Comparación de los datos obtenidos con el método y el equipo NOM-147, utilizando el estándar de suelo Montana 2710; con los reportados (*in vivo* e *in vitro*) para el mismo suelo por laboratorios internacionales
  - Comparación de los datos obtenidos con el método PBET original en el equipo LABQA-2014, con los datos reportados (*in vivo* e *in vitro*) para el mismo suelo por laboratorios internacionales
4. Determinación de la viabilidad de la aplicación a escala comercial, del método PBET original utilizando el equipo LABQA-2014
  - Determinación de la bioaccesibilidad de As en muestras de suelo contaminado (n=83) de un sitio en proceso de remediación, utilizando el método PBET original y el equipo LABQA-2014, cumpliendo los criterios de calidad del LABQA
  - Evaluación de la precisión obtenida utilizando las muestras analizadas por duplicado

A continuación se presenta el diagrama conceptual:



## 2.2 Equipos utilizados para la medición del porcentaje de bioaccesibilidad del As

### 2.2.1 Equipos pre-existent

Existen varios métodos y equipos que permiten determinar la bioaccesibilidad, los cuales presentan diferentes características en relación a los tiempos de residencia, el pH, los reactivos, la cantidad de suelo, el tamaño de partícula, la relación sólido-líquido, las características del recipiente y el método de agitación (gas o mecánico) (ver Cuadros 37, 38, 39 y 40 del apéndice A.4). A continuación se describen brevemente las características de cada equipo:

#### a) Equipo PBET

El equipo PBET cuenta con un baño de agua que permite mantener en forma constante la temperatura de 37°C. La agitación se realiza introduciendo gas argón mediante mangueras, por la parte inferior de los embudos de agitación de PTF (polietilénftalato). Durante el experimento, las alícuotas se recuperan abriendo los reactores. Después de finalizar cada fase (gástrica o intestinal), el extracto se filtra y se almacena en refrigeración hasta ser analizado (Ruby *et al.*, 1996) (Figura 7).

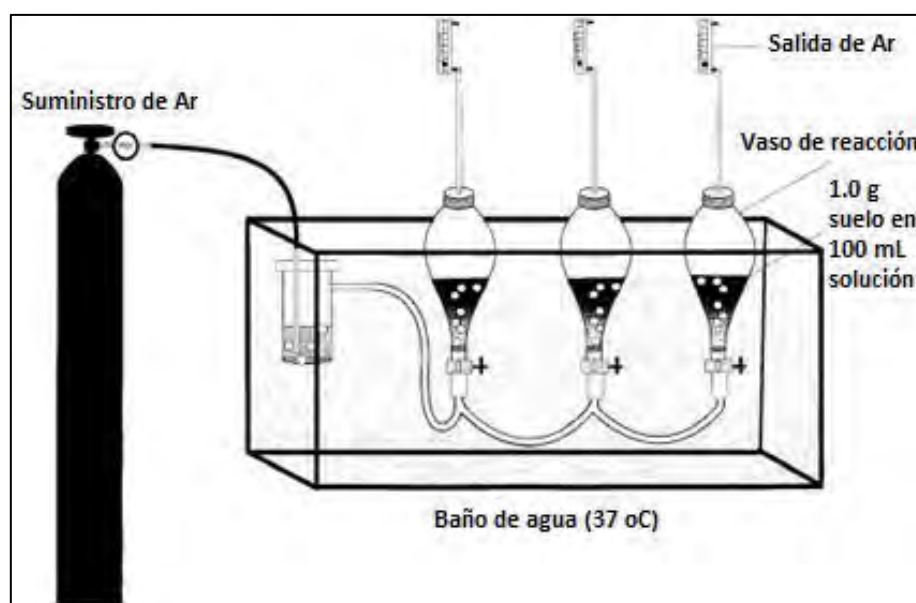


Figura 7. Equipo utilizado en el método PBET (imagen obtenida de Ruby *et al.*, 1996)

El equipo PBET presenta ciertas limitaciones, ya que solamente cuenta con 6 lugares para colocar reactores. Por otra parte, el flujo de cada embudo se ajusta por observación visual. En el caso del equipo del Laboratorio de Geoquímica Ambiental del Instituto de Geología de la UNAM, los medidores de flujo están dañados (fluxómetros), por lo que la presión en los reactores se controla únicamente con el manómetro del tanque de alimentación. Esta limitación produce ocasionalmente que parte de la muestra se regrese a las mangueras, lo que afecta el volumen final de la suspensión de suelo (Figuras 8, 9 y 10).



Figura 8. Equipo PBET del Laboratorio de Geoquímica Ambiental



Figura 9. Mangueras del equipo PBET del Laboratorio de Geoquímica Ambiental



Figura 10. Fluxómetros del equipo PBET

## b) Equipo NOM-147

En el equipo NOM-147 la agitación es axial y los reactores se encuentran inmersos en un baño de agua a temperatura constante de 37 °C; que se controla mediante una resistencia eléctrica (Figura 11).

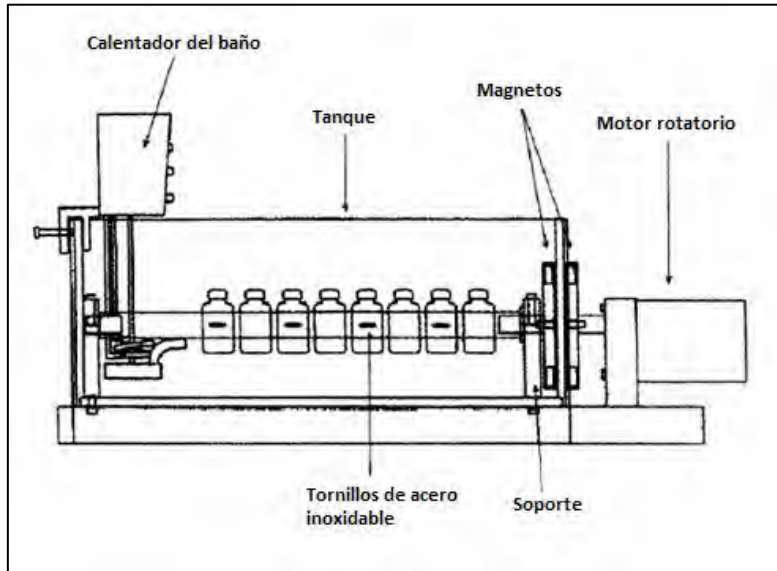


Figura 11. Diagrama del equipo NOM-147 (imagen tomada de la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004)

El sistema del equipo NOM-147 es eficiente, tiene una capacidad para 12 lugares y la agitación no presenta variaciones. Sin embargo, el equipo presenta algunas limitaciones, entre las que destacan las siguientes: a) debido a la rotación constante de los reactores, se disminuye el tamaño de las partículas; b) solamente se obtienen valores de pH al inicio y al final del experimento y c) para tomar alícuotas se requiere suspender la agitación (Figura 12).

Considerando que la variación permitida de pH es  $\pm 0.5$  unidades<sup>18</sup> en las muestras, respecto al valor inicial de pH 1.5, la falta de control de este parámetro afecta la calidad de los resultados.

<sup>18</sup> En la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 se estableció como control de calidad en la prueba de bioaccesibilidad de Pb, que el pH de la solución extractante durante su preparación debe ser  $1.50 \pm 0.50$ , a diferencia del  $\Delta\text{pH} = 0.5$  unidades de las muestras que se permite en la determinación (al inicio y al final de los 60 min de agitación)





Figura 12. Equipo NOM 147 del Laboratorio de Geoquímica Ambiental

### **c) Equipo LABQA-2011**

En la Figura 13 se presenta el equipo LABQA-2011 que se diseñó buscando optimizar el tiempo de análisis y el número de reactores ( $n=20$ ), pero su diseño no fue adecuado, porque de los equipos pre-existentes éste presenta el mayor número de limitaciones:

- La agitación magnética no funciona correctamente debido a que el movimiento de la mezcla no es homogéneo (Figura 14)
- Los reactores son cuadrados, por lo que se acumula suelo en las esquinas. Además, el espacio entre reactores no es suficiente para permitir una manipulación adecuada
- En los agitadores magnéticos se acumula la magnetita presente en los suelos
- El sistema electrónico de calentamiento no permite un control adecuado de la temperatura del baño de agua



Figura 13. Equipo LABQA-2011



Figura 14. Acumulación de sedimento en los reactores del equipo LABQA-2011

#### **d) Equipo del Laboratorio de Ingeniería Química (LIQ)**

El equipo del Laboratorio de Ingeniería Química (LIQ) de la Facultad de Química (Figura 15) cuenta con un agitador orbital que se programa a diferentes velocidades, durante el experimento se estableció a 160 rpm. Sin embargo, durante la agitación no es posible tomar alícuotas y parte del suelo se sedimenta en el fondo de los recipientes.



Figura 15. Agitador orbital del equipo LIQ

En síntesis, los sistemas de agitación de los equipos pre-existentes, presentan las siguientes limitaciones:

- La agitación orbital genera sedimentos en algunas partes del fondo del recipiente, por lo que no logra la suspensión completa de todos los sólidos (equipo LIQ)



- La agitación magnética propicia la acumulación de magnetita de algunos suelos en el fondo del recipiente (equipo LABQA-2011)
- La agitación axial evita el monitoreo durante el proceso de extracción (equipo NOM-147)
- La agitación en los embudos de separación no es homogénea en todos los reactores (equipo PBET)

### 2.2.2 Equipo LABQA-2014

La agitación se lleva a cabo en forma similar a una centrífuga tubular; pero en lugar de introducir el gas por la parte inferior como en el equipo PBET, en el equipo LABQA-2014 se introduce por la parte superior de los reactores, a través de un tubo que toca la base del recipiente de fondo cónico, por lo que se genera una turbulencia suficiente para lograr una agitación constante de la suspensión (Figura 16).



Figura 16. Sistema de agitación del equipo LABQA-2014

Los recipientes de agitación son tubos de vidrio de fondo cónico, que se colocan dentro de un contenedor de acrílico que funciona como soporte, lo que facilita su manipulación durante el experimento (Figura 17). Se seleccionó el vidrio<sup>19</sup>, ya que es un material que permite fabricar los recipientes en un taller a bajo precio, considerando, además,

<sup>19</sup> Aunque el vidrio es un material que se caracteriza por adsorber vestigios de cationes, su uso es posible siempre y cuando se trate cada vez que se va a utilizar, como lo indica Harris (2007):

- 1) lavar con detergente libre de fosfatos (Hyclean)
- 2) enjuagar con agua destilada
- 3) mantener el material sumergido en HNO<sub>3</sub> (10 %) durante 2 horas para eliminar residuos de cationes adsorbidos en su superficie
- 4) enjuagar con agua destilada y después con agua desionizada

que permite dar un seguimiento visual al proceso. No se consideró el uso de recipientes de plástico, ya que adquieren un color amarillento que indica cierta reactividad en la superficie interna de los recipientes, ya sean de polietileno de alta densidad (HDPE), polipropileno (PP), policarbonato (PC) o politetrafluoroetileno (PTFE) (Figura 18).



Figura 17. Diseño de los recipientes y el contenedor del equipo LABQA-2014



Figura 18. Recipientes tradicionales, de izquierda a derecha se encuentran los recipientes de HDPE, PP, PC y PTF

Los recipientes de vidrio cuentan con un orificio en la tapa, el cual que permite: a) la colocación de embudos de vidrio de cuello relativamente ancho, que se utilizan para adicionar la muestra y los reactivos; b) introducir el electrodo para medir el pH; c) extraer las alícuotas necesarias sin detener la agitación y c) dar salida al gas de agitación (Figura 19). Los reactores se colocan en una gradilla de acrílico de tres niveles para evitar que se muevan los tubos durante la agitación (Figura 20).



Figura 19. Introducción de reactivos y muestras a través de embudos en el equipo LABQA-2014



Figura 20. Imagen del equipo en funcionamiento

Para el sistema de control de flujo del gas, se utilizan llaves de plástico análogas a las usadas para realizar venoclisis<sup>20</sup> en los hospitales. Estas llaves permiten ajustar a  $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  el flujo del gas en cada reactor (Figura 21), el cual se mantiene durante toda la agitación, pues una vez establecida la abertura de cada llave por medio de un fluxómetro, se sellan con resina epóxica y se fija la cantidad de gas que entra.

<sup>20</sup> Introducción de un catéter en venas periféricas, para la administración de medicamentos y/o soluciones parenterales y para la realización de pruebas diagnósticas



Figura 21. Control de la presión en cada reactor

Se evitó el uso de fluxómetros independientes, ya que ésto aumentaría notablemente el precio del equipo, además se requeriría sustituirlos cuando dejaran de operar correctamente.

La gradilla con los reactores y el sistema de agitación con gas, se colocan dentro del baño de agua con control de temperatura (Figura 22). La toma de alícuota se realiza mediante una cánula insertada en una jeringa graduada (Figura 23).

Después de tomar la alícuota, se quita la cánula y el líquido se filtra directamente por membranas de  $0.45\ \mu\text{m}$ . La cánula se puede sustituir por micropipeta, pero en ese caso, el líquido se coloca en tubos de ensayo graduados para rectificar el volumen.



Figura 22. Sistema de control de pH de la solución extractora





Figura 23. Toma de alícuota en el equipo LABQA-2014

En la Figura 24 se presenta una imagen completa del equipo LABQA-2014 en funcionamiento, se aprecia el potenciómetro utilizado para el control del pH durante el proceso de extracción. También se puede observar que el tamaño del equipo LABQA-2014 es relativamente pequeño, lo que permite su uso en espacios pequeños.



Figura 24. Imagen del equipo LABQA-2014 en funcionamiento

## 2.3 Parámetros de control de calidad analítica

### 2.3.1 Exactitud

Para evaluar la exactitud del método se determinó el porcentaje de recobro, el cual se define como la proporción de la cantidad de analito presente en la porción de la muestra o adicionado, se determina utilizando el método de ensayo (CENAM & EMA, 2012). El porcentaje de recobro es un indicativo de la exactitud, es decir, permite determinar qué tan cercano está el valor obtenido respecto a un "valor verdadero" (Magnusson y Örnemark, 2014), que en este caso corresponde al adicionado<sup>21</sup>.

---

<sup>21</sup> Cuando hay interferencias en el porcentaje de recobro, el resultado obtenido se encuentra fuera del intervalo de aceptación

Para calcular el porcentaje de recobro se midió la concentración de As en el suelo estándar Montana 2711a, en experimentos independientes:

$$\% \text{ recobro} = \frac{\text{concentración obtenida}}{\text{concentración del certificado}} * 100$$

El criterio de aceptación utilizado fue  $100 \pm 15 \%$ , que fue establecido en el LABQA, además cumple con los lineamientos de la NOM-147.

### **2.3.2 Precisión**

Otro parámetro importante a determinar, en cuanto a la variabilidad de resultados, es la precisión<sup>22</sup>, que se define como el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes, obtenidos bajo condiciones específicas. La precisión se mide determinando la repetibilidad, la reproducibilidad o la precisión intermedia<sup>23</sup>.

#### ***Repetibilidad***

Este parámetro indica si hay concordancia entre las determinaciones independientes realizadas por un analista en el mismo laboratorio, utilizando los mismos instrumentos y el mismo objeto de prueba, dentro de intervalos cortos de tiempo (EURACHEM, 2005). La prueba de repetibilidad puede evaluarse entre réplicas, o bien entre lotes. Si se lleva a cabo considerando un gran número de variables, se considera una prueba más robusta, ya que hay mayor probabilidad de que aumente la variabilidad.

La determinación de la repetibilidad exige que se utilice un mismo método y se aplique a objetos idénticos (misma muestra y matriz), así como llevar a cabo las pruebas en un mismo laboratorio, por un solo operador y con el mismo equipo, cuidando de que se realicen en el menor tiempo posible<sup>14</sup>.

En este estudio, la repetibilidad se evaluó mediante pruebas por triplicado, cumpliendo las condiciones antes señaladas utilizando la misma muestra; con los datos se calculó el porcentaje de coeficiente de variación (% C.V.), también conocido como desviación estándar relativa (% DER), utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ C.V.} = \frac{\text{desviación estándar de las repeticiones}}{\text{concentración promedio de las repeticiones}} * 100$$

---

<sup>22</sup> De manera general, la repetibilidad es una forma de determinar la precisión, cuando se mantienen todas las condiciones iguales (instrumento, método, equipo, analista y período de tiempo); la reproducibilidad cuando se cambia por lo menos una de las condiciones de la prueba (instrumento, método, equipo, analista o período de tiempo) (EURACHEM, 2005).

<sup>23</sup> Concepto de precisión revisado el 30/08/16 a las 14:00 h en:  
[http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPND10/datapoints\\_spnd10.html](http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPND10/datapoints_spnd10.html)

El criterio de aceptación fue %C.V. menor o igual al 15%, que es el valor establecido en el sistema de calidad del LABQA.

Adicionalmente, se llevaron a cabo otras pruebas para determinar la repetibilidad, pero en éstas, dado que se tenía poca cantidad de muestra o un gran número de muestras para analizar, las mediciones fueron únicamente por duplicado y se determinó la desviación porcentual relativa (DPR), mediante la siguiente ecuación:

$$DPR = \frac{|X_1 - X_2|}{C_{promedio}} * 100$$

Donde,

X<sub>1</sub>= valor de la repetición 1

X<sub>2</sub>= valor de la repetición 2

C<sub>promedio</sub>= concentración promedio de las repeticiones

El criterio de aceptación fue DPR menor o igual al 20%, que es el valor establecido en el sistema de calidad del LABQA.

### ***Reproducibilidad***

La reproducibilidad se determina con datos obtenidos de pruebas mediante el mismo método y con objetos de prueba idénticos, pero, a diferencia de la repetibilidad, se lleva a cabo en diferentes laboratorios, con diferentes analistas y utilizando diversos equipos. Tanto la prueba de repetibilidad como la prueba de reproducibilidad evalúan la precisión, sólo que en la reproducibilidad se pretende demostrar que los resultados emitidos son independientes del analista(s), del equipo y del laboratorio (EURACHEM, 2005).

Para determinar la reproducibilidad se comparó el %C.V. de la bioaccesibilidad obtenida en el equipo LABQA-2014, con el reportado por Koch *et al.*, (2013). Estos investigadores evaluaron 17 diferentes métodos para determinar la bioaccesibilidad, utilizando el suelo estándar Montana 2710; y determinaron la reproducibilidad, como la suma de la variabilidad inter e intralaboratorio. Además, midieron la biodisponibilidad relativa en cerdos y ratones, con el mismo material de referencia.

### ***Precisión intermedia***

"Como su nombre lo indica, la precisión intermedia es un valor que se determina bajo condiciones intermedias entre la repetibilidad y la reproducibilidad, -que representan dos situaciones extremas-, para establecer la precisión de un método de prueba". En este caso, se permite variar los analistas y los equipos, y realizar las pruebas durante períodos de tiempo más largos (semanas o meses), en un mismo laboratorio<sup>14</sup>.

Comúnmente, se realiza en la evaluación de repetibilidad entre lotes (Barwick y Prichard, 2011).

## 2.4 Materiales y métodos

### 2.4.1 Descripción y preparación de las muestras

#### a) Suelos y estándares utilizados

- ⇒ Suelos con baja concentración de As ( $<200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) procedente de una zona minera.
- ⇒ Suelos con bajas y altas concentraciones de As (4,964 a 39,914  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Quince muestras que pertenecen a un sitio contaminado por una planta de  $\text{As}_2\text{O}_3$ , lugar que estuvo en funcionamiento por más de 40 años (Figura 26).
- ⇒ Muestras compuestas de suelo: 5 muestras preparadas a partir de las 15 muestras de suelo con altas y bajas concentraciones de As.
- ⇒ Muestras complementarias de suelo: 83 muestras procedentes de un sitio contaminado por actividades mineras y metalúrgicas.
- ⇒ Material estándar de referencia (por sus siglas en inglés SRM) Montana soil 2710 con certificado NIST (National Institute of Standards & Technology)<sup>24</sup>, de tamaño  $< 74 \mu\text{m}$  según el certificado.
- ⇒ Material estándar de referencia (por sus siglas en inglés SRM) Montana soil 2711a con certificado NIST (National Institute of Standards & Technology), de tamaño  $< 74 \mu\text{m}$  según el certificado.

#### b) Preparación de las muestras de suelo

- ⇒ El suelo se tamizó por malla núm. 10 ( $< 2\text{mm}$ ) para determinar los siguientes parámetros: pH, conductividad eléctrica (C.E.), potencial redox ( $E_{\text{Ag}/\text{AgCl}}$ ) y As geodisponible.
- ⇒ Del suelo tamizado por malla 10, se molieron 200 g en un molino de bolas marca Pulverisette 6 y, posteriormente, se volvió a tamizar por la malla núm. 200 ( $<0.074 \text{ mm}$ ) para el análisis de As total por FRX.
- ⇒ Del suelo tamizado en malla 10 se tomaron 100 g y se volvieron a tamizar por malla núm. 60 ( $<0.250 \text{ mm}$ ), para determinar As bioaccesible.

### 2.4.2 Gases de agitación

Los dos gases que se probaron en el equipo LABQA-2014, con la finalidad de seleccionar el mejor gas para experimentos posteriores, fueron: argón 4.8 plasma de alta pureza y aire libre de hidrocarburos. El argón es el gas que indica el método PBET, y el aire libre de hidrocarburos se seleccionó por ser de menor costo, además, porque el método de la NOM-147 no exige un ambiente inerte.

---

<sup>24</sup> Este material estándar está agotado comercialmente



### **2.4.3 Métodos y equipos analíticos para la caracterización general de los suelos**

La descripción completa de los métodos se presenta en la sección A.6 del Apéndice analítico

- a) Medición de pH: Método de referencia U.S. EPA 9045D. Equipo: potenciómetro marca BECKMAN 720.
- b) Medición de conductividad eléctrica: Método de referencia SSS Book Series No. 5 parte III Glossary of Soil Science Terms. Soil Science Society of America, USA (1996). Equipo: conductímetro marca CORNING 441.
- c) Medición de potencial redox: Método de referencia indicado en suelos y lodos (ISO 11271, 2002; NRES 381, 2002; Patrick *et al.*, 1996). Equipo: potenciómetro marca BECKMAN 720.
- d) Fluorescencia de rayos X: Método de referencia U.S. EPA 6200 indicado para Espectrometría de Fluorescencia de rayos X portátil. Se utilizó un equipo portátil Thermo Scientific modelo NITONXL3t, para cuantificar los elementos con número atómico entre 12 y 92.
- e) Geodisponibilidad (fracción soluble): el método indicado en la NOM-147 es análogo al método ASTM D3987-85 (1992), Standard Test Method for Shake Extraction of solid Waste with water modificado. Se aplicó para determinar las concentraciones solubles en agua meteórica (simulando agua de lluvia), utilizando un equipo ICP-OES (THERMO ELECTRON CORPORATION modelo IRIS INTREPID XSP-II).
- g) Difracción de rayos X. Se utilizó un equipo marca Shimadzu XRD. Los análisis los realizó la Dra. Teresa Pi Puig en el Departamento de Geoquímica del Instituto de Geología.

### **2.4.4 Métodos utilizados para la determinación de bioaccesibilidad**

Para realizar la prueba de bioaccesibilidad se utilizaron los siguientes métodos que fueron comentados en los apartados 1.3.2 y 1.3.5; se describen de forma detallada en el Apéndice A.7.

- a) Método PBET (por sus siglas en inglés Physiologically Based Extraction Test). Utiliza argón de alta pureza para la agitación y la temperatura del baño de agua se mantiene a 37°C. En la primera etapa (gástrica) se utiliza una solución<sup>25</sup> preparada con 1.25 g de pepsina de mucosa gástrica porcina, 0.5 g de ácido

---

<sup>25</sup> No se agregó glicina para no modificar las condiciones del método PBET y para evitar variantes

cítrico, 0.5 g de ácido DL-málico, 410  $\mu$ L de ácido DL-láctico, y 500  $\mu$ L de ácido acético en 990 mL de agua Tipo I. El pH se ajusta a  $1.50 \pm 0.05$  con HCl concentrado y se mantiene en agitación durante una hora. En la segunda etapa (intestinal) se aumenta el pH a  $7.00 \pm 0.05$  con una solución saturada de bicarbonato de sodio, posteriormente se añade una solución intestinal preparada con sales biliares y pancreatina, se mantiene en agitación durante tres horas a temperatura de 37°C. Si es necesario se adicionan gotas de antiespumante (alcohol decílico) durante la agitación.

- b) Método PBET modificado (fase gástrica). Extracción con una solución de HCl a pH 1.5, a temperatura de 37 °C durante una hora de agitación.
- c) Método PBET modificado (fase intestinal). Corresponde a la segunda etapa del método PBET, para lo cual se incrementa el pH de la solución gástrica de  $1.50 \pm 0.05$  a  $7.00 \pm 0.05$ , utilizando una solución sobresaturada de  $\text{NaHCO}_3$ , a temperatura de 37°C y se mantiene en agitación durante tres horas.
- d) Método de referencia para medir la bioaccesibilidad gástrica, NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Extracción con una solución de glicina, ajustando el pH a 1.5 con HCl, a una temperatura de 37 °C y agitando durante una hora.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Caracterización del suelo contaminado con baja concentración de arsénico

En la muestra de suelo 015-14 que contiene baja concentración de As, se determinaron los siguientes parámetros: pH, conductividad eléctrica (C.E.), potencial redox ( $E_{Ag/AgCl}$ ) y As geodisponible, en el suelo tamizado por malla núm. 10 (<2 mm). Se cuantificó As total por Fluorescencia de Rayos X (FRX) en el suelo con tamaño de partícula < 74  $\mu\text{m}$ .

En el Cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos del suelo 015-14. Se observa que el pH fue 4.7, lo que indica que el suelo es ácido, posiblemente por haber sido contaminado con sulfuros que al oxidarse produjeron  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . El pE varió de +2 a +12 (ambiente subóxico<sup>26</sup>), lo que aporta otra evidencia de la presencia de sulfuros. El contenido de As total fueron  $131 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . La suma de pE y pH es ligeramente mayor a 10, por lo que el As en este suelo en el equilibrio debe ser pentavalente (Sadiq, 1997). La conductividad eléctrica (C.E.), expresada en  $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , indica que es un suelo moderadamente salino (clasificación 2.1 – 4.0  $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ ), posiblemente por la presencia de sulfatos que son el producto de la oxidación de sulfuros (ver criterios del Cuadro 29 en el apéndice A.1). La concentración de As total fueron  $131 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  y de As geodisponible fueron  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . El As total de la muestra superó la concentración de As total de referencia ( $22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  es el valor de referencia para suelos contaminados, está señalado en la NOM-147 y se presenta en el Cuadro 27 del apéndice A.1). La concentración de As geodisponible fue menor al límite máximo señalado en la NOM-147, que es de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Cuadro 28 del apéndice A.1), lo que indica que los compuestos de As en este suelo son poco solubles.

Cuadro 3. Caracterización de la muestra 015-14

Muestra	pH	C.E. <sup>27</sup> $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$	$E_{Ag/AgCl}$ (mV)	$E_H$ <sup>28</sup> (mV)	pE <sup>29</sup>	pE + pH	As <sub>total</sub> * $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	As <sub>geodisponible</sub> * $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
015-14	4.7	2.4	114	334	5.7	10.4	131	0.05

\* El As total se determinó por duplicado y el DPR fue 10%, por lo que se encuentra dentro del criterio de aceptación del LABQA.

<sup>26</sup> El valor de pE es un valor teórico, se determinó suponiendo que la muestra se encontraba en un microambiente representativo del lugar original. Sin embargo, de acuerdo con Sposito (2008), la medición de potenciales redox en suelos usando electrodos, no es del todo confiable, pues los pares redox tienen diferentes cinéticas de equilibrio, las cuales son lentas sobre todo en equilibrios heterogéneos (gas/acuoso o sólido/acuoso), por lo que se crea una preferencia artificial por los pares homogéneos (en solución acuosa).

<sup>27</sup>  $1 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  equivale a  $1000 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  y a  $1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$

<sup>28</sup>  $E_H$  corresponde al potencial redox relativo al electrodo de hidrógeno, se calculó como  $E_H = E_{Ag/AgCl} + 220_{(mV)}$

<sup>29</sup>  $pE = (E_H, \text{volts}/0.059)$ ; cuando el  $pE < +2$  indica que la zona es anóxica, cuando  $+2 < pE < +12$  es una zona subóxica y cuando  $pE > +12$  es una zona óxica (Sposito, 2008)

### 3.2 Análisis de los suelos utilizados para preparar las muestras compuestas

Se determinaron los siguientes parámetros: pH, C.E. potencial redox, As total y As geodisponible en los 15 suelos con altas concentraciones de As, que se utilizaron para preparar las muestras compuestas (Sección 2.4.1). Los resultados se presentan en el Cuadro 4.

El intervalo de los resultados obtenidos de As total varió de 2,462 a 50,407 mg\*kg<sup>-1</sup>, con una desviación estándar de 12,792, lo que indica una gran diferencia en el grado de contaminación de los suelos. La fracción geodisponible, -que simula la cantidad de As que se puede disolver en el agua de lluvia-, también varió ampliamente de 179 a 1,391 mg\*kg<sup>-1</sup>, lo que corresponde a 1.5 y 23.9 de porcentaje en masa de As geodisponible.

Cuadro 4. Valores generales de los suelos seleccionados para preparar las muestras compuestas: pH, potencial redox, C.E., As total y As geodisponible

Claves de muestras simples	pH	E <sub>Ag/AgCl</sub> (mV)	C.E. dS*m <sup>-1</sup>	AS <sub>total</sub> FRX (<250µm)	AS <sub>geodisponible</sub>	% AS <sub>geodisponible</sub>
				mg*kg <sup>-1</sup>		
1	6.7	1	1.8	50,407	767	1.5
2	5.7	53	1.5	15,086	308	2.0
3	4.2	130	0.5	23,008	588	2.6
4	4.6	123	0.8	18,717	751	4.0
5	6.3	33	0.4	11,466	475	4.1
6	5.5	63	0.4	15,679	705	4.5
7	4.2	133	0.6	3,778	179	4.7
8	6.1	64	0.3	28,191	1,391	4.9
9	4.7	115	0.4	23,912	1,234	5.2
10	5.4	88	0.6	13,899	938	6.7
11	5.2	80	1.1	4,938	246	5.0
12	5.0	98	1.4	9,360	541	5.8
13	3.7	155	1.1	3,678	279	7.6
14	7.8	-49	0.6	2,462	588	23.9
15	8.0	-56	0.4	2,840	394	13.9
mínimo	3.7	-56	0.3	2,462	179	1.5
máximo	8.0	155	1.8	50,407	1,391	23.9
media	5.5	69	0.8	15,161	626	6.4
mediana	5.4	80	0.5	13,899	588	4.9
Desv. Est.	1.3	64	0.5	12,792	353	5.6

Se observa que todos los valores de la fracción de As geodisponible (179 – 1,391 mg\*kg<sup>-1</sup>) superaron en más de dos órdenes de magnitud el límite máximo permisible, señalado en la NOM-147 (1 mg\*kg<sup>-1</sup> que equivale a 0.5 mg\*L<sup>-1</sup>).

La media de la C.E. fue de 0.8 dS\*m<sup>-1</sup> con un intervalo de 0.3 a 1.8 dS\*m<sup>-1</sup>. De acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000<sup>30</sup>, estos suelos se clasifican como "muy ligeramente salinos", ya que los valores son menores a 2.0 dS\*m<sup>-1</sup> (Cuadro 29 del apéndice A.1). El valor promedio de pH fue de 5.5, con un intervalo de 3.7 a 8.0 y una desviación estándar de 1.3. La mayor parte de los suelos son ácidos, ya que únicamente dos muestras (14 y 15) presentaron valores superiores a 7.

Cuadro 5. Valores de (pH+pE) y estado de oxidación probable del As, en los suelos seleccionados para preparar las muestras compuestas

Claves de muestras simples	pH	E <sub>Ag/AgCl</sub> (mV)	E <sub>H</sub> (mV)	pE	pE + pH	Probable estado de oxidación del As
1	6.7	1	221	3.7	10.4	V
2	5.7	53	273	4.6	10.3	V
3	4.2	130	350	5.9	10.1	V
4	4.6	123	343	5.8	10.4	V
5	6.3	33	253	4.3	10.6	V
6	5.5	63	283	4.8	10.3	V
7	4.2	133	353	6.0	10.2	V
8	6.1	64	284	4.8	10.9	V
9	4.7	115	335	5.7	10.4	V
10	5.4	88	308	5.2	10.6	V
11	5.2	80	300	5.1	10.3	V
12	5	98	318	5.4	10.4	V
13	3.7	155	375	6.4	10.1	V
14	7.8	-49	171	2.9	10.7	V
15	8	-56	164	2.8	10.8	V
mínimo	3.7	-56	164	2.8	10.1	
máximo	8	155	375	6.4	10.9	
media	5.5	69	289	4.9	10.4	V
mediana	5.4	80	300	5.1	10.4	
Desviación estándar	1.3	64	62	1.0	0.2	

<sup>30</sup> NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECENAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.

Con base en el potencial redox y el pH, se puede predecir: el grado de aireación del sitio donde se tomaron los suelos y el estado de oxidación del As en el equilibrio. En el Cuadro 5 se presentan para cada muestra, los valores de (pE + pH) y el estado de oxidación del As en el suelo en el equilibrio, aunque es posible que estos suelos no hayan alcanzado el equilibrio porque no se minitoreó después de un largo tiempo.

En la Figura 25 se aprecia el diagrama reportado por Baas-Becking (1960), en el que se presentan los valores de Eh y pH de los suelos. En esta figura se señalaron en amarillo los datos de los suelos caracterizados en este estudio. De acuerdo con los valores de Eh -que dependen del grado de aireación de los suelos- y del pH, las muestras simples se localizaron en la región subóxica transicional.

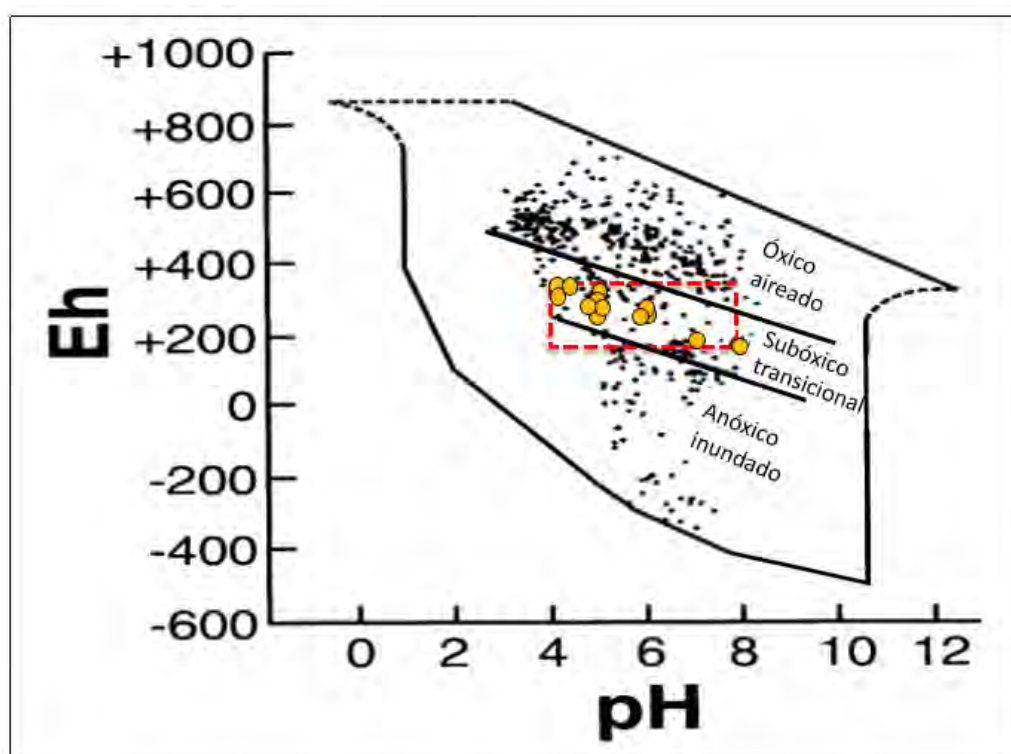


Figura 25. Valores de Eh (mV) y pH de las muestras individuales respecto al intervalo reportado para suelos no afectados (modificado de Baas-Becking, 1960)

### 3.3 Preparación de las muestras compuestas

#### 3.3.1 Características generales

Las muestras compuestas (C-1 a C-5) se prepararon utilizando suelos que se seleccionaron, principalmente, con base en los porcentajes de As geodisponible y los valores de pH. Las muestras 1, 2 y 3 que presentaron los porcentajes de geodisponibilidad más bajos (1.5 - 2.6)% y valores de pH menor a 7, se utilizaron para preparar la muestra C-1. La muestra C-2 se preparó utilizando las muestras 4, 5, 6 y 7, cuyo pH es ácido y donde los porcentajes de As geodisponible fueron más altos que

los de los suelos de la muestra C-1 (varían de 4 a 4.7%). Las muestras 8, 9 y 10 se utilizaron para preparar la muestra compuesta C-3, su pH es ácido y los porcentajes de As geodisponible fueron más altos, que en los suelos utilizados para preparar las dos muestras compuestas anteriores (varían de 4.9 a 6.7). La muestra C-5 se formó de los suelos 14 y 15 que presentan los valores más altos de pH (7.8 y 8.0) y de porcentaje de As geodisponible (13.9 y 23.9). Todos los datos de pH y de porcentaje de As geodisponible de As, de los suelos utilizados para preparar las muestras compuestas, se presentan en el Cuadro 4.

En la Figura 26 se muestra la ubicación de los sitios, donde se tomaron los suelos utilizados para preparar las muestras compuestas, los cuales se identifican con un mismo color (compuesta 1 en amarillo, compuesta 2 en naranja, compuesta 3 en rojo, compuesta 4 en verde y compuesta 5 en café). El área de todas las muestras compuestas es una zona donde operó una planta de trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ). Las muestras utilizadas para preparar la muestra C-4 (color verde) presentan la mayor cercanía espacial.

Para la preparación de las muestras compuestas, se pesaron 20 g de los suelos individuales y se tamizaron por malla # 60 ( $<250 \mu m$ ). Posteriormente se mezclaron en una bolsa durante 10 minutos para lograr un material homogéneo, el cual se molió en un molino de bolas (Pulverisette 6 marca Fritsch) durante 2 min y se pasó por malla # 200 ( $<74 \mu m$ )<sup>31</sup>. La cantidad que se obtuvo de cada muestra compuesta fue de aproximadamente 200 g.

---

<sup>31</sup> Este cambio se debe al alto precio y bajo volumen de los estándares de suelo utilizados en el estudio, lo que obligó a disminuir la cantidad de suelo utilizado por la NOM-147; se mantuvo la relación y se aseguró la homogeneidad de los suelos, reduciendo el tamaño de partícula ( $<74 \mu m$ ), respecto al que se indica en la prueba de bioaccesibilidad en la NOM-147 ( $<250 \mu m$ ).



Figura 26. Ubicación de los sitios de muestreo de los suelos utilizados para preparar las 5 muestras compuestas (imagen obtenida por Google Earth)

En el Cuadro 6 se presentan los valores promedio esperados para las muestras compuestas de los suelos, calculados con base en los datos de los suelos individuales (Cuadro 4), para los siguientes parámetros: pH,  $E_{Ag/AgCl}$ , C.E., As total y As geodisponible.

Cuadro 6. Valores promedio de los parámetros generales de las muestras compuestas calculados a partir de los datos de las muestras individuales

Muestra	Claves de muestras simples	pH	$E_{Ag/AgCl}$ (mV)	C.E. $dS \cdot m^{-1}$	$AS_{total}$ FRX (<250 $\mu m$ )	$AS_{total}$ FRX (<250 $\mu m$ )	$AS_{geodisponible}^{32}$	% de $AS_{geodisponible}$ respecto al $AS_{total}$
					% *	$mg \cdot kg^{-1}$		
Compuesta 1	1, 2 y 3	5.5	61.1	1.2	3	29,500	554	2
Compuesta 2	4, 5, 6 y 7	5.2	87.9	0.5	1.2	12,410	528	4.3
Compuesta 3	8, 9 y 10	5.4	89.1	0.4	2.2	22,001	1,188	5.6
Compuesta 4	11, 12 y 13	4.6	111	1.2	0.6	5,992	355	6.1
Compuesta 5	14 y 15	7.9	-52.6	0.5	0.3	2,651	491	18.9

\*El As total expresado en porcentaje significa que 1 % equivale a 10,000  $mg \cdot kg^{-1}$

En la Figura 27 se presenta la gráfica de barras de las concentraciones totales esperadas para las muestras compuestas ácidas. La línea representa la tendencia de

<sup>32</sup> El As geodisponible se expresa en  $mg \cdot L^{-1}$  pero se transformó a unidades de  $mg \cdot kg^{-1}$ , con el objetivo de poder calcular el porcentaje de As geodisponible respecto al total, es decir, el porcentaje disponible en el agua de lluvia



cambio del pH. Se observa que todas las muestras compuestas presentaron diferentes concentraciones de As total, tal y como se buscaba, ya que es importante para la evaluación de la repetibilidad. En las muestras ácidas (C-1 a la C-4) hay relación lineal entre el pH y el As total, porque el valor del coeficiente de correlación fue 0.90. La muestra C-5 no se incluyó en la figura, pues no presenta una relación lineal entre el pH y la concentración total.

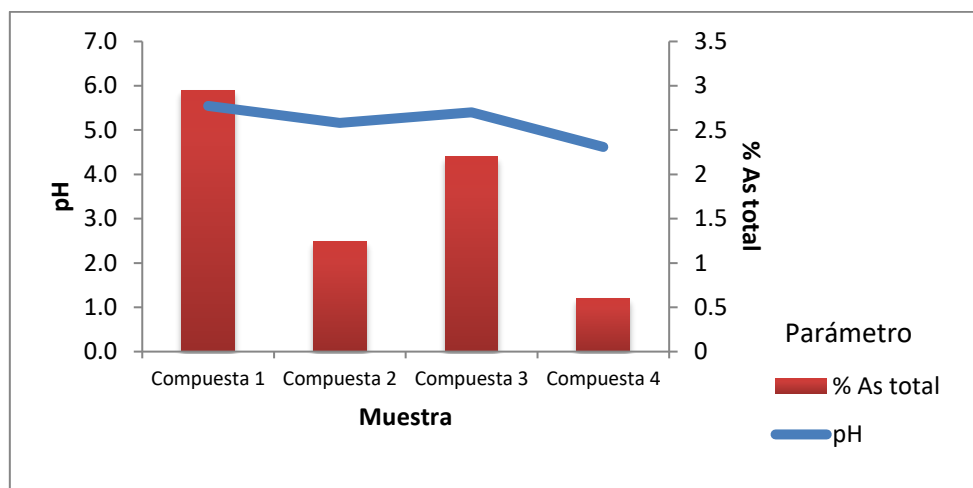


Figura 27. Gráfica de barras del As total y tendencia del pH en las muestras compuestas ácidas

### 3.3.2 Caracterización de las muestras compuestas

#### a. Parámetros generales

En el Cuadro 7 se presentan los parámetros generales obtenidos al analizar las muestras compuestas en el laboratorio. En las muestras C-1, C-2, C-3 y C-4 se observa que el pH es ácido y disminuye gradualmente de 5.8 a 5.2, a diferencia de los valores "esperables" que son ácidos pero no disminuyen gradualmente, aunque sí se encontró una correlación entre estos factores ( $r = 0.90$ ). La muestra C-5, es ligeramente alcalina ( $\text{pH} = 7.5$ ), el pH es un poco más bajo que el obtenido al promediar los valores individuales ( $\text{pH} = 7.9$ ). Estas diferencias posiblemente se deben a reacciones de hidrólisis entre los minerales de los suelos individuales, que suceden durante la agitación.

Con respecto a la C.E., las muestras C-2, C-3 y C-5 se clasifican como suelos con valores muy bajos de salinidad, y las muestras C-1 y C-4 como suelos moderadamente salinos (Clasificación del Cuadro 29 del apéndice A.1).

En la Figura 28, se presenta un diagrama de barras de las concentraciones totales de As, Fe, Ca y K (elementos mayores), obtenidas por FRX. Las concentraciones de los elementos menores (Pb, Zn, Cu, Mn, Cr y Cd) se presentan en la Figura 29. La muestra

C-1 presenta el valor más alto de As total (39,914 mg\*kg<sup>-1</sup>) y de Pb, Zn, Cu y Cd. La muestra C-5 es la que contiene menos As total (4,964 mg\*kg<sup>-1</sup>) y Pb, Zn, Cu, Cr y Cd (Figura 29), y las más alta de Ca y K, lo que explica que el pH sea básico y el As geodisponible sea alto.

Cuadro 7. Valores promedio de los parámetros generales de las muestras compuestas, calculados a partir de las mediciones realizadas en el laboratorio

Muestra	pH	E <sub>Ag/AgCl</sub> (mV)	C.E. dS*m <sup>-1</sup>	A <sub>Stotal</sub> FRX (<250 μm)		A <sub>Sgeodisponible</sub>		% de A <sub>Sgeodisponible</sub> respecto al A <sub>Stotal</sub>
				% *	mg*kg <sup>-1</sup>	mg*L <sup>-1</sup>	mg*kg <sup>-1</sup>	
Compuesta 1	5.8	302.6	2.6	3.99	39,914	51.7	1,034	2.6
Compuesta 2	5.6	260.0	0.9	1.99	19,878	45.7	913	4.6
Compuesta 3	5.3	253.6	0.8	3.25	32,490	142.8	2,855	8.8
Compuesta 4	5.2	269.1	2.5	1.06	10,648	24	480	4.5
Compuesta 5	7.5	195.7	0.8	0.50	4,964	40	801	16.1

\*El As total expresado en porcentaje, significa que 1 % equivale a 10,000 mg\*kg<sup>-1</sup>

Los valores de potencial redox de las muestras compuestas reportados en el Cuadro 7, fueron más altos que los valores calculados a partir de los suelos individuales (Cuadro 6). Esta diferencia se debe posiblemente a que las muestras compuestas se molieron finamente para lograr la homogeneidad deseada, pero al disminuir el tamaño de partícula se aumentó el área superficial y su reactividad. Por lo tanto, aumentó la concentración de sales disueltas y la fuerza iónica de la solución y, consecuentemente el potencial redox<sup>33</sup>. Por ejemplo, el potencial para una solución 1 M de KCl es +192 mV, para una solución 4 M es 228 mV y puede llegar a 236 mV cuando se alcanza la saturación.

<sup>33</sup> Revisado en (<http://www.peroxychem.com/media/179432/peroxychem-peroxygen-talk-2009-3-oxidation-and-reduction-potential-uf.pdf>).

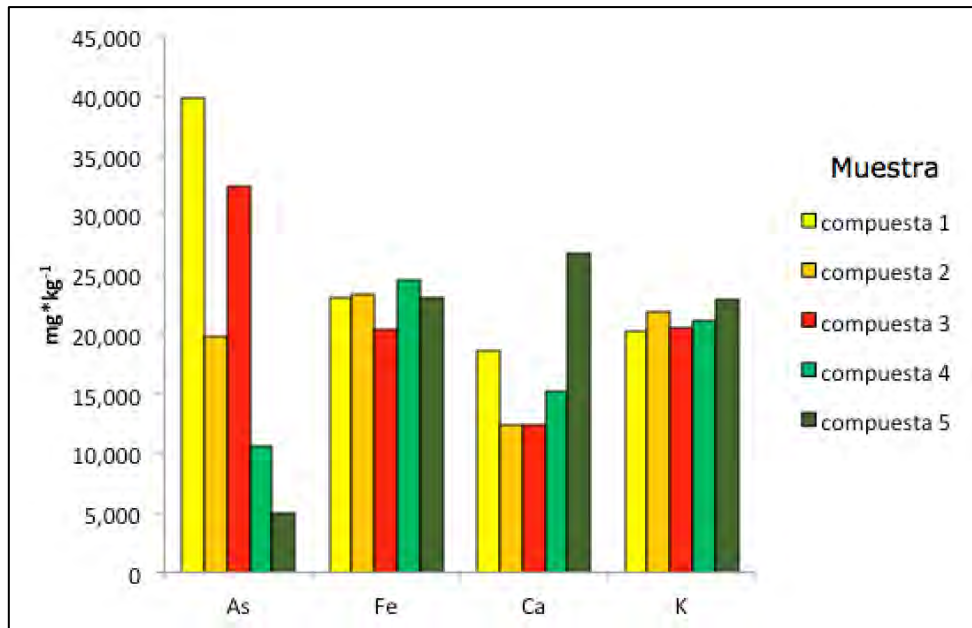


Figura 28. Concentraciones totales de As, Fe, Ca y K en mg\*kg<sup>-1</sup> obtenidas por FRX, de las muestras

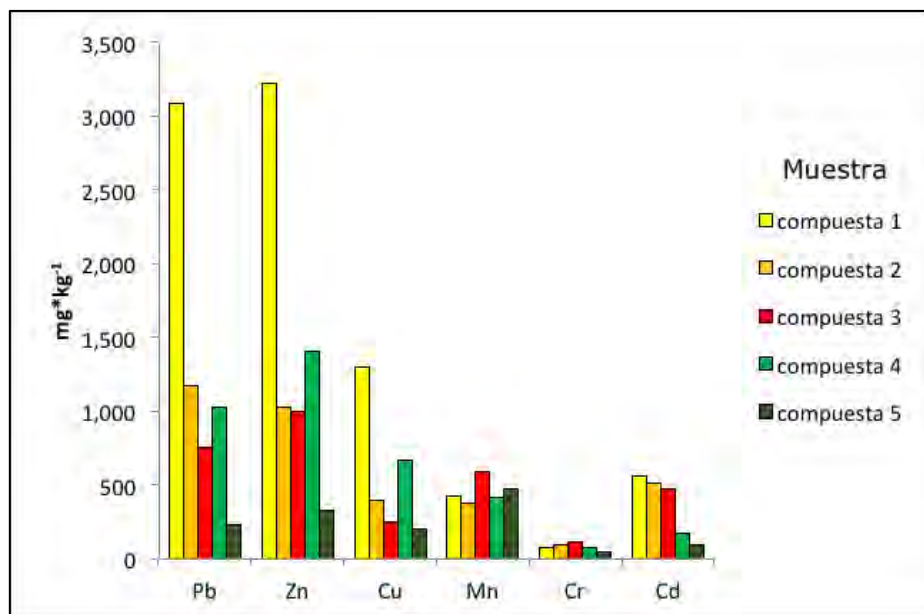


Figura 29. Concentraciones totales de Pb, Zn, Cu, Mn, Cr y Cd en mg\*kg<sup>-1</sup> obtenidas por FRX, de las muestras compuestas de suelo

En el Cuadro 8 se presentan los coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre las concentraciones totales de As, Fe, Ca, K, S, Pb, Zn, Cu, Cr y Cd. Se obtuvo que el As total está correlacionado con las concentraciones totales de Pb ( $r = 0.75$ ), Zn ( $r = 0.74$ ) y Cd ( $r = 0.89$ ). De igual forma, el Pb se correlaciona con el Zn ( $r = 0.98$ ) y el Cu ( $r = 0.96$ ), así como el Zn con el Cu ( $r = 0.98$ ). Estos valores son los esperados

para suelos contaminados con residuos minero-metalúrgicos, pues estos elementos están asociados con los yacimientos polimetálicos.

Cuadro 8. **Coefficientes de correlación "r" de las concentraciones totales de las muestras compuestas**

<i>totales mg*kg<sup>-1</sup></i>	<i>As</i>	<i>Fe</i>	<i>Ca</i>	<i>K</i>	<i>S</i>	<i>Pb</i>	<i>Zn</i>	<i>Cu</i>	<i>Mn</i>	<i>Cr</i>	<i>Cd</i>
As	1										
Fe	-0.52	1									
Ca	-0.44	0.22	1								
K	-0.86	0.30	0.58	1							
S	0.54	0.30	0.18	-0.54	1						
Pb	0.75	0.14	-0.15	-0.71	0.93	1					
Zn	0.74	0.14	-0.15	-0.77	0.94	0.98	1				
Cu	0.58	0.33	-0.03	-0.66	0.97	0.96	0.98	1			
Mn	0.24	-0.87	-0.05	-0.22	-0.39	-0.35	-0.27	-0.41	1		
Cr	0.58	-0.59	-0.91	-0.57	-0.28	0.07	0.06	-0.12	0.36	1	
Cd	0.89	-0.41	-0.61	-0.68	0.36	0.67	0.60	0.44	-0.01	0.70	1

### **b. Fracción geodisponible**

En el Cuadro 9 se presentan los resultados de la geodisponibilidad de los siguientes elementos: As, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Cr, Cd, Ca, K y S, en las muestras compuestas de los suelos. Esta fracción corresponde a iones solubles y a coloides menores de 0.45 µm que se liberan en agua en equilibrio con CO<sub>2</sub> a pH 5.5, conocida como agua meteórica según la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. De acuerdo con Molina *et al.*, (2013), la geodisponibilidad es la fracción más móvil de los EPT's en el ambiente y está relacionada con la bioaccesibilidad de estos elementos en los organismos humanos.

Cuadro 9. Concentraciones geodisponibles de As, Ca, K, S, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Cr y Cd en mg\*L<sup>-1</sup> de las muestras compuestas (ICP-OES)

Elemento mg*L <sup>-1</sup>	As	Ca	K	S	Pb*	Zn	Cu	Fe	Mn	Cr	Cd
C-1	51.7	361.8	32.9	218.2	<L.D.	7.0	3.1	4.4	1.8	2.4	3.6
C-2	45.7	52.5	14.5	32.3	<L.D.	3.6	2.4	2.1	0.8	1.2	3.2
C-3	142.8	56.0	26.5	22.6	<L.D.	3.0	3.4	1.4	1.2	1.5	9.1
C-4	24.0	254.2	39.3	148.1	<L.D.	13.4	2.2	1.1	3.9	4.5	2.8
C-5	40.0	72.6	21.5	21.5	<L.D.	1.0	0.8	< L.D.*	0.2	0.2	2.7
mínimo	24.0	52.5	14.5	21.5		1.0	0.8	1.1	0.2	0.2	2.7
máximo	142.8	361.8	39.3	218.2		13.4	3.4	4.4	3.9	4.5	9.1
media	60.8	159.4	26.9	88.5	N.A.	5.6	2.4	2.3	1.6	2.0	4.3
mediana	45.7	72.6	26.5	32.3		3.6	2.4	1.8	1.2	1.5	3.2
desviación estándar	47.0	141.1	9.7	90.0		4.9	1.0	1.5	1.4	1.6	2.7

\* Límites de detección (L.D.) de Pb y Fe = 0.1 mg\*L<sup>-1</sup>

El valor más alto de As geodisponible lo presentó la muestra C-3 ( $142.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), aunque en porcentaje no es la más alta. En el difractograma<sup>34</sup> de esta muestra, se identificaron señales correspondientes a  $\text{As}_2\text{O}_3$  y picos intensos que corresponden a cuarzo y plagioclasa (Figura 30). La concentración de As geodisponible más baja fue de la muestra C-4 ( $24.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). En % de As geodisponible, la muestra C-5, ligeramente básica ( $\text{pH} = 7.5$ ), es la que liberó más arsénico (16.1 %) (Cuadro 7, Figura 30), posiblemente se debe a la presencia de arsenolita como especie dominante, aunque no se detectó este mineral por DRX en la muestra C-5, posiblemente por la baja concentración de As total. En general, los suelos que contienen  $\text{As}_2\text{O}_3$  presentan una mayor solubilidad y su presencia es posible, pues en el terreno contaminado, funcionó una planta que producía arsenolita. Posiblemente el clima tan seco de la región, en donde se ubica el sitio contaminado (precipitación anual  $< 400 \text{ mm}$ ), evitó la oxidación del As (III) a As (V), que es la especie que se predice en el equilibrio, con base en los valores de pH y pE (Diagrama de Pourbaix, Figura 31).

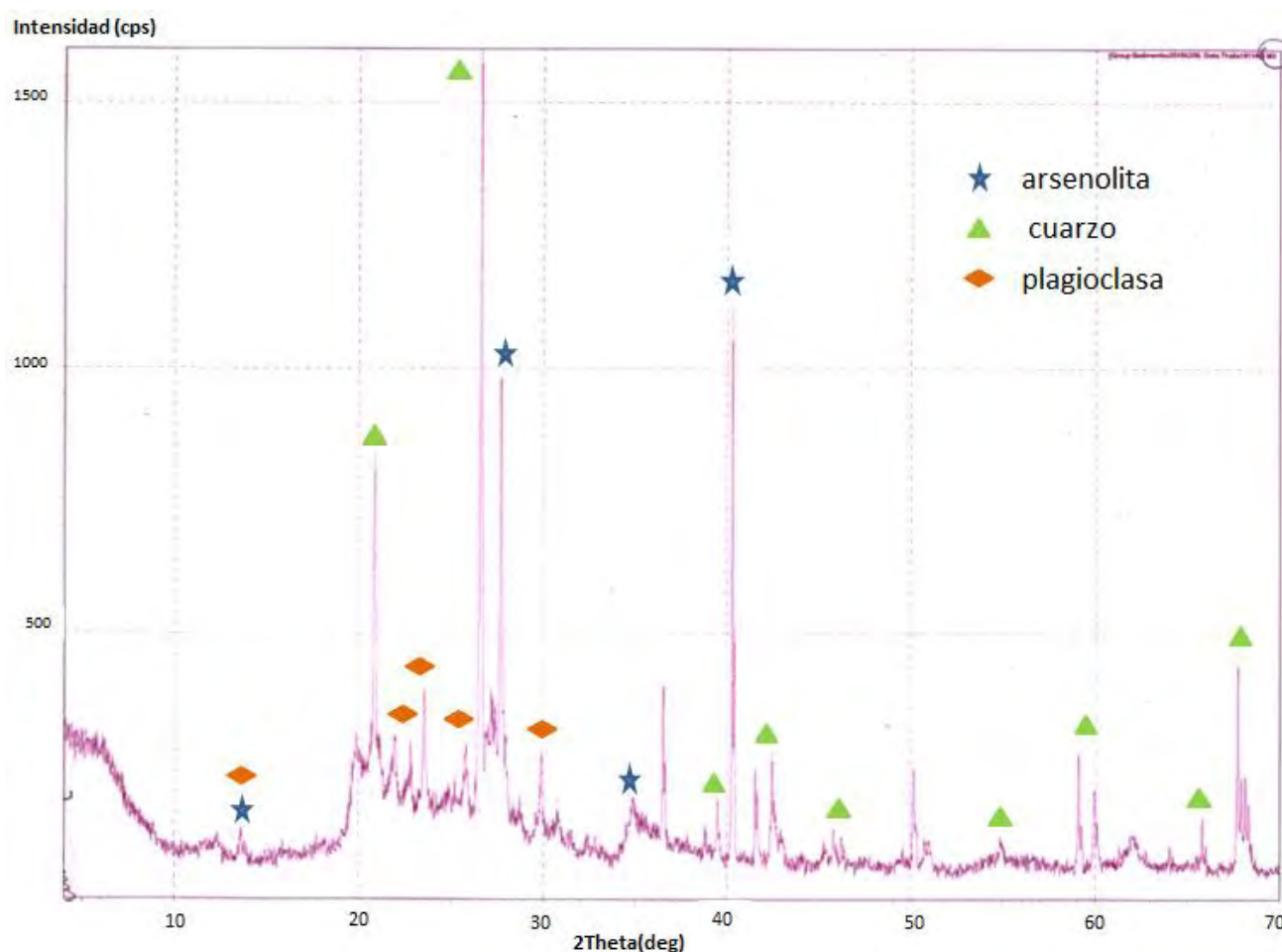


Figura 30. Difractograma de la muestra Compuesta 3, obtenido con el equipo Shimadzu XRD en el Instituto de Geología

<sup>34</sup> El análisis del difractograma lo realizó la Dra. Teresa Pi Puig del Instituto de Geología

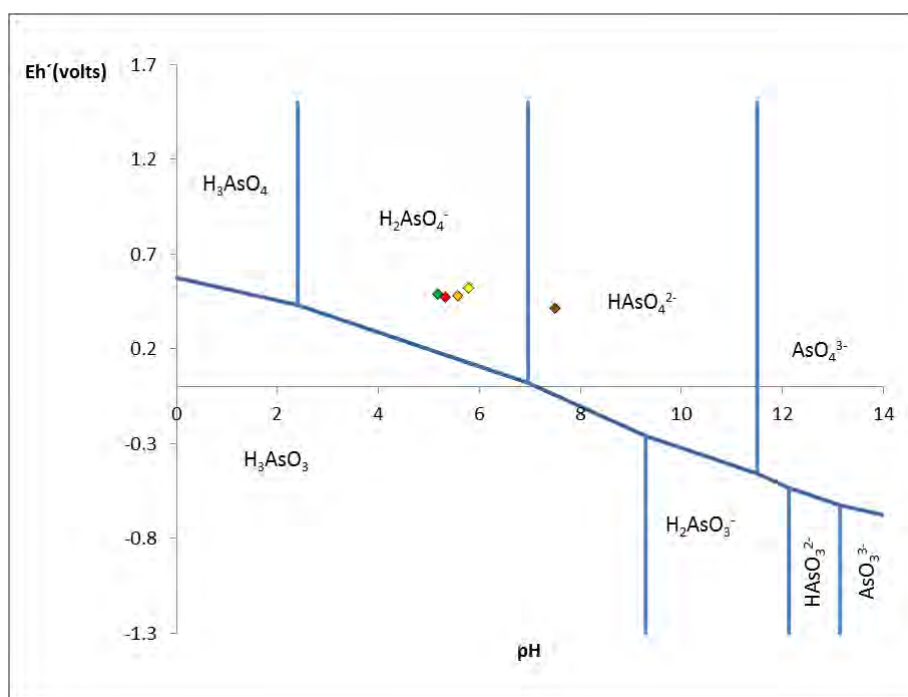


Figura 31. Diagrama de Pourbaix para As (1 M). Se presentan los intervalos de valores de Eh', pH y las especies dominantes de arsénico, con los datos experimentales de las muestras compuestas (rombos)

Los valores de geodisponibilidad reportados en el Cuadro 9, se presentan en forma de diagrama de barras en las Figuras 32 y 33. Las cantidades de As, Cu y Cd totales, que se determinaron en la muestra compuesta C-3, son los más altos, pero no así la concentración de Ca, K, Zn, Fe, Mn, Cr. La muestra C-5 presenta los valores más bajos de todos los elementos, excepto de As, Ca y K porque los valores son similares al resto de las muestras, sin considerarse a la C-3.

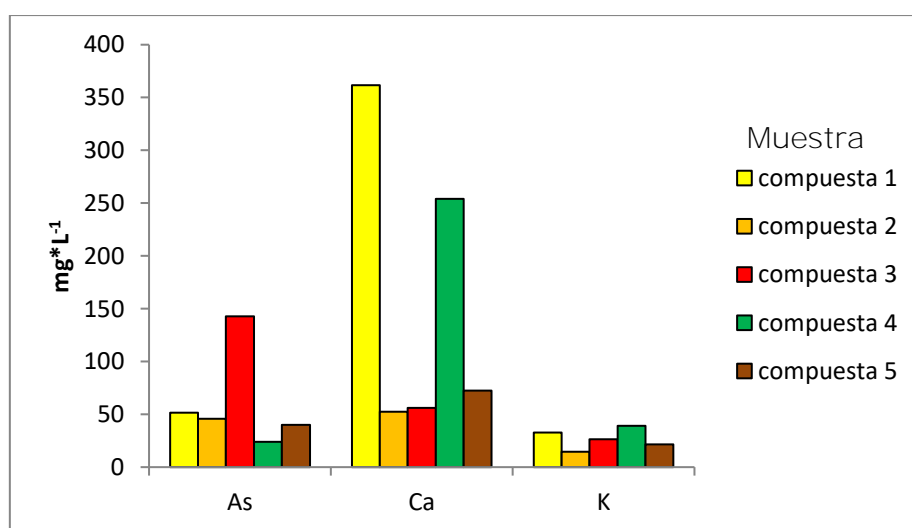


Figura 32. Gráfica de columnas de las concentraciones geodisponibles de As, Ca y K en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para las muestras compuestas, obtenidas por ICP-OES

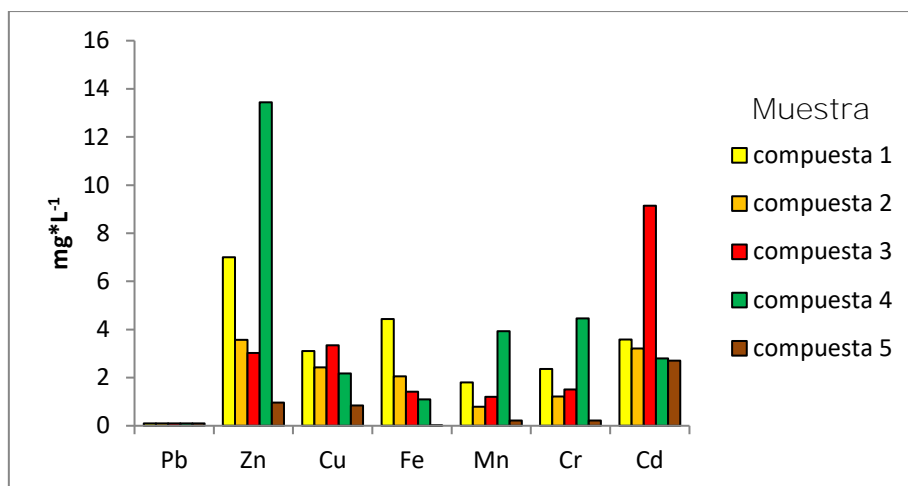


Figura 33. Gráfica de columnas de las concentraciones geodisponibles de Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Cr y Cd en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para las muestras compuestas, obtenidas por ICP-OES

### 3.4 Determinación de la aceptabilidad del equipo LABQA-2014

#### 3.4.1 Comparación de la repetibilidad obtenida con los equipos de agitación (método PBET modificado fase gástrica) y selección de los equipos con mayor precisión

Se utilizó la muestra 015-14 cuyo contenido<sup>35</sup> de As total fue el más bajo ( $131 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Los resultados de las concentraciones de As extraído y de repetibilidad se presentan en el Cuadro 10, señalando el tipo de agitación y el gas utilizado.

Cuadro 10. Determinación de As en la muestra 015-14 utilizando todos los equipos y el método PBET modificado (fase gástrica)

equipo <sup>36</sup>	tipo de agitación	gas	muestra	As $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$					% C.V.
				Rep 1	Rep 2	Rep 3	promedio	desviación estándar	
NOM-147	axial	ninguno	015-14	0.26	0.28	0.29	0.28	0.02	4.8
PBET	gas	argón	015-14	0.22	0.25	0.21	0.23	0.02	8.5
LABQA-2011	magnética y gas	argón	015-14	0.19	0.24	0.27	0.23	0.04	17.1
LIQ	orbital	aire	015-14	0.28	0.67	0.24	0.40	0.24	60.3
LABQA-2014	gas	argón	015-14	0.28	0.25	0.27	0.27	0.02	4.9

Como se observa en el Cuadro 10, los valores de % C.V. más bajos fueron los obtenidos utilizando los equipos NOM-147 (4.8 %) y LABQA 2014 (4.9 %). Por lo tanto, estos dos equipos presentan los mejores valores de repetibilidad y se

<sup>35</sup> El experimento se realizó con una muestra de concentración relativamente baja de As, para que fuera más estricto su análisis

<sup>36</sup> El nombre de estos equipos se designó desde la introducción

comprueba que el equipo LABQA-2014 es adecuado para utilizarse en la determinación de la bioaccesibilidad y a diferencia del NOM-147 permite la adición de reactivos sin detener el proceso. En la Figura 34 se presentan los valores promedio de As en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , en donde también se puede observar que las menores desviaciones estándar corresponden a los equipos NOM-147 y LABQA-2014.

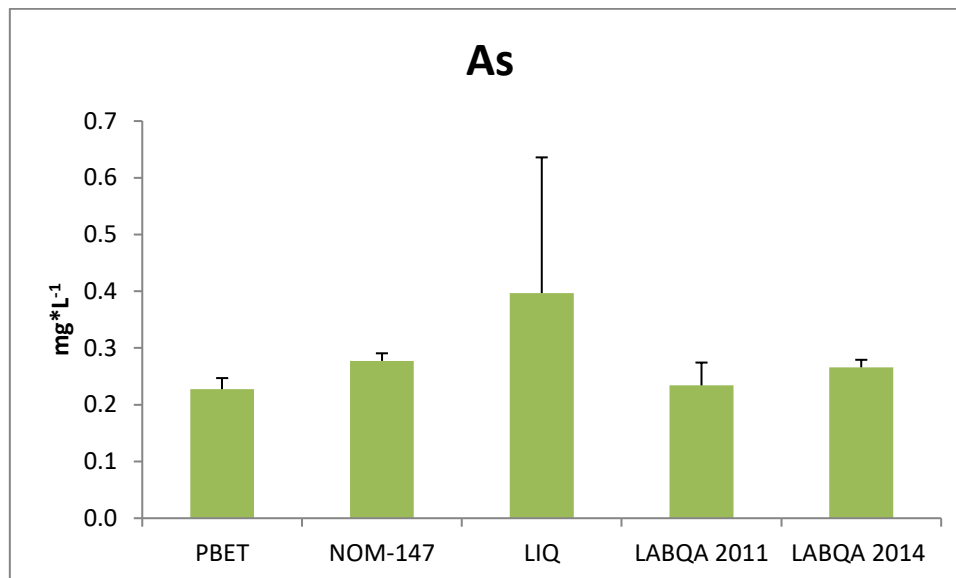


Figura 34. Diagrama de barras de los valores promedio de As bioaccesible obtenidos con los equipos de agitación disponibles

El equipo PBET que funciona en el Instituto de Geología de la UNAM presentó una alta variabilidad (% C.V = 8.5), de casi el doble que en los equipos LABQA-2014 (4.9 %) y NOM-147 (4.8 %). Los otros equipos evaluados (LABQA-2011 y LIQ) obtuvieron valores de %C.V. más altos (17.1% y 60.3%), por lo que resultaron ser los menos adecuados para la determinación de bioaccesibilidad, con una precisión aceptable (Figura 34).

### 3.4.2 Evaluación de la repetibilidad del equipo LABQA-2014 utilizando todos los reactores

Una vez que se aprobó el uso del equipo LABQA 2014, se determinó la repetibilidad de As extraído de la muestra C-4 ( $\text{As total} = 10,648 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) con el método PBET modificado durante la fase gástrica. El experimento se realizó en los 8 reactores del equipo, se llevaron a cabo en tres pruebas independientes, en 3 diferentes días de 3 semanas consecutivas (Cuadro 11).

Las concentraciones promedio de As extraído en cada prueba independiente fueron en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ : 42.1 (A), 41.6 (B) y 40.8 (C) (Cuadro 11). El % C.V. de las dos primeras pruebas (A y B) fue del 3.0 %, mientras que para la última fue de 0.7 %. En conclusión, se obtuvo que los % de C.V. de los resultados, entre reactores y días para el equipo LABQA-2014 fue menor o igual a 3 %, que es un excelente valor.



Cuadro 11. Porcentajes del coeficiente de variación (% C.V.) en la determinación de As extraíble de la muestra C-4, con el método PBET modificado-fase gástrica, utilizando el equipo LABQA-2014

Reactor	As mg*L <sup>-1</sup>		
	Día A-semana 1	Día B-semana 2	Día C-semana 3
1	41.0	41.0	40.0
2	42.4	42.1	40.7
3	40.5	40.9	40.9
4	42.0	41.9	40.7
5	41.0	40.3	40.6
6	44.1	42.5	41.1
7	43.2	40.2	40.4
8	43.0	43.8	42.4
As promedio	42.1	41.6	40.8
desviación estándar	1.3	1.2	0.7
% C.V.	3.0	3.0	1.7

### 3.4.3 Evaluación de la influencia del gas y los reactivos orgánicos en la precisión (reproducibilidad<sup>37</sup>) del equipo LABQA-2014:

#### a) Tipo de gas (método PBET modificado, fase gástrica<sup>38</sup>)

Dabin *et al.*, (2012) sugieren que el gas más adecuado para la agitación, es el que simula las condiciones fisiológicas que imperan en el sistema digestivo humano (ambiente aerobio en el estómago y anaerobio en el intestino); y que además, su costo sea aceptable. Es importante considerar, que no hay información en la bibliografía internacional sobre el efecto del tipo de gas en la agitación, ni de cómo afecta en la precisión de las determinaciones.

Para contar con datos sobre la variación en los resultados, se probaron dos gases: argón 4.8 plasma de alta pureza (condiciones anaerobias) y aire libre de hidrocarburos (condiciones aerobias). En ambos casos, se determinó el As extraído en la muestra C-4 (alta concentración de As = 10,648 mg\*kg<sup>-1</sup>) y 015-14 (baja concentración de As = 131 mg\*kg<sup>-1</sup>).

La muestra C-4 con mayor concentración de As presentó la mejor precisión con ambos gases, especialmente con Ar (% C.V= 0.4), mientras que con el suelo 015-14 se obtuvieron valores superiores de los % C.V. para ambos gases. No obstante, con aire

<sup>37</sup> La reproducibilidad se determinó en LABQA bajo condiciones específicas que se explican con la modificación de algunos factores en el método PBET

<sup>38</sup> Método PBET modificado (fase gástrica): Solución HCl pH 1.5, agitación 1 hora, relación suelo-solución (1:100), tamaño de partícula < 250 µm

el % C.V fue mayor que con argón (7.5% y 5.7%, respectivamente). La diferencia entre las dos muestras de suelo se explica por la diferente concentración de As, especialmente de la cantidad extraíble, la cual para el suelo 015-14 fue cercana al límite de detección ( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Cuadro 12).

Cuadro 12. Determinación de As extraído con el método PBET modificado (fase gástrica), utilizando aire y argón en el equipo LABQA 2014

muestra	gas de agitación	As extraído $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			promedio de As extraído $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	% C.V.
C-4	aire	39.84	41.25	40.45	40.51	1.7
C-4	argón	40.28	40.58	40.52	40.46	0.4
015-14	aire	0.25	0.28	0.29	0.27	7.5
015-14	argón	0.28	0.25	0.27	0.27	5.7

Debido a que con argón se obtuvieron los mejores valores de precisión (Cuadro 12), se eligió este gas para llevar a cabo las pruebas de bioaccesibilidad. Sin embargo, la diferencia entre el uso de ambos gases no es estadísticamente significativa, ya que al aplicar la prueba t-student, con un 95% de confianza se aceptó la hipótesis nula ( $H_0$ ), es decir que la media del método PBET modificado (fase gástrica) con argón, no difiere de la media del mismo método utilizando gas aire en la agitación (Cuadro 34, apéndice A.3); por lo que si no se cuenta con argón, es posible utilizar aire, lo cual reduce los costos de la determinación de la bioaccesibilidad.

### **b) Influencia de los reactivos orgánicos utilizados en el método PBET modificado (fases gástrica e intestinal) y en el método PBET original (muestra C-4 y equipo LABQA-2014)**

Los métodos: PBET modificado y PBET original propuesto por Ruby *et al.* (1993), se diferencian por los reactivos que utilizan. A continuación se explican estas diferencias.

Método PBET modificado. Se prepara una suspensión del suelo 1:100 (sólido: líquido) con un tamaño de partícula  $< 250 \mu\text{m}$  y una solución de HCl a  $\text{pH } 1.50 \pm 0.05$ . Se coloca en el equipo y se agita durante una hora con gas argón (fase gástrica). Posteriormente, se aumenta el pH a  $7.00 \pm 0.05$  (fase intestinal), con una solución de  $\text{NaHCO}_3$  y se mantiene en agitación durante tres horas<sup>39</sup>.

<sup>39</sup> Las fases gástrica e intestinal se realizaron de manera consecutiva, al terminar la fase gástrica se da seguimiento a la fase intestinal en ambos métodos PBET

Método PBET original. El procedimiento es similar al descrito para el método PBET modificado, aunque en este caso se adicionan a la fase gástrica ácidos láctico, málico y acético, así como pepsina; y en la fase intestinal sales biliares y pancreatina.

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se presentan en los Cuadros 13 y 14. En el Cuadro 13 se observa que durante la fase gástrica la diferencia en los valores del As extraído no es estadísticamente significativa al 95 % de confianza, a pesar de que los métodos utilizan diferentes reactivos; ya que la prueba de t-student indicó que el valor de  $t_{\text{calculado}}$ (0.939) es menor que  $t_{\text{tablas}}$ (2.776) (ver Cuadro 36 del apéndice A.3). Sin embargo, la precisión es diferente entre ambos métodos. Para el método PBET modificado el %C.V. fue 0.4 y para el método PBET original fue 2.2%. Aunque ambos son valores aceptables, se observa que el uso de reactivos orgánicos disminuye la precisión.

Cuadro 13. Comparación del % C.V. obtenido en la determinación del As extraído de la muestra C-4 por triplicado, durante la fase gástrica (métodos PBET original y PBET modificado), utilizando el equipo LABQA 2014

Muestra	Método	As extraído $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	As promedio $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	As extraído $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	As promedio $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	% C.V.	% As extraído respecto al total
Blanco	PBET modificado	<L.D.	40.5	N.A.	4,046	0.4	38.0
C-4 (1)		40.28		4,028			
C-4 (2)		40.58		4,058			
C-4 (3)		40.52		4,052			
Blanco	PBET original	<L.D.	40.0	N.A.	4,004	2.2	37.6
C-4 (1)		39.39		3,939			
C-4 (2)		41.02		4,102			
C-4 (3)		39.7		3,970			

Notas: el L.D. de As es  $0.19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  y la concentración de As total de la muestra C-4 es  $10,648 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

Respecto a la fase intestinal, en el Cuadro 14 se observa que con el método PBET modificado, en el cual no se adicionan reactivos orgánicos, la concentración promedio de As extraída fue  $34.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $3,430 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) que equivale a un 32.2% respecto al As total y el % C.V. fue de 3.8.

La concentración promedio obtenida con el método PBET original, fue de  $42.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $4,211 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) que equivale a 39.5 % respecto al As total y el % C.V. fue 2.9. Al comparar los resultados de la fase intestinal obtenidos utilizando los métodos PBET original y PBET modificado, se observa que cuando se utilizan reactivos orgánicos, la concentración de As recuperada es mayor. Esta diferencia posiblemente se relacione con una mayor solubilidad de los compuestos arseno-orgánicos que la de los

inorgánicos, bajo las condiciones de pH y pE de la prueba que simulan el ambiente intestinal.

Estadísticamente, la diferencia entre los dos métodos PBET en la fase intestinal, es significativa al 95 % de confianza. La prueba de t-student indica que el valor de  $t_{\text{calculado}}$  (7.372) es mayor que el valor de  $t_{\text{tablas}}$  (2.776), por lo que se rechaza la hipótesis nula de que la media del método PBET original-fase intestinal es igual a la media del método PBET modificado-fase intestinal.

Cuadro 14. Concentración de As extraído en la fase intestinal, con el método PBET original y modificado, en el equipo LABQA 2014

Muestra	método	As extraído mg*L <sup>-1</sup>	As promedio mg*L <sup>-1</sup>	As extraído mg*kg <sup>-1</sup>	As promedio mg*kg <sup>-1</sup>	% C.V.	% As extraído respecto al total
Blanco	PBET modificado	<L.D.	34.3	<L.D.	3,430	3.8	32.2
C-4 (1)		32.81		3,281			
C-4 (2)		35.13		3,513			
C-4 (3)		34.96		3,496			
Blanco	PBET original	<L.D.	42.1	<L.D.	4,211	2.9	39.5
C-4 (1)		41.28		4,128			
C-4 (2)		41.57		4,157			
C-4 (3)		43.49		4,349			

Notas: el L.D. de As es 0.19 mg\*L<sup>-1</sup> y el As total de la muestra C-4 es 10,648 mg\*kg<sup>-1</sup>

En la Figura 35, se puede observar que aunque los % C.V. en los dos métodos probados fueron aceptables (< 5 %), la precisión del método PBET modificado fue mejor que la del método original. Respecto a la comparación entre las dos fases gástrica e intestinal, fue en la primera donde se obtuvieron los mejores valores de la precisión medida como % C.V.; y de ambos métodos el mejor valor se logró con el método modificado, en el que únicamente se adiciona HCl a pH 1.5, pero es el que simula menormente el proceso gastrointestinal. En la fase intestinal, el método más preciso fue el PBET original.

Estos resultados pueden deberse a que la extracción en medio ácido (fase gástrica) es más sencilla que en medio básico (fase intestinal). Cuando se comparan las precisiones obtenidas con los dos métodos en la fase intestinal, se observa que los reactivos orgánicos que se adicionan en el método PBET original, posiblemente mejoran la precisión debido a la formación de soluciones amortiguadoras. Al adicionar la solución de bicarbonato de sodio hasta un pH de 7 sin mantener un control continuo (método PBET modificado que no utiliza reactivos orgánicos), la basicidad aumenta hasta cerca

de 9, mientras que en el caso del método PBET original, en el cual si se adicionan reactivos orgánicos, solamente aumenta a 8.

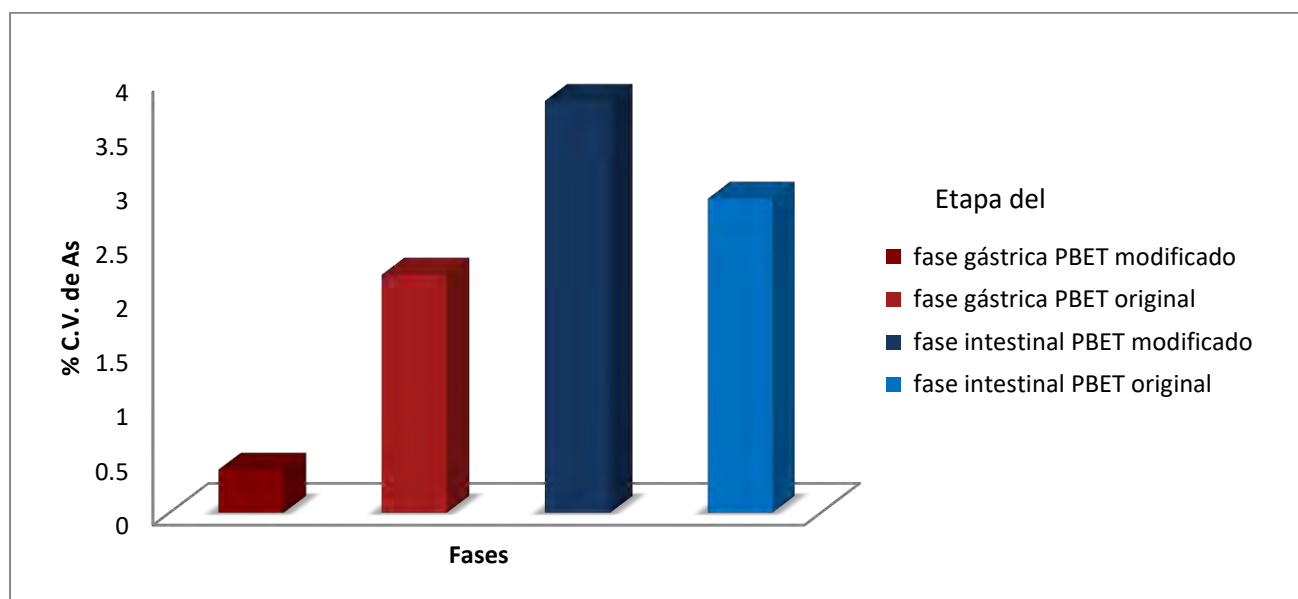


Figura 35. Porcentajes de C.V. de la determinación del As bioaccesible, con los métodos PBET original y modificado (fases gástrica e intestinal) en el equipo LABQA 2014

Al realizar la prueba de t-student, considerando que la hipótesis nula ( $H_0$ ) es que la media de las concentraciones de la fase gástrica de los dos métodos PBET-original y PBET-modificado son iguales; se obtuvo que se acepta la  $H_0$  al 95 % de confianza, porque el valor de  $t_{calculado}(0.94)$  es menor que el valor de  $t_{tablas}(2.776)$ . Sin embargo, en la fase intestinal la diferencia entre los dos métodos es estadísticamente significativa al 95 % de confianza, ya que el valor de  $t_{calculado}(7.37)$  es mayor que el valor de  $t_{tablas}(2.78)$ .

Cuando se compararon los resultados de las concentraciones extraídas en la fase gástrica (ambos métodos) con la fase intestinal (ambos métodos) se observa que: a) la fracción intestinal obtenida con el PBET modificado es diferente a todos los demás resultados obtenidos y b) la fase intestinal del método PBET original no es estadísticamente diferente a los resultados de la fase gástrica ( $t_{calculado}=2.43$  y  $t_{tablas}=2.78$ ). Sin embargo, este resultado indica que no es necesaria la inclusión de la fase intestinal, no puede generalizarse, pues las pruebas se realizaron utilizando una única muestra de suelo. En el siguiente apartado se presentan los resultados del análisis de 3 muestras y en la Sección 3.6 se presentan los resultados del análisis estadístico realizado con datos de 83 muestras de suelo.

### 3.4.4 Evaluación comparativa de la repetibilidad de la bioaccesibilidad de As en 3 muestras compuestas utilizando dos equipos y dos métodos

#### a. Repetibilidad determinada utilizando 3 muestras, y el equipo LABQA-2014 y el método PBET original (fases gástrica e intestinal)

Esta prueba se realizó con el método PBET original y el equipo LABQA-2014, utilizando las muestras C-3, C-4 y C-5. Las mediciones se llevaron a cabo por duplicado, con un blanco y un blanco adicionado; con el objeto de contar con datos de repetibilidad utilizando más muestras que en el experimento anterior para poder comparar los resultados obtenidos, con los del método y equipo NOM-147 (PBET modificado).

En el Cuadro 15 se observa que en la fase gástrica, los valores de DPR de las muestras variaron de 1.3 a 6.2 %; mientras que en la fase intestinal, de 1.4 a 8.5 %, lo cual es un resultado similar al obtenido en los experimentos anteriores. No obstante, en esta prueba se observó que la muestra ligeramente básica (C-5) presenta mejor repetibilidad en la fase intestinal (medio básico) que en la fase gástrica (medio ácido), y viceversa; las muestras ácidas (C-1 a C-4) obtuvieron mejor repetibilidad en la fase gástrica que en la intestinal, lo cual podría estar relacionado con reacciones ácido-base.

Cuadro 15. Bioaccesibilidad de As, determinada con el método PBET original y equipo LABQA-2014, DPR y cálculo de las CE<sub>T</sub> de remediación

Muestra	As total mg*kg <sup>-1</sup>	As bioaccesible <i>fase gástrica</i>			Parámetros para calcular concentración objetivo		As bioaccesible <i>fase intestinal</i>			Parámetros para calcular concentración objetivo	
		mg*kg <sup>-1</sup>	%	DPR	BA	CE <sub>T</sub> (mg*kg <sup>-1</sup> )	mg*kg <sup>-1</sup>	%	DPR	BA	CE <sub>T</sub> (mg*kg <sup>-1</sup> )
C-3	32,490	11,655	36	1.3	0.36	61	15,225	47	8.3	0.47	47
C-4	10,648	4,004	38	2.3	0.38	58	4,211	40	3.0	0.40	55
C-5	4,964	2,735	55	6.2	0.55	40	2,216	45	1.4	0.45	49

BA (adimensional) = As bioaccesible/ As total

CE<sub>T</sub> = (concentración de referencia total 22 mg\*kg<sup>-1</sup>) / BA según la NOM-147

Se observó que la muestra C-3 (en la que se identificó la presencia de arsenolita), la cantidad de As recuperada en la fase intestinal (15,225 mg\*kg<sup>-1</sup>) es mayor que en la fase gástrica (11,655 mg\*kg<sup>-1</sup>). Este resultado se puede deber a que la arsenolita se disuelve en soluciones alcalinas formando arsenitos y, en cambio, es menos soluble en ácidos, incluyendo al HCl (Greenwood *et al.*, 1997).

Asimismo, este resultado indica la importancia de determinar la bioaccesibilidad incluyendo las dos fases y no solamente la fase gástrica como lo indica la NOM-147, especialmente en suelos que puedan contener arsenolita.

### **b. Repetibilidad determinada utilizando 3 muestras, y el método y equipo NOM-147 (fase gástrica)**

La prueba se llevó a cabo usando las muestras compuestas (C-3, C-4 y C-5) y los análisis por duplicado, con un blanco y un blanco adicionado. Los resultados se presentan en el Cuadro 16, en el que se observa que la repetibilidad cumple con el criterio de aceptación, ya que los valores de DPR son mucho menores al 20%.

Cuadro 16. Bioaccesibilidad de As determinada con el método y equipo NOM-147, DPR y cálculo de las  $CE_T$  de remediación

Muestra	As total $mg \cdot kg^{-1}$	As bioaccesible <i>fase gástrica</i>			Parámetros para calcular concentración objetivo	
		$mg \cdot kg^{-1}$	%	DPR	BA	$CE_T$ ( $mg \cdot kg^{-1}$ )
C-3	32,490	12,283	38	4.4	0.38	58
C-4	10,648	3,816	36	0.4	0.36	61
C-5	4,964	3,000	60	3.5	0.60	37

(\*) El % de As bioaccesible se calculó como % As extraído, tomando como 100% la concentración de As total de FRX

### **c. Cálculo de la concentración específica total de acuerdo a la NOM-147**

Los valores de bioaccesibilidad expresados como BA (% As bioaccesible/100) se emplean en el cálculo de la concentración específica total ( $CE_T$ ), que es el cociente entre la concentración de referencia total ( $CR_T$ ) y el BA. El valor de  $CE_T$  corresponde a una de las concentraciones de remediación de suelos, que se indica en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, cuando hay población expuesta.

Al comparar los valores de  $CE_T$  calculados con base en el As bioaccesible, se observa que la tendencias de las concentraciones (fracción gástrica) para las tres muestras, utilizando ambos métodos (PBET y NOM-147) son análogas, pero la fracción intestinal difiere siendo mayor en la muestra C-3 (Figura 36).

Asimismo, en la Figura 36 b, se presentan las tendencias de las concentraciones específicas totales que se calcularon con base en los valores de bioaccesibilidad, se observa que la fracción intestinal no sigue la misma tendencia que las fracciones gástricas. Este resultado también fundamenta la necesidad de calcular la fracción intestinal, pues aunque en las muestras con pH ácido las concentraciones específicas totales son menores que cuando se utiliza la fracción gástrica, en el caso de la muestra con pH básico el resultado es el opuesto, pues los valores de remediación son más exigentes, lo cual es congruente con el hecho de que la fracción geodisponible del As en esta muestra es la más alta.

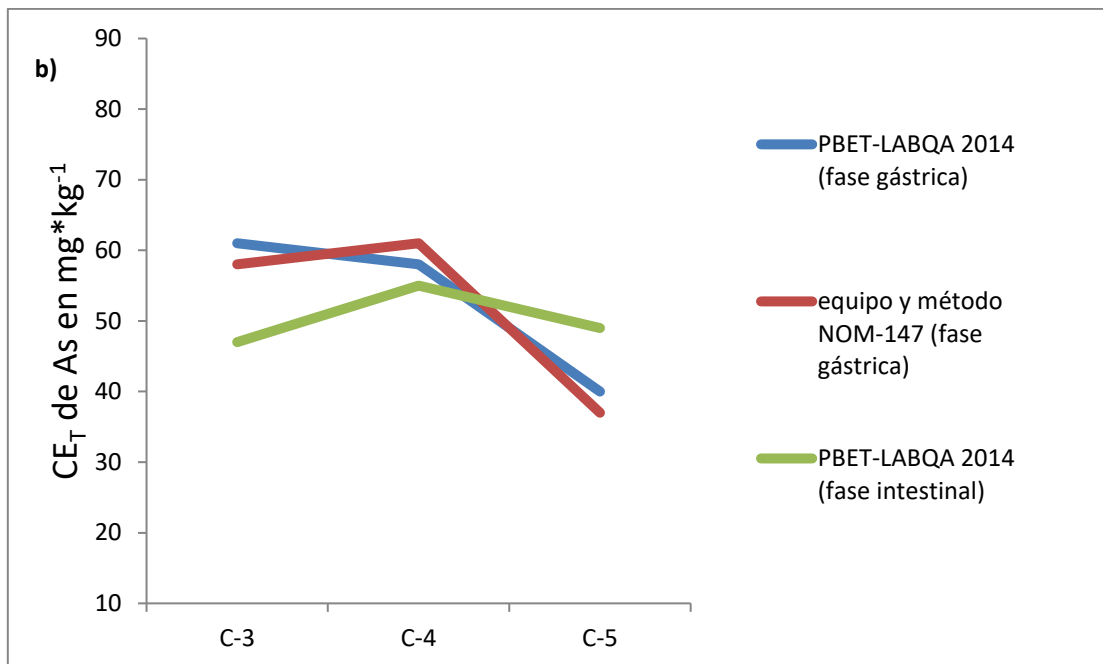
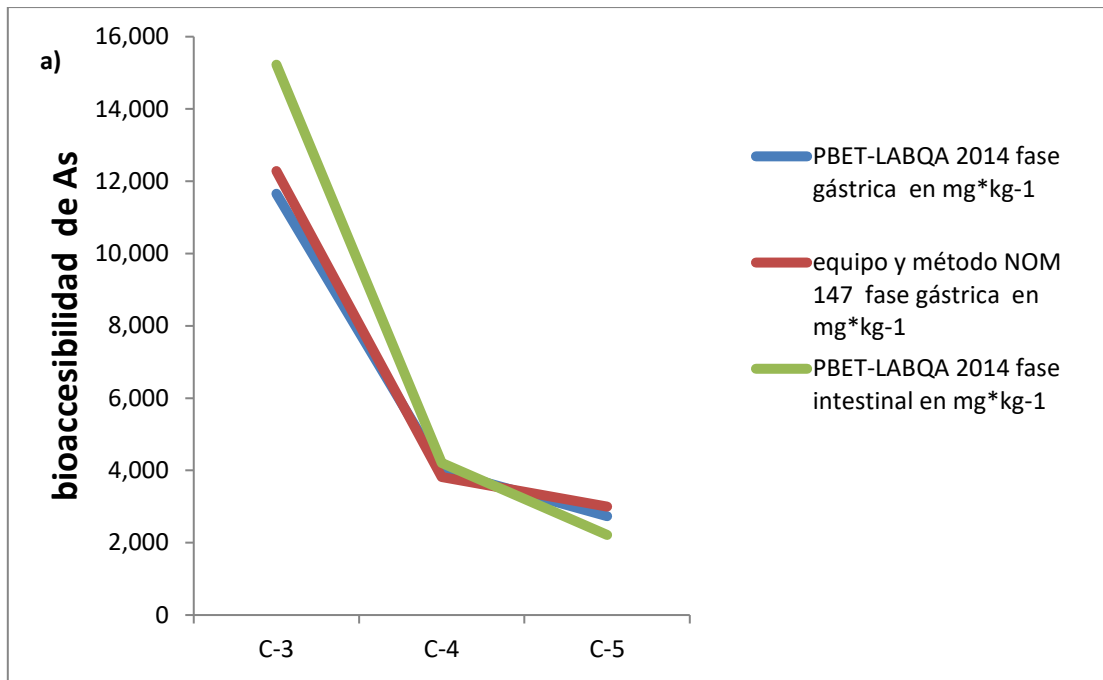


Figura 36. Tendencias de tres muestras compuestas en: a) bioaccesibilidad de As con dos métodos y equipos y b) CE<sub>T</sub> de remediación de acuerdo con la NOM-147

En la Figura 37 a, se presentan los diagramas de barras en que se comparan los valores de As bioaccesible y las CE<sub>T</sub> obtenidas de las muestras C-3, C-4 y C-5. Se observa que la fase intestinal difiere de la fase gástrica, especialmente para la muestra C-3, que es la que presenta mayor concentración de As bioaccesible y en la que se identificó arsenolita, -lo cual como ya se comentó, se explica por la mayor solubilidad del As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en medio básico del intestino delgado-. La CE<sub>T</sub> calculada con base en los resultados obtenidos con el método PBET (fase intestinal) es la más exigente (47 mg\*kg<sup>-1</sup>), lo cual es congruente con un mayor riesgo (Figura 37 b).



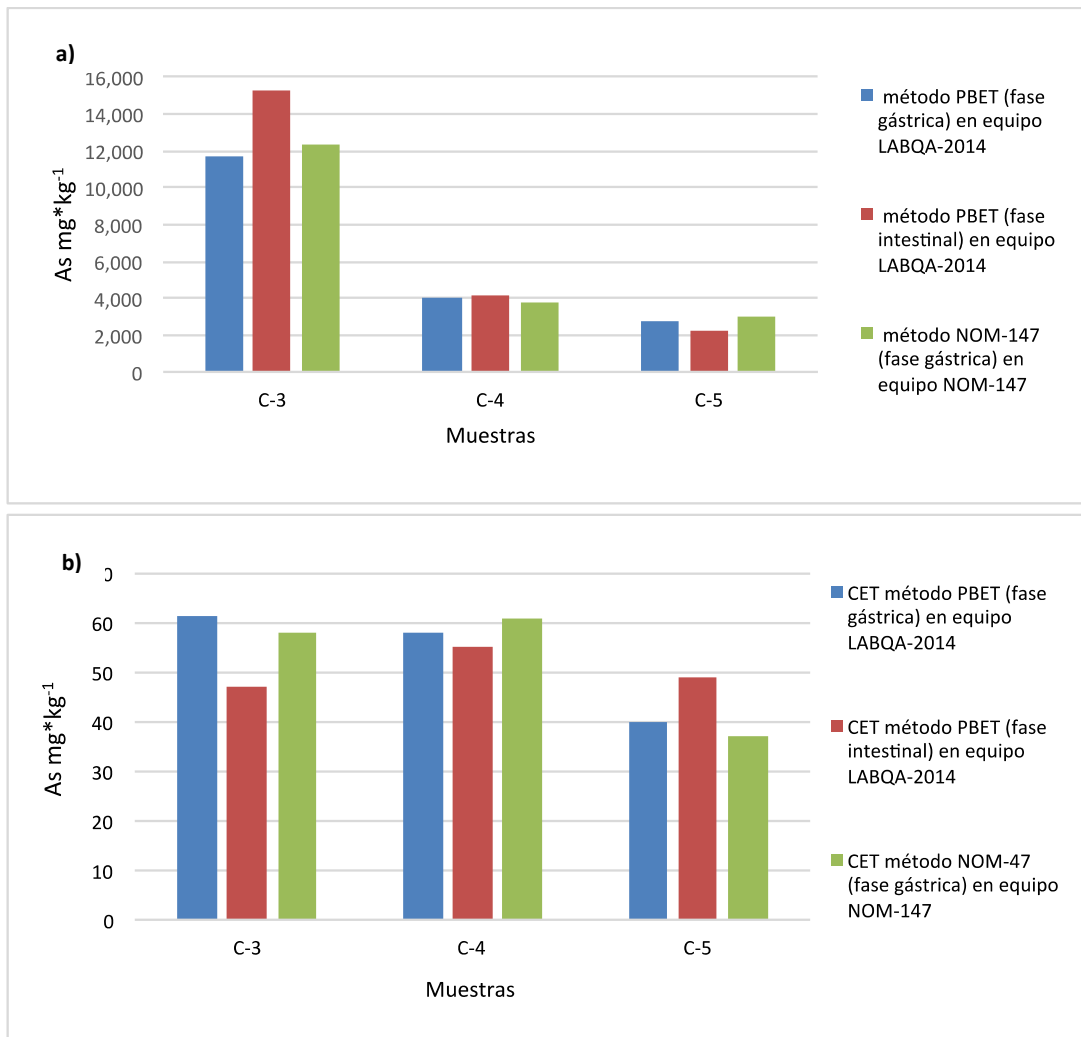


Figura 37. Diagramas de barras: a) concentraciones de As bioaccesible por el método y equipo NOM-147, y el método PBET original y el equipo LABQA 2014 y b) concentraciones específicas totales para la remediación de suelos contaminados, calculadas con base en las concentraciones bioaccesibles

Cabe señalar que la ecuación para calcular la  $CE_T$  presenta limitaciones, ya que se basa en considerar el valor máximo permisible, bajo un escenario de máximo riesgo, en que todo el As presente en la muestra es soluble ( $22 \text{ mg*kg}^{-1}$ ) y su división entre el valor de BA, que es el porcentaje de As bioaccesible entre 100 (García, 2013). La ecuación de  $CE_T$  tiende a calcular valores menos exigentes a muestras cuyo porcentaje de bioaccesibilidad es mayor. Por ejemplo, en este caso, el nivel de limpieza de la muestra C-3 sería de  $58 \text{ mg*kg}^{-1}$  y de la muestra C-4 serían  $61 \text{ mg*kg}^{-1}$ . Esta última muestra (C-4) contiene la tercera parte del As total que la C-3 y el % de bioaccesibilidad es menor. Sin embargo, si se utilizan los valores de bioaccesibilidad de As en la fase intestinal, el límite de concentración de As para la remediación de la muestra C-3 sería de  $47 \text{ mg*kg}^{-1}$  y para la C-4 sería de  $55 \text{ mg*kg}^{-1}$ , lo cual mejora el cálculo, aunque, como ya se comentó, es necesario revisar el fundamento de la ecuación propuesta en la NOM-147.

A continuación se presentan los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) entre: los valores de As bioaccesible obtenido con el método y equipo NOM-147, y con el método PBET y el equipo LABQA-2014, así como con el As geodisponible y el As total de las muestras de suelo compuestas (Cuadro 17).

Cuadro 17. Coeficientes de correlación ( $r$ ) de As total, As bioaccesible y As geodisponible de las muestras compuestas

<i>Parámetro</i>	<i>As total</i>	<i>As bio-PBET FG*</i>	<i>As bio-PBET FI*</i>	<i>As bio-NOM-147</i>	<i>As geodisponible</i>
As total	1				
As bio-PBET FG	0.94	1			
As bio-PBET FI	0.70	0.89	1		
As bio-NOM-147	0.94	0.99	0.90	1	
As geodisponible	0.55	0.78	0.95	0.81	1

Nota: FG se refiere a fase gástrica y FI a fase intestinal

El As bioaccesible obtenido con el método PBET (fase gástrica), correlaciona con la fase intestinal del mismo método ( $r = 0.89$ ) y con el As bioaccesible de la fase gástrica obtenida con el método NOM-147 ( $r = 0.99$ ) que corresponde al método PBET modificado. En este último caso, el coeficiente de correlación es mayor, posiblemente porque ambos experimentos se llevan a cabo a un pH de 1.5, y el control de las condiciones de reacción es sencillo. El As bioaccesible del método PBET (fase intestinal) se correlaciona con el As bioaccesible del método NOM-147 ( $r = 0.90$ ) y con el As geodisponible ( $r = 0.95$ ) (Figura 36 a y Cuadro 17).

Por otra parte, en el Cuadro 18 se presentan las pruebas de t-student que se llevaron a cabo para comparar los resultados de los diferentes experimentos (As total, As geodisponible y As bioaccesible). Se presentaron diferencias significativas al 95% de confianza entre la concentración de As total y la fracción geodisponible, lo cual se debe a que la cantidad extraída depende de la solubilidad de los compuestos de As, que puede ser alta o muy baja, independientemente de las concentraciones totales. Cuando los suelos alcanzan el equilibrio, el compuesto más insoluble domina la fracción soluble. Por ejemplo, si hay arseniato de plomo en altas concentraciones, como es un compuesto poco soluble, la fracción geodisponible resulta muy baja. No obstante, el hecho de que el coeficiente de correlación entre la fracción soluble y la concentración total sea alto (0.94) indica que posiblemente los suelos no han alcanzado el equilibrio y la cantidad extraída depende de la solubilidad de todos los compuestos de As que hay en la muestra y no únicamente del más insoluble.

Por otra parte, en el caso del As bioaccesible y el As total no hay diferencia estadísticamente significativa, posiblemente porque los reactivos adicionados aumentan la eficiencia de extracción. Por ejemplo, como se comentó, en el caso de la arsenolita extraída en medio básico (fase intestinal), ésta se transforma a arsenito de sodio muy soluble, por lo que a mayor concentración de arsenolita mayor cantidad solubilizada, lo cual deberá corroborarse en estudios posteriores.

Cuadro 18. Resultados de las pruebas de t-student, entre el As total, el As geodisponible y el As bioaccesible de las muestras compuestas

Parámetros	t <sub>calculado</sub>	t <sub>tablas</sub>	Conclusión
AS <sub>total</sub> y AS <sub>geodisponible</sub>	3.11	2.31	Sí hay diferencia significativa
AS <sub>total</sub> y AS <sub>bioaccesible</sub> (fase gástrica -PBET)	2.16	2.31	No hay diferencia significativa <sup>40</sup>
AS <sub>total</sub> y AS <sub>bioaccesible</sub> (fase intestinal - PBET)	2.12	2.31	No hay diferencia significativa <sup>41</sup>
AS <sub>bioaccesible</sub> (fase gástrica - PBET) y AS <sub>geodisponible</sub>	3.30	2.31	Sí hay diferencia significativa
AS <sub>bioaccesible</sub> (fase intestinal - PBET) y AS <sub>bioaccesible</sub> (fase gástrica - NOM 147)	0.06	2.31	No hay diferencia significativa
AS <sub>bioaccesible</sub> (fase intestinal - PBET) y AS <sub>geodisponible</sub>	2.52	2.31	Sí hay diferencia significativa
AS <sub>bioaccesible</sub> (fase gástrica - PBET) y AS <sub>bioaccesible</sub> (fase gástrica - NOM 147)	0.04	2.31	No hay diferencia significativa

### **3.4.5 Cartas control para el As bioaccesible con el método y equipo NOM-147; y el método PBET (fases gástrica e intestinal) con el equipo LABQA-2014, utilizando el estándar Montana 2711a**

#### **a. Método y equipo NOM-47**

Se determinó la bioaccesibilidad de As con el método y el equipo NOM-147. Se utilizó el material estándar de referencia (SRM, por sus siglas en inglés) Montana soil 2711a con certificado NIST<sup>42</sup>. Se llevaron a cabo 7 experimentos independientes y en cada uno se

<sup>40</sup> El valor P fue 8 %, que indica 8 % de probabilidad de que la conclusión en la prueba estadística no se deba al azar, además que al ser mayor a 5% cae en la zona de aceptación

<sup>41</sup> El valor P fue 9 %, que indica 9 % de probabilidad de que la conclusión en la prueba estadística no se deba al azar,

además que al ser mayor a 5% cae en la zona de aceptación

<sup>42</sup> NIST es la abreviatura de las siglas en inglés, del National Institute of Standards & Technology

analizaron un blanco sin As, un blanco con As<sup>43</sup>de 10 mg\*L<sup>-1</sup> y el suelo de referencia Montana 2711a.

En el Cuadro 19 se presentan los resultados de As bioaccesible, obtenidos con el suelo estándar Montana 2711a. El valor del % C.V. fue 7, que es menor al valor máximo permitido en el Laboratorio de Biogeoquímica (20 %).

Cuadro 19. Valores de As bioaccesible (fracción gástrica) del suelo Montana 2711a, utilizando el método y el equipo señalado en la NOM-147

Experimento	As bioaccesible mg*kg <sup>-1</sup>
1	92
2	114
3	95
4	104
5	101
6	100
7	98
mínimo	92
máximo	114
media	100
desviación estándar	7
%C.V.	7

Para evaluar el funcionamiento del equipo NOM-147 se elaboró la carta control del suelo Montana 2711a con los resultados de As bioaccesible (fase gástrica) utilizando el método NOM-147. En la Figura 38, se observa que los resultados de As bioaccesible obtenidos con el método NOM-147, se encuentran en el intervalo de la media  $\pm$  2 desviaciones estándar, por lo que la variación durante los 7 experimentos independientes se encontró en límites aceptables, ya que que las diferencias se deben a factores aleatorios (Taylor, 1987).

<sup>43</sup> En la NOM-147 se indica calcular el % de recobro de As, aplicando el método señalado en esta misma regulación

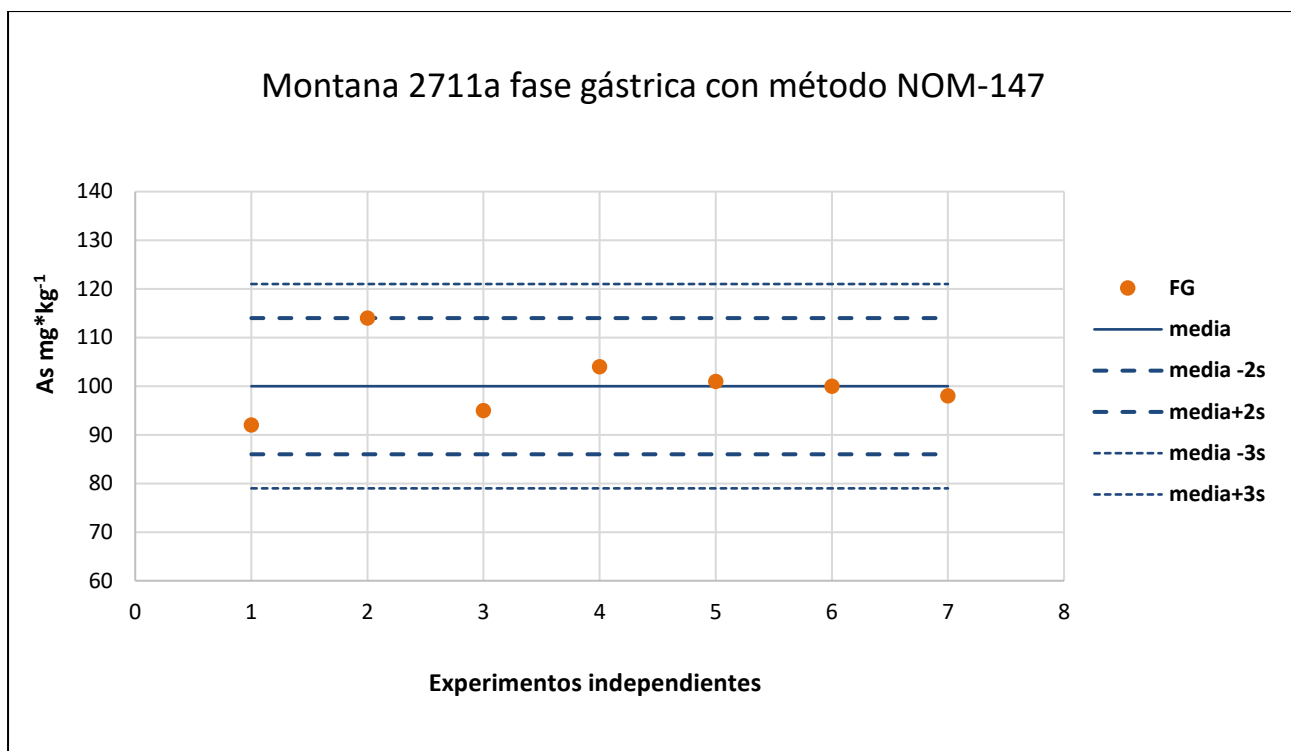


Figura 38. Carta control del suelo Montana 2711a al determinar la fase gástrica (método NOM-147) en el equipo NOM-147

### b. Método PBET y equipo LABQA 2014

Se utilizó el mismo material estándar de referencia (SRM, por sus siglas en inglés) Montana soil 2711a con certificado NIST<sup>44</sup>. Se analizaron 6 experimentos independientes, y en cada uno se introdujeron un blanco sin As, un blanco con As<sup>45</sup> de 10 mg\*L<sup>-1</sup> y el suelo de referencia Montana 2711a. Se siguió el procedimiento señalado por el método PBET original (Ruby *et al.*, 1996) para ambas fracciones (gástrica e intestinal).

Los resultados se presentan en el Cuadro 20. El % C.V. de la fase gástrica fue de 9 y para la fase intestinal, de 29. Este último porcentaje fue mayor al 20% establecido como límite en el LABQA. En general, como en todas las pruebas antes realizadas, la fase gástrica fue más reproducible que la fase intestinal. El valor promedio de As bioaccesible en la fase gástrica (64 mg\*kg<sup>-1</sup>) fue menor que el de la fase intestinal (78 mg\*kg<sup>-1</sup>), lo que ofrece evidencias adicionales de la posible presencia de arsenolita, en varias muestras.

<sup>44</sup> NIST es la abreviatura de las siglas en inglés, del National Institute of Standards & Technology

<sup>45</sup> En la NOM-147 se indica calcular el % de recobro de As, aplicando el método señalado en esta misma regulación

Cuadro 20. Valores de As bioaccesible del suelo Montana 2711a, utilizando el método PBET y el equipo LABQA 2014

Experimento	As mg*kg <sup>-1</sup>	
	Fase gástrica	Fase intestinal
1	68	111
2	64	58
3	71	63
4	56	71
5	66	100
6	57	63
Mínimo	56	58
Máximo	71	111
Media	64	78
desviación estándar	6	22
%C.V.	9	29

Los valores de % C.V. de la fase intestinal que se obtuvieron con el método PBET original y el equipo LABQA-2014, no cumplieron con el valor establecido como límite en el LABQA. Sin embargo, las cartas control<sup>46</sup> indican que todos los valores caen en el intervalo de la media  $\pm 2s$  (Figuras 39 y 40), que son los límites establecidos en la bibliografía como aceptables ya que se considera que las diferencias en los resultados solamente dependen de factores aleatorios (Taylor, 1987).

<sup>46</sup> Las cartas control se realizaron también para plomo bioaccesible (Cuadro 33 en el Apéndice A.3), tanto en la fase gástrica como en la intestinal los resultados se encontraron en los límites establecidos (media  $\pm 2s$ )

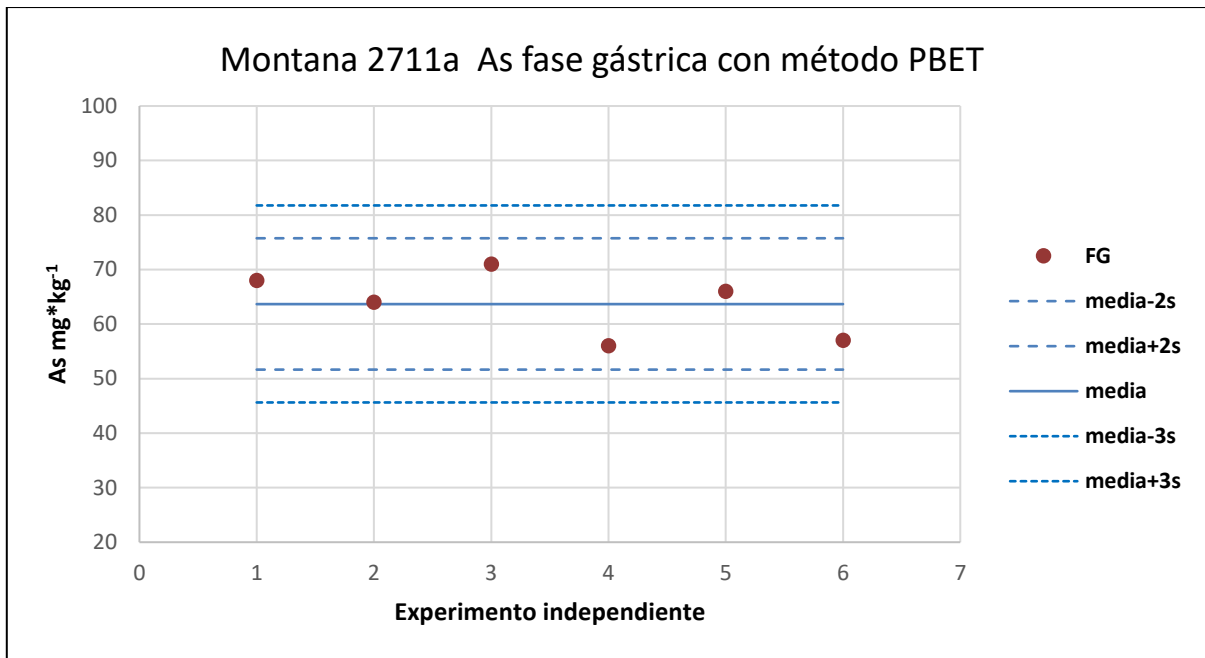


Figura 39. Carta control del suelo Montana 2711a al determinar la fase gástrica (método PBET) en el equipo LABQA 2014

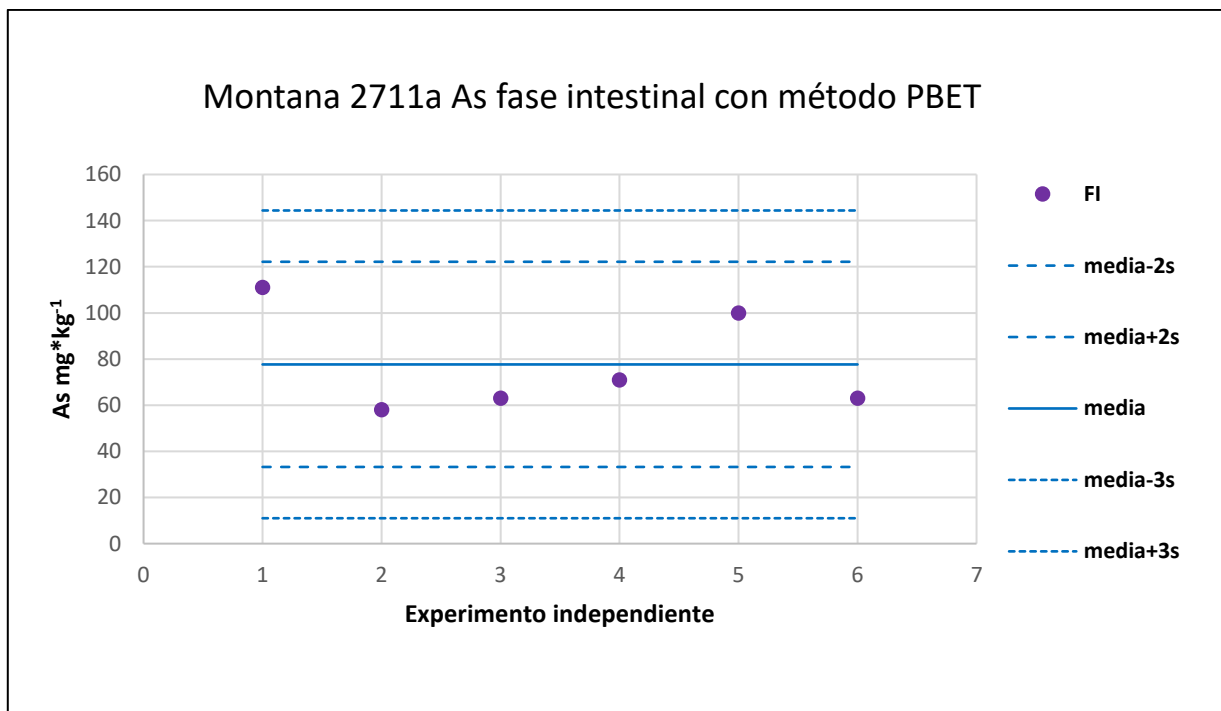


Figura 40. Carta control del suelo Montana 2711<sup>a</sup> al determinar la fase intestinal (método PBET) en el equipo LABQA 2014

3.5 Determinación del grado de veracidad de los resultados mediante la comparación de los datos obtenidos con el equipo y el método NOM-147, y con el equipo LABQA-2014 y el método PBET original, para el estándar de suelo Montana 2710 (reportado *in vivo* e *in vitro* por diferentes laboratorios internacionales).

El análisis por duplicado de As bioaccesible del suelo estándar Montana 2710, utilizando el método PBET en el equipo LABQA-2014 se realizó por duplicado y se calculó la desviación porcentual relativa (DPR).

En el Cuadro 21 se presentan los resultados obtenidos. Se observa que los valores de DPR son menores al 20%, por lo que cumplen con el criterio de aceptación establecido en el LABQA. El DPR en la fase gástrica fue del 6 % y en la fase intestinal del 16 %. Se observó que en la fase gástrica se liberó una mayor cantidad de As ( $290 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), que en la fase intestinal ( $144 \text{ mg*kg}^{-1}$ ), lo cual se debe a que posiblemente este estándar no contiene arsenolita. Los porcentajes de As bioaccesible se calcularon tomando como 100% la concentración de As total del certificado ( $626 \text{ mg*kg}^{-1}$ ).

Cuadro 21. Bioaccesibilidad de As del suelo Montana 2710, determinada con el método PBET y el equipo LABQA 2014

PBET Equipo LABQA 2014	As bioaccesible		
	$\text{mg*kg}^{-1}$	% liberado	DPR
Fase Gástrica	290	43	6
Fase Intestinal	144	23	16

Complementariamente, se determinó el As bioaccesible en la fase gástrica del suelo estándar Montana 2710, con el método y equipo NOM-147, realizando los análisis por triplicado. El suelo Montana 2710 presentó un valor de As bioaccesible de  $384 \text{ mg*kg}^{-1}$  y % de As bioaccesible de 61.3 % respecto al As total (Cuadro 22). El % C.V. fue de 10.8 %, que es menor al 20% (criterio de aceptación del LABQA), aunque fue superior al obtenido con el equipo LABQA para la misma fase.

Cuadro 22. Bioaccesibilidad de As del suelo Montana 2710, determinada con el método y equipo NOM-147

Muestra	$A_{\text{total FRX}}$ $\text{mg*kg}^{-1}$	$A_{\text{bioaccesible NOM-147}}$ $\text{mg*L}^{-1}$	% C.V. de $A_{\text{bioaccesible}}$	$A_{\text{bioaccesible}}$ $\text{mg*kg}^{-1}$	% $A_{\text{bioaccesible}}$ (*)
Montana 2710	626	0.8	10.8	384	61.3

(\*) El % de As bioaccesible se calculó como % As extraído, tomando como 100% la concentración de As total de FRX

Los datos obtenidos con el estándar de suelo Montana 2710 permiten medir la veracidad del resultado considerando que el valor "verdadero" es la biodisponibilidad



del As medida *in vivo*. Este estándar fue utilizado en un ensayo internacional para determinar la biodisponibilidad (*in vivo*) y la bioaccesibilidad (*in vitro*). El estudio fue liderado por la unidad de servicios analíticos (ASU por sus siglas en inglés) de la Queen's University (Kingston, ON, Canadá) y participaron 14 laboratorios que utilizaron 17 métodos<sup>47</sup> para medir la bioaccesibilidad.

Koch *et al.*, (2013) reportaron los resultados de bioaccesibilidad para Pb y As, que se compararon con los datos de biodisponibilidad *in vivo*, obtenidos en cerdos (INERIS, 2009) y en ratones (Bradham, 2011). Asimismo, estos autores reportaron el porcentaje de la biodisponibilidad relativa (RBA, por sus siglas en inglés) del As, utilizando el estándar de suelo Montana 2710. El valor de RBA representa la relación entre la biodisponibilidad del suelo medida en cerdos y/o ratones, respecto a la biodisponibilidad obtenida con arseniato diprotonado de sodio (NaH<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>), que es una sal muy soluble que se absorbe fácilmente en los organismos vivos. El valor de RBA de As en cerdos varía de 288 a 326 mg\*kg<sup>-1</sup> y en porcentaje de 46 a 52 %. En ratones el valor de RBA varía de 232 a 313 mg\*kg<sup>-1</sup> y en porcentaje de 37 al 50 % (ver Cuadro 23).

Utilizando los datos reportados para el suelo estándar Montana 2710 fue posible evaluar el grado en que el método y equipo NOM-147, y el método PBET-equipo LABQA 2014, simulan dentro de un intervalo aceptable (delimitado por los resultados *in vivo*) la absorción del As en el tracto gastrointestinal humano.

Cuadro 23. Biodisponibilidad relativa (*in vivo*) del suelo Montana 2710, obtenida de Koch *et al.*, (2013)

Biodisponibilidad relativa de As		
Referencia:	INERIS (2009)	Bradham (2011)
Animal de prueba:	cerdos	ratones
Sustancia control	NaH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>
matriz:	orina	orina
% RBA*	49%	44%
Intervalo en %	(46-52)%	(37-50)%
Intervalo en mg*kg <sup>-1</sup>	(288-326) mg*kg <sup>-1</sup>	(232-313) mg*kg <sup>-1</sup>

\*Nota: RBA es la abreviatura de biodisponibilidad relativa

Los valores obtenidos del promedio de As bioaccesible con los diferentes métodos, así como la repetibilidad y la reproducibilidad de los resultados reportados por Koch *et al.* (2013), se presentan en el Cuadro 24.

<sup>47</sup> Métodos de bioaccesibilidad: OSU-IVG, EPM-IVG, RRU-PBET, RMC-PBET, UG-PBET, SFU-PBET, BGS-PBET, US-SHIME, RIVM, BGS-UBM, RRU-RBALP, Lab A-RBALP, Lab B- RBALP, Exponent-Gly, Exponent-Phos, SGS-Mod TCLP y HC-HC

Cuadro 24. Resultados de As bioaccesible del estándar de suelo Montana 2710, realizados en 14 laboratorios y compilados por Koch *et al.*, (2013)

Laboratorio	Fase	As <sub>total</sub> * mg*kg <sup>-1</sup>	Métodos	Valores promedio de As <sub>bioaccesible</sub> mg*kg <sup>-1</sup>	% As <sub>bioaccesible</sub>	% RSD repetibilidad	% RSD reproducibilidad
Lab central	Gástrica	626	15	263	42	4.7	41 (8.8-70)%
Otros laboratorios		626	12	280	48	3.1	38 (23-79)%
Lab central	Intestinal	626	10	194	31	7.1	44 (2.8-59)%
Otros laboratorios		626	8	206	34	5.1	22 (24-51)%

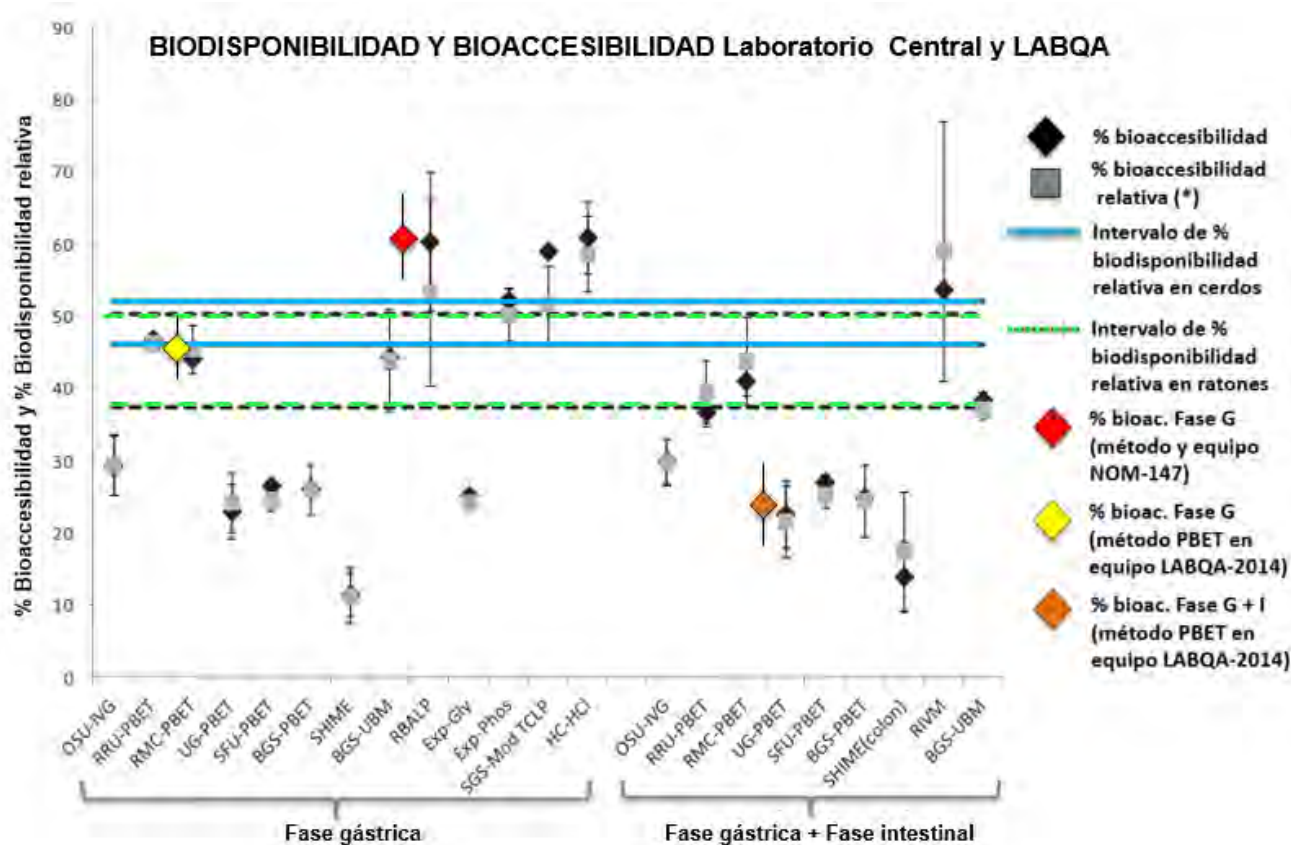
\*Valor del certificado NIST

En la Figura 41 se presentan gráficamente los resultados obtenidos utilizando el estándar de suelo NIST Montana 2710: a) As biodisponible en cerdos y ratones; y b) As bioaccesible en fase gástrica e intestinal, analizados por el laboratorio central. En esta figura se adicionaron<sup>48</sup> los resultados obtenidos en este trabajo: a) As bioaccesible en fase gástrica mediante el método y equipo NOM-147; b) As bioaccesible en fase gástrica y c) As bioaccesible en fase intestinal, con el método PBET y el equipo LABQA-2014.

En la Figura 41, se observa que muy pocos resultados de los laboratorios participantes y los de este estudio caen dentro del intervalo de valores de biodisponibilidad *in vivo* (líneas azules para cerdos y líneas verdes para ratones). De los pocos resultados que entran en esta zona, se encuentra el obtenido con el equipo LABQA-2014 y el método PBET fase gástrica. Los métodos que obtuvieron resultados similares a los datos *in vivo* y aparecen en la gráfica muy cerca unos de otros son los métodos BGS-UBM y RMC-PBET<sup>49</sup>. El método de la NOM-147 y el método RBALP, que también se conoce como SBET o SBRC, arrojaron resultados que en la gráfica quedan por arriba del intervalo de la biodisponibilidad *in vivo*. En la fase intestinal, los resultados del equipo LABQA-2014, utilizando el método PBET, se encuentran debajo del intervalo de biodisponibilidad *in vivo*, aunque son similares a los obtenidos con los métodos BGS-PBET, SFU-PBET y UG-PBET.

<sup>48</sup> No se añadieron al gráfico los porcentajes de bioaccesibilidad relativa con los resultados de este estudio, ya que experimentalmente no se realizó la prueba de bioaccesibilidad con NaH<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>.

<sup>49</sup> Las características de estos métodos se explican en la sección A.4 el apéndice.

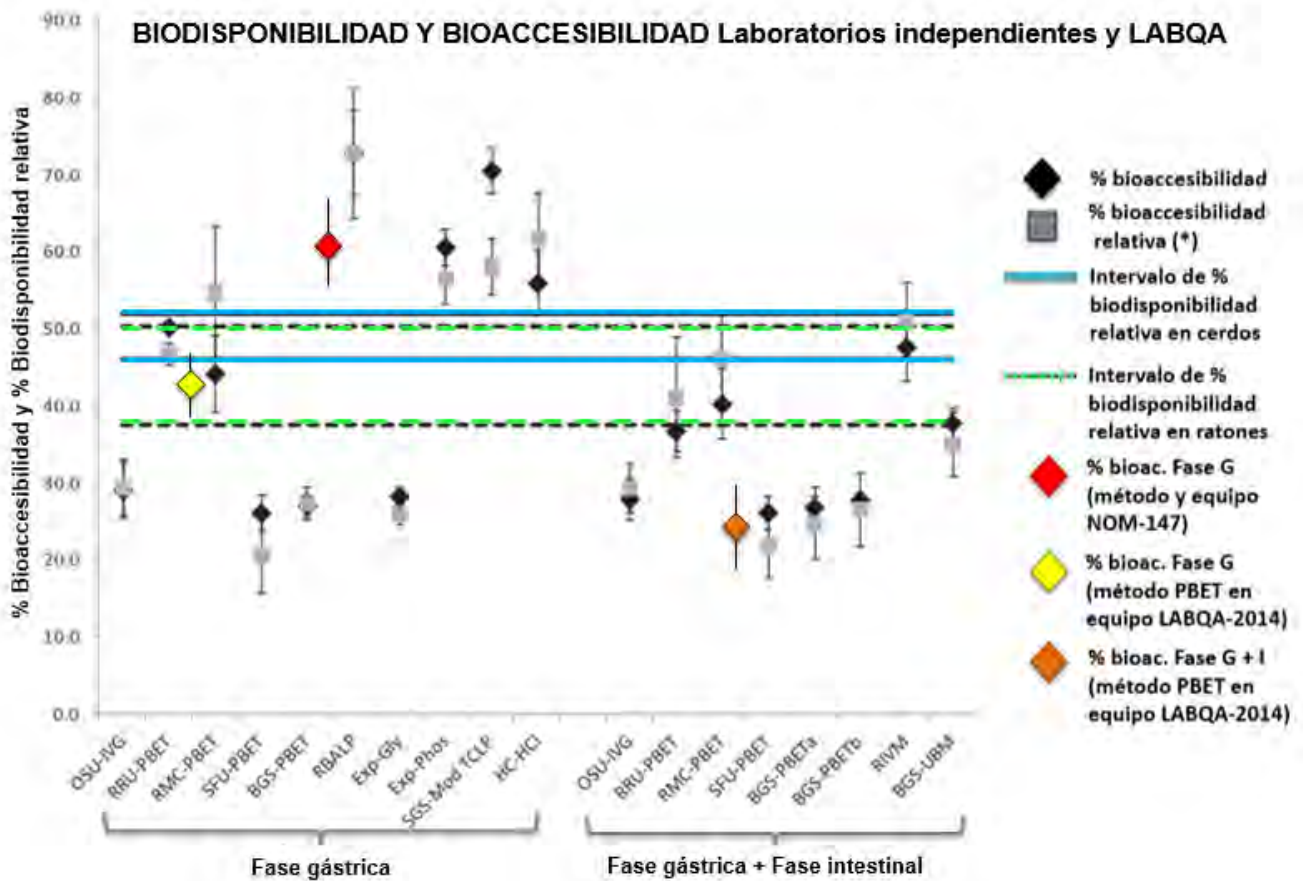


(\*) % de bioaccesibilidad relativa respecto a  $\text{NaH}_2\text{AsO}_4$  (corregida por el recobro de la adición)

Figura 41. Porcentajes de As biodisponible y As bioaccesible, determinados en el suelo estándar NIST Montana 2710, cuantificado por el Laboratorio Central de la **Unidad de servicios analíticos de la Queen's University Canadá** por una serie de métodos diferentes de bioaccesibilidad (imagen modificada de Koch *et al.*, 2013); y resultados obtenidos del mismo suelo en este estudio

Posiblemente, para que aumente la coincidencia entre las mediciones *in vivo* con las *in vitro*, hay que ajustar los tiempos de agitación y/o las dosis de los reactivos utilizados en el laboratorio. Sin embargo, si se quieren utilizar los datos publicados *in vivo*, los experimentos *in vitro* tendrían que llevarse a cabo con el mismo estándar utilizado con los animales de prueba, que es el Montana 2710. No obstante, esto prácticamente no es posible, pues el estándar ya no está disponible comercialmente; por lo que habría que hay que llevar a cabo simultáneamente nuevas pruebas *in vivo* e *in vitro* con el estándar que esté disponible en el mercado.

En la Figura 42, se presentan los resultados de los porcentajes de As biodisponible y As bioaccesible reportados por los laboratorios independientes que participaron junto con el Laboratorio Central, y cuyos resultados fueron publicados por Koch *et al.*, (2013). Asimismo, en la figura antes citada, se presentan los resultados obtenidos en este estudio aplicando el método PBET original y el equipo LABQA 2014.



(\*) % de bioaccesibilidad relativa respecto a  $\text{NaH}_2\text{AsO}_4$  (corregida por el recobro de la adición)

Figura 42. Porcentajes de As biodisponible y As bioaccesible, determinado en el suelo estándar NIST Montana 2710, cuantificado por los laboratorios independientes que participaron con el Laboratorio Central de la Unidad de servicios analíticos de la **Queen's University Canadá** por una serie de métodos diferentes de bioaccesibilidad (imagen modificada de Koch et al., 2013); y resultados obtenidos del mismo suelo en este estudio<sup>50</sup>

En la Figura 42, al igual que en la 41, las líneas azules continuas confinan la zona de los resultados de As biodisponible para cerdos, mientras que las líneas verdes discontinuas, indican la zona de As biodisponible para ratones. En comparación con los valores del Laboratorio Central, fueron menos los resultados obtenidos en este estudio que coincidieron con los de biodisponibilidad *in vivo* determinada en los laboratorios independientes. No obstante, de igual forma que en el caso del Laboratorio Central, el resultado de As bioaccesible obtenido en este estudio utilizando el método PBET y el equipo LABQA 2014, se encuentra dentro del intervalo de As biodisponible determinado en ratones, mientras que el resultado del método de la norma NOM-147 aportó un

<sup>50</sup> Se corrigieron los errores de los resultados de este estudio, fueron mal interpolados anteriormente. El % C.V. del As bioaccesible con el método NOM-147 en el equipo NOM-147 fue 10.8 %, el % DPR de As bioaccesible en la fase gástrica fue 5.8 % y el % DPR del As bioaccesible en la fase intestinal fue 16 %. Los resultados de % C.V. y % DPR fueron calculados respecto al valor promedio

resultado mayor que el obtenido en los experimentos *in vivo*, es decir que este método sobrevalora la peligrosidad de los suelos contaminados con As.

El resultado de As bioaccesible obtenido con el método PBET (fase intestinal) y el equipo LABQA 2014, fue menor que los valores del intervalo de biodisponibilidad *in vivo*, ya sea de los resultados del Laboratorio Central como los reportados por los laboratorios independientes. Sin embargo, el As bioaccesible determinado en este estudio en la fase intestinal, fue similar a los reportados utilizando los métodos SFU-PBET, BGS-PBETa y BGS-PBETb.

En el siguiente Cuadro 25, se presentan los métodos con el mejor desempeño en la determinación de As bioaccesible para las fases gástrica e intestinal, considerando su similitud con los resultados *in vivo*, reportados por Koch *et al.*, (2013).

Cuadro 25. Métodos de bioaccesibilidad que corresponden al intervalo de bio-disponibilidad para cerdos y ratones, tanto para los resultados reportados por el Laboratorio Central como para los laboratorios independientes

Métodos Fase gástrica		Métodos Fase intestinal	
RBA en cerdos	RBA en ratones	RBA en cerdos	RBA en ratones
RRU-PBET Exp-Phos (sólo para el Lab Central)	RMC-PBET (sólo para el Lab Central) RRU-PBET BGS-UBM (sólo para Lab Central) <i>LABQA 2014-PBET</i>	RIVM (sólo para los laboratorios independientes)	BGS-UBM (en el límite) RIVM (en el límite) RMC-PBET RRU-PBET

Los métodos *in vitro* que mejor simulaban la biodisponibilidad de As determinada en los dos tipos de animales de prueba utilizados, tanto para la fase gástrica como para la fase intestinal, fueron los métodos RRU-PBET y RMC-PBET. El método PBET (fase gástrica) utilizando el equipo LABQA 2014 simuló la biodisponibilidad de este elemento en ratones.

El hecho de que los resultados obtenidos con algunos métodos *in vitro*, que utilizan únicamente la fase gástrica, sean similares a los resultados de la bioaccesibilidad en cerdos y ratones, posiblemente se relaciona a que el estándar del suelo solamente contiene As (V) y la solubilidad de esta especie, bajo las condiciones ácidas del jugo estomacal o las básicas del intestino, es análoga. No obstante, como lo indicaron los experimentos realizados con muestras reales, cuando los suelos presentan As (III), la solubilidad de esta especie es mayor en soluciones con un pH neutro o ligeramente básico.

Respecto al éxito del método PBET y equipo LABQA-2014, en comparación con la magnificación del resultado que produce la aplicación del método y equipo NOM-147; posiblemente se debe a que utiliza reactivos similares a los que existen en el estómago y no solamente ácido clorhídrico y glicina, pues la agitación utilizando gas es menos agresiva que la mecánica, lo que evita la reducción del tamaño de las partículas de suelo y, consecuentemente, el aumento de la reactividad.

3.6 Determinación de la viabilidad de aplicar el método PBET original en el equipo LABQA 2014, para determinar la bioaccesibilidad de As, a escalas típicas de casos reales

Se analizaron 83 muestras de suelo procedentes de sitios contaminados en una zona donde se realizaron actividades minero-metalúrgicas ubicada en el norte de México. Nueve muestras se colectaron en un primer muestreo, cuatro en un segundo muestreo, realizado por vecinos de la zona residencial aledaña y el resto en el último muestreo que se realizó después de llevar a cabo la remediación en el sitio. A todas los suelos se les determinó As total y As bioaccesible, y solamente en 22 muestras se realizaron los análisis por duplicado, con las cuales se calculó el DPR y se determinó la precisión (repetibilidad). Los resultados se presentan en el Cuadro 26.

Cuadro 26. Desviación porcentual relativa (DPR) de las determinaciones de As bioaccesible, en muestras seleccionadas (n=22) de los suelos de un sitio contaminado (n=83), utilizando el método PBET en el equipo LABQA 2014

Sitio y etapa	Técnica analítica	Clave de muestra	%DPR	
			As bioaccesible	
			Fase gástrica	Fase intestinal
Chihuahua 1	ICP-OES	084-15	6.9	N.A.
		083-15	4.8	13.2
		113-15	6	5.5
		033-15	0.9	10.5
		077-15	0.5	19.6
		041-15	2.7	0.9
Chihuahua 2	ICP-OES	814-15	12.8	10.2
		828-15	2.8	1.1
		831-15	4.5	N.A.
Chihuahua 3	AA-flama	002-16	N.A.	N.A.
		005-16	11.4	N.A.
		010-16	1.5	5.5
		013-16	5.5	4.4
		018-16	2.9	5.3
		021-16	20.3	8
		026-16	1.2	10.4
		034-16	16.5	6.5
		037-16	8.2	19.1
		042-16	4	18.1
		045-16	1	8.5
050-16	6.3	29.2*		
067-16	16.1	27.9*		

Notas: N.A. = No aplica, porque los resultados fueron < L.D. Algunos valores de DPR > 20% fueron aceptados por el sistema de calidad de LABQA, ya que es un método no acreditado, pero con trazabilidad analítica

Se observó que en algunas muestras del sitio contaminado, la concentración de As bioaccesible en la fase intestinal (método PBET) fue menor que el As bioaccesible en la fase gástrica (método PBET), lo que indica que posiblemente contenían As(V) en forma de arseniatos y no como  $As_2O_3$ , ya que este último se disuelve en medio básico. Este resultado indica que la especie en que se encuentra el As influye en los resultados de las pruebas *in vitro*, y las diferencias con los datos obtenidos *in vivo*.

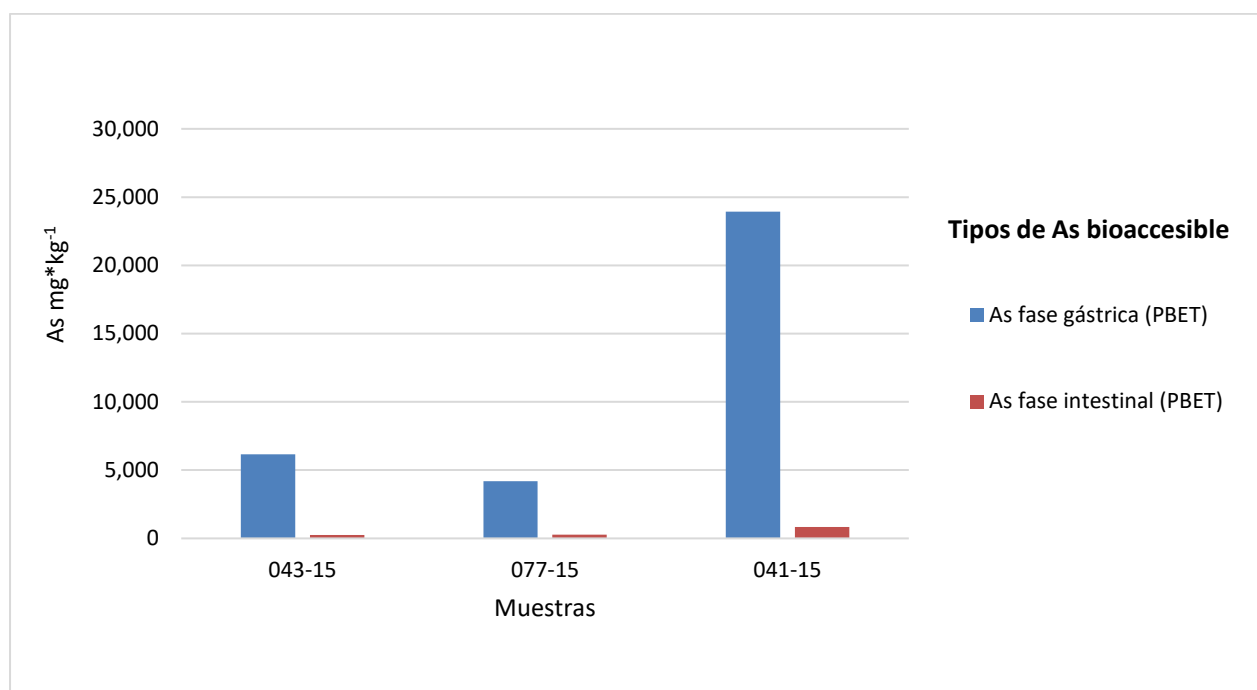


Figura 43. Bioaccesibilidad de As con el método PBET (fases gástrica e intestinal) para tres muestras de Chihuahua 1

En la Figura 43 se presenta la comparación de los datos obtenidos en las fases gástrica e intestinal en 3 muestras<sup>51</sup> seleccionadas. Se observa que la cantidad de As extraído en la fase intestinal es considerablemente más baja que el As en la fase gástrica. Los datos analíticos obtenidos para el As total de las muestras, así como su distribución, se presentan en el Apéndice A.5. Para determinar si estos son similares o no lo son con los dato de biodisponibilidad, se requiere realizar experimentos *in vivo*.

Respecto a la repetibilidad, los valores de DPR para la fase gástrica variaron de 0.3 - 20.3 %, y para la fase intestinal de 0.9 - 29.2 % (Cuadro 30). En esta última fase, dos muestras presentaron un DPR mayor al aceptado en el LABQA. Sin embargo, en ambas fases, la precisión mejoró respecto a los resultados obtenidos con los resultados determinados con el método y equipo señalado por la NOM-147, que pertenece al

<sup>51</sup> Los resultados de la muestra 043-15 no se presentan en el Cuadro 26

Instituto de Geología de la UNAM, en que el intervalo de % C.V. para  $n=15$ , fue de 2 a 23 %, y en la fase intestinal de 3 a 36 % (García, 2013).

Los resultados de las 22 muestras analizadas indican que se puede aplicar el método PBET y el equipo LABQA-2014 para analizar suelos a escala de los casos reales.



#### 4. Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo a los resultados de este estudio, las principales ventajas del equipo LABQA-2014 fueron las siguientes: a) la agitación es eficaz y no permite la sedimentación del suelo en el fondo de los reactores; b) permite que la toma de alícuotas y el monitoreo de pH se realice sin detener la agitación; c) permite medir las dos fases (gástrica e intestinal) sin detener el proceso para abrir los reactores y; d) es posible analizar el mismo número de muestras que en el equipo NOM-147.

El equipo LABQA-2014 permitió cuantificar la bioaccesibilidad de As aplicando el método PBET, con una precisión comparable a la obtenida con el equipo y método NOM-147 (fase gástrica). Además, el dato del As bioaccesible determinado en la fase gástrica, utilizando el estándar NIST Montana 2710 y el método PBET con el equipo LABQA-2014, cae en el intervalo de As biodisponible determinado en ratones; lo cual indica que es un método que simula lo que sucede en organismos vivos.

El resultado del As bioaccesible en la fase gástrica, utilizando el estándar NIST Montana 2710 y el método PBET con el equipo LABQA-2014, cae en el intervalo de As biodisponible determinado en ratones; lo cual indica que es un método adecuado. Por otro lado, los resultados de As bioaccesible obtenidos con el método señalado en la NOM-147 ( $384 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} = 61.3 \%$ ) y con el método análogo, denominado RBALP o SBET o SBRC fueron más altos que los reportados *in vivo*; lo que muestra que estos métodos que solamente contemplan la fracción gástrica, magnifican la cantidad de As bioaccesible que es absorbido por animales de prueba y, posiblemente, por el ser humano.

El equipo LABQA-2014 con el método PBET pueden aplicarse para determinar la bioaccesibilidad de otros **EPT's**, especialmente del Pb, Cd y As que son los elementos de principal interés en los casos de remediación de suelos contaminados por las actividades minero-metalúrgica. Sin embargo, en el caso del As se debe considerar que el estado de oxidación y la solubilidad de los compuestos de este elemento influyen en la calidad de los resultados.

Los datos obtenidos en este estudio indican que es importante continuar realizando experimentos que permitan identificar los cambios necesarios para mejorar los métodos de bioaccesibilidad, especialmente en lo referente a las diferencias de comportamiento de las especies del As -que pueden encontrarse en los suelos contaminados-, que se observaron bajo las condiciones de los métodos analíticos. Asimismo, es importante que cuando se revise la NOM-147, el grupo de trabajo conozca estos resultados para que analice la pertinencia de incluir la determinación de la bioaccesibilidad del As y posiblemente de más elementos utilizando las dos fracciones (gástrica e intestinal), para determinar las concentraciones específicas totales ( $CE_T$ ) para la remediación de sitios contaminados.

Es importante considerar la conveniencia de realizar determinaciones de la biodisponibilidad de As en suelos contaminados que contengan las especies penta y

trivalente, para elaborar estándares que permitan definir cual de las fracciones (gástrica o intestinal) determinadas *in vitro*, es la que simula los valores *in vivo*. El uso de estándares permitiría definir con que método se obtienen los mejores resultados de la bioaccesibilidad del As; ya que en este estudio se encontró que la fase intestinal determinada con el método PBET y el equipo LABQA-2014 se subvaloró la biodisponibilidad medida en animales, en la misma forma que sucedió con los análisis de 7 de los 9 laboratorios (Central e independientes) que participaron en el ensayo realizado por Canadá, el Reino Unido y los Estados Unidos de América.

Respecto a la viabilidad de aplicar el método PBET original utilizando el equipo LABQA-2014 a escala comercial, se concluye que es posible analizar un gran número de muestras de suelos, cumpliendo con los controles analíticos (blancos, material de referencia y réplicas).

Se recomienda:

- Realizar más pruebas de bioaccesibilidad utilizando N<sub>2</sub> en lugar de argón, para así disminuir el costo de la prueba
- Para facilitar el monitoreo de pH, adaptar un electrodo a cada reactor del equipo LABQA-2014
- Sugerir cambios en la metodología de la prueba de bioaccesibilidad, de la norma mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, como considerar todos los reactivos orgánicos de la fase gástrica (método PBET), además del uso del equipo LABQA-2014 en los análisis de rutina, ya que se ha demostrado que cumple con los parámetros evaluados en este trabajo
- Evaluar la influencia de los reactivos de manera individual, para saber si se puede prescindir de alguno, porque son costosos y difíciles de conseguir en el país
- Utilizar un estándar interno del que se tengan registros anteriores para seguir realizando cartas control, dado que el suelo Montana 2710 está agotado
- Proponer un sistema de recuperación del gas de agitación en el equipo LABQA-2014, en el caso de que se realice la prueba con argón, dado el alto precio de este gas
- Complementar los estudios de la prueba de bioaccesibilidad para analizar otros EPT's en el equipo LABQA-2014

## 5. Bibliografía

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2007) Toxicological profile for arsenic. Draft for Public Comment. Atlanta: US Department of Health and Human Services. Available at URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.html>. Last accessed 8.20.16

ASTM D3987-85 (1992). Standard test method for shake extraction of soil waste in water. American Society for Testing Materials, USA.

Baas-Becking, L. G. M., J. R. Kaplan y D. Moore (1960) "Limits of the natural environment in terms of pH and oxidation-reduction potentials", *The Journal of Geology*, 243-284.

BARC (2010) Webinar proceedings. Revisado en: <http://www.bioavailabilityresearch.ca/BARC%20webinar%20proceedings%20%20Oct%205,%202010.pdf>

BARC (2011) Round robin experiment: variability of bioaccessibility results using seventeen different methods on a standard reference material (NIST 2710).

Barwick, V. y Prichard, E. (2011) Eurachem Guide: Terminology in Analytical Measurement- Introduction to VIM 3 (1ª ed.) Recuperado a partir de [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)

Battelle y Exponent (2000) Guide for Incorporating Bioavailability adjustments into Human Health and Ecological Risk Assessments at U.S. Navy and Marine Corps.

Bertolero F., Pozzi G., Sabbioni E. y Saffiotti U. (1987) Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformations. *Carcinogenesis* 8:803-808.

Bradham, K. D.; Scheckel, K. G.; Nelson, C. M.; Seales, P.E.; Lee, G. E.; Hughes, M. F.; Miller, B. W.; Yeow, A.; Gilmore, T.; Harper, S. y Thomas, D. J. (2011) Relative bioavailability and bioaccessibility and speciation of arsenic in contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 2011, 119, 1639-1634

Caboche J. (2009) **Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité. Application a 4 elements traces metalliques dans les sols: As, Cd, Pb et Sb.**

Calabrese, E.; Barnes, R.; Stanek, E.; Pastides, J.; Gilbert, C.; Veneman, P.; Wang, X.; Laszity, A. y Kos- tecki, P. (1989) *En Regul. Toxicol. Pharmacol.* 10,123-137.

Cave, M.; Wragg, J.; Harrison, I.; Vane, C.; Wiele, T.; Groeve, E. Nathanail, C.; Ashmore, M.; Thomas, R.; Robinson, J. y Daly, P. (2010) Comparison of batch mode and dynamic physiologically based bioaccessibility tests for PAHs in soil samples. *Environ. Sci. Technol* 44, 2654-2660.

CENAM y EMA (2012) Guía Técnica de Trazabilidad Metrológica e Incertidumbre de Medida en las Mediciones Analíticas que Emplean la Técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente. México, D.F.

Charlet, L., y Manceau, A. (1993). Structure, formation, and reactivity of hydrous oxide particles: Insights from x-ray absorption spectroscopy. In **"Environmental Particles"** (J. Buffle and A.P. vanLeeuwen, eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, FL. p. 117-164

Coll-Hurtado, A.; Sánchez-Salazar M. y Morales J. (2002) La minería en México, Geografía, historia, economía y medio ambiente, Temas Selectos de Geografía de México, Instituto de Geografía, UNAM, ISBN: 970-32-013-7.

Dabin C. y Algros E. (2012) Bioavailability and bioaccessibility of pollutants in contaminated soils, state of present knowledge and research avenues, Final report.

Davis, A.; Ruby, M. y Bergstrom, P. (1992) Environ. Sci. Technol. En: 26 (3), 461-468.

De Boever, P., Deplancke, B. y Verstraete, W. (2000) Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soy germ powder. J. Nutr 130, 2599-2606.

Denys S., Dor F. y Dabin C. (2011) Integration of the oral bioaccessibility of trace elements in the human exposure and risk assessment of contaminated soils.

Dopp, E.; Hartmann, L.; Florea, A.; von Recklinghausen, U.; Pieper, R.; Shokouhi, B.; Rettenmeier, A.; Hirner, A. y Obe G. (2004) Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Toxicol Appl Pharmacol 201(2):156-165.

Drexler, J. y Brattin, W. (2007) An *In vitro* Procedure for Estimation of Lead Relative Bioavailability: With Validation. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal. 13(2): 383.

Duggan, M.; Inskip, M.; Rundle, S. y Moorcroft, J. (1985) Atmos. Environ. En: 44, 65-79.

Ellickson, K.; Meeker, R.; Gallo, M.; Buckley, B. y Liroy P. (2001) Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2001 janv; 40(1):128-35.

EURACHEM (2005) Guía Eurachem: Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito – Guía para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. Querétaro, México: CENAM

Exponent Bioavailability & Exposure Assessment. (2010). En:

<http://www.exponent.com/services/practices/environmental-sciences/ecological--biological-sciences/capabilities/bioavailability--exposure-assessment>

Falkowski, C. (2005) Cátedra de Química Medicinal Fac. Cs. Exts. Qcas. Y Nat UNAM. Guías de estudio, p. 7 y 8.

Fitz, P. (1980) Suelos, su formación, clasificación y distribución, CECSA, México, p. 430.

García, T. (2013) Estudio de la bioaccesibilidad de As, Cd y Pb en suelos impactados con residuos mineros. Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM.

Gorby, M. (1988) Arsenic poisoning. *West J Med* 1988; 149: 308-315.

Gravellier, A. (2007) Biodisponibilité des métaux lourds dans les sols et impact de sa prise en compte dans les évaluations de risque sanitaire.

Greenwood, N. y Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the Elements* (2nd Edn.), Oxford: Butterworth Heinemann. ISBN 0-7506-3365-4).

Gron, C. (2005) Test for bioaccessibility of metals and PAH from soil - Test selection, validation an application. (DHI: 2005).

Gutiérrez, M. (1998) Evaluación de la peligrosidad de las escorias de la planta de San Luis Cobre, S.L.P., Informe técnico, p. 33.

Gutiérrez, M. y Moreno M. (1997) Los residuos en la minería mexicana. INE, México. Disponible en Internet en: [http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/35/los\\_residuos.html?id\\_pub=35](http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/35/los_residuos.html?id_pub=35).

Hagens, W.; Walraven, N.; Minekus, M.; Havenaar, R.; Lijzen, J. y Oomen, A. (2009) Relative oral bioavailability of lead from Dutch made grounds - Report 711701086.

Hamel, S.; Buckley, B. y Liroy P. (1998) Bioaccessibility of Metals in Soils for Different Liquid to Solid Ratios in Synthetic Gastric Fluid. *Environmental Science & Technology*. 1998 fevr 1; 32(3): 358-62.

Hamel, S.; Ellickson, K. y Liroy, P. (1999) The estimation of the bioaccessibility of heavy metals in soils using artificial biofluids by two novel methods: mass-balance and soil recapture. *Sci. Total Environ*. 1999 dec 15; 243-244: 273-83.

Harris, D. (2007) Análisis químico cuantitativo. Reverte, España, 2006, p. 32.

INEGI (2015) Boletín de prensa número 114/16, en Banco de Información Económica (BIE) en la liga <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie/default.aspx> y/o en <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/cn/pibt/default.aspx>

INERIS (2005) **Mesure de la bioaccessibilite du plomb pour l'homme a l'aide de deux tests (IVG et RIVM) couplee a l'etude de la speciation.**

INERIS (2009) Biodisponibilité et spéciation: bilan sur les modeles BLM – Rapport DRC-09-102844-02073<sup>a</sup>

ISO/TR 17924 (2008) (International Organization for Standardization/Technical Report) Soil quality — Assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material — Guidance on the application and selection of physiologically based extraction methods for the estimation of the human bioaccessibility/bioavailability of metals in soil.

ISO/TS 17924 (2007) (International Organization for Standardization/Technical Specification) Soil quality — Assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material — Guidance on the application and selection of physiologically based extraction methods for the estimation of the human bioaccessibility/bioavailability of metals in soil.

ISO 11271 (2002) Soil quality - determination of redox potential. Field method.

ISO 11074 (2005) (International Organization for Standardization) Soil quality – Vocabulary.

ISO 17402 (2008, 2011) (International Organization for Standardization) Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials.

Jain, C. y Ali, I. (2000) Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Wat. Res.* Vol. 34, No. 17, pp. 4304 - 4312.

James, K.; Peters, E.; Laird, D.; Ma, K.; Wickstrom, M.; Stephenson, L. y Siciliano, D. (2011) Human exposure assessment: a case study of 8 PAH contaminated soils using *in vitro* digestors and the juvenile swine model. *Environ. Sci. Technol.* mai 15; 45(10): 4586–93.

Kaltreider, C.; Davis, M.; Lariviere, P. y Hamilton, W. (2001) Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environ Health Perspect.* 109: 245-251.

Kawana, S.; Uzuki, M.; Nakae, Y. y Namiki, A. (2000) Preoperative anxiety and volume and acidity of gastric fluid in children. *Paediatric Anaesthesia* 10, 17-21.

Kelly, N. (1993) *Medicina interna*, Volumen 1. Ed. Panamericana, p. 444 y 445.

Kimbrough, R.; Falk, H.; Stehr, P. y Fries, G. Toxicol. (1984) En Environ. Health 14, 47-93.

Koch, I.; Reimer, J.; Kenneth, B.; Martine, Basta, T.; Cave, R.; Denys, S.; Dodd, M.; Hale, A.; Irwin, R.; Lowney, W.; Moore, M.; Paquin, V.; Rasmussen, E.; Repaso-Subang, T.; Stephenson, L.; Siciliano, D.; Wragg, S. y Zagury, J. (2013) Variability of bioaccessibility results using seventeen different methods on a standard reference material, NIST 2710, Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 48:6, 641-655, DOI: [10.1080/10934529.2013.731817](https://doi.org/10.1080/10934529.2013.731817)

La Grega, M.; Buckingham, P. y Evans, J. (1996) Gestión de Residuos Tóxicos. **Traducción de la primera versión del inglés "Hazardous Waste Management"**. Editor Antonio García Brage. México.

Laird, D.; Van de Wiele, R.; Corriveau, C.; Jamieson, E.; Parsons, B.; Verstraete, W. y Siciliano, D. (2007) Gastrointestinal microbes increase arsenic bioaccessibility of ingested mine tailings using the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. Environ. Sci. Technol. Aout 1;41(15):5542-7.

Lara, A.; Gutiérrez, M.; Romero, F. y Rosas, H. (2007) Impacto de las pilas portátiles gastadas en el ambiente. Geos, Vol. 27, No. 1, p. 67

Lijzen, A.; Baars, J.; Crommentuijn, T.; Otte, F.; Van de Plassche, E.; Rikken, J.; Rompelberg, M.; Sips, M. y Swartjes, A. (1999) Herziening interventiewaar de lood. Evaluatie van de afleiding van de interventiewaarde grond/sediment en grondwater. Report no. 711701013, available at <http://www.rivm.nl/en/>, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.

López, S.; Miyashita, Y. y Simons, S. (1990) Structurally based, selective interaction of arsenic with steroid receptors. J Biol Chem. 265:16039-16042.

Magnusson, B. y Örnemark, U. (2014) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (2ª edición). Recuperado a partir de [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)

Melo, V. y Cuamatzi, O. (2007). Bioquímica de los procesos metabólicos. Editorial Reverté, p. 374-376.

Miller, J. y Miller C. (2002) Estadística y quimiometría para química analítica, Pearson Educación, S.A. Madrid p. 45-58

Molina, M.; Schaidler, A.; Donaghey, C.; Shine, P. y Brain, D. (2013) Mineralogy affects geoavailability of zinc. Environmental Pollution 182 (2013) 217-224

Ng, J.; Juhasz, A.; Smith, E. y Naidu, R. (2010) Contaminant bioavailability and bioaccessibility - Part 1: A scientific and technical review. 2010 avr.

Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (2007) Que



establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. (p. 3-64).

Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 (2002) Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.

NRES 381 (2002). Soil pH and Eh measurement by electrode and a pH meter. College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences.

Ochiai, E. (1984) Química bioinorgánica: una introducción. Editorial Reverté, pags. 175 y 176.

Oomen, A.; Hack, A.; Minekus, M.; Zeijdner, E.; Cornelis, C.; Schoeters, G.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T.; Wragg, J.; Rompelberg, J.; Sips, J. y Van Wijnen, H. (2002) Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. Environ. Sci. Technol. août 1;36(15):3326-34

Oomen, A.; Brandon, E.; Swartjes, A. y Sips A. (2006) How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated soils? Implementation and scientific basis.

Oomen, A.; Rompelberg, J.; Bruil, A.; Dobbe, J.; Pereboom, P. y Sips, J. (2003) Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. Arch. Environ. Contam. Toxicol 44, 281-287.

Oomen A., Rompelberg C., Bruil M., Dobbe C., Pereboom D. y Sips J. (2003) Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2003 avr; 44(3):281-7.

Palacios, A. y América, L. (1997). Introducción a la toxicología ambiental. Metepec, ECO, p.247-254., México

Patrick, W.; Gambrell, R. y Faulkner, S. (1996). Redox measurements of soils en Sparks, D. Methods of soil analysis, Parte 3: Chemical methods. Soil Science Society of America, Madison, Wi., USA

Paustenbach, J. (2000) The practice of exposure assessment: a state-of-the-art review. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2000 sept; 3(3): 179-291.

Pompella, A.; Visvikis, A.; Paolicchi, A.; De Tata, V. y Casini, F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 66 (8): pp. 1499-503.

Química ambiental de suelos QAS (2012) Clase de Posgrado en Ciencias de la Tierra, UNAM.

Roberts, M. (2004) Incorporating Information on Bioavailability of Soil-Borne Chemicals into Human Health Risk Assessments. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2004; 10(4):631

Rodríguez, R.; Basta, T.; Casteel, W. y Pace, W. (1999) An *In vitro* Gastrointestinal Method To Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media. *Environmental Science & Technology*. Fevr 1; 33(4):642-9.

Rosenman, K. (2007) Occupational Heart Disease. In: Rom W and Markowitz S eds. *Environmental and Occupational Medicine*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, page 688.

Ruby, V.; Davis, A.; Link, T.; Schoof, R.; Chaney, R.; Freeman, G. y Bergstrom, P. (1993) Development of an *in vitro* screening test to evaluate the *in vivo* bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science & Technology*. dec 1; 27(13):2870-7.

Ruby, V.; Davis, A.; Schoof, R.; Eberle, S. y Sellstone, M. (1996) Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. *Environmental Science & Technology*. janv 1; 30(2):422-30.

Ruby, M.; Schoof, R.; Brattin, W.; Goldade, M.; Post, G.; Harnois, M.; Mosby, D.; Casteel, S.; Berti, W.; Carpentier, M.; Edwards, D.; Cragin, D. y Chappell, W. (1999) Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environmental Science & Technology*. 1999 nov 1; 33(21):3697-705.

Sadiq, M. (1997) Arsenic Chemistry in soils: an overview of thermodynamic predictions and field observations. *Water, Air, & Soil Pollution* 93: 117-136. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. doi:10.1023/A:1022135909197

Saikat, S.; Barnes, B. y Westwood, D. (2007) A review of laboratory results for bioaccessibility values of arsenic, lead and nickel in contaminated UK soils. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 42, 1213-1221.

Schoof, A. (2003) Guide for Incorporating Bioavailability Adjustments into Human Health and Ecological Risk Assessments at US Department of Defense Facilities.

Schoof, A. (2004) Bioavailability of Soil-Borne Chemicals: Method Development and Validation. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2004; 10(4):637

Secretaría de Economía (2015) Minería/Estadísticas y estudios del sector. Revisado en: <http://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria-estadisticas-y-estudios-del-sector-6951>

Siebe, C. y Cram, S. (2012) Curso: Degradación y Contaminación del Suelo. Posgrado en Ciencias de la Tierra, UNAM.

Sips J.; Bruil, M.; Dobbe, C.; Van de Kamp, E.; Oomen, A.; Pereboom, D.; Rompelberg, C. y Zeilmaker, M. (2001) Bioaccessibility of contaminants from ingested soil in humans: method development and research on the bioaccessibility of lead and benzo[a]pyrene. RIVM; 2001.

Soil Science Society of America (SSSA) (1997) Glossary of Soil Science Terms, American Society of Agronomy, Madison, WI p. 138

SSA Book. No. 5 part III (1996) Glossary of Soil Science Terms. Soil Science Society of America, USA.

Sparks, D. (2003) Environmental Soil Chemistry. Segunda edición, Editorial Academic Press, Estados Unidos, p. 115 y 116

Sparks, D. (2005) Toxic Metals in the Environment: The Role of Surfaces. ELEMENTS v. 1 no. 4 p. 193-197

Sposito, G. (2008). The Chemistry of Soils, Nueva York, Ed. Oxford University Press, p. 3 -13.

Taylor, J. (1987) Quality Assurance of Chemical Measurements. Lewis publishers, USA, p. 132

U.S. DDF (2003). (Department of Defense Facilities) Guide for Incorporating Bioavailability Adjustments into Human Health and Ecological Risk Assessments at U. S. Department of Defense Facilities. Part 1: Overview of Metals Bioavailability. Updated by Rosalind A. Schoof, Ph. D. US-DDF, June.

U.S. DDF (2003). (Department of Defense Facilities) b. Technical Background Document for Assessing Metals Bioavailability. Part 2 Guide for Incorporating Bioavailability Adjustments into Human Health and Ecological Risk Assessments at U.S. Department of Defense Facilities, June.

U.S. EPA (1989) Risk Assessment Guidance for Superfund Volume I. Human Health Evaluation Manual (Part A). Office of Emergency and Remedial Response U.S. Environmental Protection Agency. Washigton, D.C. 20450.

U.S. EPA (1995) Method 9045C (United States Environmental Protection Agency). Soil and Waste pH to Test Methods for Evaluating solid. <http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/9045c.USA>. January.

U.S. EPA (1996) Method 6010B. Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry. USA.

U.S. EPA (2000) Ecological Soil Screening Level Guidance. DRAFT. U.S. Office of Emergency and Remedial Response 1200 Pennsylvania Avenue, N.W. Washington D.C. 20460.

U.S. EPA (2002) (United States Environmental Protection Agency). Region 9 Preliminary Remediation Goals (PRG) Table: The Pacific Southwest. <http://www.epa.gov/region09/waste/sfund/prg/files/04prgtable.pdf>

U.S. EPA (2007). Método 6200. (United States Environmental Protection Agency). Field portable x-ray fluorescence spectrometry for the determination of elemental concentrations in soil and sediment, p. 3, 10-30.

Van de Wiele, R.; Oomen, A.; Wragg, J.; Cave, M.; Minekus, M.; Hack, A.; Cornelis, C.; Rempelberg, J.; De Zwart, L.; Klinck, B.; Van Wijnen, J.; Verstraete, W. y Sips, J. (2007) Comparison of five *in vitro* digestion models to *in vivo* experimental results: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *J Environ Sci Health ATox Hazard Subst Environ Eng.* 2007 juill 15; 42(9):1203–11.

Vázquez, A. y Bautista, N. (1993) Guía para interpretar el análisis químico de suelo y agua. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma de Chapingo. México.

Vega, S. (1985) Toxicología III; aspectos específicos de la toxicología de algunos contaminantes. ECO, Evaluación epidemiológica de Riesgos Causados por Agentes Químicos Ambientales, 6. México, D.F.; p. 200

Wardle, D.; Bardgett, R.; Klironomos, J.; Setälä, H.; van der Putten, W. y Wall, D. (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science.* 304: 1629-1633.

Whitford J. (2006) Ingestion bioavailability of arsenic, lead and cadmium in human health risk assessments: critical review, and recommendations.

Wragg, J.; Cave, M.; Basta, N.; Brandon, E.; Casteel, S.; Denys, S.; Gron, C.; Oomen, A.; Reimer, K.; Tack, K. y Van de Wiele, T. (2011) An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Sci Total Environ RECORD study no. 10-0671/1A – 134* [Internet]. 2011 jun 22 [cite 2011 juill 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703664>.

### *Referencias web*

Ataxia. Revisado el 26 de febrero de 2014 a las 2:10 pm en:  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003198.htm>

Escoria. Revisado el 26 de febrero de 2014 a la 1:20 pm en:  
[http://www.sma.df.gob.mx/sma/download/archivos/manual\\_residuos\\_peligrosos\\_giro\\_fundicion.pdf](http://www.sma.df.gob.mx/sma/download/archivos/manual_residuos_peligrosos_giro_fundicion.pdf)

Histonas. Revisado el 26 de febrero de 2014 a la 1:55 pm en:  
<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/estructura%20cromosoma1.html>

Neuritis periférica. Revisado el 26 de febrero a las 2:05 pm en:  
[http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area\\_medica/rehabili/neuropatia\\_periferica.pdf](http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/rehabili/neuropatia_periferica.pdf)

Reacciones de As. Revisado el 30 de julio de 2016 a las 12:00 pm en:  
[http://www.atsdr.cdc.gov/es/sem/arsenic/cambios\\_patogenicos.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/sem/arsenic/cambios_patogenicos.html)

Xenobiótico. Revisado el 19 de febrero de 2014 a las 5:38 pm en:  
[http://www2.uah.es/tejedor\\_bio/bioquimica\\_ambiental/T2.htm](http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/T2.htm)

## 6. Apéndice analítico

A.1 Caracterización de suelos.....	97
A.2 Límites de detección de los equipos utilizados.....	102
A.3 Pruebas estadísticas.....	102
A.4 Descripción de las características generales de los métodos de bioaccesibilidad.....	107
A.5 Concentraciones de As en las muestras del Norte de México.....	112
A.6 Descripción de los métodos analíticos utilizados.....	116
A.7 Métodos utilizados para medir la bioaccesibilidad.....	120

### A.1 Caracterización de suelos

Cuadro 27. Concentraciones de referencia totales (CR<sub>T</sub>) por tipo de uso de suelo de la NOM-147

Contaminante	Uso agrícola, residencial o comercial mg*kg <sup>-1</sup>	Uso industrial mg*kg <sup>-1</sup>
Arsénico	22	260
Bario	5,400	67,000
Berilio	150	1 900
Cadmio	37	450
Cromo hexavalente	280	510
Mercurio	23	310
Níquel	1 600	20 000
Plata	390	5 100
Plomo	400	800
Selenio	390	5 100
Talio	52	67
Vanadio	78	1 000

Cuadro 28. Concentraciones solubles de referencia de contaminantes (CRs) que establece la NOM-147

Contaminante	Concentración mg*L <sup>-1</sup>
Arsénico	0.500
Bario	10.000
Berilio	0.122
Cadmio	0.100
Mercurio	0.020
Níquel	1.100
Plata	0.500
Plomo	0.500
Selenio	0.100
Talio	0.020
Vanadio	0.160

Cuadro 29. Criterios para evaluar la salinidad de un suelo, con base en la interpretación de su conductividad eléctrica según la NOM-021-SEMARNAT-2000

<b>CE dS m<sup>-1</sup> a 25°C</b>	<b>Efectos</b>
< 1.0	Efectos despreciables de la salinidad
1.1 - 2.0	Muy ligeramente salino
2.1 - 4.0	Moderadamente salino
4.1 - 8.0	Suelo salino
8.1 - 16.0	Fuertemente salino
> 16.0	Muy fuertemente salino

Los resultados de las concentraciones totales de muestras individuales, a partir de las cuales se prepararon las muestras compuestas, se presentan a continuación:

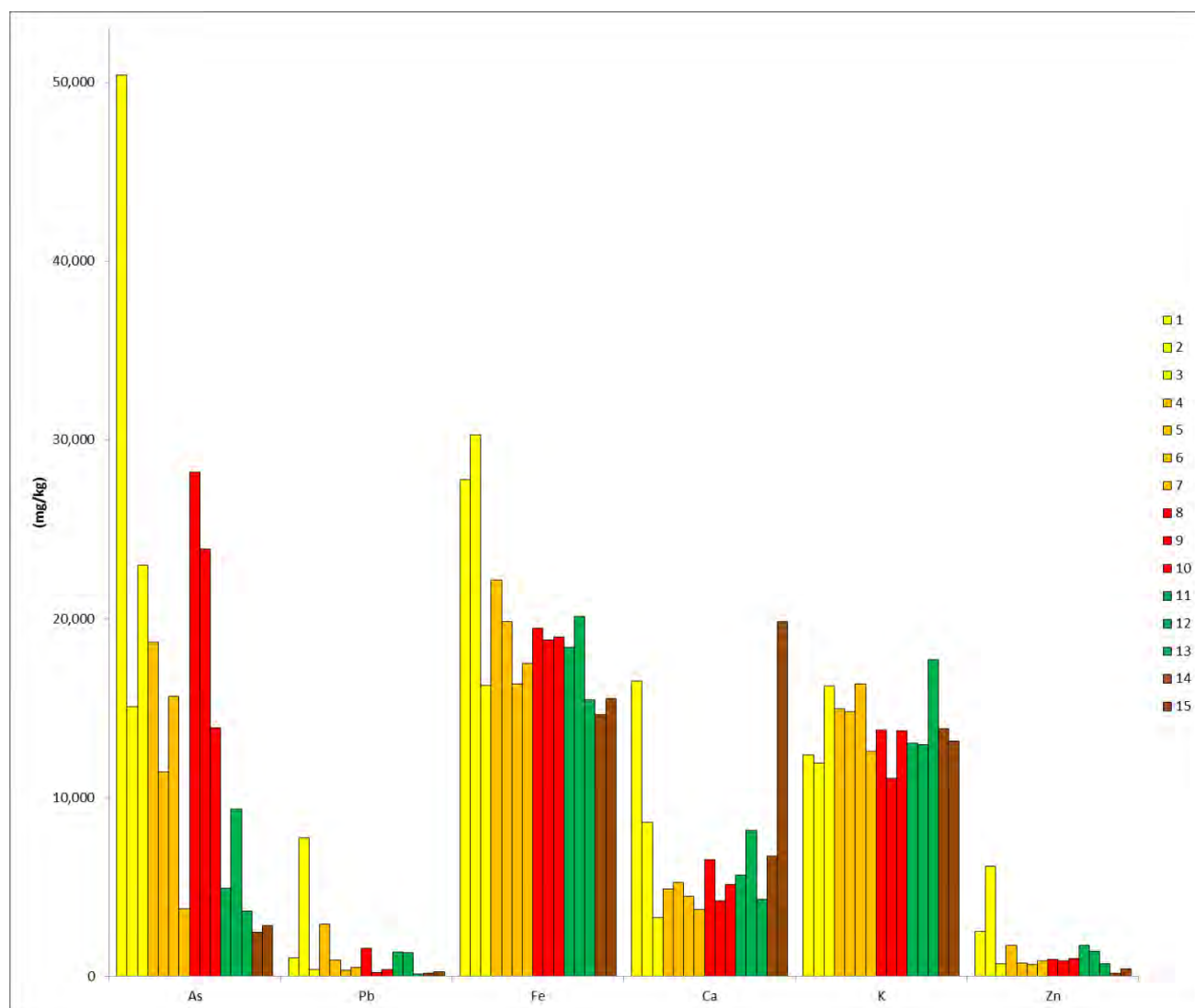


Figura 44. Concentraciones totales obtenidas por FRX de As, Pb, Fe, Ca, K y Zn en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de las muestras individuales que conforman las muestras compuestas



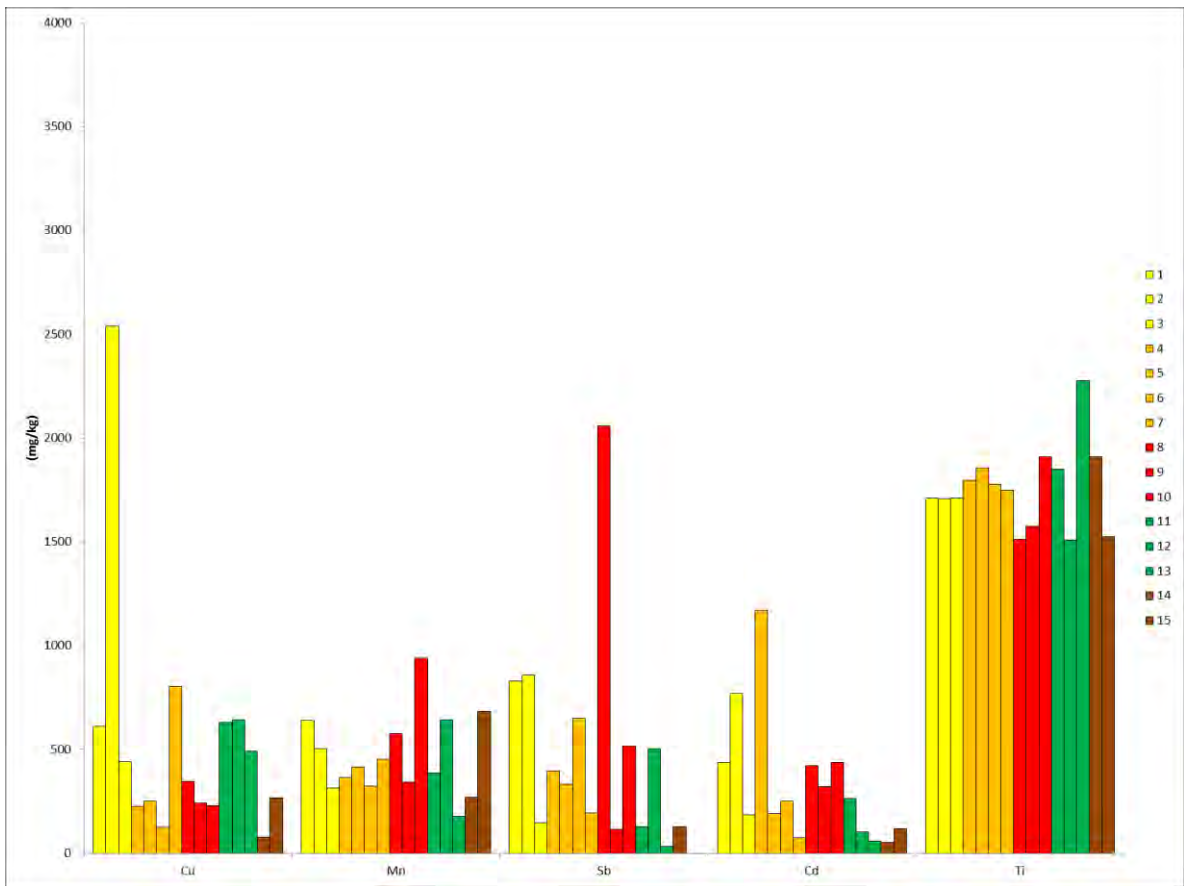


Figura 45. Concentraciones totales obtenidas por FRX de Cu, Mn, Sb, Cd y Ti en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de las muestras individuales que conforman las muestras compuestas

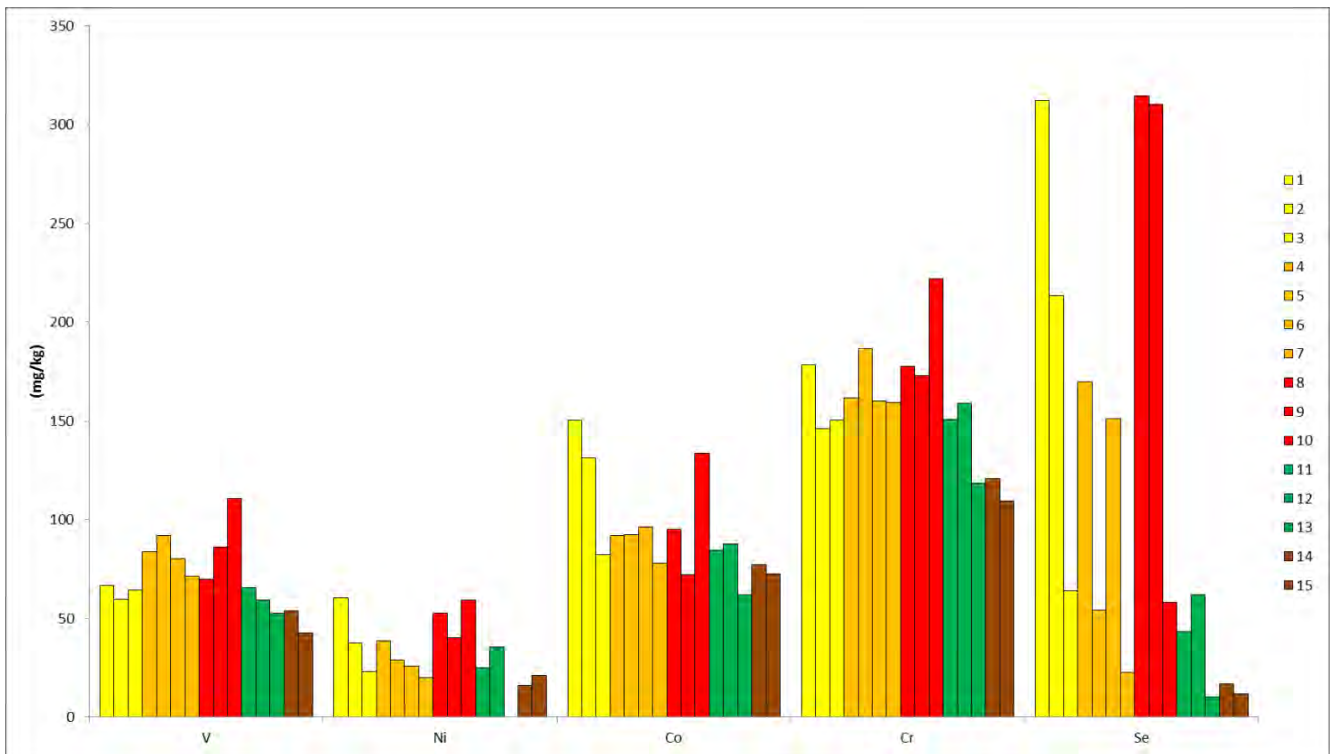


Figura 46. Concentraciones totales obtenidas por FRX de V, Ni, Co, Cr y Se en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de las muestras individuales que conforman las muestras compuestas

Cuadro 30. **Coefficientes de correlación "r", entre parámetros de las muestras individuales que conforman las muestras compuestas**

Variables	pH vs C.E.	pH vs E	E vs C.E.	As <sub>TOT</sub> vs As <sub>geo</sub>	As <sub>TOT</sub> vs Fe <sub>TOT</sub>	As <sub>TOT</sub> vs Ca <sub>TOT</sub>	As <sub>TOT</sub> vs K <sub>TOT</sub>	C.E. vs As <sub>geo</sub>	As <sub>TOT</sub> vs Zn <sub>TOT</sub>
Todas muestras compuestas	-0.08	-0.99	0.01	0.59	0.57	0.23	-0.20	-0.34	0.39
Compuesta 1	0.98	-1.00	-0.98	0.90	0.14	0.81	-0.21	0.08	-0.40
Compuesta 2	-0.79	-0.99	0.88	0.99	0.47	0.65	0.83	0.09	0.91
Compuesta 3	-0.36	-1.00	0.30	0.99	0.54	0.54	-0.22	-1.00	0.43
Compuesta 4	0.34	-0.99	-0.20	0.95	0.90	0.99	-0.68	1.00	0.37
Compuesta 5	-1.00	-1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-1.00	1.00	1.00

Nota: se abrevió concentración total como "TOT" y geodisponible como "geo"

Se calcularon los coeficientes de correlación entre los parámetros de pH, conductividad eléctrica (C.E.), potencial químico (E), As geodisponible y As, Ca, K y Zn totales en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Los coeficientes de correlación entre todas las muestras, indica que los parámetros de pH y potencial químico están linealmente relacionados ( $r = -0.99$ ), al aumentar el pH disminuye el potencial. En la Compuesta 2 el As total correlaciona con el As geodisponible ( $r = 0.99$ ), el As total con el Zn total ( $r = 0.91$ ) y también entre el pH y la C.E. ( $r = -0.99$ ). En la Compuesta 3 el As total correlaciona con el As

geodisponible ( $r = 0.99$ ). En la Compuesta 4 alta correlación entre As y As geodisponible ( $r = 0.95$ ), Fe total ( $r = 0.90$ ) y Ca total ( $r = 0.99$ ). La Compuesta 5 se conforma de únicamente 2 muestras alcalinas, por eso todos los valores de  $r$  son 1 ó -1 cerrado.

## A.2 Límites de detección de los equipos utilizados

Cuadro 31. Límites de FRX del Laboratorio Geoquímica Ambiental

Elemento	L.D. (%)	L.D. mg*kg <sup>-1</sup>
Hierro	0.0114	113.0
Titanio	0.021	209.5
Manganeso	0.0107	107.3
Níquel	0.0005	5.5
Zinc	0.0061	61.1
Zirconio	0.0008	8.1
Cobre	0.0042	42.7
Estroncio	0.0004	4.3
Plomo	0.0003	3.7
Arsénico	0.0014	14.5
Bario	0.0027	27.1
Vanadio	0.0093	93.2
Cromo	0.0095	95.5

Nota: 1% equivale a 10 000 mg\*kg<sup>-1</sup>

Cuadro 32. Límites de detección y límites de cuantificación del ICP-OES en LABQA

Elemento	Ag	As	Ba	Be	Cd	Ni	Pb	Se	Tl	V
$\lambda$ , nm	328.0	193.7	455.4	313.0	228.8	221.6	216.9	196.0	190.8	292.4
L.D. mg*L <sup>-1</sup>	0.017	0.019	0.003	0.005	0.006	0.005	0.010	0.016	0.013	0.005
L.C. mg*L <sup>-1</sup>	0.026	0.032	0.010	0.015	0.020	0.014	0.028	0.030	0.026	0.010

## A.3 Pruebas estadísticas

Exactitud de Pb bioaccesible con el método PBET en el equipo LABQA 2014

En la NOM-147 se establece como criterio de control de calidad, que el porcentaje de recobro del suelo NIST Montana 2711<sup>a</sup> debe ser entre ( $9.22 \pm 1.50$  mg\*L<sup>-1</sup>), en porcentaje es ( $79 \pm 13$ ) % de Pb bioaccesible respecto al Pb total del certificado. Se comprobó que el método PBET cumplió con la exactitud que establece la NOM-147 para Pb bioaccesible en fase gástrica, ya que se obtuvo ( $90-92$ ) % de recobro (Cuadro 33).

Cuadro 33. Exactitud del Pb bioaccesible durante la fase gástrica (método PBET) del suelo Montana 2711<sup>a</sup> en el equipo LABQA 2014

Experimento independiente*	Pb (mg*kg <sup>-1</sup> )	% de recobro**
1	1,264	90
2	1,280	91
3	1,253	90
4	1,275	91
5	1,288	92
6	1,288	92
mínimo	1,253	90
máximo	1,288	92
media	1,275	91

\* Cuando se determinó la bioaccesibilidad de As con el método PBET en el equipo LABQA 2014, se realizaron 6 experimentos independientes para analizar todas las muestras, donde se colocó una vez en cada experimento el suelo NIST Montana 2711<sup>a</sup> para determinar la reproducibilidad del método PBET y del equipo LABQA 2014

\*\*El % recobro se calculó con respecto a la concentración de Pb total del certificado (1400 mg\*kg<sup>-1</sup>)

### Comparación estadística, entre utilizar aire y argón con el método gástrico simplificado

Para decidir si es significativa la diferencia entre dos medias muestrales, se contrastó una hipótesis nula (H<sub>0</sub>), que se establece como H<sub>0</sub>: μ<sub>1</sub> = μ<sub>2</sub>, que las medias poblacionales son iguales, mediante el cálculo del estadístico t (Miller & Miller, 2002). Se realizó esta prueba para comparar el uso de aire y argón, en el método gástrico simplificado. El valor del estadístico "t" se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{s * \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde "s" se calcula a partir de,

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Donde t tiene como grados de libertad n<sub>1</sub> + n<sub>2</sub> - 2. En este método, se parte de la suposición, de que las muestras se extraen de poblaciones, con desviaciones estándar iguales.

Cuadro 34. Resultados de As en mg\*L<sup>-1</sup>, del método PBET modificado (fase gástrica), utilizando argón y aire en el equipo LABQA 2014

Muestra	As mg*L <sup>-1</sup> método gástrico modificado*	
	argón	aire
Compuesta 4 rep 1	40.28	39.84
Compuesta 4 rep 2	40.58	41.25
Compuesta 4 rep 3	40.52	40.45
promedio	40.46	40.51
desviación estándar	0.16	0.71
%C.V.	0.4	1.7

\*Método PBET modificado (fase gástrica) se abrevió como MGM

$$H_0: \mu_{\text{argón MGM}} = \mu_{\text{aire MGM}}$$

$$n_{\text{argón MGM}} = 3$$

$$n_{\text{aire MGM}} = 3$$

$$\bar{X}_{\text{argón MGM}} = 40.46$$

$$\bar{X}_{\text{aire MGM}} = 40.51$$

$$S_{\text{argón MGM}} = 0.16$$

$$S_{\text{aire MGM}} = 0.71$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$s^2 = \frac{(3 - 1)0.16^2 + (3 - 1)0.71^2}{(3 + 3 - 2)} = \frac{(2 * 0.16^2) + (2 * 0.71^2)}{4}$$

$$S^2 = 0.2649 \quad \dots \quad S = 0.5146$$

$$t_{\text{calculada}} = \frac{(40.46 - 40.51)}{0.5146 * \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = |-0.1190|$$

$$t_{\text{tablas}} = t_{(n_1 + n_2 - 2), 0.975} = t_{(3 + 3 - 2), 0.975} = t_{(4, 0.975)} = 2.776$$

Conclusión:

$$t_{\text{calculado}} (0.119) < t_{\text{tablas}} (2.776)$$

Se acepta  $H_0$  al 95 % de confianza, no hay diferencia significativa entre la FG del método modificado entre argón y aire

### Comparación estadística entre la fase gástrica y la fase intestinal, utilizando argón con el método PBET

Cuadro 35. Resultados de As en  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , de la fase gástrica y la fase intestinal del método PBET, obtenidos del equipo LABQA 2014

Muestra	As $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ método PBET	
	Fase gástrica	Fase intestinal
Compuesta 4 rep 1	39.39	41.28
Compuesta 4 rep 2	41.02	41.57
Compuesta 4 rep 3	39.70	43.49
promedio	40.0	42.1
desviación estándar	0.9	1.2
%C.V.	2.2	2.9

$$H_0: \mu_{FG, \text{ argón PBET}} = \mu_{FI, \text{ argón PBET}}$$

$$n_{FG, \text{ argón PBET}} = 3$$

$$n_{FI, \text{ argón PBET}} = 3$$

$$\bar{X}_{FG, \text{ argón PBET}} = 40.0$$

$$\bar{X}_{FI, \text{ argón PBET}} = 42.1$$

$$S_{FG, \text{ argón PBET}} = 0.9$$

$$S_{FI, \text{ argón PBET}} = 1.2$$

$$s^2 = \frac{(3-1)0.9^2 + (3-1)1.2^2}{(3+3-2)} = \frac{(2 * 0.9^2) + (2 * 1.2^2)}{4}$$

$$S^2 = 1.125 \quad \therefore S = 1.0607$$

$$t_{calculada} = \frac{(40.0 - 42.1)}{1.0607 * \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = |-2.425|$$

$$t_{tablas} = t_{(n_1 + n_2 - 2), 0.975} = t_{(3 + 3 - 2), 0.975} = t_{(4, 0.975)} = 2.776$$

Conclusión:

$$t_{calculada} (2.425) < t_{tablas} (2.776)$$

Se acepta  $H_0$  al 95 % de confianza, no hay diferencia significativa entre la FG y la FI del método PBET

## Comparación estadística entre la fase gástrica del método PBET y el método gástrico modificado, utilizando argón

Cuadro 36. Resultados de As en mg\*L<sup>-1</sup>, de la fase gástrica del método PBET original y del método PBET modificado, obtenidos del equipo LABQA 2014

Muestra	As mg*L <sup>-1</sup> en la fase gástrica	
	Método PBET modificado	Método PBET original
Compuesta 4 rep 1	40.28	39.39
Compuesta 4 rep 2	40.58	41.02
Compuesta 4 rep 3	40.52	39.70
promedio	40.5	40.0
desviación estándar	0.2	0.9
%C.V.	0.4	2.2

H<sub>0</sub>:  $\mu_{\text{argón MGM}} = \mu_{\text{FG, argón PBET}}$

$n_{\text{argón MGM}} = 3$

$n_{\text{FG, argón PBET}} = 3$

$\bar{X}_{\text{argón MGM}} = 40.5$

$\bar{X}_{\text{FG, argón PBET}} = 40.0$

$S_{\text{argón MGM}} = 0.2$

$S_{\text{FG, argón PBET}} = 0.9$

$$s^2 = \frac{(3-1)0.2^2 + (3-1)0.9^2}{(3+3-2)} = \frac{(2 * 0.2^2) + (2 * 0.9^2)}{4}$$

$$S^2 = 0.425 \quad \therefore S = 0.6519$$

$$t_{\text{calculada}} = \frac{(40.5 - 40.0)}{0.6519 * \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = |0.9393|$$

$$t_{\text{tablas}} = t_{(n_1 + n_2 - 2), 0.975} = t_{(3 + 3 - 2), 0.975} = t_{(4, 0.975)} = 2.776$$

Conclusión:

$$t_{\text{calculada}} (0.939) < t_{\text{tablas}} (2.776)$$

Se acepta H<sub>0</sub> al 95 % de confianza, no hay diferencia significativa entre la FG del método PBET y el MGM

#### A.4 Descripción de las características generales de los métodos de bioaccesibilidad

Cuadro 37. Comparación de tipo de prueba, segmentos digestivos, pH, temperatura, comida, uso de gas, cantidad de suelo y relación sólido líquido de los métodos PBET, IVG, DIN 19738 y RIVM en ayuno

MÉTODOS	PBET (Ruby)	PBET modificado (SBET)	PBET modificado por Drexler	IVG	DIN 19738	RIVM en ayuno
Referencias	Ruby (1993 y 1996)	Schoff (2003)	Schoff (2003)	Rodriguez <i>et al.</i> (1999)	Método estándar	Oomen <i>et al.</i> (2003)
Tipo de prueba	estático	estático	estático	estático	estático	estático
Segmentos digestivos	Estómago Intestino delgado	Estómago	Estómago Intestino delgado	Estómago Intestino delgado	Saliva (opcional) Estómago Intestino delgado	Saliva Estómago Intestino delgado (con bilis)
pH	2.5 7	1.5	2 7	1.8 5.5	No determinado 2 7.5	6.5 1.2 >5.5
Temperatura	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Comida	No	No	No	Opcional, alimento utilizado en pruebas <i>in vitro</i>	Opcional (leche en polvo)	No en esta versión
Uso de gas	Argón	No	Argón	Argón	Opcional, Nitrógeno	No
Cantidad de suelo	0.4 g	1 g	1.5 g	4 g	2 g	0.6 ó 0.06 g
Relación sólido: líquido por compartimento	1:100 1:100	1:100	1:100 1:100	1:150	1:15 1:50 1:100	(1:15) ó (1:150) (1:37.5) ó (1:375) (1:97.5) ó (1:975)



Cuadro 38. Comparación de tipo de prueba, segmentos digestivos, pH, temperatura, comida, uso de gas, cantidad de suelo y relación sólido líquido de los métodos RIVM con alimento, UBM, FORHeST, SHIME, TIM, Farmacopea y MB/SR

MÉTODOS	RIVM con alimento	UBM	FORHeST	SHIME	TIM	Farmacopea	MB/SR
Referencias	Gron (2005) y Oomen <i>et al.</i> , (2006)	Caboche (2009)	Cave <i>et al.</i> , (2010)	Laird <i>et al.</i> , (2007)	Oomen <i>et al.</i> , (2002)	Hamel <i>et al.</i> , (1998)	Hamel <i>et al.</i> , (1998) y Ellickson <i>et al.</i> , (2001)
Tipo de prueba	estático	estático	estático	estático/dinámico	estático	estático	estático
Segmentos digestivos	Saliva Estómago Intestino delgado (con bilis)	Saliva Estómago Intestino delgado	Saliva Estómago Intestino delgado	Estómago Intestino delgado Colon	Saliva Estómago Duodeno Yeyuno Íleon	Estómago	Saliva Estómago Intestino delgado
pH	6.8 1.3 8.1	6.5 1.2-1.7 5.8-6.8	6.8 1.3 8.1	1.5 6.2 5.9	5 5.2 6.5 6.8 7.2	No especificado	1.4 6.5
Temperatura	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Comida	Sí, alimento orgánico para bebé	No	Sí, mezcla de alimento para bebé, avena y aceite	Opcional	Opcional	No	No
Uso de gas	No	No	No	Nitrógeno	No	No	No
Cantidad de suelo	0.4 ó 0.04 g	0.6 g	0.3 g	0.15 g	10 g	0.05 ó 0.5 g	0.05 g
Relación sólido: líquido por compartimento	(1:15) ó (1:150) (1:37.5) ó (1:375) (1:97.5) ó (1:975)	1:15 1:37.5 1:97.5	No especificado	1:40 1:60 1:100	1:5 1:9.5 1:45.5	1:100 1:5000	1:160 1:2160 1:4160

Cuadro 39. Comparación de tamaño de partícula, tiempos de residencia, tiempo de manipulaciones, tiempo total, tipo de agitación, tratamiento de la muestra antes de analizar, tipo de recipiente, equipo, otros materiales, número de réplicas, controles analíticos y comentarios de los métodos PBET, IVG, DIN 19738 y RIVM en ayuno

MÉTODOS	PBET (Ruby)	PBET modificado (SBET)	PBET modificado por Drexler	IVG	DIN 19738	RIVM en ayuno
Tamaño de partícula	<250 µm	<250 µm	<250 µm	<250 µm	<1 mm	<1 mm
Tiempos de residencia	1 h 3 h después de alcanzar pH 7	1 h	1 h 3 h después de alcanzar pH 7	1 h 1 h	0.5 h 2 h 6 h	5 min 2 h 2 h
Tiempo de manipulaciones	10 min	No especificado	10 min (purga de Ar)	15 min (centrifugar)	10 min (centrifugar) 12 min a 2 h (agitando) 10 min (centrifugar)	5 min (centrifugar)
Tiempo total (residencia + manipulaciones)	4 h 10 min	1 h	4 h 10 min	2 h 15 min	> 9 h	4 h 10 min
Tipo de agitación	Argón	Rotación (30 rpm)	Propelas	Propelas (100 rpm)	Plataforma agitadora o agitador magnético	Rotación (55 rpm)
Tratamiento de la muestra antes de analizar	Centrifugar	Filtrar	Filtrar	Centrifugar	Centrifugar	Centrifugar
Tipo de recipiente	Embudo de separación	Botellas Nalgene de boca ancha (125 mL)	Envases de acrílico sellados (150 mL) y espacio para monitorear pH, agitador y entrada de Ar	Frascos de vidrio de 1 L	Frascos de vidrio o PE (500 mL) con tapa	Tubos de centrifuga de policarbonato (85 ó 94 mL)
Equipo	Baño de agua termostático Centrifuga	Baño de agua termostático con rotación	Baño de agua termostático	Centrifuga	Baño de agua termostático Centrifuga	Incubador de agitación o baño de agua termostático Centrifuga
Otros materiales	Saco de diálisis	Jeringa para filtración	Saco de diálisis Jeringa para filtración	No especificado	No especificado	No especificado
Número de réplicas según los autores	Duplicado o triplicado	Un duplicado cada 10 muestras	Triplicado	Duplicado	Duplicado o triplicado	Quintuplicado en dos submuestras
Controles analíticos	No especificado	No especificado	No especificado	No especificado	Blanco o un suelo de referencia	Un blanco por serie Un suelo de referencia por serie
Comentarios	Ajuste de pH cada 10 min durante 1 h Tiempo variable en alcanzar pH de 7	La prueba debe repetirse si no se mantiene el pH inicial	Ajuste de pH cada 5 min durante 1 h Tiempo variable en alcanzar pH de 7	No especificado	Se han encontrado pocos estudios	No especificado

Cuadro 40. Comparación de tamaño de partícula, tiempos de residencia, tiempo de manipulaciones, tiempo total, tipo de agitación, tratamiento de la muestra antes de analizar, tipo de recipiente, equipo, otros materiales, número de réplicas, controles analíticos y comentarios de los métodos RIVM con alimento, UBM, FORHeST, SHIME, TIM, Farmacopea y MB/SR

MÉTODOS	RIVM con alimento	UBM	FORHeST	SHIME	TIM	Farmacopea	MB/SR
Tamaño de partícula	<1 mm	<250 µm	<250 µm	<38 µm	No indicado	(150-250 µm)	<125 µm
Tiempos de residencia	5 min 2 h 2 h	5 min 1 h 4 h	5 min 2 h 2 h	2.5 min 3 h 1.8 h	5 min 1.5 h 6 h (total en intestino)	2 h	5 seg 2 h 4 h
Tiempo de manipulaciones	5 min (centrifugar)	5 min (centrifugar)	No especificado	3 semanas (crecer bacterias) 1 h (anaerobio) 20 min (centrifugar)	No especificado	10 min (centrifugar)	50 min (centrifugar)
Tiempo total (residencia + manipulaciones)	4 h 10 min	5 h 10 min	No especificado	23 h 50 min (+ 3 semanas para fase dinámica)	7 h 35 min	2 h 10 min	6 h 50 min
Tipo de agitación	Rotación (55 rpm)	Rotación (55 rpm)	No especificado	Agitador magnético	No especificado	Agitador en baño de agua (90 ciclos/min)	Agitador en baño de agua (90 ciclos/min)
Tratamiento de la muestra antes de analizar	Centrifugar	Centrifugar	No especificado	Centrifugar y ultrafiltración	No especificado	Centrifugar	Centrifugar y ultrafiltración
Tipo de recipiente	Tubos de centrifuga de policarbonato (85 ó 94 mL)	Tubos de centrifuga de policarbonato (85 ó 94 mL)	No especificado	Frascos de vidrio de 30 mL para fase estática y	Reproducción de movimiento de peristalsis, válvulas y membrana intestinal	Botellas Nalgene (> 100 mL) Tubos de centrifuga (15 mL)	Botellas Nalgene 250 mL Tubos de centrifuga (15 mL)
Equipo	Incubador de agitación o baño de agua termostático Centrifuga	Incubador de agitación o baño de agua termostático Centrifuga	No especificado	Centrifuga Equipo para ultrafiltración		Centrifuga	Centrifuga
Otros materiales	No especificado	No especificado	No especificado	Inyector		No especificado	No especificado
Número de réplicas según los autores	Quintuplicado en dos submuestras	Quintuplicado en dos submuestras	Triplicado	Duplicado cada 10 muestras	No especificado	No especificado	No especificado
Controles analíticos	Un blanco por serie Un suelo de referencia por serie	Un blanco por serie Dos suelos de referencia por serie	Blanco	No especificado	No especificado	No especificado	Blancos y controles positivos
Comentarios	Opcional otro tipo de comida, por ej. spaghetti	Las soluciones digestivas se preparan un día antes	A priori como método RIVM	Se requieren microorganismos	Los estudios sólo se han realizado por la compañía TNO	No especificado	No especificado

Cuadro 41. Comparación de las características principales de los métodos PBET y RIVM, modificado de BARC, (2011) y Koch *et al.*, (2013)

Variable	Método						
	RRU-PBET	UG-PBET	RMC-PBET	SFU-PBET	BGS-PBET	PBET – LABQA 2014	RIVM
Cantidad de suelo	<b>1 g</b>	10 mg en 10 alícuotas (5 para la fase estomacal y 5 para la fase intestinal)	<b>0.2 g</b> (una alícuota para fase gástrica y otra para la fase intestinal)	100 mg en 10 alícuotas (5 y 5)	No informado	<b>1.0 g</b>	No informado
Volumen de solución gástrica	100 mL	1 mL	20 mL	10 mL	No informado	100 mL	No informado
Relación sólido: líquido	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:1000
Temperatura	37 °C, controlado por baño de agua termostático	37 °C, controlado por baño de agua termostático	37 °C, controlado por baño de agua termostático	37 °C, controlado por baño de agua termostático	37 °C, controlado por baño de agua termostático	37 °C, controlado por baño de agua termostático	37 °C baño de agua termostático
Composición de solución gástrica	1,25 g/L de pepsina 0.5 g/L de citrato de sodio 0.5 g/L ácido DL-málico 0.42 mL/L de ácido láctico 0.5 mL/L de ácido acético	0.12 g/L de pepsina 0.5 g/L de citrato de sodio 0.5 g/L ácido málico 0.42 mL/L de ácido láctico 0.5 mL/L de ácido acético	1,25 g/L de pepsina 0.5 g/L de citrato de sodio 0.5 g/L ácido málico  0.5 mL/L de ácido acético <b>0.15 M de NaCl</b>	0.13 mM de pepsina 0.5 g/L de citrato de sodio 0.5 g/L de ácido málico 0.42 mL/L de ácido láctico 0,5 mL/L de ácido acético glacial	1,25 g/L de pepsina 0.50 g/L de citrato de sodio 0.50 g/L malato de sodio 0.42 mL/L de ácido láctico 0.5 mL/L de ácido acético	1,25 g/L de pepsina 0.50 g/L de citrato de sodio 0.50 g/L malato de sodio 0.42 mL/L de ácido láctico 0.5 mL/L de ácido acético	Solución que simula saliva (sales, enzimas y otros) + solución gástrica compleja (ácidos, enzimas, sales y otros)
pH gástrico	<b>2</b> (ajustado con HCl concentrado)	<b>2.5</b> (ajustado con HCl 0.18 M)	<b>1.8</b> (ajustado con HCl concentrado)	<b>2.5</b> (ajustado con HCl 0.18 M)	<b>2.5</b> (ajustado con HCl concentrado)	<b>1.5</b>	1.5

Variable	Método						
	RRU-PBET	UG-PBET	RMC-PBET	SFU-PBET	BGS-PBET	PBET – LABQA 2014	RIVM
Agitación: método y velocidad	<b>Rotación de 30 rpm</b>	Plataforma agitadora a 70 rpm	<b>Plataforma agitadora a 70 rpm</b>	Rotación a 60 rpm	<b>Rotación a 30 rpm</b>	<b>1 L/min de argón</b>	Rotación a 50 rpm
Duración de fase gástrica	1 h (pH ajustado a 2 cada 5 min)	2 h	1 h (ajustado a pH 1.8 cada 30, 45 y 60 min)	1 h	1 h	<b>1 h</b>	<b>2 h</b>
Tratamiento de extractos de la fase gástrica	Filtración a través de 0.45 µm  Almacenamiento a 4 °C	Filtración a 1.6 µm + ataque ácido (1 mL HNO <sub>3</sub> al 70 % a 110 °C y dilución en 10 mL)	<b>Centrifugar</b> por 30 min (2800 g) + Filtración a través de 0.45 µm Almacenamiento a 4 °C	Centrifugar por 5 min (2000 g)  Almacenamiento a 4 °C	Filtración a través de 0.45 µm  Almacenamiento a 4 °C	Filtración a través de 0.45 µm  Almacenamiento a 4 °C	Centrifugar (3,000 g)
Duración de fase intestinal	<b>3 h</b>	0.5 h y después adicionar NaHCO <sub>3</sub>	<b>4 h</b>	0.5 h y luego 0.5 h	<b>2 h + 2 h</b>	<b>3 h</b>	2 h
Composición de la solución intestinal	Solución saturada de NaHCO <sub>3</sub>  <b>1.75 g/L de sales biliares</b>  <b>0.5 g/L de pancreatina</b>	7 mg de NaHCO <sub>3</sub> sólido 0.5 h a 37 °C  0.36 g/L de extracto biliar  0.03 g/L de pancreatina 1 mM de CaCl <sub>2</sub> 0.04 M de Tris buffer pH 7 100 mg/mL de BSA*	Solución saturada de NaHCO <sub>3</sub>  <b>1.75 g/L de extracto de bilis</b> <b>0.5 g/L de pancreatina</b>	7 mg de NaHCO <sub>3</sub> sólido 0.5 h a 37 °C  0.36 g/L de extracto biliar  0.03 g/L de pancreatina 1 mM de CaCl <sub>2</sub> 0.04 M de Tris buffer pH 7 0.9 g/L de BSA*	Solución saturada de NaHCO <sub>3</sub>  <b>1.75 g/L de extracto biliar</b>  <b>0.5 g/L de pancreatina</b>	Solución saturada de NaHCO <sub>3</sub>  <b>17.3 g/L de sales biliares</b>  <b>5 g/L de pancreatina</b>	Solución intestinal compleja (NaHCO <sub>3</sub> , otras sales, enzimas y sales biliares)
pH intestinal	7	7	7	7	7	7	5.5
Tratamiento de extractos de la fase intestinal	Filtración a través de 0.45 µm	Ataque ácido (1 mL HNO <sub>3</sub> al 70 %, a 110 °C, dilución en 10 mL)	Ataque ácido (HNO <sub>3</sub> al 2 %, dilución 10 veces)	Centrifugar 5 min (2000 g) 4 °C	Filtración a través de 0.45 µm Almacenamiento a 4 °C	Filtración a través de 0.45 µm Almacenamiento a 4 °C	No informado

\*BSA se refiere a albúmina sérica bovina

Explicación de las siglas de los métodos PBET:

- SBET, Simplified Bioaccessibility Extraction Test

- RBALP, Relative Bioaccessibility Leaching Procedure
- RRU, Royal Roads University
- UG, University of Guelph
- RMC, Royal Military College
- SFU, Simon Fraser University
- SGS, SGS Lakefield
- BGS, British Geological Survey

#### A.5 Concentraciones de As en las muestras del Norte de México

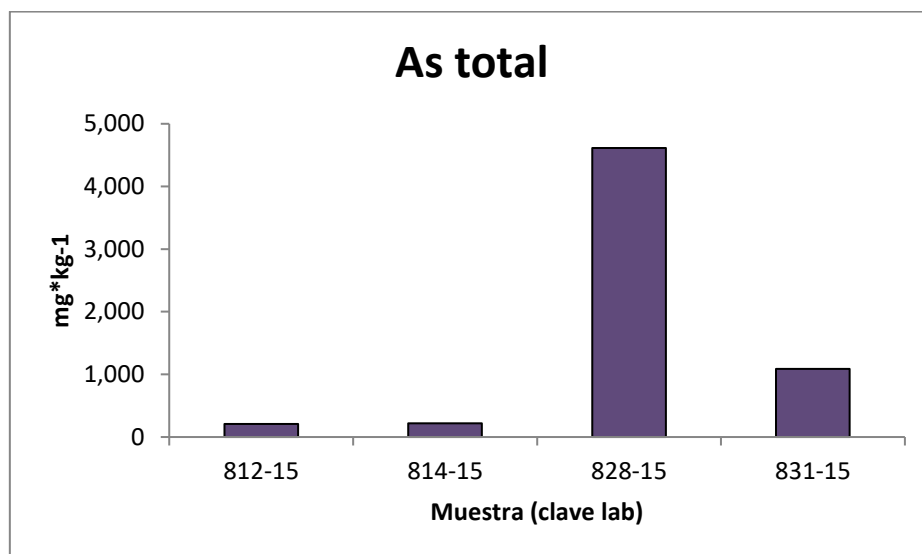


Figura 47. Concentración de As total en mg\*kg<sup>-1</sup> del sitio Chihuahua 2, mediante ICP-OES

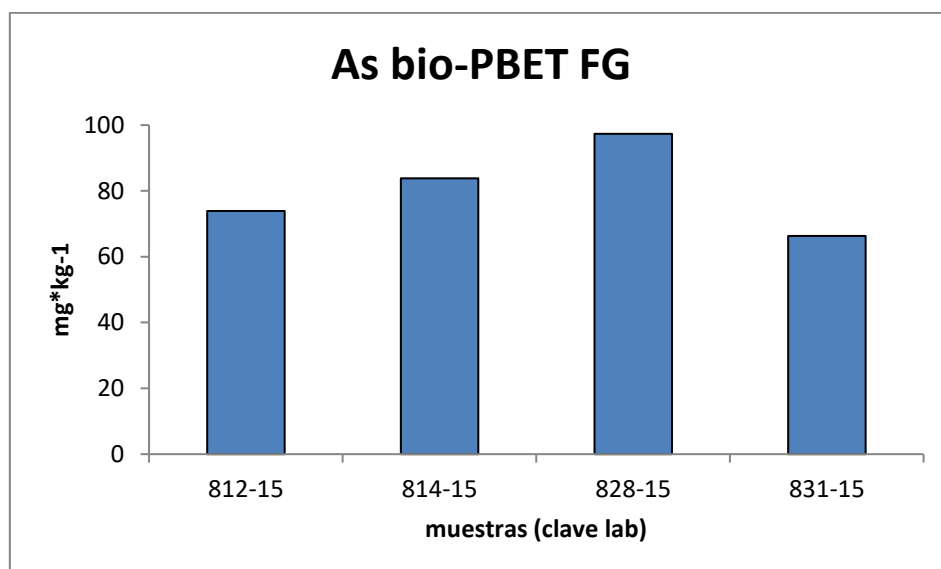


Figura 48. Concentración de As en la fase gástrica en mg\*kg<sup>-1</sup> del sitio Chihuahua 2, con el método PBET en el equipo LABQA 2014

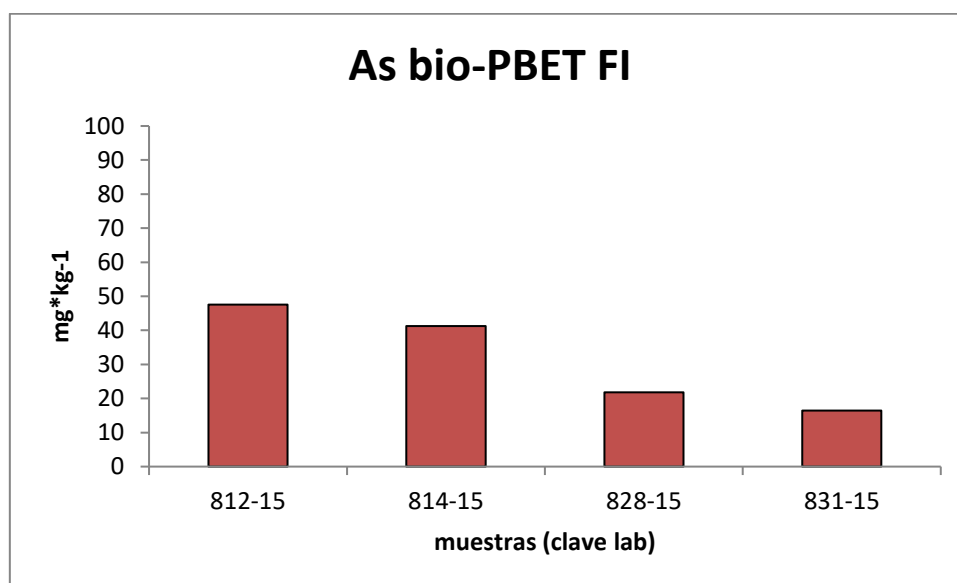


Figura 49. Concentración de As en la fase intestinal en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  del sitio Chihuahua 2, con el método PBET en el equipo LABQA 2014

Para evaluar la viabilidad de aplicar el método PBET en un gran número de muestras ( $n = 83$ ) con el método PBET en el equipo LABQA, se prepararon duplicados cada 5 muestras. Este criterio se consideró aceptable, considerando que el procedimiento señalado en la NOM-147 indica preparar un duplicado por cada lote de 8 muestras.

Las 4 muestras de la zona residencial limítrofe al área en remediación, presentaron niveles de  $\text{As}_{\text{total}}$  de 209 hasta  $4,613 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $\text{As}_{\text{bioaccesible}}$  para la fase gástrica de 66 a  $97 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  y  $\text{As}_{\text{bioaccesible}}$  para la fase intestinal de 16 a  $48 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . En las Figuras 50, 51 y 52 se aprecian los histogramas, con la distribución de frecuencias de concentración para:  $\text{As}_{\text{total}}$  (Figura 50),  $\text{As}_{\text{bioaccesible}}$  de la fase gástrica (Figura 51) y  $\text{As}_{\text{bioaccesible}}$  de la fase intestinal (Figura 52). En el sitio Chihuahua 3, que constó de 70 muestras, se realizaron solamente 14 duplicados; los intervalos de concentración que se obtuvieron fueron los siguientes:  $\text{As}_{\text{total}}$  de 25 a  $12,098 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,  $\text{As}_{\text{bioaccesible}}$  para la fase gástrica de 24 a  $5,014 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  y  $\text{As}_{\text{bioaccesible}}$  para la fase intestinal de 18 a  $392 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Los amplios intervalos se debieron a que fueron suelos sin tratar y remediados.

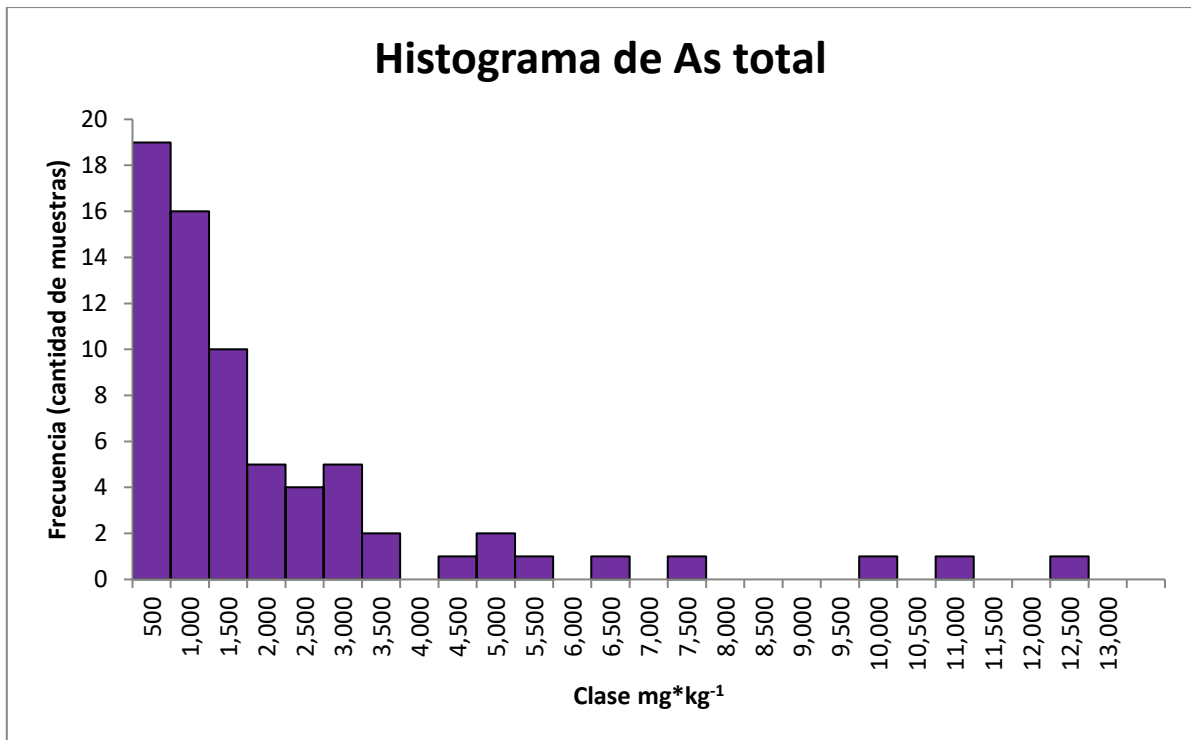


Figura 50. Concentración de As total en  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de las muestras del sitio Chihuahua 3

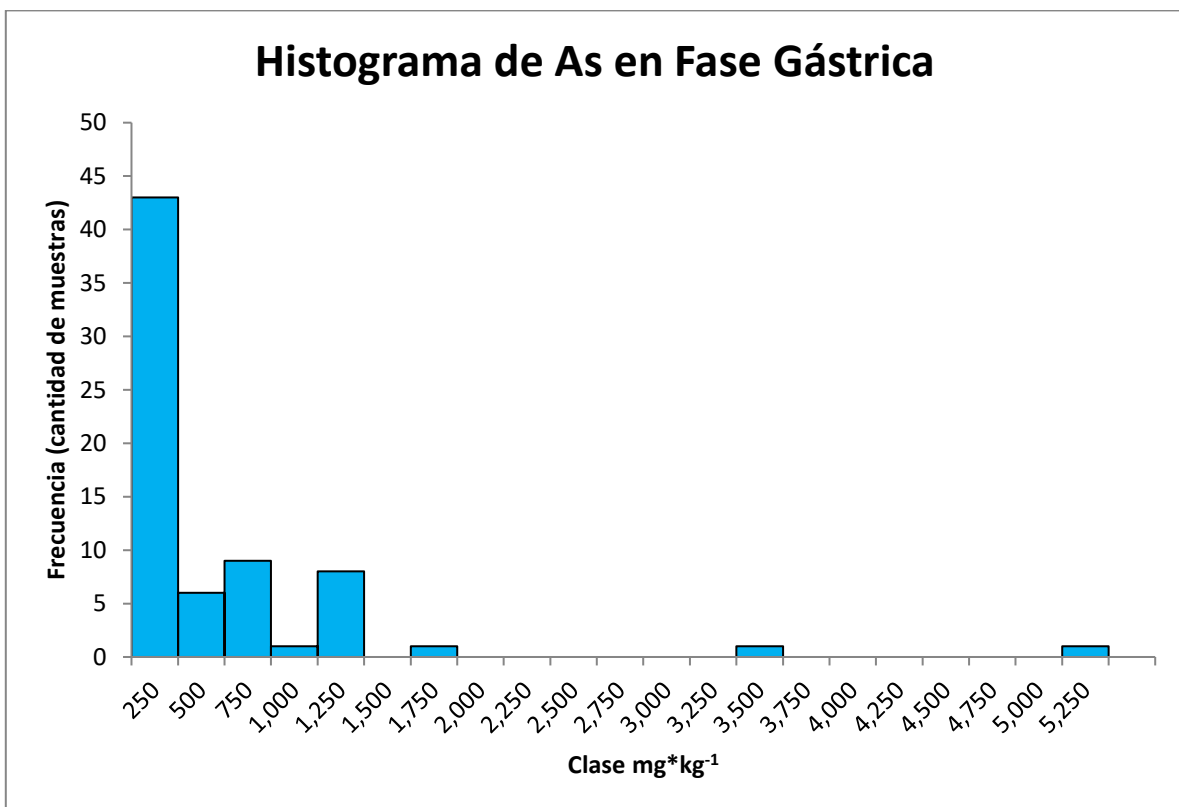


Figura 51. Concentración de As en la fase gástrica en  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de las muestras del sitio Chihuahua 3

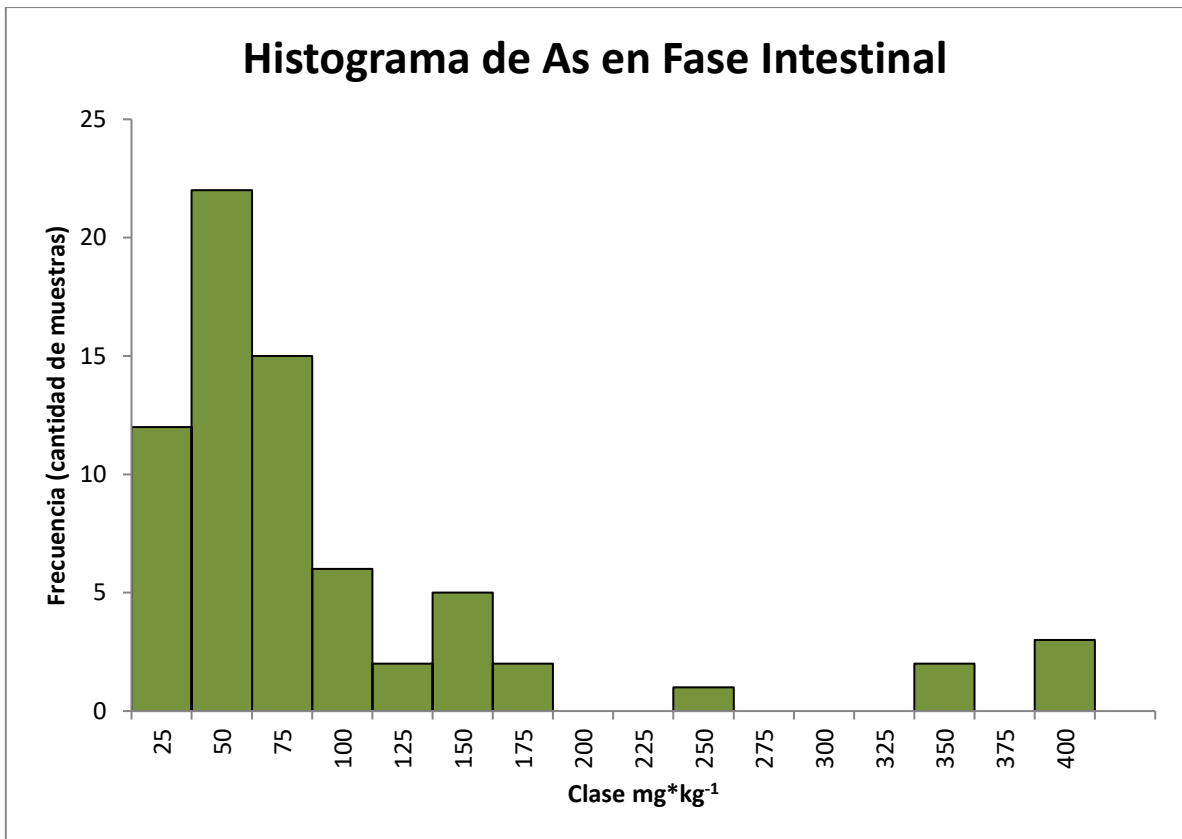


Figura 52. Concentración de As en la fase intestinal en  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de las muestras del sitio Chihuahua 3



## A.6 Descripción de los métodos analíticos utilizados

### Medición de pH

Método de referencia: U.S. EPA 9045D

#### *Equipo*

- Potenciómetro marca BECKMAN 720
- Agitador orbital marca Heidolph Unimax 2010

#### *Material*

- Pañuelos absorbentes
- Recipientes de polietileno de 100 mL

#### *Reactivos*

- Disoluciones buffer pH 4.0, 7.0 y 10.0
- Agua Tipo 1 (agua de características conocidas por la ASTM D1193-99, la cual presenta una resistividad eléctrica mínima de **17.0 MΩ/cm a 25 °C**)

#### *Procedimiento*

En los recipientes de polipropileno se colocaron 7.0 g de muestra (tamizada por malla # 60) en 21.0 mL de agua Tipo 1, la cantidad de muestra se modificó a la indicada en el método (20 g/60 mL), ya que se contaba con poca muestra, manteniendo la relación suelo-agua (1:3). Después se taparon herméticamente los recipientes y se mantuvieron en agitación orbital durante 5 min a 240 rpm. Por cada lote se utilizó un blanco (agua Tipo 1) y todas las muestras por duplicado o triplicado como controles de calidad. Al transcurrir ese tiempo, se dejó reposar 1 hora para permitir sedimentar los sólidos suspendidos. Y se filtró o centrifugó el sobrenadante para posteriormente medir el pH.

Antes de realizar las mediciones, el equipo se calibró con disoluciones buffer de pH 4.0, 7.0 y 10.0. Posteriormente, se llevaron a cabo las mediciones, manteniendo la muestra en agitación, y se reportó el valor de pH hasta que la lectura se estabilizó. Entre cada lectura, el electrodo se enjuagó con agua Tipo 1 para evitar cualquier tipo de contaminación, después se secó con pañuelos absorbentes (sin frotar). Cada 10 muestras se verificó el funcionamiento del equipo con las disoluciones buffer. De ser necesario se recalibró nuevamente el equipo.

### Medición de conductividad eléctrica

Método de referencia: SSS Book Series No. 5 parte III Glossary of Soil Science Terms. Soil Science Society of America, USA (1996)

### *Equipo*

- Conductímetro marca CORNING 441
- Agitador orbital marca Heidolph Unimax 2010

### *Material*

- Pañuelos absorbentes
- Recipientes de polietileno de 100 mL

### *Reactivos*

- Solución estándar de cloruro de potasio (KCl) de 12.88 mS/cm y 1413  $\mu\text{m}/\text{cm}$
- **Agua Tipo 1 con resistividad de 17 M $\Omega$ /cm**

### *Procedimiento*

Las suspensiones que se prepararon para medir el pH, se utilizaron también para medir la conductividad eléctrica. El conductímetro se calibró con dos puntos, el primer punto fue el aire y el segundo punto fue una solución estándar de KCl, de alta o baja conductividad eléctrica (12.88 dS $\cdot$ m<sup>-1</sup> o 1413  $\mu\text{m}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), según el intervalo donde se encontraron las muestras. El conductímetro se enjuagó con agua Tipo 1 entre cada lectura, se verificó el funcionamiento del equipo cada 10 muestras con las soluciones estándar de KCl, de ser necesario se recalibró el equipo.

#### Medición de potencial redox

Método de referencia indicado en suelos y lodos (ISO 11271, 2002; NRES 381, 2002; Patrick *et al.*, 1996).

### *Equipo*

- Potenciómetro BECKMAN 720
- Agitador orbital marca Heidolph Unimax 2010

### *Material*

- Pañuelos absorbentes
- Recipientes de polietileno de 100 mL

### *Reactivos*

- Solución buffer de pH 7.0
- **Agua Tipo 1 con resistividad de 17 M $\Omega$ /cm**

### *Procedimiento*

Las suspensiones que se prepararon para medir el pH y la conductividad eléctrica se utilizaron para medir el potencial redox. El potenciómetro constó de un electrodo

combinado de platino, y de referencia, un electrodo de Ag/AgCl. Antes de medir las muestras se verificó el equipo con la respuesta del electrodo, la cual fue  $\approx 280$  mV con la solución buffer de pH 7. El electrodo se enjuagó con agua Tipo 1 entre cada lectura, se verificó el funcionamiento del equipo cada 10 muestras con la solución buffer de pH 7.

### Fluorescencia de rayos X

Esta técnica se utilizó para obtener valores de concentraciones totales mediante un método no invasivo y rápido.

Método de referencia: U.S. EPA 6200, Espectrometría de Fluorescencia de rayos X portátil, determinación en campo de concentraciones elementales en suelo y sedimento (2007).

### Equipo

- Molino Pulverisette 6 marca Fritsch
- Equipo portátil de Fluorescencia de Rayos X marca Thermo Scientific, modelo NITONXL3t

### Reactivos

- Materiales de referencia estándar (SRMs) Montana soil 2710a y Montana soil 2711 obtenidos del National Institute of Standards and Technology (NIST) y TILL-4 (Thermopar # 180-601)
- Dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ )

### Material

- Brocha de cerdas suaves o hisopo de algodón
- Pañuelos absorbentes

### Procedimiento

Se colocaron 100 g de la muestra tamizada por malla # 60 (menor a  $250 \mu\text{m}$ ), en el molino Pulverisette 6 marca Fritsch durante 2 min para disminuir la heterogeneidad de la muestra, al transcurrir ese tiempo se almacenó en bolsas de polietileno para su posterior análisis. Las muestras se molieron antes de utilizarse en el equipo de fluorescencia de rayos X Thermo Scientific.

Antes de analizar las muestras, se verificó el funcionamiento del equipo con un blanco ( $\text{SiO}_2$ ), además de materiales de referencia estándar (SRMs): Montana soil 2710a y Montana soil 2711 obtenidos del National Institute of Standards and Technology (NIST), y TILL-4 (Termophar # 180-601).

El equipo de Fluorescencia de Rayos X constó de una pistola de rayos X, una ventana y una cámara de plomo.

La muestra a analizar se colocó encima de la ventana de análisis dentro de la cámara de plomo, y se inició la emisión de rayos X, una vez transcurrido el tiempo de análisis se abrió la cámara, se homogeneizó la muestra nuevamente de la bolsa y se procedió a realizar las repeticiones necesarias. Una vez terminado el análisis se retiró la muestra, se limpió la cámara con un algodón y se procedió con la siguiente muestra, verificando el funcionamiento del equipo cada 10 muestras con controles, los cuales fueron un blanco (dióxido de silicio), y los materiales de referencia estándar. Las muestras se analizaron por el método de mina (%) y por el método de suelo (ppm) por quintuplicado, con 45 seg por cada filtro y 130 seg de lectura por repetición.

#### Geodisponibilidad (fracción soluble)

Método de referencia: método modificado de ASTM D3987-85 (1992), Standard Test Method for Shake Extraction of solid Waste with water.

#### *Equipo*

- Potenciómetro marca BECKMAN 720
- Lixiviador marca ENVIRONMENTAL EXPRESS

#### *Material*

- Pañuelos absorbentes
- Recipientes de polietileno de 150 mL
- Membranas de nitrocelulosa marca Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de apertura
- Jeringas de 50 mL
- Dispositivos de filtración (swinex)

*Reactivo:* Agua meteórica (agua en equilibrio con  $\text{CO}_2$  a pH 5.5)

#### *Procedimiento*

En un frasco de polietileno se colocaron 5.0 g de muestra (tamizada| por malla # 10). Se preparó la cantidad suficiente de agua meteórica para agregar 100.0 mL por frasco. El lote constó de 1 blanco y todas las muestras se realizaron por triplicado. Para preparar el agua meteórica, se burbujeó aire en agua destilada hasta alcanzar un pH de  $5.5 \pm 0.2$ .

Una vez que se agregó el agua a las muestras, los recipientes se cerraron herméticamente con contratapa y tapa, se mantuvieron en agitación orbital durante 18 horas a 30 rpm. Transcurrido ese tiempo, los recipientes se sacaron del lixiviador, se esperó hasta que sedimentaron o se procedió a centrifugar, después se filtraron con jeringas que se adaptaron a un dispositivo de filtración (swinex), a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro.

El filtrado se guardó en recipientes de polietileno y se conservó en refrigeración hasta su análisis por ICP-OES, con base en el método de referencia EPA 6010B (1996).

## A.7 Métodos utilizados para medir la bioaccesibilidad

Se evaluó la bioaccesibilidad de As por los siguientes métodos: según la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, el cual sólo considera la fase gástrica; por el método desarrollado por Ruby *et al.*, (1996), denominado Physiologically Based Extraction Test (PBET), el cual considera dos fases, la fase gástrica y la fase intestinal y por el método modificado, el cual es una variante del PBET: el método gástrico simplificado y el método intestinal simplificado.

Método de referencia para medir la bioaccesibilidad, NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004

### *Equipo*

- Potenciómetro BECKMAN 720
- Agitador con control de temperatura Modelo IDH-30 marca Lumistell

### *Material*

- Frascos de boca ancha de polietileno de alta densidad (HDPE), con tapón de sello hermético, con capacidad para 125 mL
- Membranas de nitrocelulosa marca Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de apertura

### *Reactivos*

- **Agua desionizada Tipo 1 con resistividad de 17 M $\Omega$ /cm**
- Ácido clorhídrico concentrado (HCl) marca BAKER ACS pureza 36.0 %
- **Glicina marca SIGMA pureza  $\geq$  99.0 %**
- Material de referencia Montana Soil 2711 con concentraciones elevadas de elementos traza (US Department of commerce National Institute of Standards and Technology Gaithersburg)
- Solución estándar de As de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  marca HIGH PURITY STANDARDS

### *Procedimiento*

En un frasco de boca ancha de polietileno, se depositó 1.0 g de muestra (tamizada por malla # 60) y se adicionó a cada muestra 100.0 mL de una solución de glicina. La solución de glicina se preparó con 30.0 g de glicina en 990 mL de agua desionizada Tipo 1, el agua **se mantuvo a 37°C y se ajustó el pH a 1.50  $\pm$  0.05 con HCl concentrado (89.81 M)**. Una vez que se alcanzó el pH requerido, se completó el volumen a 1.0 L con matraz aforado.

Para el control analítico, se agregó 1 blanco reactivo, 1 blanco frasco, 1 blanco adicionado (con 1.0 mL de solución estándar de As de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 1 material de referencia Montana Soil 2711 y por lo menos 20 % de las muestras por duplicado.

Los frascos se colocaron en el agitador con control de temperatura a  $37 \pm 2$  °C, se mantuvo la agitación a velocidad de 30 rpm durante 1 hora.

Transcurrida una hora, los frascos se sacaron del agitador, se registró la temperatura y el pH; verificando que los valores no excedieran los límites mencionados anteriormente. Después se filtraron 40 mL de las muestras con jeringas que se adaptaron a un dispositivo de filtración (swinex), a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Los filtrados se depositaron en frascos de polietileno y se conservaron en refrigeración, hasta su análisis en AA-flama o ICP-OES.

Método de referencia para la bioaccesibilidad: Physiologically Based Extraction Test (PBET) según Ruby *et al.*, (1996) en el equipo PBET

#### *Equipo*

- Potenciómetro BECKMAN 720
- Dispositivo para determinar bioaccesibilidad según Ruby *et al.*, (1996)
- Microondas CEM MarsXpress

#### *Material*

- Membranas de nitrocelulosa marca Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de apertura
- Frascos de polietileno de 60 mL

#### *Reactivos*

- **Agua Tipo 1 con resistividad de 17 M $\Omega$ /cm**
- Ácido clorhídrico concentrado (HCl) marca BAKER ACS pureza 36.5 %
- Solución estándar de As de 100  $\mu\text{g/mL}$  marca HIGH PURITY STANDARDS
- Ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) marca ACS ALDRICH pureza 99.7 %
- Ácido cítrico marca SIGMA pureza 99.5 %
- Ácido DL-láctico marca SIGMA pureza 85 % (m/m)
- Ácido DL-málico 99 %
- Antiespumante (decyl alcohol) marca ALDRICH pureza 99 %
- Argón 4.8 plasma de alta pureza marca PRAXAIR
- Pepsina de mucosa gástrica porcina, marca SIGMA ALDRICH pureza de (800-2500) unidades/mg de proteína; 427 unidades/mg de sólido; 914 unidades/mg de proteína
- Extracto de bilis porcina, que contiene glicina, taurina, conjugados de hiodesoxicólico y otras bilis marca SIGMA
- Pancreatina de páncreas porcino, cultivo celular almacenado a -20 °C
- Solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) marca SIGMA ACS pureza 99.7-100.3 %

### *Procedimiento*

Primero se prepararon dos soluciones, una gástrica y otra intestinal. La solución gástrica se preparó con 1.25 g de pepsina, 0.5 g de ácido cítrico, 0.5 g de ácido DL-málico, 410  $\mu\text{L}$  de ácido láctico y 500  $\mu\text{L}$  de ácido acético en 990 mL de agua Tipo 1 a  $37 \pm 1$  °C, posteriormente se ajustó el pH a  $1.50 \pm 0.05$  con HCl concentrado y se completó el volumen a 1.0 L en matraz aforado. La solución intestinal se preparó con 1.56 g del extracto biliar y 0.46 g de pancreatina en 90 mL de agua Tipo 1.

En un embudo de separación de polietileno se colocó 1.0 g de muestra (tamizada por malla # 60), se agregaron 100.0 mL de solución gástrica y 2 gotas de antiespumante. Cabe recordar que los embudos se encontraban sumergidos en un baño de agua a  $37 \pm 1$  °C.

Se abrieron las llaves de paso de los embudos para permitir la entrada de gas argón (debajo de los embudos), se verificó que el pH se mantuviera en  $1.50 \pm 0.05$ , si el pH cambiaba después de agregar la solución gástrica se ajustó nuevamente, se taparon los embudos y se mantuvo la agitación durante 1 hora.

Transcurrida 1 hora de agitación, se suspendió la misma, mientras se tomó una alícuota de 10.0 mL de muestra de cada embudo, la alícuota se filtró con jeringas adaptadas a un dispositivo de filtración (swinex), a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ , el filtrado se almacenó en refrigeración en recipientes de polietileno de 60 mL etiquetados y se almacenaron en refrigeración. Posteriormente se abrió la llave de argón para continuar la agitación, se aumentó el pH de la solución de cada embudo hasta  $7.00 \pm 0.05$  con gotas de la solución saturada de bicarbonato de sodio, en caso de exceder el pH indicado se ajustaba con HCl. Después de estabilizar el pH se agregó una alícuota de 10.0 mL de solución intestinal a cada embudo y se taparon nuevamente.

Al transcurrir 2.5 horas después de agregar la solución intestinal, se midió el pH y de ser necesario se ajustó a  $7.00 \pm 0.05$  nuevamente. Posteriormente se detuvo la agitación y se tomaron 20.0 mL de alícuota de cada embudo y se filtraron por membranas de 0.45  $\mu\text{m}$ , el filtrado se depositó en recipientes de polietileno de 60 mL etiquetados, y se conservaron en refrigeración.

La solución restante de los embudos se trató como residuo. Finalmente, para analizar los filtrados de la fase gástrica e intestinal, se evitó interferencias de matriz mediante digestiones con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) en microondas. Las digestiones se llevaron a cabo con 7.0 mL de filtrado y 3.5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. Las condiciones de digestión fueron una rampa de calentamiento de 15 min, **temperatura constante de 130 °C** durante 25 min y 15 min de enfriamiento.

Las digestiones ácidas en microondas de los filtrados de las fases gástrica e intestinal, se conservaron en refrigeración hasta su posterior análisis en no más de 15 días, para evitar la desnaturalización de reactivos proteicos. Para determinar el contenido de EPT,

se analizaron las digestiones por ICP-OES o AA-flama, con base en el método de referencia EPA 6010B (1996).

#### Método PBET original en equipo LABQA-2014

##### *Equipo*

- Potenciómetro BECKMAN 720
- Equipo de bioaccesibilidad LABQA-2014
- Microondas CEM MarsXpress

##### *Material*

- Membranas de nitrocelulosa marca Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de apertura
- Frascos de polietileno de 60 mL

##### *Reactivos*

- **Agua Tipo 1 con resistividad de 17 M $\Omega$ /cm**
- Ácido clorhídrico concentrado (HCl) marca BAKER ACS pureza 36.5 %
- Solución estándar de As de 100  $\mu\text{g/mL}$  marca HIGH PURITY STANDARDS
- Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) marca ACS ALDRICH pureza 99.7 %
- Ácido cítrico marca SIGMA pureza 99.5 %
- Ácido DL-láctico marca SIGMA pureza 85 % (m/m)
- Ácido DL-málico 99 %
- Antiespumante (decyl alcohol) marca ALDRICH pureza 99 %
- Argón 4.8 plasma de alta pureza marca PRAXAIR
- Pepsina de mucosa gástrica porcina, marca SIGMA ALDRICH pureza de (800-2500) unidades/mg de proteína; 427 unidades/mg de sólido; 914 unidades/mg de proteína
- Extracto de bilis porcina, que contiene glicina, taurina, conjugados de hiodesoxicólico y otras sustancias bilis marca SIGMA
- Pancreatina de páncreas porcino, cultivo celular almacenado a **-20 °C**
- Solución saturada de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) marca SIGMA ACS pureza 99.7-100.3 %

##### *Procedimiento*

Antes de utilizar el equipo LABQA-2014 se debe verificar que no haya fugas en las conexiones de las mangueras, que las tapas sellen adecuadamente en los reactores y el baño de agua **alcance la temperatura de  $37 \pm 1$  °C** al medir con otro termómetro. Se calibró el potenciómetro con los buffers de pH 4.0 y 7.0 a **la temperatura de 37 °C**. Posteriormente se prepararon dos soluciones, una gástrica y otra intestinal, de la misma manera que en el método PBET: La solución gástrica se preparó con 1.25 g de pepsina, 0.5 g de ácido cítrico, 0.5 g de ácido DL-málico, 410  $\mu\text{L}$  de ácido láctico y 500  $\mu\text{L}$  de ácido acético en **990 mL de agua Tipo 1 a  $37 \pm 1$  °C**, posteriormente se ajustó el



pH a  $1.50 \pm 0.05$  con HCl concentrado y se completó el volumen a 1.0 L en matraz aforado. La solución intestinal se preparó con 1.56 g del extracto biliar y 0.46 g de pancreatina en 90 mL de agua Tipo 1.

En el orificio de las tapas de los reactores, se agregaron 100.0 mL de solución gástrica y se abrió la llave general de gas argón, la cual suministra 1 L/min a cada reactor, dejando purgar el sistema por 5 min. Posteriormente se colocó 1.0 g de muestra (que se tamizó por malla # 60) con ayuda de un pequeño embudo de vidrio, y 2 gotas de antiespumante. Cabe recordar que los reactores se encontraban sumergidos en un baño **de agua a  $37 \pm 1$  °C**.

Se verificó que el pH se mantuviera en  $1.50 \pm 0.05$ , si el pH cambiaba después de agregar la solución gástrica se ajustó nuevamente, se mantuvo esta fase del experimento durante 1 hora una vez que se fijó el pH.

Transcurrida 1 hora de agitación, se suspendió la agitación mientras se tomó una alícuota de 10 mL de muestra de cada embudo con ayuda de micropipeta o pipeta volumétrica, la alícuota se filtró con jeringas adaptadas a un dispositivo de filtración (swinex), a través de membranas de nitrocelulosa de  $0.45 \mu\text{m}$ , el filtrado se almacenó en refrigeración en recipientes de polietileno de 60 mL etiquetados y se almacenaron en refrigeración. Posteriormente se abrió la llave de argón para continuar la agitación, se aumentó el pH de la solución de cada embudo hasta  $7.00 \pm 0.05$  con gotas de la solución saturada de bicarbonato de sodio, en caso de exceder el pH indicado se ajustaba con HCl. Después de estabilizar el pH se agregó una alícuota de 10.0 mL de solución intestinal a cada embudo y se taparon nuevamente.

Al transcurrir 2.5 horas después de agregar la solución intestinal, se midió el pH y de ser necesario se ajustó a  $7.00 \pm 0.05$  nuevamente. Posteriormente se detuvo la agitación y se tomaron 20.0 mL de alícuota de cada embudo con micropipeta o pipeta volumétrica y se filtró por membranas de  $0.45 \mu\text{m}$ , el filtrado se depositó en recipientes de polietileno de 60 mL etiquetados, y se conservaron en refrigeración.

La solución sobrante de los reactores se trató como residuo. Finalmente se analizó la fase gástrica de forma directa por ICP-OES o AA-flama, a la fase intestinal se le realizaron digestiones con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) en microondas para evitar interferencias de matriz por los reactivos lipídicos y proteicos. Las digestiones se llevaron a cabo con 7.0 mL de filtrado intestinal y 3.5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado. Las condiciones de digestión fueron una rampa de calentamiento de 15 min, temperatura constante de **130 °C durante 25 min y 15 min de enfriamiento**.

Las digestiones ácidas en microondas de la fase intestinal y los filtrados de la fase gástrica, se conservaron en refrigeración durante no más de 15 días hasta el momento de su análisis, para evitar la desnaturalización de reactivos proteicos. Para determinar el contenido de EPT, se analizaron las digestiones por ICP-OES o AA-flama, con base en el método de referencia EPA 6010B (1996).

## Método PBET modificado en equipo LABQA-2014

### Fase gástrica

Se realizaron suspensiones de suelo de 1.0 g de muestra tamizada por malla # 60 (< 250  $\mu\text{m}$ ), en 100 mL de solución de HCl a pH 1.50. Se mantuvo constante la temperatura de 37°C y la agitación (axial, orbital o por gas) durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se filtró el sobrenadante a través de membranas de 0.45  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se analizaron los filtrados en ICP-OES o en AA-flama.

### Fase intestinal

Una vez realizado el método gástrico simplificado, se aumentó el pH a  $7.00 \pm 0.05$  con una solución sobresaturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Se mantuvieron las suspensiones de suelo:solución a temperatura y agitación constante, es decir a 37°C y la agitación (axial, orbital o por gas) durante 3 horas. En el transcurso de las 3 horas, se verificó que el pH estuviera en  $7.00 \pm 0.05$ , de no ser así, se ajustó el pH con HCl concentrado o con  $\text{NaHCO}_3$ . Finalmente, se analizaron los filtrados en ICP-OES o en AA-flama.

Cuantificación de EPT por espectrómetro de emisión óptica acoplado inductivamente a plasma (ICP-OES) y espectrofotómetro de absorción atómica mediante flama (AA-flama)

### *Equipo*

- Espectrómetro de emisión óptica acoplado inductivamente a plasma (ICP-OES) Thermo Electron Corporation
- Espectrofotómetro de absorción atómica Varian SpectrAA 110 Thermo Electron Corporation

Para determinar el contenido de EPT en algunos experimentos, se utilizaron los equipos antes mencionados, con base en el método de referencia EPA 6010B (1996).

## 7. Anexo: Descripción de otros métodos que se utilizan en la prueba de bioaccesibilidad

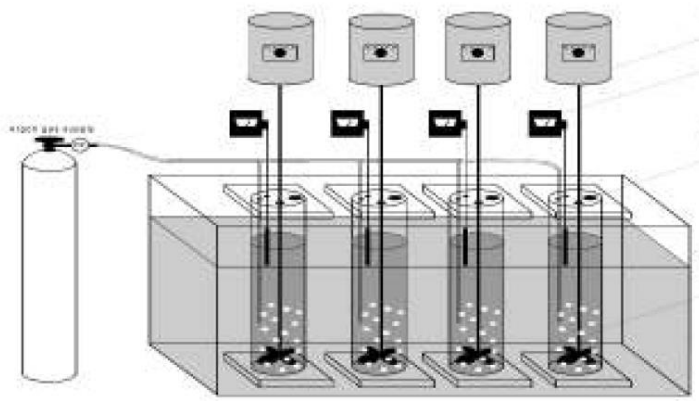


Figura 53. Equipo utilizado en el método PBET modificado por Drexler (imagen obtenida de Dabin *et al.*, 2012)

### Método PBET modificado

El equipo modificado por Drexler (Figura 53) está formado por un contenedor sellado, para minimizar las interacciones entre el fluido de reacción y el oxígeno de la atmósfera. El gas utilizado para agitar es Ar, para simular condiciones anóxicas del tracto gastrointestinal (Schoof A. *et al.*, 2003).

Limitaciones:

- En las propelas podría adherirse material, lo cual propicia contaminación si no se limpia el material adecuadamente.
- Durante la agitación el tamaño de partícula del suelo disminuye, ya que la muestra choca con las propelas constantemente durante el experimento.

Otros métodos

### Método IVG

Rodríguez *et al.*, (1999) desarrollaron el *In vitro* Gastrointestinal Method (IVG) que consta de dos fases, estomacal e intestinal. Las características del método son que se realiza en un baño de agua a 37 °C, el proceso de agitación es por medio de argón y también con una pequeña propela; se requiere una dosificación de alimento, la cual se agrega a la solución gástrica y representa a la comida ya humedecida (ver Figura 54).

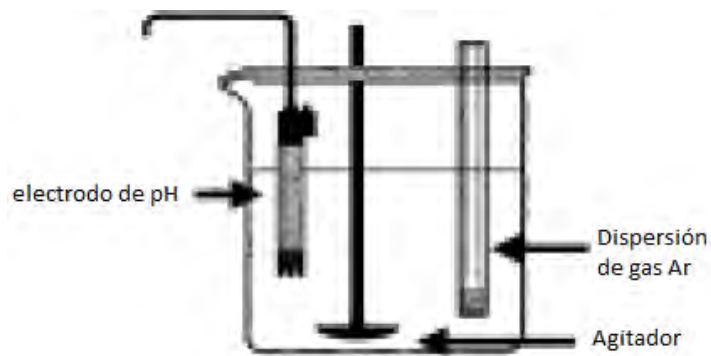


Figura 54. Equipo utilizado en el método IVG (imagen obtenida de Dabin *et al.*, 2012)

## Método DIN

El método DIN (Figura 55) simula las fases gástrica, intestinal y si se requiere la fase salival. El procedimiento se realiza en un baño de agua a 37 °C, el proceso de agitación es por medio de una plataforma agitadora o con agitadores magnéticos. Opcionalmente se puede utilizar nitrógeno para agitar e incluir la adición de leche como nutrimento (durante la fase gástrica). Los valores de pH son 2.0 en la fase gástrica y 7.5 en la fase intestinal (Dabin *et al.*, 2012).

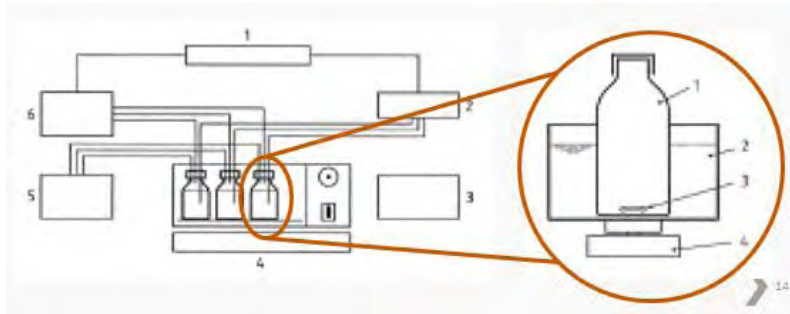


Figura 55. Equipo utilizado en el método DIN 19738 (imagen obtenida de Dabin *et al.*, 2012)

## Método SHIME

El método SHIME (Figura 56) utiliza un inóculo de bacterias, el cual es representativo de la flora bacteriana del tracto gastrointestinal humano. El método se desarrolló en 1993 como un modelo dinámico, con el objetivo de estudiar dos efectos, la influencia de alimento y la fermentación microbiana, la cual es representativa del colon (De Boever *et al.*, 2010).

El equipo está formado por vasos conectados en serie, para simular las distintas fases gastrointestinales, es decir el paso del estómago al intestino delgado y finalmente las distintas secciones el colon. La agitación es magnética y bajo condiciones anaerobias con el uso de nitrógeno.

La limitación es que la prueba puede tardar hasta 1 mes en realizarse, además de que se requiere el uso de bacterias.

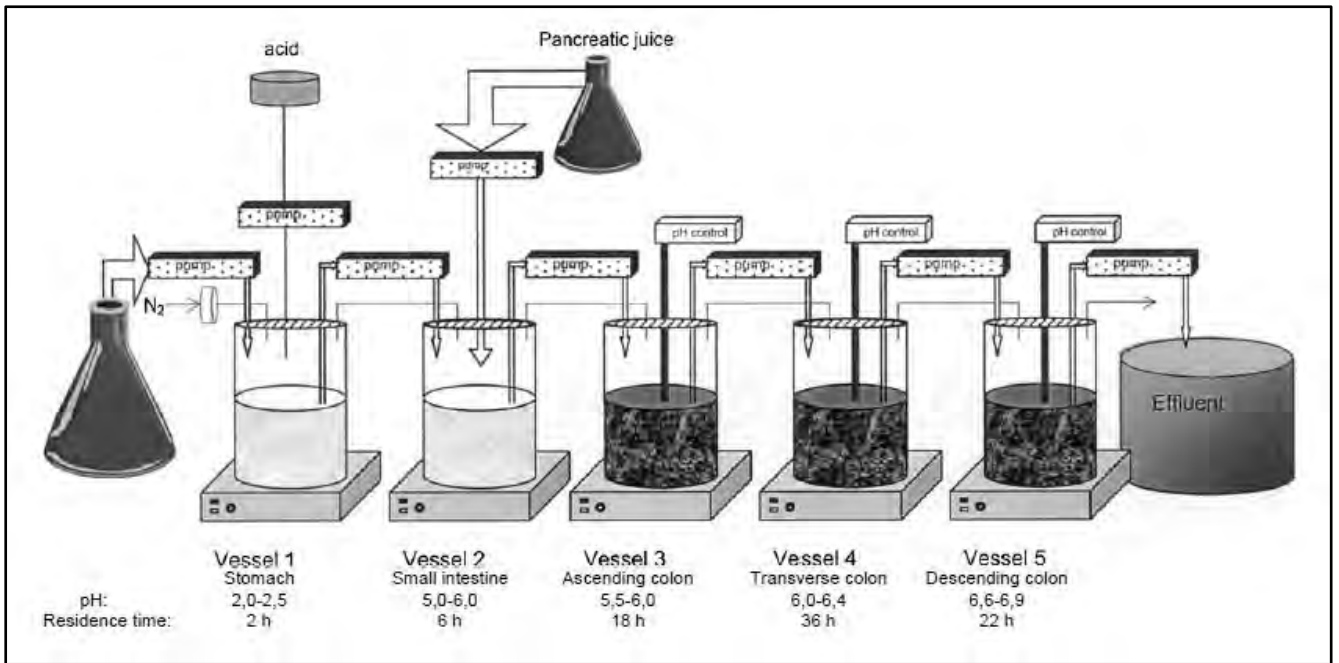


Figura 56. Equipo utilizado en el método SHIME (imagen obtenida de Dabin *et al.*, 2012)

### Método TIM

El método TIM (Figura 57) fue desarrollado por el TNO Nutrition and Food Research Institute en los Países Bajos de Europa. El método consiste en un sistema dinámico controlado de forma computarizada, el cual es capaz de simular los siguientes compartimentos: estómago, duodeno, yeyuno e íleon. Las soluciones digestivas se agregan gradualmente en cada compartimento, el pH se ajusta con HCl o NaHCO<sub>3</sub> y se mantiene a 37 °C. Además se tratan de simular las válvulas peristálticas entre los segmentos del yeyuno y el íleon. Es opcional agregar leche como alimento (Dabin *et al.*, 2012).

Limitaciones: El costo por análisis es elevado, se requieren bacterias y su uso ha sido en estudios nutricionales más que ambientales.

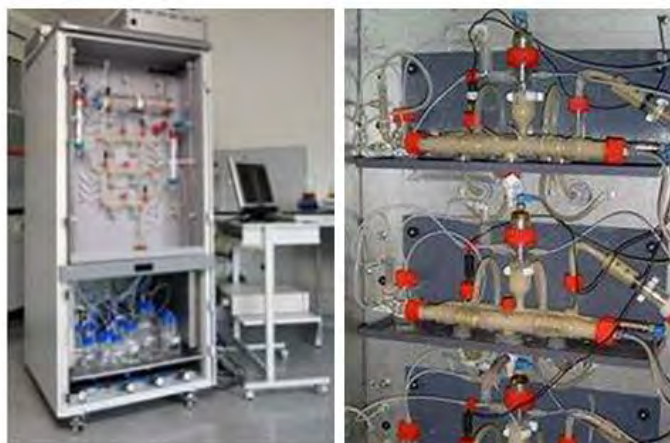


Figura 57. Equipo utilizado en el método TIM (imagen obtenida de Dabin *et al.*, 2012)

### Método *In vitro* Gastrointestinal Method (IVG)

Rodríguez *et al.*, (1999) desarrollaron el *In vitro* Gastrointestinal Method (IVG) que consta de dos fases, estomacal e intestinal. Las características del método son que se realiza en un baño de agua a 37 °C, el proceso de agitación es por medio de argón y con una pequeña propela, se requiere una dosificación de alimento, la cual se agrega a la solución gástrica y representa a la comida ya humedecida (este alimento se ha utilizado en las pruebas *in vivo* bajo con el modelo animal de cerdos jóvenes).

Además, el mismo autor agregó en su método una membrana semipermeable, la cual se utiliza para simular la pared intestinal, que está elaborada de un gel de hidróxido de hierro amorfo. Este gel actúa como un absorbente, con el objetivo de determinar si se obtienen resultados más precisos y que correlacionen mejor con las pruebas *in vivo* del arsénico, ya que ningún otro método utiliza este gel.

Los valores de pH en el método IVG son menores comparados con los de otros métodos, ya que en la fase gástrica el pH es 1.8 y en la fase intestinal es 5.5. La composición de las soluciones digestivas varía, particularmente, se preparan con NaCl y la relación sólido:líquido es 1: 150.

INERI (2005) propuso un protocolo para el método IVG, en el cual se indica que el proceso de agitación es por rotación durante una hora, mientras que Rodríguez *et al.*, (1999) sugiere agitar por medio de propelas.

### Método estándar alemán DIN 19738

El método DIN fue estandarizado en Alemania y se utiliza para analizar la bioaccesibilidad de contaminantes inorgánicos y orgánicos. El método DIN simula las fases gástrica, intestinal y opcionalmente la fase salival. El procedimiento se realiza en un baño de agua a 37 °C, y el proceso de agitación es por medio de una plataforma agitadora o con agitadores magnéticos. Las condiciones pueden ser anaerobias al utilizar nitrógeno (aunque es opcional). El método puede incluir la adición de leche

como nutrimento, durante la fase gástrica. Los valores de pH son 2.0 en la fase gástrica y 7.5 en la fase intestinal (Dabin *et al.*, 2012).

Al final de la etapa gástrica se centrifuga, se recoge el sobrenadante y el material resuspendido se coloca en agua destilada para mezclarse y centrifugarse nuevamente. El último sobrenadante se mezcla con el obtenido anteriormente antes de filtrarse, si es necesario se analiza este último. Además, el material retenido en el filtro del sobrenadante también se analiza.

Método RIVM, por sus siglas en inglés: Digestion model developed by the Dutch National Institute for Public Health and the Environment

El método de RIVM se desarrolló inicialmente para estudiar la bioaccesibilidad de metales en escorias<sup>52</sup>. Este método trata de simular las fases salival, gástrica e intestinal de la digestión. La prueba se realiza en tubos de centrifuga. Previamente, las soluciones digestivas se calientan a 37 °C dentro de una incubadora y ahí mismo se agitan los recipientes de forma axial. Las soluciones digestivas incluyen enzimas y otros reactivos, los cuales se preparan un día antes bajo condiciones aerobias (Dabin *et al.*, 2012).

Los investigadores que desarrollaron el método, propusieron que la solución biliar se preparara de forma más compleja, es decir, adicionar reactivos orgánicos, inorgánicos y enzimas y sales biliares. La bilis puede tener mayor influencia en la bioaccesibilidad de las moléculas, debido a sus propiedades surfactantes<sup>53</sup> (Oomen *et al.*, 2003). En este método se prefiere utilizar la bilis liofilizada en lugar de las sales biliares, para así mantener los fosfolípidos y el colesterol que se encuentra en las micelas formadas por estas sales biliares, como requisito durante la prueba, el pH de la solución biliar debe ser  $8.0 \pm 0.2$ . Por otra parte, una variante del método incluye la adición de alimento (comida para bebé o spaghetti) para estimar la bioaccesibilidad de moléculas orgánicas, como por ejemplo los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (Gron, 2005).

Método UBM, por sus siglas en inglés: Unified BARGE Method

El método UBM fue desarrollado en 2005 por el Bioaccessibility Research Group of Europe (BARGE), el cual fue el resultado de intentar desarrollar una prueba única, con base en el método RIVM, que se considera es el método más representativo de las condiciones fisiológicas en el tracto gastrointestinal de los niños (Oomen, 2003).

El método UBM en comparación con el método RIVM, se realiza en tubos de centrifuga bajo condiciones aerobias. Las soluciones gástricas se preparan un día antes y se mantienen a 37 °C dos horas antes de la prueba. La agitación es de manera axial, se

---

<sup>52</sup> Escoria: Residuo generado en el proceso de fundición de metales ferrosos ([http://www.sma.df.gob.mx/sma/download/archivos/manual\\_residuos\\_peligrosos\\_giro\\_fundicion.pdf](http://www.sma.df.gob.mx/sma/download/archivos/manual_residuos_peligrosos_giro_fundicion.pdf))

<sup>53</sup> Surfactante: sustancia que disminuye la tensión superficial de una solución

mantiene 1 hora durante la fase gástrica-salival, y de 4 horas durante la fase gástrica-intestinal, después se centrifuga y se analiza por espectroscopia de emisión.

Según Caboche (2009) se han realizado varias modificaciones al método, para evitar que el nivel de riesgo sea subestimado. Los valores de pH en las distintas fases (salival, gástrica e intestinal) y los tiempos de residencia fueron modificados en comparación del método RIVM.

#### Método FOREhST

Cave *et al.*, (2010) desarrollaron el método Fed ORganic Estimation human Simulaton Test (FOREhST), con base en el método RIVM bajo condiciones de alimento, con el objetivo de determinar la bioaccesibilidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). La diferencia entre estos dos métodos es la adición de alimento que sólo se utiliza en el método RIVM.

El método RIVM utiliza como alimento una mezcla de un suplemento para niños y aceite vegetal, los cuales representan la dieta promedio de adultos entre 19 y 65 años en los Países Bajos de Europa (Cave *et al.*, 2010).

Cave *et al.*, (2010) utilizaron la mezcla de alimento y encontró que se degrada rápidamente, por lo cual no es muy útil. Por lo tanto utilizó otra mezcla de alimento, que se realizó con avena liofilizada, arroz mazamorra y aceite de girasol; esta dieta representa la ingesta promedio de un niño de Gran Bretaña. Por otra parte, no especifica la composición de las soluciones digestivas.

Cave y Wragg (2002) mencionaron en una presentación oral<sup>54</sup> el modelo CePBET, el cual es similar al modelo PBET, pero incluye el compartimento del colon, para estudiar la bioaccesibilidad de contaminantes orgánicos, aunque no se han encontrado resultados recientes.

#### Método SHIME, por sus siglas en inglés: Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem

El método SHIME utiliza un inóculo de bacterias, el cual es representativo de la flora bacteriana del tracto gastrointestinal humano. El método se desarrolló en 1993 como un modelo dinámico, con el objetivo de estudiar dos efectos, la influencia de alimento y la fermentación microbiana, la cual es representativa del colon (De Boever *et al.*, 2010).

Según Laird y colaboradores (2007, 2010), el método consta de dos fases, una dinámica y otra estática:

En la fase dinámica se encuentra el hábitat microbiano del colon. Se conforma de tres a cinco compartimentos: estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon ascendente, colon transversal y colon descendente. Los tiempos de residencia y el pH varían según el

---

<sup>54</sup> Exponent Bioavailability & Exposure Assessment (2010)



compartimento. El tiempo que dura la prueba es muy largo, ya que en esta fase tarda 3 semanas aprox.

En la fase estática, las soluciones digestivas gástrica e intestinal y el inóculo bacteriano, se colocan en contacto con el suelo. La prueba se realiza a 37 °C, con agitación magnética y bajo condiciones anaerobias (atmósfera cerrada con N<sub>2</sub>).

### **Modelo intestinal TNO's: prueba TIM**

Este método fue desarrollado por el TNO Nutrition and Food Research Institute en los Países Bajos de Europa. El método consiste en un sistema dinámico controlado de forma computarizada, el cual es capaz de simular los siguientes compartimentos: estómago, duodeno, yeyuno e íleon. Las soluciones digestivas se agregan gradualmente en cada compartimento, el pH se ajusta con HCl o NaHCO<sub>3</sub> y se mantiene a 37 °C. Además se tratan de simular las válvulas peristálticas entre los segmentos del yeyuno y el íleon. Es opcional agregar leche como alimento (Dabin *et al.*, 2012).

Recientemente se ha desarrollado un segundo modelo, denominado TIM-2, el cual simula el colon y contiene flora bacteriana, aunque no hay resultados reportados con el modelo TIM-2, sí los hay para el modelo TIM-1. En general, el método TIM se utiliza para estudios nutricionales (BARC, 2011).

### **Método US Farmacopea**

Este método fue desarrollado originalmente para perfiles de disolución de fármacos de manera *in vitro* (USP XII, 1990), aunque ha sido utilizado últimamente para pruebas de bioaccesibilidad de suelos contaminados por metales pesados. El método sólo incluye una fase gástrica, la cual dura 2 horas a temperatura de 37 °C. En la prueba de bioaccesibilidad se utilizaron tres relaciones sólido:líquido (entre 1:100 y 5,000:1), con cantidades de suelo de 0.05 ó 0.5 g (Dabin *et al.*, 2012).

### **Método de Balance de Masa (MB) y Recaptura de Suelo (SR)**

Hamel *et al.*, (1999) desarrolló un protocolo a 37 °C, el cual simula los siguientes compartimentos salival, estomacal (similar con la Farmacopea) y el intestino delgado. Al final se analizan los extractos y el suelo residual.

### **Método de digestión con pepsina (AOAC 2000)**

Originalmente, este método se desarrolló para medir la porción digerible de proteínas. El método simula las condiciones metabólicas de los pollos. La muestra se agita en presencia de HCl 0.075 N (pH del estómago de los pollos) y 0.2 % de pepsina durante 16 h a 37 °C (Dabin *et al.*, 2012).