



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DISEÑO DE UN EQUIPO PARA REALIZAR PRUEBAS Y ANÁLISIS DE  
BIOACCESIBILIDAD DE METALES EN SUELOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO**

**PRESENTA**

**DANIEL QUIROZ VIVANCO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Margarita Eugenia Gutiérrez Ruíz**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Margarita Eugenia Gutiérrez Ruíz**

**VOCAL:**               **Profesor: María Isabel Gracia Mora**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Víctor Manuel Luna Pabello**

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: Alejandra Mendoza Campos**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Daniel Bobadilla Ocampo**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE BIOGEOQUÍMICA AMBIENTAL (LABQA); FACULTAD DE QUÍMICA,  
UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Margarita Eugenia Gutiérrez Ruiz**

**SUSTENTANTE:**

**Daniel Quiroz Vivanco**

En mis años mozos y más vulnerables mi padre me dio un consejo que desde aquella época no ha dejado de darme vueltas en la cabeza.

“Cuando sientas deseos de criticar a alguien” -fueron sus palabras- “recuerda que no todo el mundo ha tenido las mismas oportunidades que tú tuviste.”

F. Scott Fitzgerald

El Gran Gatsby

## Agradecimientos

Parafraseando a Marcel Proust, seamos agradecidos con las personas y momentos que nos hacen felices, ellos son los encantadores jardineros que hacen florecer nuestra alma; de aquí que agradezca en primera instancia y de sobremanera a la UNAM, ya que, además de que me ha soportado durante muchos años (más de los que hubiese esperado) y de ser quien me respaldará para intentar ser profesionista con título, es una institución que me ha dejado muchas buenas experiencias y espero jamás defraudarla.

Muchas gracias a la Doctora Margarita Gutiérrez Ruiz por su apoyo durante todo este tiempo que, por fin, se ve aterrizado en el presente trabajo. De la misma forma, gracias al jurado revisor y a la Facultad de Química.

Además, a la UNAM le agradezco haberme dado la oportunidad de conocer a mucha gente valiosa, algunos de los cuales se convirtieron en muy buenos amigos y compañeros: gracias Danely por soportarme desde nuestro primer semestre en el CCH; Victoria ¡lo logré!, podemos seguir con nuestra competencia para ver quién es más grinch, ya tengo una preocupación menos; Fernanda, muchas gracias por todo tu apoyo en los buenos y malos momentos... ¡a seguir con la cocina molecular!; Thalía y Jennifer, sin ustedes no sé si alguna vez hubiese terminado con este proyecto; Reyna, gracias por tu amistad, cariño y apoyo; Alexa, Víctor, Nora, César, Sandra, Verónica, Andrea, Memo, Inés, Alfredo "ansina", Lety, Liz, Gaby, Gerardo, Agueda, Alicia, Xavier, Iván, Betsa, Diana Payne, Lorena, Priscila, Charly, Rutis, Milton, Katy, los QA's Daniel y Felipe, así como a todo el personal que se encuentra y ha pasado por el LABQA, de todos ustedes he aprendido cosas que de alguna manera se reflejan en este trabajo, gracias a todos.

Por su parte, estoy y estaré siempre agradecido con mi familia: mis hermanos Armando, Rodolfo, Anahí; mis primos Mario, Carolina, Alberto, Neti, Juan Carlos, Jeshua, Belén, Mateo, Lourdes y mis tíos; mi familia elegida: Anita, Laura, Aurora,

Dalila y Valeria, con quienes sé que puedo contar en los buenos momentos como en los malos.

Finalmente, y más importante, muchas gracias a mis padres, obvio, sin su intervención no estaría aquí, pero con su cariño y apoyo es que logro cumplir con otro objetivo; a ambos les debo un eterno agradecimiento, jamás podre retribuir lo que por mi han hecho, pero lucharé por lograrlo.

## Resumen

El presente trabajo plantea diseñar un equipo mediante el cual sea posible determinar la fracción bioaccesible de diversas sustancias, principalmente metales y elementos potencialmente tóxicos que se encuentren presentes en sitios contaminados. Para tal fin, se llevó a cabo una investigación documental para conocer los equipos existentes, así como las diferentes metodologías y mecanismos de extracción, de tal forma que se pudiesen determinar las bases de diseño a seguir para la construcción del equipo.

El diseño del Reactor de Simulación Gastrointestinal para Bioaccesibilidad (RSGB), representa una opción innovadora en los estudios de riesgo. Las pruebas realizadas con este equipo arrojan resultados equiparables a los reportados por otros grupos de investigación, los cuales utilizan equipos más complejos o con limitaciones en el control, operación y alcance de sus equipos. Mientras que la mayoría de los equipos se enfocan únicamente en la fase gástrica, y al ser utilizados para realizar la prueba de la fase intestinal presentan errores sistemáticos de consideración, el diseño del RSGB permite obtener resultados consistentes de simulación del tracto gástrico e intestinal.

Al comparar los resultados de extracción de la fracción bioaccesible en un material de referencia (NIST Montana 2710), se obtienen valores muy cercanos a la media entre 17 diferentes equipos de investigación, teniendo que el RSGB mantiene una repetibilidad similar al equipo de la NOM-147 y un error menor al de los otros grupos de investigación.

El RSGB ha demostrado ser un equipo robusto, adaptable, de bajo costo y sencillo de usar, que puede ser usado para análisis de rutina o bien, con fines de investigación.

## Lista de figuras

Figura 1 Representación esquemática de la bioaccesibilidad (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012).....	5
Figura 2 Interacción de agregados del suelo con diferentes formas de vida (Jacke & Toensmeier, 2005).....	10
Figura 3 Interacción de los EPT y la cadena trófica (Schoof, 2003).....	12
Figura 4 Fuentes de ingesta y exposición de niños a EPT (Pamuk, Makuc, Heck, Reuben, & Lochner, 1998).....	14
Figura 5 Representación de la bioaccesibilidad y de la biodisponibilidad (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012). ....	18
Figura 6 Influencia del alimento y del tamaño de partícula en la bioaccesibilidad (García Rodríguez T. , 2017).....	27
Figura 7 Patrón de flujo en un reactor Pachuca (Kleijntjens, van der Lans, & Luyben, 1994). ....	31
Figura 8 Esquema de un reactor agitado (Harnby, Edwards, & Nienow, 1992). ...	32
Figura 9 Patrones de flujo en reactores agitados. ....	32
Figura 10 Mezcladores de tambor a) cilindro horizontal, b) de doble cono, c) cono en V, d) cono en Y. (Ortegas-Rivas, 2005).....	33
Figura 11 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) (García Rodríguez T. , 2017) .....	42
Figura 12 Recipientes tradicionales, de izquierda a derecha se encuentran los recipientes de HDPE, PP, PC y PTFE.....	45
Figura 13 Equipo PBET (LGA-IG). ....	46
Figura 14 Líneas de gas contaminadas del método PBET en el equipo del LGA-IG. ....	47
Figura 15 Equipo LABQA-2011.....	48
Figura 16 Acumulación de sedimento durante la agitación con barras magnéticas. ....	49
Figura 17 A la derecha, los recipientes flotando en la tina de acrílico; a la izquierda, incrustación del material en el recipiente ocasionada por el uso del agitador magnético. ....	49
Figura 18 Equipo NOM 147 (LGA-IG) basado en el método SBET/RBALP/SBRC. ....	50
Figura 19 Incubadora con agitación orbital, LIA-FQ. ....	51



Figura 20 Agitador de propelas o hélices. Equipo similar al usado en el LIQ-FQ..	52
Figura 21 Representación esquemática del patrón de flujo y depósito de muestra en un agitador de propelas. ....	53
Figura 22 Muestra de suelo previa a tratamiento. ....	54
Figura 23 Muestra posterior al tratamiento de extracción en agitador orbital.....	55
Figura 24 Muestra posterior al tratamiento de extracción mediante agitadores magnéticos. ....	56
Figura 25 Muestra posterior al tratamiento de extracción mediante un agitador axial o de tambor. ....	57
Figura 26 Muestra posterior al tratamiento de extracción en un agitador de propelas. ....	58
Figura 27 Muestra posterior al tratamiento de extracción con gas burbujeado. ....	59
Figura 28 Esquema del reactor. ....	60
Figura 29 Esquema en tercera dimensión de la gradilla para colocar los reactores. ....	61
Figura 30 Tubo de inyección de gas dentro del reactor. ....	61
Figura 31 Presentación de los reactores en la gradilla de trabajo.....	62
Figura 32 Tubo de inyección de gas. ....	63
Figura 33 Agitación homogénea y con suspensión total dentro del RSGB. ....	63
Figura 34 Medición del pH a través del orificio de monitoreo. ....	64
Figura 35 A la izquierda, introducción de reactivos a través del orificio de monitoreo; a la derecha, embudos usados para poder introducir la muestra a los reactores.....	65
Figura 36 Control de flujo de gas en los reactores. ....	65
Figura 37 Diseño del RSGB en operación. ....	66
Figura 38 Extracción de As durante las pruebas de agitación, muestra 015-14..	67
Figura 39 Toma de muestra en el RSGB .....	69
Figura 40 Esquema de las mejoras propuestas al RSGB. ....	75
Figura 41 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). ....	78
Figura 42 Diseño experimental del método PBET (imagen modificada de Ruby et al., 1996).....	87

Figura 43 Representación esquemática del método PBET (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012).....	88
Figura 44 Diseño PBET modificado (Schoof, 2003) .....	90
Figura 45 Esquema experimental del método PBET modificado (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012) .....	91
Figura 46 Representación esquemática del modelo RBALP propuesto por Drexler y otros (2007). .....	95
Figura 47 Esquema del método SBET o RBALP (Dabin et al., 2012) .....	96
Figura 48 Diseño de reactor propuesto (Rodríguez, Basta, Casteel, & Pace, 1999) .....	97
Figura 49 Representación esquemática del método IVG .....	98
Figura 50 Diagrama de flujo del método IVG (Rodríguez, Basta, Casteel, & Pace, 1999) .....	99
Figura 51 Representación esquemática del método DIN 19738 (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012) .....	101
Figura 52 Representación esquemática del método RIVM (Oomen, y otros, 2003). .....	103
Figura 53 Representación esquemática del método UBM (INERIS, 2010) .....	105
Figura 54 Representación esquemática del método SHIME (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012).....	108
Figura 55 Simulador del ecosistema microbiano intestinal (SHIME) (Robinson & Reeves, 2013) .....	109
Figura 56 Presentación esquemática del equipo TIM-1 para el estudio de la biodisponibilidad. ....	110
Figura 57 Esquema del RSGB. ....	111
Figura 58 Dimensiones en milímetros de los embudos utilizados. ....	111
Figura 59 Vista superior de la gradilla, dimensiones en centímetros. ....	112
Figura 60 Vista inferior de la gradilla, dimensiones en centímetros. ....	113
Figura 61 Vista lateral del diseño de la gradilla, dimensiones en centímetros. ...	114
Figura 62 Vistas lateral, frontal y superior del diseño en tercera dimensión de la gradilla. ....	115

## Lista de cuadros

Cuadro 1 Tabla 1 de la NOM-147, en que se indican con las concentraciones de referencia totales de los EPT normados, por tipo de uso de suelo (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004). .....	8
Cuadro 2 Comparación de las características fisicoquímicas de los principales métodos para determinar la fracción bioaccesible. ....	21
Cuadro 3 Comparación de las características mecánicas de los principales métodos para determinar la fracción bioaccesible. ....	22
Cuadro 4 Caracterización de las muestras compuestas (García Rodríguez T. , 2017). ....	41
Cuadro 5 Comparación del arsénico extraído para una misma muestra en los diferentes métodos de agitación probados. ....	67
Cuadro 6 Fracción bioaccesible de arsénico en la muestra compuesta 4.....	70
Cuadro 7 Comparativa de la fracción bioaccesible para la fase gástrica obtenida entre los métodos NOM-147 y RSGB.....	71
Cuadro 8 Comparativa de resultados obtenidos por la ASU y el LABQA para bioaccesibilidad del NIST Montana 2710.....	72
Cuadro 9 Biodisponibilidad de arsénico para NIST 2710. ....	72
Cuadro 10 Desviación porcentual relativa (DPR) en las muestras duplicadas. *N.A. No aplica, debido a que, en estos casos, la concentración de arsénico bioaccesible es menor al límite de detección del equipo.....	74
Cuadro 11 Principales características de 5 métodos basados en el método PBET (BARC, 2011). ....	92
Cuadro 12 Principales características de 5 métodos basados en el método PBET (BARC, 2011). ....	93
Cuadro 13 Condiciones de trabajo de los métodos RIVM y UBM. ....	104
Cuadro 14 Principales diferencias entre el método RIVM y el FOREhST propuesto por Cave y otros (2010). ....	107

## Contenido

Agradecimientos .....	I
Resumen .....	I
Lista de figuras .....	II
Lista de cuadros .....	V
Introducción .....	1
Justificación y objetivo del proyecto .....	2
Actividades generales realizadas .....	3
1 Marco teórico.....	5
1.1 Generalidades.....	5
1.2 Características del suelo relacionadas con la biodisponibilidad /bioaccesibilidad de un contaminante en el suelo .....	8
1.3 Mecanismos de ingesta de suelo .....	12
1.4 Conceptos de biodisponibilidad y bioaccesibilidad.....	15
1.5 Métodos de medición de biodisponibilidad y bioaccesibilidad.....	17
1.5.1 Pruebas químicas simples.....	18
1.5.2 Pruebas fisiológicas simples. ....	19
1.5.3 Pruebas fisiológicas con análogos gastrointestinales. ....	19
1.6 Factores que afectan la bioaccesibilidad .....	23
1.6.1 Factores fisicoquímicos .....	25
1.6.2 Factores mecánicos .....	29
2 Metodología.....	35
2.1 Actividades por realizar .....	35
2.2 Métodos utilizados .....	37

3	Resultados y discusión.....	41
3.1	Preparación y caracterización de muestras .....	41
3.2	Bases de diseño.....	42
3.2.1	Bases fisicoquímicas.....	43
3.2.2	Bases mecánicas .....	44
3.3	Pruebas de métodos y equipos disponibles .....	46
3.3.1	Prueba PBET, equipo “Prueba de Ruby” LGA-IG .....	46
3.3.2	Prueba IVG-DIN, equipo “LABQA-2011” .....	47
3.3.3	Prueba SBET/RBALP/SBRC, equipo “NOM-147” LGA-IG .....	49
3.3.4	Prueba DIN, equipo “Incubadora con agitación” LIA-FQ .....	51
3.3.5	Prueba IVG, equipo “Agitador de propelas” LIQ-FQ.....	52
3.4	Efecto de la agitación sobre el tamaño de partícula.....	53
3.5	Propuesta de diseño de RSGB .....	60
3.5.1	Diseño del reactor .....	60
3.5.2	Pruebas de desempeño .....	66
3.6	Propuesta de mejoras .....	75
4	Análisis de resultados.....	77
5	Conclusiones .....	80
6.	Bibliografía.....	81
7.	Apéndices.....	87
A.	Métodos para extracción de la fracción bioaccesible .....	87
A1.	Método PBET .....	87
A2.	Método PBET modificado.....	89
A3.	Método SBET/RBALP/SBRC .....	94
A4.	Método gastrointestinal in vitro (IVG) .....	96

A5. Método estándar alemán DIN 19738.....	100
A6. Método RIVM .....	102
A7. Método UBM .....	103
A8. Método FOREhST .....	106
A9. Método SHIME .....	107
A10. Modelo intestinal TNO's: prueba TIM .....	109
B. Planos de diseño del Reactor de Simulación Gastrointestinal para Bioaccesibilidad. ....	111
C. Descripción de los métodos analíticos utilizados .....	116
C1. Medición de pH .....	116
C2. Medición de conductividad eléctrica.....	117
C3. Medición de potencial redox .....	118
C4. Fluorescencia de rayos X.....	119
C5. Geodisponibilidad (fracción soluble) .....	120
C6. Bioaccesibilidad .....	121
C7. Método de referencia para medir la bioaccesibilidad, NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 .....	121
C8. Método de referencia para la bioaccesibilidad: Physiologically Based Extraction Test (PBET) según Ruby et al., (1996) .....	123
C9. Método gástrico modificado para determinar bioaccesibilidad ....	126
C10. Método intestinal modificado para determinar bioaccesibilidad	126
C11. Método PBET en equipo LABQA (2014).....	126
C12. Cuantificación de EPT por espectrómetro de emisión óptica acoplado inductivamente a plasma (ICP-OES) y espectrofotómetro de absorción atómica mediante flama (AA-flama).....	129

### Introducción

La dispersión de elementos potencialmente tóxicos (EPT)<sup>1</sup> en el ambiente, es una fuente de preocupación ya que la concentración de éstos ha aumentado en forma exponencial. El factor de movilización, que corresponde a la relación entre la cantidad de EPT liberada por las actividades mineras y de la generación energía y entre la cantidad de EPT liberados por el intemperismo natural y la actividad volcánica indica que tan grande la magnitud de este fenómeno. Por ejemplo, para el mercurio el factor de movilización es de 342, el cobre de 632, el plomo de 127 y el arsénico de 27, siendo el suelo el principal compartimento donde se acumulan estos elementos, desde donde los EPT pueden distribuirse vía aire, agua o alimentos, en caso de que las plantas los absorban y entren a la cadena trófica, lo cual para ese tipo de contaminante no es muy común, pero si hay casos reportados (Sposito, 2008).

Las vías de ingreso de un EPT al organismo son la ingestión, la absorción y la inhalación. En el primer caso, la toxicidad del EPT depende de que se absorba a través de las paredes intestinales, mecanismo en el cual influye el tamaño de partícula, el compuesto en que se encuentra y su liberación en un medio ácido (estómago) y neutro (intestino delgado).

Cuando se iniciaron los estudios de riesgo, se consideraban únicamente los datos de toxicidad en formas químicas muy solubles, lo cual en la realidad no siempre es así; por lo que se introdujo el concepto de biodisponibilidad, ya conocido en el mundo de la farmacocinética, que corresponde a la fracción que puede absorberse e introducirse al sistema circulatorio.

Dada la complejidad de medir la fracción biodisponible mediante experimentos *in vivo*, se han desarrollado métodos *in vitro*, que simulan al sistema

---

<sup>1</sup> EPT es un término acuñado por el Grupo de Biogeoquímica Ambiental para referirse a sustancias químicas que pudiesen representar un riesgo a la salud.

digestivo de los organismos, cuyos resultados se denominan fracción bioaccesible, para ello, se utilizan diversos equipos, pero en la normatividad mexicana (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio, NOM-147) únicamente se recomienda medir la fracción gástrica, únicamente para el caso del plomo, en un equipo de agitación que no permite analizar la fracción intestinal.

La tendencia actual a nivel internacional es incluir la fracción intestinal y medir la bioaccesibilidad para todos los elementos potencialmente tóxicos.

### **Justificación y objetivo del proyecto**

Al considerar los altos costos de los equipos recomendados, así como las limitaciones funcionales y los errores sistemáticos detectados de los mismos, se consideró importante diseñar un equipo capaz de competir con los ya existentes, por lo que se planteó el siguiente objetivo general<sup>2</sup>:

**Diseñar un equipo para obtener la fracción bioaccesible de elementos potencialmente tóxicos presentes en suelos contaminados, mejorando la repetibilidad y calidad de los resultados, respecto a los obtenidos con otros equipos existentes y con el método señalado en la normatividad mexicana.**

De manera complementaria se consideran los siguientes objetivos particulares:

- Plantear las bases de diseño óptimas para la construcción del equipo.

---

<sup>2</sup> Este proyecto fue complementario a la tesis realizada por la M. en C. Thalía García Rodríguez quien probó la eficiencia del equipo midiendo la bioaccesibilidad en suelos contaminados y estándares internacionales



- El equipo diseñado debe ser de fácil operación y económicamente accesible.
- Los resultados de repetibilidad y precisión deben ser similares o mejores a los obtenidos con el equipo de la norma mexicana NOM-147 y el propuesto por Ruby *et al.* 1993, ambos de uso común a nivel internacional.
- La prueba para la extracción de la fracción bioaccesible debe ser realizada de manera rápida y confiable, a manera de poder contar con un equipo capaz de realizar análisis de rutina, así como de investigación.

### **Actividades generales realizadas**

Con la finalidad de lograr el objetivo planteado se llevaron a cabo las siguientes actividades:

- a) Investigación documental de los conceptos de bioaccesibilidad, así como de los métodos para su análisis y los factores que la afectan.
- b) Selección de los criterios fundamentales para el diseño del equipo.
- c) Diseño conceptual del equipo.
- d) Selección del EPT control (arsénico).
- e) Selección de muestras de suelo contaminadas que contienen los EPT control, considerando como principal fuente de exposición a estos elementos a la ingesta directa de suelo en niños y adultos.
- f) Análisis de la fracción bioaccesible del EPT control en las muestras de suelo y determinación de la repetibilidad.
- g) Construcción del equipo y aplicación de modificaciones pertinentes al modelo conceptual.
- h) Análisis de la fracción bioaccesible de los EPT control con el equipo modificado (pruebas de desempeño).
- i) Análisis de resultados y conclusiones.

El trabajo experimental, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM, contando con el apoyo del Laboratorio de Geoquímica Ambiental del Instituto de Geología, el Laboratorio de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Química, el Laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad de Química y del Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica (LUME), todos ellos pertenecientes a la UNAM; el equipo diseñado se aplicó para los estudios de la determinación de la fracción bioaccesible de arsénico y plomo en suelos contaminados de la planta fundidora Ávalos, en el Estado de Chihuahua.

## 1 Marco teórico

### 1.1 Generalidades

El riesgo depende de que exista un agente peligroso y un medio vulnerable, en el caso de población humana se requiere que exista una población expuesta a una sustancia tóxica.

Cuando la sustancia tóxica es un EPT y el medio en que se encuentra es el suelo, la exposición puede darse en tres diferentes maneras (ISO/TS 17924:2007):

- Ingestión de suelo directamente de las manos o por alimentos expuestos.
- Inhalación del particulado fino proveniente del suelo u otros materiales ricos en el contaminante en estudio (residuos y materias primas).
- Contacto directo del suelo con la piel; lo cual en el caso de la mayoría de los EPT no es tan importante.

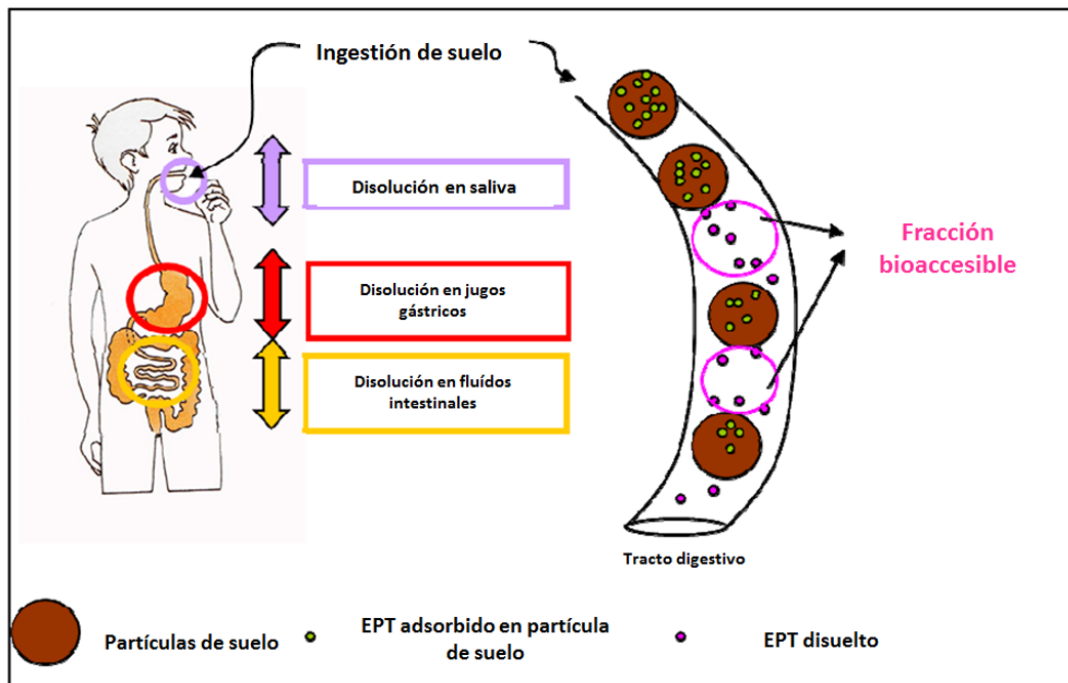


Figura 1 Representación esquemática de la bioaccesibilidad (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012)

El riesgo asociado a la ingestión de EPT depende de factores físicos y químicos del contaminante, así como del tamaño de partícula que determina la superficie de reacción.

Los EPT requieren solubilizarse en el tracto digestivo para ser absorbidos en el intestino delgado. Hasta hace poco tiempo, en los modelos de riesgo se consideraba que el total del contaminante presente en la sustancia ingerida dañaba al organismo. Esta convención implica que toda la sustancia tóxica presente en el suelo es absorbida y entra al sistema circulatorio, lo cual constituye una sobreestimación del riesgo (Ng, Juhasz, Smith, & Naidu, 2010), ya que el elemento tóxico requiere estar en formas químicas solubles en el intestino delgado para ser absorbido. Por lo tanto, la concentración total no representa a la fracción peligrosa.

Una consecuencia de este escenario extremo, en el que el 100% de la concentración del EPT se considera activa en el organismo, es que suelos no contaminados de regiones naturalmente ricas en EPT pueden ser clasificados como peligrosos. Asimismo, algunos suelos contaminados pero en los que los mecanismos de atenuación natural han insolubilizado los EPT, puedan ser sometidos a procesos de remoción con la consecuente pérdida del valor de estos materiales, los cuales cumplen funciones vitales como son la retención y purificación de agua, la insolubilización o transformación de sustancias tóxicas orgánicas e inorgánicas, la fertilidad y mantenimiento de la cubierta vegetal, así como la protección del subsuelo, cuerpos de agua subterráneos, del hábitat de microorganismos y control del clima (Sposito, 2008).

La cantidad del total presente de un contaminante, que dentro del tracto digestivo se puede absorber y pasar al torrente sanguíneo, se conoce como biodisponibilidad y su medición siempre se realiza *in vivo*, como ya se comentó, mientras que el valor determinado *in vitro* se conoce como bioaccesibilidad<sup>3</sup>. A pesar

---

<sup>3</sup> Cabe mencionar que hay avances en la medición de la biodisponibilidad vía inhalación, pero es un tema complejo del cual recién inicia su estudio.

de que estos dos términos tienen diferente significado, existen autores que los llegan a usar de forma indistinta (Ng, Juhasz, Smith, & Naidu, 2010), por lo que se ha buscado contar con definiciones aceptadas universalmente, las cuales se presentan en la sección 1.4 del presente trabajo.

El uso y aplicación de la bioaccesibilidad se está popularizando, pero la cantidad y calidad de la información es todavía insuficiente, por lo que las autoridades tienden a no aceptar fácilmente la aplicación en modelos de riesgo de este factor. Sin embargo, ya hay avances al respecto. En México, se estableció una norma oficial NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 (NOM-147), que 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, en la cual se presentan valores de referencia genéricos para la concentración de estos elementos en suelos de uso agrícola, residencial y comercial, e industrial (Cuadro 1), pero también se permite determinar valores específicos para la remediación de sitios contaminados mediante estudios de riesgo a la salud humana en casos de sitios habitados, o midiendo la geodisponibilidad de los EPT en sitios sin población humana.

Dentro de la NOM-147 se plantea que el estudio de los sitios sospechosos de estar contaminados debe considerar factores como la fuente de contaminación del suelo, los mecanismos de liberación de los contaminantes, así como los de su transporte, además de las rutas y vías de exposición al EPT. Con la información anterior, y junto a la caracterización del sitio, se compara la información con la mostrada en la Tabla 1 de la NOM-147 para determinar la concentración objetivo, tras lo cual se procede a realizar o no la remediación del sitio.

Cuadro 1 Tabla 1 de la NOM-147, en que se indican con las concentraciones de referencia totales de los EPT normados, por tipo de uso de suelo (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004).

**TABLA 1**  
**Concentraciones de referencia totales (CR<sub>T</sub>) por tipo de uso de suelo.**

Contaminante	Uso agrícola/residencial /comercial (mg/kg)	Uso industrial (mg/kg)
Arsénico	22	260
Bario	5 400	67 000
Berilio	150	1900
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	5,2	67
Vanadio	78	1000

**NOTA:**

- a. En caso de que se presenten diversos usos del suelo en un sitio, debe considerarse el uso que predomine.
- b. Cuando en los programas de ordenamiento ecológico y de desarrollo urbano no estén establecidos los usos del suelo, se usará el valor residencial.

En los estudios de riesgo acordes a lo señalado en la NOM-147, se permite aplicar el factor de bioaccesibilidad únicamente para el caso del plomo y en la fracción gástrica, utilizando el método SBET (por sus siglas en inglés Simplified Bioaccessibility Extraction Test), descrito en la sección 1.5.3. Sin embargo, en la práctica se ha permitido utilizar resultados de bioaccesibilidad del arsénico en las fases gástrica e intestinal, a manera de lograr que se lleven a cabo diversos proyectos de remediación, con el fin de reducir drásticamente el riesgo para las poblaciones expuestas.

## 1.2 Características del suelo relacionadas con la biodisponibilidad /bioaccesibilidad de un contaminante en el suelo

El suelo es un medio poroso que se formó en la superficie de la Tierra a través de procesos de intemperismo físico, químico y biológico. Desde el punto de vista de

la química, los suelos son sistemas biogeoquímicos abiertos y multicomponentes que contienen sólidos, líquidos y gases.

En la normatividad mexicana, la NOM 147 define al suelo como material no consolidado, de origen natural, compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos, que incluye aquél alterado por actividades antropogénicas. En síntesis, el suelo contiene compuestos inorgánicos, orgánicos, aire pobre en oxígeno y enriquecido con  $\text{CO}_2$ , así como agua con diversos iones simples y complejos en solución. Las partículas inorgánicas presentan diferente tamaño y se clasifican genéricamente en arenas, limos y arcillas. Cabe hacer mención que las arcillas agrupan a todos los coloides que son activos químicamente como los óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos, aunque formalmente se refieren únicamente a aluminosilicatos. La fracción orgánica contiene el humus que es resultado de la descomposición de material vegetal y animal y que presenta también reactividad química. Al tratarse de un sistema abierto, existe un intercambio de materia y energía del suelo con la atmósfera, la biosfera y con la hidrósfera (Sposito, 2008). La Figura 2 representa menos de un milímetro cuadrado de suelo, sin embargo, esta área puede tener zonas que van de ácidas a alcalinas, secas a mojadas, y ricas en oxígeno a pobres en oxígeno. Es posible observar como los agregados del suelo interactúan con formas de vida del suelo más grandes, incluyendo raíces de plantas, hongos y artrópodos como los ácaros.

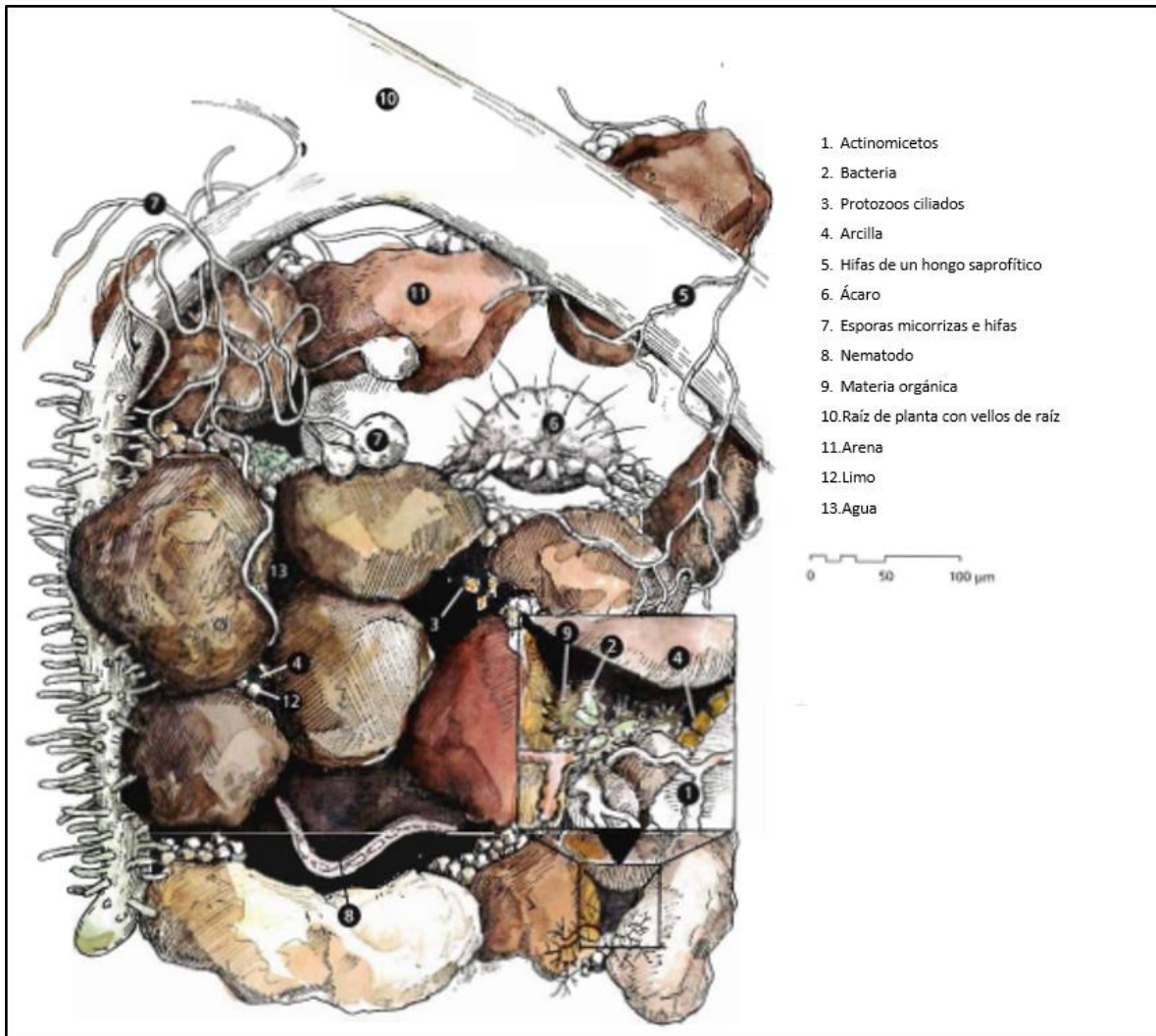


Figura 2 Interacción de agregados del suelo con diferentes formas de vida (Jacke & Toensmeier, 2005).

Las características más importantes que considerar en el suelo es la fuerza de los enlaces con los que se retienen los contaminantes y la posibilidad de que se liberan en el tracto digestivo humano.

Los componentes con actividad química en el suelo, como ya se comentó, son los coloides, quienes exhiben una gran superficie de reacción. Básicamente son las arcillas y los oxi-hidróxidos que además presentan cargas eléctricas en su superficie. Estos compuestos forman complejos inorgánicos de diferentes tipos, con los cuales se puede dar la retención de los EPT:



- a) complejo de esfera externa o adsorción física, en que el contaminante está unido por interacciones electrostáticas;
- b) complejo de esfera interna o adsorción química, en el que el EPT forma enlaces químicos, ya sean iónicos o covalentes con el coloide;
- c) la formación de una fase mineral pura (precipitados);
- d) coprecipitados con otros elementos;
- e) inclusión-oclusión que conforman enlaces en las partes internas de los coloides, lo que se conoce como absorción;
- f) formación de quelatos con la materia orgánica;

Las reacciones de liberación y retención en el suelo dependen en gran medida de los valores de pH y pE, así como de reacciones de oxidación-reducción que son catalizadas por microorganismos y/o sustancias inorgánicas (McCauley, Jones, & Olson-Rutz, 2017). Al ser ingerido el suelo y entrar al estómago y, posteriormente, pasar al intestino, en forma análoga queda sujeto a cambios de pH y pE, así como a reacciones de acomplejamiento por la presencia de materiales bioquímicos que contienen muchas posiciones de coordinación. Las fases que se liberan y, por lo tanto, se consideran muy biodisponibles/bioaccesibles (García Rodríguez T. , 2017), son la fracción soluble y los complejos de esfera externa (adsorción física). Los medianamente biodisponibles/bioaccesibles son los complejos de esfera interna (adsorción química) y la fracción orgánica, así como los precipitados y coprecipitados solubles, que liberan los contaminantes en soluciones de HCl con presencia de compuestos coordinantes y bajo condiciones ácidas y reductoras. El resto de las fases se consideran no biodisponibles/bioaccesibles.

La biodisponibilidad/bioaccesibilidad depende también del tamaño de la partícula, lo cual es muy importante debido a que el tiempo máximo en el tracto digestivo es limitado (Dodds, 1982). La superficie de reacción aumenta cuando disminuye el tamaño, por lo que van a reaccionar en mayor proporción las partículas finas. En la NOM-147 se establece para la determinación de la bioaccesibilidad un tamaño de partícula de 250  $\mu\text{m}$ .

El equipo diseñado debe ser capaz de simular estas condiciones cambiantes de pH y pE, manteniendo la temperatura y sujetando al suelo a una agitación similar a la del estómago (movimientos peristálticos).

### 1.3 Mecanismos de ingesta de suelo

Las interacciones entre el suelo y los contaminantes conllevan a un posible aumento del riesgo a la salud humana, ya que cuando los EPT son absorbidos por las plantas, la cadena trófica facilita que los EPT sean más accesibles al humano (Figura 3).

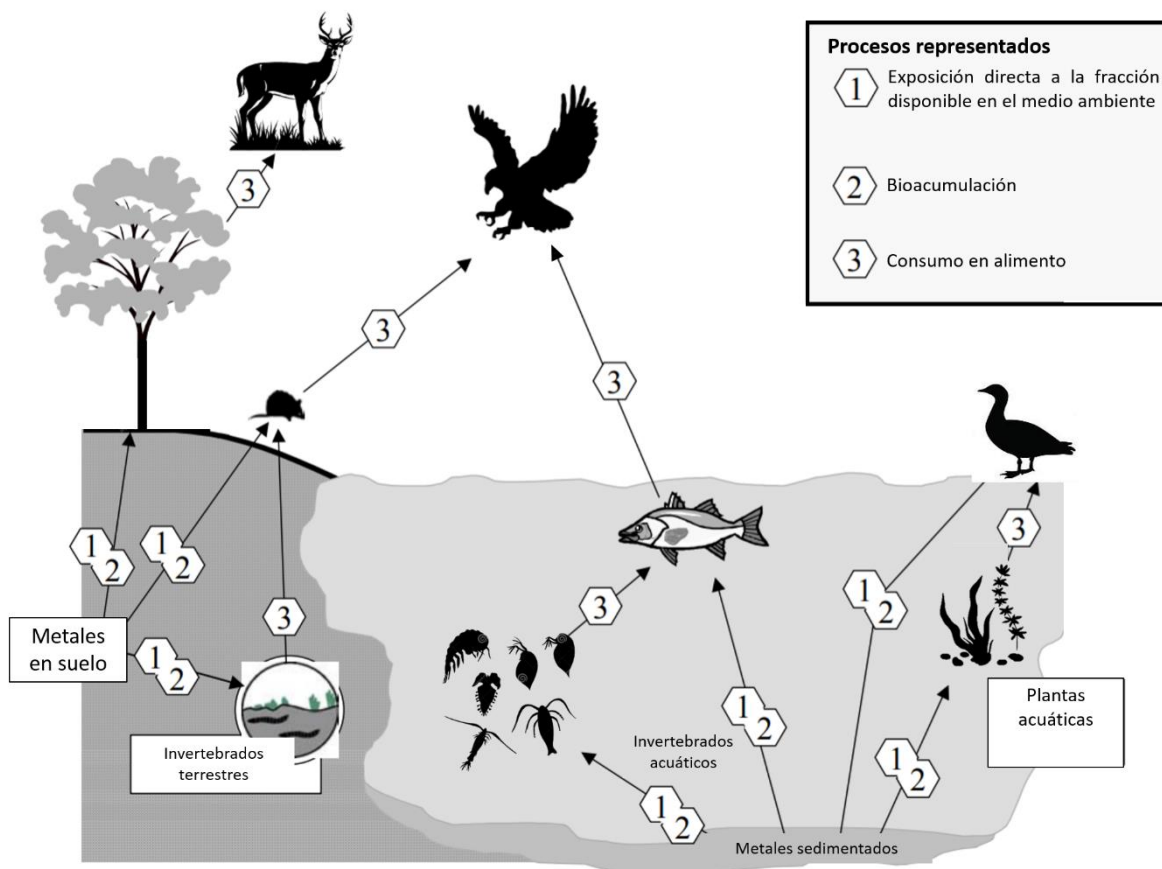


Figura 3 Interacción de los EPT y la cadena trófica (Schoof, 2003)

Para el reconocimiento de la afectación causada por EPT en un determinado receptor se utilizan como niveles de referencia las concentraciones de EPT que ocurren naturalmente (valores de fondo naturales) en la zona donde se ubica el área

de estudio (Gutiérrez-Ruiz, Romero, & González-Hernández, 2007). Esto implica conocer el contexto geológico del sitio, las características intrínsecas del suelo y la naturaleza de los contaminantes presentes, así como las actividades humanas pasadas y futuras con la finalidad de establecer estudios de riesgo y de afectación confiables.

Los estudios iniciales de afectación del suelo incluyen la textura (contenido de limo, arcilla y arenas), pH, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica y humedad. Otra parte de los estudios corresponde a la caracterización de los contaminantes presentes en el suelo: concentración total de metales y fracción soluble. Este último ayuda a determinar las posibles especies del contaminante presentes en el sistema. Estos estudios son de suma importancia, ya que, aunque el ingreso a la salud de un EPT por la vía trófica representa un riesgo a la salud humana, la administración directa por vía oral debido a la solubilización del EPT o a la ingesta directa de un suelo contaminado representa un riesgo considerablemente mayor. La concentración del EPT solubilizado o en el suelo es mayor con respecto al presente en un alimento, siendo los niños el segmento de la población más expuesto a la ingesta de suelo.

La ingesta de suelo puede ocurrir debido al consumo no intencional a través de las manos o de la comida. Estudios experimentales han reportado tasas de ingesta de suelo de 50 a 200 mg al día por parte de los niños (Davis, Waller, Buschbom, Ballou, & White, 1990). En niños con síndrome de pica<sup>4</sup>, la tasa de ingesta de suelo excede de manera muy importante el valor promedio, teniendo una tasa de ingestión de suelo de entre 5,000 a 10,000 mg por día. (U.S. Agency for

---

<sup>4</sup> Trastorno de la ingestión y de la conducta alimentaria de la niñez. Se define como el consumo persistente de sustancias no nutritivas durante un período de por lo menos un mes (Viguria Padilla & Miján de la Torre, 2006). La incidencia de este síndrome se da en todos los sectores de la sociedad, pero su frecuencia está correlacionada con el estado nutricional y el cuidado del infante. Dentro del grupo con mayor incidencia de pica se encuentran los niños de 1 a 3 años de edad, niños de familias con bajo nivel socioeconómico y niños con deficiencias neurológicas como daño cerebral, epilepsia, retraso mental, entre otros (EPA Office of Health and Environmental Assessment, 1990)

Toxic Substances and Disease Registry., 1995). En el caso de receptores adultos, se calcula que la tasa de ingesta de suelo es de 100 mg por día (Calabrese, Stanek, Gilbert, & Barnes, 1990).

Al evaluar las rutas de exposición a suelos contaminados con EPT, se debe considerar el uso y acceso a sitios contaminados y sus alrededores; en el caso de los niños, sitios como edificios abandonados, estanques de agua o arroyos, son atractivos y la exposición puede darse en puntos que se encuentren cercanos al hogar, a las áreas recreativas o a los jardines escolares, debido a que el suelo puede entrar al hogar en los zapatos de algún miembro de la familia, por arrastre del viento o en el pelo y patas de alguna mascota. Un niño pequeño que juegue en el piso tendrá el máximo riesgo de exponerse a un EPT por la vía oral debido al polvo acumulado que puede provenir de diversas fuentes (Figura 4). En el caso de los adultos la exposición es menor, aunque los trabajadores en zonas industriales o comerciales pueden ingerir suelo, dependiendo del trabajo realizado (U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry., 1995).

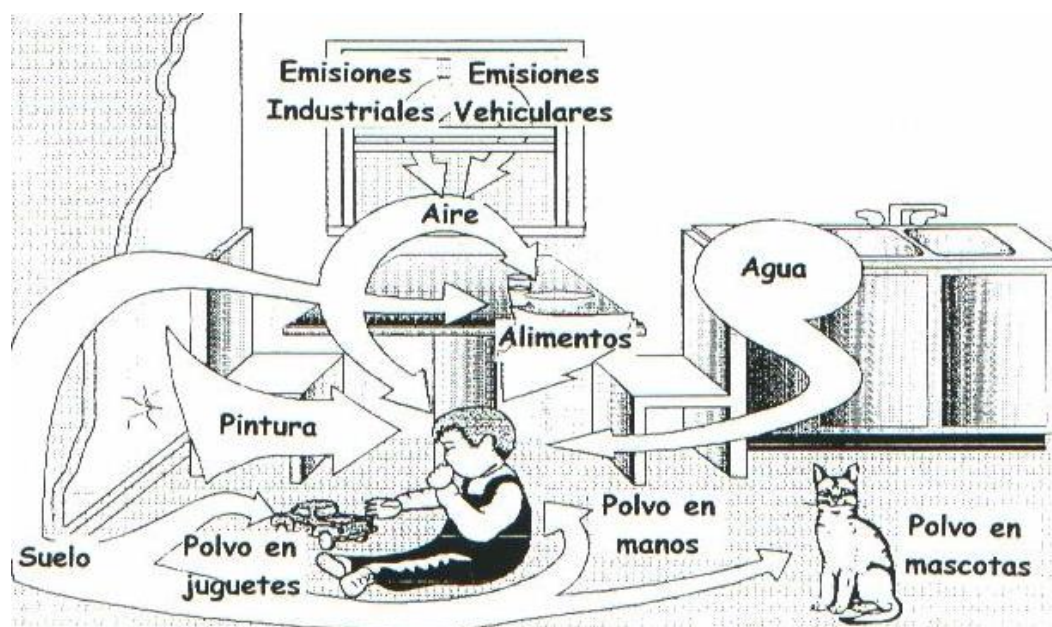


Figura 4 Fuentes de ingesta y exposición de niños a EPT (Pamuk, Makuc, Heck, Reuben, & Lochner, 1998).

## 1.4 Conceptos de biodisponibilidad y bioaccesibilidad

Estos conceptos se originaron en la farmacocinética, ya que en este campo la biodisponibilidad describe la fracción de una dosis de fármaco administrado que llega hasta el sistema circulatorio (Ng, Juhasz, Smith, & Naidu, 2010). El campo de la toxicología toma estos conceptos farmacológicos para poder determinar el riesgo asociado a un contaminante ingerido. En general, la biodisponibilidad depende de parámetros como la naturaleza del contaminante, las propiedades del suelo y la interacción con organismos, por lo que no es posible entender la biodisponibilidad sin conocer el entorno ni el receptor (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012).

A continuación, se presenta algunas definiciones de biodisponibilidad:

- a) “la disponibilidad de una sustancia de interactuar con el biosistema de un organismo” (Van Leeuwen & Hermes, 1995);
- b) un compuesto biodisponible es aquél que libremente puede atravesar la membrana celular de un organismo desde el medio en el que éste se encuentra. Una vez ocurrida la transferencia, puede darse el almacenamiento, transformación, asimilación o degradación de la sustancia dentro del organismo (Semple, y otros, 2004).
- c) la Organización Internacional de Estandarización (ISO) define a la biodisponibilidad como el grado en que las sustancias químicas presentes en el suelo pueden ser absorbidas o metabolizadas por el humano o por receptores ecológicos (humanos, plantas, animales, organismos acuáticos, cuerpos de agua, microorganismos en el suelo, etcétera), o el grado en que están disponibles para interactuar con sistemas biológicos (ISO 11074:2015). Desde el punto de vista de la ISO, la biodisponibilidad puede ser vista como un proceso dinámico dividido en tres distintas fases:
  - I. Disponibilidad ambiental: es la disponibilidad del contaminante en el suelo controlada por procesos fisicoquímicos y presente en las fases sólida y líquida del suelo. Es decir, es la fracción del contaminante que

es potencialmente disponible a los organismos como resultado de un proceso fisicoquímico de desorción (ISO 17402:2008). Esta disponibilidad de la sustancia se subdivide en la fracción actual disponible de contaminante en condiciones ambientales, la fracción potencialmente disponible de contaminante es aquella que puede ser liberada en condiciones extremas, y la fracción no disponible. Es claro que la fracción potencialmente disponible no puede exceder la cantidad total de contaminante presente en el suelo, al igual que la fracción actual disponible no puede ser mayor que la fracción potencialmente disponible.

- II. Biodisponibilidad ambiental: esta fase del proceso hace referencia a la absorción del contaminante por el organismo, la cual depende de la fisiología del organismo en cuestión. Según la ISO 17402, la biodisponibilidad ambiental corresponde a la fracción disponible de una sustancia química en el ambiente que un organismo absorbe mediante procesos fisiológicos. Este tipo de biodisponibilidad puede servir como parámetro de medición en procesos de fitorremediación o de biodegradación, ya que al ser una medición de lo que un organismo puede absorber, se puede predecir la capacidad de los organismos o de las plantas para absorber o degradar contaminantes del ambiente.
  - III. Biodisponibilidad toxicológica: esta fase alude a la distribución, acumulación y a la toxicidad del contaminante en el organismo. Dentro de la ISO 17402 se define como la concentración interna que es acumulada o relacionada a un efecto tóxico en el organismo.
- d) La norma ISO/TS 17924:2007, refiere en su contenido que la biodisponibilidad, incluye a los procesos físicos, químicos y microbiológicos en el cuerpo humano, desde el masticar hasta la llegada de una sustancia a los intestinos (ISO/TS 17924:2007).
  - e) Otra definición indica que la biodisponibilidad se refiere a la fracción de una sustancia presente en el ambiente que, después de un largo tiempo, es disponible de ser absorbida por los organismos (INERIS, 2009).

Para el caso de la bioaccesibilidad son pocas las definiciones explícitas para este término. La normatividad mexicana define a la bioaccesibilidad como la fracción soluble de un elemento químico contenido en el suelo determinado a partir de un estudio *in vitro* (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004). Otra definición para la bioaccesibilidad, la expone como la fracción de la dosis administrada de una sustancia que se solubiliza en el tracto gastrointestinal y que está disponible para ser absorbida (InVS, INERIS, BRGM, ICF., 2009).

Para fines del presente trabajo, se entiende por ***bioaccesibilidad como a la fracción soluble de una sustancia contenida en una muestra, determinada mediante análisis in vitro, la cual representa a la fracción solubilizada en el tracto gastrointestinal y es susceptible de ser absorbida por el organismo, mientras que la biodisponibilidad, refiere a la fracción de una sustancia administrada que entra al torrente sanguíneo.***

## **1.5 Métodos de medición de biodisponibilidad y bioaccesibilidad**

Como ya se comentó, la biodisponibilidad se valora mediante pruebas *in vivo* que requieren del uso de animales en los cuales se realizan análisis de fluidos, sangre y tejidos (Figura 5). Como alternativa a ello, se han venido desarrollado diversas técnicas de simulación del tracto digestivo humano, con la finalidad de determinar la bioaccesibilidad de una sustancia y a través de ella estimar la biodisponibilidad de esa sustancia.

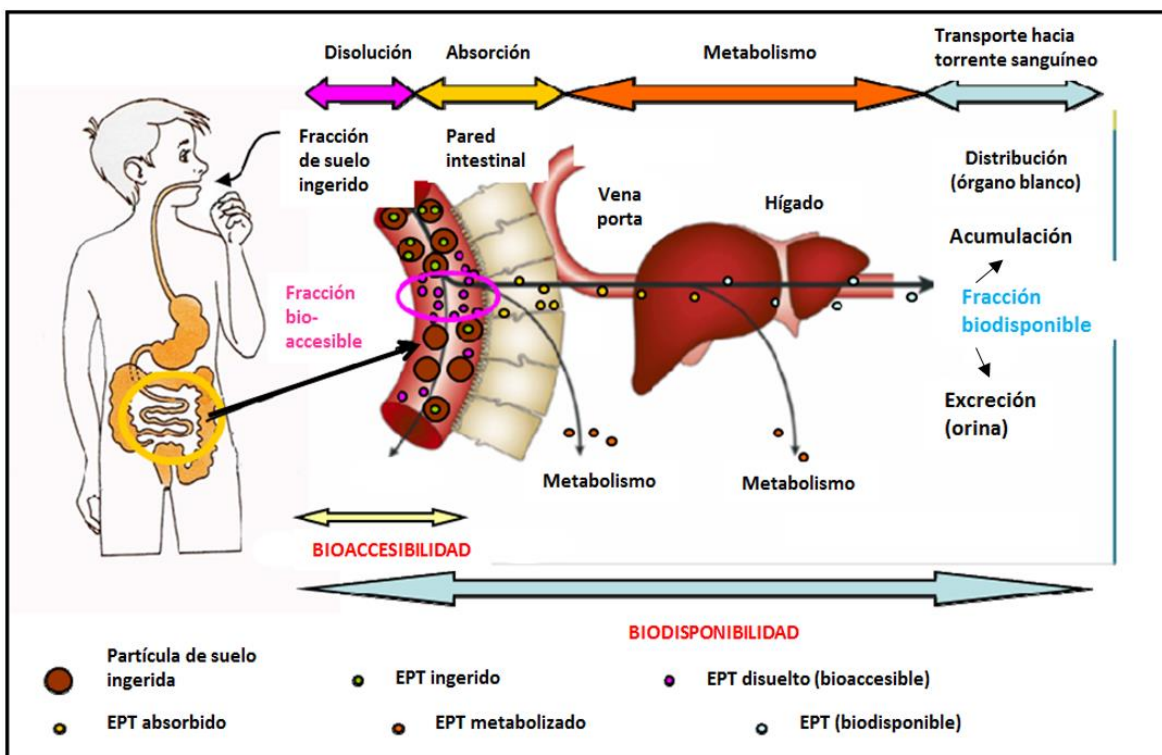


Figura 5 Representación de la bioaccesibilidad y de la biodisponibilidad (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012).

Desde la década de 1990, diversos grupos de investigación han propuesto diferentes pruebas *in vitro* para determinar la bioaccesibilidad de una manera más sencilla, con la ventaja de que estas pruebas *in vitro* son más económicas, rápidas y éticas que las pruebas *in vivo*. En general, las pruebas de extracción para determinar la bioaccesibilidad propuestas por los diferentes grupos de investigación, se clasifican en tres categorías: pruebas químicas simples, pruebas fisiológicas simples y pruebas fisiológicas con análogos gastrointestinales que utilizan reactivos similares a los fluidos gastrointestinales (García Rodríguez T. , 2017).

### 1.5.1 Pruebas químicas simples.

Se llevan a cabo simulando únicamente la fase gástrica y se utilizan reactivos químicos inorgánicos, principalmente ácido clorhídrico. Estas pruebas se realizan sin acondicionamiento fisiológico alguno, ya que no se considera el efecto de la



temperatura corporal. Ejemplos de estas pruebas es el método TCLP<sup>5</sup> (Procedimiento de lixiviación característico de la toxicidad) modificado por la Societé Généralé de Surveillance.

### 1.5.2 Pruebas fisiológicas simples.

Se llevan a cabo simulando únicamente la fase gástrica, pero se utilizan reactivos químicos inorgánicos y orgánicos. Básicamente se usan glicina, fosfatos y el ácido clorhídrico, aunque en algunas pruebas se utilizan sales biliares o enzimas.

A diferencia de las pruebas químicas simples, en estas pruebas se controla la temperatura a 37° C aproximadamente. Ejemplos de estos métodos son: "Proceso de lixiviación bioaccesible relativo" (RBALP<sup>6</sup>), "Prueba simplificada de extracción bioaccesible" (SBET<sup>7</sup>), el método del "Consortio de investigación de solubilidad/biodisponibilidad" (SBRC<sup>8</sup>), "Método analítico para determinar la bioaccesibilidad del plomo" de la NOM-147, éste último, se basa en los métodos RBALP, SBET y SBRC.

Otros métodos usados son "Método con fosfato", "Método con glicina" y el "Método con ácido clorhídrico" del departamento de salud de Canadá denominado "Health Canada", aunque estos son poco usados debido a la poca aproximación a simular el sistema gástrico.

### 1.5.3 Pruebas fisiológicas con análogos gastrointestinales.

Estas pruebas incluyen las diversas fases que comprenden el proceso de digestión: salival, gástrica e intestinal. Por lo mismo, requieren una mayor cantidad de reactivos, en particular los que corresponden a los análogos gastrointestinales (enzimas y/o sales biliares). Ejemplos de estos métodos son la "Prueba de

---

<sup>5</sup> Toxicity Characteristic Leaching Procedure.

<sup>6</sup> Relative bioavailability leaching procedure.

<sup>7</sup> Simplified Bioaccessibility Extraction Test

<sup>8</sup> Solubility/*Bioavailability* Research Consortium.

extracción con base fisiológica" (PBET<sup>9</sup>), así como variantes del mismo (PBET modificado), el "Método gastrointestinal *in vitro* (IVG<sup>10</sup>), la prueba desarrollada por el Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente de los Países Bajos (RIVM<sup>11</sup>), el método "Simulador del ecosistema microbiano intestinal del humano" (SHIME<sup>12</sup>), el "Método DIN 19738" de Alemania, el "Modelo Gastrointestinal TIM" desarrollado por el Instituto de Investigación en Nutrición y Alimentos del Departamento de Investigación Científica Aplicada de los Países Bajos, la "Prueba de digestibilidad con pepsina de la Asociación de Comunidades Analíticas" (AOAC<sup>13</sup>), el "Modelo de la farmacopea de Estados Unidos" y el "Método de recaptura de suelo y balance de masa" (MB&SR<sup>14</sup>). Otros métodos que entran en esta clasificación son el "Método Unificado de Bioaccesibilidad" (UBM<sup>15</sup>) desarrollado por el Grupo Europeo de Investigación sobre Bioaccesibilidad (BARGE<sup>16</sup>), así como la "Prueba de simulación humana estimada con alimentación orgánica" (FOREHST<sup>17</sup>). Los métodos más usados para la extracción de la fracción bioaccesible se encuentran detallados en el Anexo I, aunque en los cuadros 2 y 3 se enlistan algunas características fisicoquímicas de algunos métodos.

---

<sup>9</sup> Physiologically Based Extraction Test.

<sup>10</sup> *In vitro*gastro-intestinal method.

<sup>11</sup> Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu.

<sup>12</sup> Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem.

<sup>13</sup> Association Of Analytical Communities Pepsin Digestibility Test.

<sup>14</sup> Mass balance & Soil Recapture.

<sup>15</sup> Unified Bioaccessibility Method.

<sup>16</sup> Bioaccessibility Research Group of Europe.

<sup>17</sup> Fed Organic Estimation Human Simulation Test.

Cuadro 2 Comparación de las características fisicoquímicas de los principales métodos para determinar la fracción bioaccesible.

MÉTODOS	Referencias	Segmentos digestivos	pH	Tiempos de residencia	Temperatura	Tamaño de partícula	Relación sólido-líquido	Uso de gas	Tratamiento de la muestra antes de analizar
<b>PBET (Ruby)</b>	Ruby (1993 y 1996)	Estómago Intestino delgado	2.5 7	1 h 3 h	37 °C	<250 µm	1:100 1:100	Argón	Centrifugar
<b>PBET modificado por Drexler</b>	Schoff (2003)	Estómago Intestino delgado	2 7	1 h 3 h	37 °C	<250 µm	1:100 1:100	Argón	Filtrar
<b>SBET/RBALP/SBRC</b>	Caboche (2009) Drexler & Brattin (2007)	Estómago	1.5	1 h	37 °C	<250 µm	1:100	No	Filtrar
<b>IVG</b>	Rodríguez <i>et al.</i> , (1999)	Estómago Intestino delgado	1.8 5.5	1 h 1 h	37 °C	<250 µm	1:150	Argón	Centrifugar
<b>DIN 19738</b>	Método estándar	Saliva (opcional) Estómago Intestino delgado	- 2 7.5	0.5 h 2 h 6 h	37 °C	<1 mm	1:15 1:50 1:100	Opcional, Nitrógeno	Centrifugar
<b>RIVM en ayuno</b>	Oomen <i>et al.</i> , (2003)	Saliva Estómago Intestino delgado (con bilis)	6.5 1.2 >5.5	5 min 2 h 2 h	37 °C	<1 mm	(1:15) o (1:150) (1:37.5) o (1:375) (1:97.5) o (1:975)	No	Centrifugar
<b>UBM</b>	Caboche (2009)	Saliva Estómago Intestino delgado	6.5 1.2-1.7 5.8-6.8	5 min 1 h 4 h	37 °C	<250 µm	1:15 1:37.5 1:97.5	No	Centrifugar
<b>FORHeST</b>	Cave <i>et al.</i> , (2010)	Saliva Estómago Intestino delgado	6.8 1.3 8.1	5 min 2 h 2 h	37 °C	<250 µm	No especificado	No	No especificado
<b>SHIME</b>	Laird <i>et al.</i> , (2007)	Estómago Intestino delgado Colon	1.5 6.2 5.9	2.5 min 3 h 1.8 h	37 °C	<38 µm	1:40 1:60 1:100	Nitrógeno	Centrifugar y ultrafiltración
<b>TNO/TIM</b>	TNO (2013)	Saliva, estómago, intestino delgado,	5.2 a 1.7 6.2 a 7.4	2 h 4 h	37 °C	<250 µm	No especificado	No	Filtrar

Cuadro 3 Comparación de las características mecánicas de los principales métodos para determinar la fracción bioaccesible.

MÉTODOS	PBET (Ruby)	PBET modificado por Drexler	SBET/RBALP/SBRC	IVG	DIN 19738	RIVM	UBM	FORH6ST	SHIME	TNO/TIM
<b>Tipo de agitación</b>	Argón	Propelas	Agitador de tambor	Propelas (100 rpm)	Plataforma agitadora o agitador magnético	Rotación (55 rpm)	Rotación (55 rpm)	No especificado	Agitador magnético	Peristaltico
<b>Tipo de recipiente</b>	Embudo de separación	Acrílicos (150 mL) con zona para monitorear pH, agitador y entrada de Ar	LDPE de 200 mL	Frascos de vidrio de 1 L	Frascos de vidrio o PE (500 mL) con tapa	Tubos de centrifuga de policarbonato (85 o 94 mL)	Tubos de centrifuga de policarbonato (85 o 94 mL)	No especificado	Frascos de vidrio de 30 mL para fase estática	Cilindros de vidrio
<b>Otros materiales</b>	Saco de diálisis	Saco de diálisis Jeringa para filtración	No especificado	No especificado	No especificado	No especificado	No especificado	No especificado	Inyector	Equipo especialment e diseñado

## 1.6 Factores que afectan la bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad de una sustancia depende de diversos parámetros como la naturaleza del contaminante, las propiedades del suelo, las características del receptor y la interacción de la sustancia con la matriz.

Como se mencionó anteriormente, debido a las propiedades del suelo, pueden darse casos en que las sustancias contaminantes se degraden por acción de microorganismos presentes en el suelo o matriz de estudio. Asimismo, algunas plantas tienen la capacidad de absorber EPT, con lo cual la concentración del contaminante en la matriz disminuye. La absorción por las plantas genera bioacumulación en las mismas, lo cual da ingreso a un contaminante a la cadena trófica. Son necesarios estudios complementarios con la finalidad de determinar el riesgo de exposición a sustancias peligrosas a través de la cadena trófica.

Los factores de los cuales depende la biodisponibilidad han sido estudiados desde mediados del siglo XX, sin embargo, es hasta hace pocos años que los investigadores se han enfocado en establecer controles más estrictos para determinar la bioaccesibilidad de las sustancias, ya sea mediante pruebas *in vivo* o *in vitro*. Estos estudios se han enfocado en los controles geoquímicos de la biodisponibilidad de las sustancias, los mecanismos de control para la disolución de las partículas de suelo en el tracto intestinal, sorción y precipitación de productos, así como las cinéticas de disolución, entre otros (Ruby, Davis, Kempton, Drexler, & Bergstrom, 1992) y por muchos años se han utilizado métodos de extracción simple para evaluar la cantidad de metales en disolución en un tracto gastrointestinal simulado.

El predecesor de estos sistemas de simulación fue desarrollado originalmente para estudios nutricionales para evaluar la biodisponibilidad del hierro de los alimentos (Miller, Schricker, Rasmussen, & Van Campen, 1981). En estos sistemas, varias sales metálicas, o suelos que contienen metales, son incubados en

una solución de bajo pH por un periodo que pretende simular el tiempo de residencia en el estómago. Posteriormente se incrementa el pH a quedar cercano a neutral, y la incubación continua por un periodo que simula el tiempo de residencia en el intestino. Se agregan enzimas y ácidos orgánicos para simular los fluidos gástricos y del intestino delgado. La fracción de un metal que se disuelve en las fases gástrica e intestinal representa la fracción bioaccesible.

Mediante los mecanismos de sorción y precipitación, los suelos pueden atenuar la afectación de EPT al ambiente, siendo el primero el que presenta la cinética de reacción más rápida, por lo cual es el principal proceso geoquímico que controla el transporte y biodisponibilidad de EPT en el ambiente (García Rodríguez T. , 2017). Durante el proceso de sorción se forman complejos débiles, en los que los iones son rodeados por moléculas de agua y son atraídos por las partículas coloidales a causa de las fuerzas electrostáticas débiles, dando lugar a una sorción física. Posteriormente ocurre la sorción química, en la cual los enlaces son más fuertes, formándose complejos donde no hay moléculas de agua entre el ion y el coloide. De esta manera, los EPT pueden difundirse a poros internos en el suelo, donde forman enlaces o simplemente quedan atrapados, a este fenómeno se le denomina absorción. Por otra parte, pueden coprecipitar sobre la superficie de los coloides (García Rodríguez T. , 2017). Cuando la concentración del EPT es baja, se produce la adsorción de la forma descrita, y a medida que aumenta la cantidad de EPT la sorción se hace más fuerte, dando origen a la nucleación y a la formación de agregados sobre la superficie de las partículas del suelo. En estos casos la precipitación se hace dominante, hasta llegar a formarse una fase mineral independiente (Sparks, 2005).

Las características del receptor están determinadas por los procesos fisiológicos del mismo. En el caso del humano, la bioaccesibilidad incluye todos los procesos físicos, químicos y microbiológicos en el cuerpo humano, desde el masticar en la boca hasta la precipitación en los intestinos (ISO/TS 17924:2007). En este caso, y similar para muchos receptores, la absorción requiere que el contaminante se encuentre disuelto y que sea transportado a la pared

gastrointestinal. La bilis, los ácidos estomacales, las proteínas y otros agentes de complejación, pueden modificar la disolución y absorción de una sustancia, mientras que lípidos y otros tipos de materia orgánica presentes en la comida pueden incrementar el efecto de arrastre de una sustancia hasta la bilis (ISO/TS 17924:2007). Si adicionalmente se considera la química de la matriz en la que se encuentra la sustancia o el EPT, el simple proceso de disolución-transporte-absorción se traduce en un sistema mucho más complejo y complicado, derivado de las cinéticas de reacción y los cambios secuenciales en el ambiente químico del organismo.

### 1.6.1 Factores fisicoquímicos

En el caso de los sistemas *in vitro*, los factores que determinan la bioaccesibilidad de una sustancia tienen muchos componentes, muchos de ellos ya mencionados en los métodos. Dentro de los factores más mencionados y controlados por los grupos de investigación se encuentran el pH, los tiempos de residencia, la relación sólido/líquido, las sustancias que actúan en cada fase, el tipo de reactor utilizado en el método, el mecanismo de agitación y el tratamiento de la muestra previo al análisis.

El caso del pH es importante, ya que comparando los resultados de diversas pruebas de extracción de arsénico, plomo y cadmio en la fase gástrica de entre 5 diferentes métodos (PBET, SBET, DIN, RIVM, SHIME y TIM) se obtiene que la fracción bioaccesible varía entre 4% en el método SHIME y 91% para el método SBET, en el cual el pH es de 1.5, mientras que en el método SHIME el pH de trabajo es 4. A pesar de que hay muchos parámetros que pueden influir en la obtención de la fracción bioaccesible, el análisis de los resultados concluye que esa diferencia en el porcentaje de extracción es debido a los valores de pH en la fase gástrica (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012).

Otro de los factores fundamentales para cualquier proceso es el tiempo, y para el caso de los procesos de desorción de metales en el organismo no es la excepción. La duración exacta del proceso de la fase estomacal y el de la fase

intestinal no se encuentran claramente descritos en la literatura, debido a que los equilibrios dependen del metabolismo del individuo, así como de las propiedades de lo que se ha ingerido, por lo que una parte importante de los experimentos han incluido cinéticas de desorción (Rodríguez, Basta, Casteel, & Pace, 1999).

Para el caso de los experimentos *in vivo* se halló que el proceso experimental es más largo y complicado; el proceso descrito por (Rodríguez, Basta, Casteel, & Pace, 1999) describe que los animales requieren 3 días de aclimatación, periodo tras el cual son expuestos a la dosis de suelo, siendo colocados 6.25 mg de suelo diarios por cada kilogramo del peso corporal del animal en alimento especial, el cual es repartido en dos dosis, una por la mañana, 2 horas previas al desayuno y la segunda dosis por la tarde, 2 horas antes del último alimento del día. Cada tercer día se ajustan la dosis de suelo, dependiendo la ganancia del peso que tengan los animales. En total, el periodo de alimentación es de 15 días, teniendo en cuenta que cada 24 horas se deben hacer una recolección de orina de cada uno de los especímenes, recolección que debe ser almacenada debidamente para, posteriormente realizar el análisis.

Para las pruebas *in vitro*, el tiempo de reacción para las fases estomacales e intestinal (refiriéndose únicamente a la sección del intestino delgado), no se encuentran claramente descritas en la literatura, pero experimentos para determinar la cinética de disolución de metales en cenizas y escorias utilizando el método PBET (Rousell, y otros, 2010). La concentración de metales en la fase estomacal permaneció relativamente constante, tomándose muestras cada 20 minutos durante al menos dos horas. De la misma forma sucedió en la fase intestinal, donde fueron tomadas muestras durante un periodo de tiempo de 3 horas sin que la concentración de los metales, corroborando los resultados obtenidos previamente por Ruby (Ruby, Davis, Kempton, Drexler, & Bergstrom, 1992) y por el grupo de investigación de Rodríguez (Rodríguez, Basta, Casteel, & Pace, 1999).

Con respecto a la cantidad de muestra a usar y el volumen de solución en la cual se realizará la extracción, la mayoría de las pruebas utilizan relaciones sólido-



líquido 1:100. Para el caso de la prueba RIVM en ocasiones se lleva a cabo con dos relaciones, 1:100 y 1:1000. La Figura 6 muestra los resultados de la prueba RIVM con ambas relaciones y se aprecia que cuanto mayor es la relación, más grande es la bioaccesibilidad. A esa misma conclusión llega el estudio realizado por el grupo de estudio sobre bioaccesibilidad en Canadá (BARC<sup>18</sup>) (BARC, 2011).

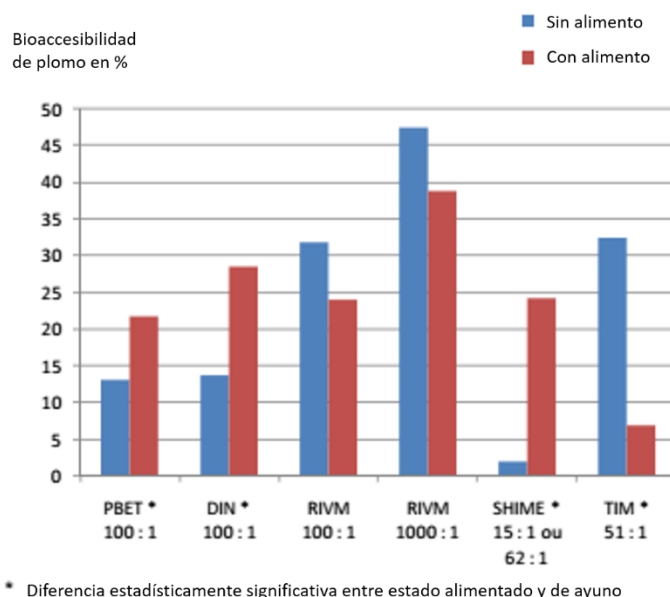


Figura 6 Influencia del alimento y del tamaño de partícula en la bioaccesibilidad (García Rodríguez T., 2017).

Oomen reportó que, para la prueba RIVM, el uso de cantidades menores de suelo (0.06 o 0.04 g) (relaciones mayores) resultaron, en algunos casos, en variaciones de pH menores en la fase gástrica, que cuando se utilizaron cantidades más grandes de suelo, esto probablemente atribuido al efecto amortiguador del suelo (Oomen, Brandon, Swartjes, & Sips, 2006). Para el caso de las relaciones sólido-líquido en la prueba SHIME, los experimentos realizados en estado de ayuno utilizaron una relación de 15:1, mucho menor incluso que la relación 62:1 utilizada en experimentos realizados en estado alimentado. En la prueba SHIME, se observa de hecho, un aumento de bioaccesibilidad en estado alimentado, es decir, cuando la relación sólido-líquido es mayor. Contrario a los resultados reportados en todas las publicaciones consultadas, la prueba TIM en estado de ayuno con una relación

<sup>18</sup> Bioaccessibility Research Canada.

sólido-líquido baja (1:51) genera valores de bioaccesibilidad superiores a aquellos obtenidos mediante las pruebas PBET, DIN y RIVM con una relación de 1:100.

Otro parámetro que también desempeña un papel en la bioaccesibilidad de las sustancias es la composición del fluido gastrointestinal.

En el desarrollo del método IVG, la bioaccesibilidad del arsénico fue estimada utilizando los métodos IVG y PBET en escoria de hierro y muestras de suelos contaminados, en el caso del método PBET se obtuvieron valores de bioaccesibilidad significativamente menores a los obtenidos con el método IVG, ya que la bioaccesibilidad con el método IVG es en promedio 24.8% en la fase gástrica, y 22.7% en la fase intestinal, mientras que con el método PBET es de 13.9 y 12.0, respectivamente.

Hay que considerar que a pesar de que los valores de pH son similares (para la prueba IVG, 1.8 en la fase gástrica y 5.5 en la fase intestinal, a la vez que en la prueba PBET el pH es de 2.0 y 7.0 respectivamente), la concentración de pepsina en la solución IVG es 10 veces más concentrada que en la prueba PBET, lo cual puede mejorar la solubilización del arsénico gracias a los productos hidrolizados (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012).

Los investigadores que desarrollaron las pruebas DIN y RIVM (UBM y FOREHST), se enfocaron en desarrollar soluciones digestivas que fuesen representativas de la fisiología humana. Sin embargo, los resultados del estudio BARC (BARC, 2011) mostraron que métodos químicos sencillos producen valores más cercanos a los resultados de biodisponibilidad que métodos más complejos como las pruebas RIVM o UBM que utilizaron análogos gastrointestinales. Sin embargo, este estudio fue realizado únicamente en un suelo. Estas observaciones deben ser reexaminadas para otros suelos y/o matrices.

Al tratar de simular el tracto gastrointestinal, es necesario considerar la presencia de alimento, el cual, al ser añadido durante la prueba, puede tener influencia en los resultados. Para el caso del método IVG, la prueba se lleva a cabo

tanto en estado alimentado como en ayuno, obteniendo que los valores promedio de bioaccesibilidad de plomo en la fase gástrica fueron de 23.0% en estado alimentado y 32.2% en ayuno. En este caso, la presencia de alimento disminuyó la bioaccesibilidad del plomo. Los autores del estudio concluyen que la presencia de alimento disminuye la absorción de plomo ingerido, debido principalmente a la presencia de calcio y fosfatos.

Por otro lado, los resultados de Oomen (Oomen, y otros, 2003), determinados con el método DIN en ayuno y con alimentado (leche entera en polvo), muestran un aumento en la bioaccesibilidad en presencia de alimento para los tres elementos en los tres suelos estudiados. Sin embargo, los autores explican que, en ambos estados, alimentado y ayuno, el pH gástrico fue mantenido en 2, siendo que fisiológicamente el pH aumenta cuando hay alimentos presentes. Esta prueba representa el caso más desfavorable (pH gástrico bajo y presencia de alimento). De acuerdo con Oomen, su método representa la situación fisiológica real donde el pH disminuye cuando aún hay alimento en el estómago.

### 1.6.2 Factores mecánicos

Los diferentes métodos existentes para determinar la bioaccesibilidad hacen énfasis en las condiciones de operación de sus equipos, pero existe poca información con respecto a los equipos utilizados, de la misma forma, no existen estudios que correlacionen el efecto de la agitación con la eficiencia de extracción de la fracción bioaccesible. Es sumamente conocer este parámetro debido a que una agitación mal controlada orillaría a situaciones en las que la mezcla no es homogénea, ocasionando que los equilibrios en la solución no sean los adecuados y, por ende, generar problemas de repetibilidad en los resultados analíticos.

La agitación y mezclado es una operación unitaria presente en muchos procesos industriales, e involucra sistemas de una o varias fases, realizándose en sistemas de agitación estáticos o en sistemas agitados. En general la agitación se refiere a forzar mediante medios mecánicos que adquiera movimiento en el interior

de un recipiente con la finalidad de mezclar una o más sustancias con el objetivo de homogeneizar las propiedades de la sustancia agitada.

El método PBET basa su funcionamiento en un reactor de suspensión de tres fases (sólido-líquido-gas) denominado como reactor Pachuca<sup>19</sup>. En este tipo de reactores es el gas quien desempeña la función de agitar la mezcla de manera intensa lo cual es crucial para lograr mantener la fase sólida en suspensión (Nienow, 1968), además, el gas es muy utilizado para cuando se requieren procesos aeróbicos o bien cuando se requiere incorporar aire en la solución.

Los reactores tipo Pachuca tienen la ventaja de que fácilmente llegan al estado de suspensión completa<sup>20</sup>, lo cual implica una reducción en los tiempos de equilibrio y en los costos, ya que un reactor con este tipo de agitación suele tener un rango de disipación de la energía (energía suministrada/masa en movimiento) bastante bajo (0.05W/kg).

---

<sup>19</sup> Estos reactores suelen ser usados para la extracción de materiales no ferrosos como uranio, oro, zinc y cobre. Fue nombrado así porque, aunque originalmente se diseñó en Nueva Zelanda, fue utilizado por primera vez en la ciudad de Pachuca, México (Nienow, 1968).

<sup>20</sup> El estado de suspensión completa de una solución es la condición en la que todas las partículas están en movimiento y no queda ninguna partícula en el fondo del tanque por más de 2 segundos. Bajo esta condición, toda la superficie de la partícula está en contacto con el fluido, por lo cual se asegura que se tiene disponible la máxima área superficial para la reacción química, o la transferencia de calor o masa (Harnby, Edwards, & Nienow, 1992).

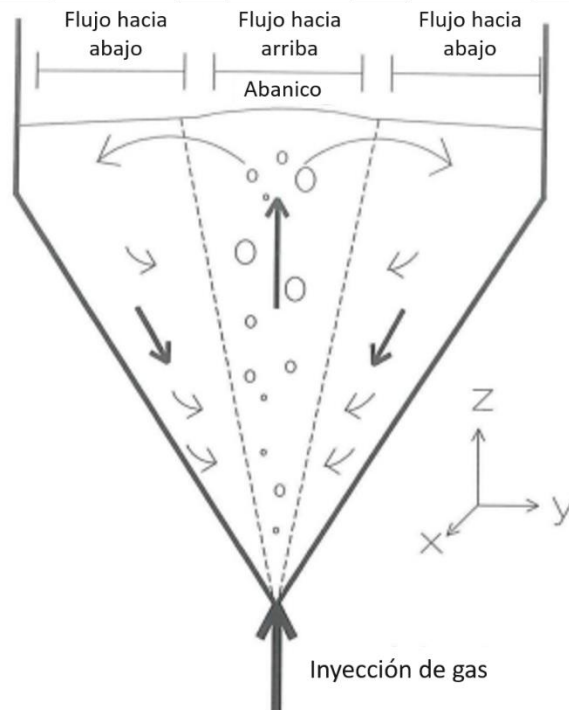


Figura 7 Patrón de flujo en un reactor Pachuca (Kleijntjens, van der Lans, & Luyben, 1994).

Un factor importante en el diseño de los reactores Pachuca y PBET es la forma cónica del fondo del reactor (Figura 7), el cual genera corrientes de flujo ascendente en la parte central del reactor y otras de flujos descendente a las orillas del mismo, haciendo así que el particulado se reparta de forma homogénea en el reactor sin formar depósitos en el fondo, ya que cuando el sólido desciende y se sedimenta, la corriente ascendente de gas hace que el sólido se reincorpore a la mezcla.

En lo que respecta al sistema PBET modificado, éste usa un sistema de vasos o reactores agitados, los cuales son recipientes de forma cilíndrica. El diseño del fondo de los reactores puede ser de forma plana, curvo o cónico, esto dependerá de criterios como la facilidad de vaciado o del tipo de solución a mezclar. Este tipo de equipos suelen ser muy usados para cuando se tienen sólidos en suspensión (Harnby, Edwards, & Nienow, 1992).

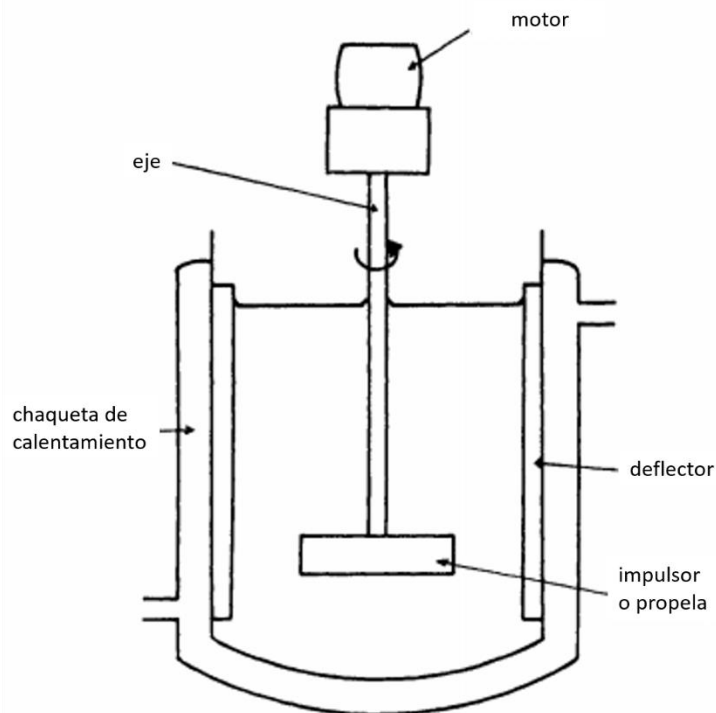


Figura 8 Esquema de un reactor agitado (Harnby, Edwards, & Nienow, 1992).

Para lograr una mezcla completa, los reactores agitados se auxilian de impulsores o propelas (Figura 8), las cuales deben tener características específicas para lograr una correcta mezcla, ya que cada tipo de propulsor da lugar a patrones de flujo distintos (Figura 9), haciéndolos específicos según el tipo de mezcla que se tiene, así como la densidad o la viscosidad de la misma, además del contenido y tamaño de sólidos.

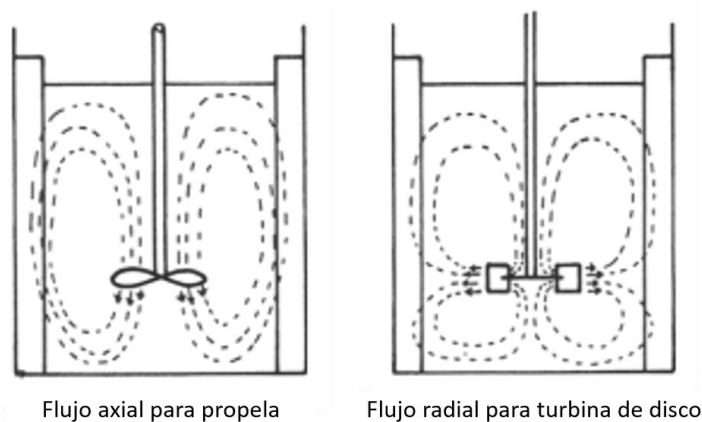


Figura 9 Patrones de flujo en reactores agitados.

Además de los impulsores, y con la finalidad de mejorar la calidad de la mezcla y llegar al estado de suspensión completa de manera más eficiente, en el diseño de los reactores agitados suele incluirse el uso de deflectores, lo cuales también ayudan a prevenir vórtices de agitación o a disminuir su tamaño, especialmente cuando se manejan líquidos de baja viscosidad (Harnby, Edwards, & Nienow, 1992).

Un caso especial de impulsor es el de las barras magnéticas o agitador magnético, el cual es una placa sobre la que coloca un recipiente de fondo plano en el que se introduce un pequeño magneto en forma de barra cubierto de una capa de teflón, esta barra agita la suspensión al ser movido por otro magneto situado bajo la placa e impulsado por un motor eléctrico. Por las características del equipo, este tipo de agitadores están limitados al uso en laboratorios, principalmente para la preparación de soluciones y medios de cultivo (García, Colom, & Jaramillo, 2003).

Los mezcladores de tambor rotatorio o mezcladores de volteo son sistemas en los que el material se mezcla como consecuencia del movimiento de rotación del recipiente en que está contenido dicho material.

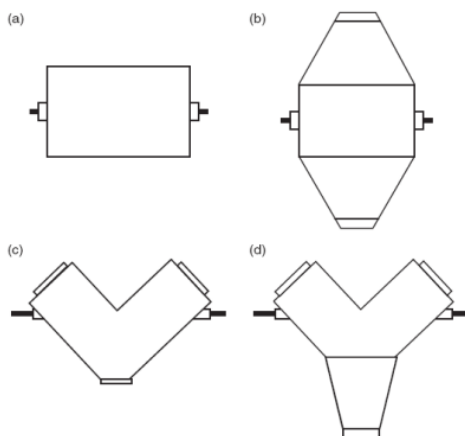


Figura 10 Mezcladores de tambor a) cilindro horizontal, b) de doble cono, c) cono en V, d) cono en Y. (Ortegas-Rivas, 2005).

Estos mezcladores son usados principalmente para mezclas sólido-sólido, especialmente en la industria alimenticia y de la construcción. El método SBET/RBALP/SBRC utiliza este tipo de equipos de mezclado, ya que los recipientes

son sellados y colocados en una gradilla, la cual gira sobre el eje horizontal del equipo (Figura 10).



## 2 Metodología

### 2.1 Actividades por realizar

- I. **Determinación de las bases de diseño.** Con base en los métodos existentes y previamente mencionados en los antecedentes, se seleccionan los criterios más relevantes para el diseño del equipo de simulación gastrointestinal.
- II. **Caracterización de las muestras de control.** Se eligen dos muestras que funcionan como control durante las pruebas de extracción, por lo que a todas las muestras se les determina los parámetros generales (pH, conductividad eléctrica, potencial químico), así como sus fracciones total y geodisponible, todo esto con la finalidad de disminuir variables y de tener certeza en cuanto a las características de las muestras con las que se llevarán a cabo las pruebas de extracción de la fracción bioaccesible.
- III. **Desarrollo de pruebas con los equipos al alcance.** Para poder entender el comportamiento de los diferentes métodos, y a fin de hallar las ventajas y desventajas de cada equipo y método, se dispone de los equipos PBET y PBET modificado, así como variantes del método RIVM, DIN e IVG. En estos equipos las pruebas iniciales determinan la cantidad de arsénico extraído utilizando una solución de HCl. También hay que mencionar que todas las pruebas se hacen por triplicado y se compara la repetibilidad de los resultados obtenidos en los diferentes equipos utilizados.
- IV. **Evaluación de los materiales de construcción del reactor.** Antes de iniciar la construcción del equipo se realizan pruebas para probar el desempeño de los posibles materiales con los cuales se construirá el simulador gastrointestinal.
- V. **Construcción del prototipo del reactor.** Con los parámetros obtenidos, es hasta este punto cuando se inicia la construcción del reactor, que a partir de este punto se denomina como ***Reactor de Simulación Gastrointestinal***

**para Bioaccesibilidad (RSGB).** Una vez que el prototipo está en funcionamiento se realizan las pruebas de desempeño para determinar la fracción bioaccesible en las muestras de control.

A continuación, se presentan las actividades realizadas en conjunto con la M. en C. Thalía García Rodríguez, que permiten demostrar la funcionalidad del equipo diseñado:

- VI. **Evaluación de la reproducibilidad de la modificación del método PBET en el RSGB.** Mediante el uso del estándar de referencia NIST Montana 2711<sup>a</sup> y el material estándar de referencia (SRM) Montana Soil 2710, este último usado por otros laboratorios para realizar pruebas de bioaccesibilidad, se realiza la extracciones de la fracción bioaccesible de arsénico en dichos estándares y posteriormente se comparan los resultados con los obtenidos según el método de la NOM-147, esto debido a que ese método es el que reporta mejores resultados y a que es el que se indica dentro de la normatividad mexicana.
- VII. **Evaluación de la viabilidad de aplicar un método PBET modificado<sup>21</sup> en el RSGB.** Con la finalidad de probar el desempeño del RSGB en una situación de trabajo real, se hace la determinación de arsénico bioaccesible, a escalas típicas, en casos reales de sitios contaminados. Las actividades que realizar incluyen:
- ⇒ Extracción mediante digestión ácida en microondas y determinación de arsénico total mediante la técnica de espectroscopía de plasma (ICP-OES), así como en fluorescencia en rayos X (FRX) para la matriz sólida.
  - ⇒ Determinación de la fracción bioaccesible de arsénico, mediante el método PBET modificado en el RSGB.
  - ⇒ Evaluar la presencia de arsénico bioaccesible en la fase gástrica y en la fase intestinal, para saber si se cumplen con los parámetros de control de calidad.

---

<sup>21</sup> Las modificaciones corresponden a las establecidas en las bases de diseño del RSGB.

Cabe señalar que para todas las pruebas realizadas se usó agua tipo I<sup>22</sup>, además de que en todos los procedimientos de extracción se establecieron controles analíticos (blanco, material de referencia y duplicados).

## 2.2 Métodos utilizados

Para la caracterización de las muestras, así como para la determinación de la fracción bioaccesible se utilizaron los siguientes métodos analíticos, de los cuales su descripción completa se presenta en la sección A del apéndice.

- a) **Medición de pH:** Método de referencia U.S. EPA 9045D.
- b) **Medición de conductividad eléctrica:** Método de referencia SSS Book Series No. 5 part III Glossary of Soil Science Terms. Soil Science Society of America, USA (1996).
- c) **Medición de potencial químico (redox):** Método de referencia indicado en suelos y lodos (ISO 11271, 2002; NRES 381, 2002).
- d) **Microscopia electrónica de barrido (SEM):** Prueba realizada por personal del Laboratorio Universitario de Microscopía Electrónica (LUME), de la UNAM.
- e) **Geodisponibilidad (fracción soluble):** Método modificado de ASTM D3987-85 (1992), Standard Test Method for Shake Extraction of solid Waste with water.
- g) **Método gástrico modificado para determinar bioaccesibilidad.** Extracción con una solución de HCl a pH  $1.5 \pm 0.3$ , a temperatura aproximada de 37°C durante una hora de agitación.

---

<sup>22</sup> El agua Tipo I tiene una resistividad eléctrica mínima de 18.0 MΩ\*cm a 298 K (ASTM, D 1193-99)

- h) **Método intestinal modificado para determinar bioaccesibilidad.** Es continuación del método gástrico modificado, donde posteriormente el pH de la suspensión de suelo se aumenta a  $7.00 \pm 0.3$ , al adicionar solución sobresaturada de  $\text{NaHCO}_3$ , a temperatura aproximada de  $37^\circ\text{C}$  durante tres horas de agitación.
- i) **Método de referencia para medir la bioaccesibilidad, NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.** Extracción con una solución de glicina ajustada a pH  $1.5 \pm 0.3$  con HCl, a temperatura aproximada de  $37^\circ\text{C}$  durante una hora de agitación.
- j) **Método PBET en el sistema RSGB:** La prueba se realiza según lo establecido en las bases de diseño y en los resultados experimentales del presente trabajo.
- k) **Espectroscopía de plasma (ICP-OES):** con base en el método de referencia EPA 6010B (1996).
- l) **Difracción de rayos X,** se realizó en el Instituto de Geología, en el Departamento de Geoquímica, en el equipo marca Shimadzu XRD a cargo de la Dra. Teresa Pi Puig.
- m) **Fluorescencia de rayos X:** 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).

Para el desarrollo de las pruebas de desempeño del equipo diseñado, se seleccionó un suelo con arsénico, el cual fue colectado en un sitio contaminado debido a actividades mineras (Muestra LABQA 015-14); asimismo, se trabajó con muestras compuestas con la finalidad de incrementar la representatividad de las pruebas.

Para comparar los resultados obtenidos en cada una de las extracciones se llevaron a cabo, los siguientes cálculos estadísticos:

**Exactitud.**

La exactitud corresponde a la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras con cantidades conocidas del analito (CENAM & EMA, 2012). Este parámetro es un indicativo de la exactitud, es decir, permite determinar qué tan cercano está el valor obtenido respecto a un "valor verdadero" (Magnusson & Örnemark, 2014). Por otra parte, este parámetro de desempeño permite identificar la presencia de interferencias, cuando el resultado de la determinación del recobro se encuentra fuera del intervalo aceptable.

Para determinar el recobro se utilizó en cada lote una muestra del material de referencia Montana soil NIST 2711a. El porcentaje de recobro se calcula utilizando la siguiente ecuación:

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

El criterio de aceptación, de acuerdo con los lineamientos establecidos en LABQA y de la NOM-147, es de "valor verdadero"  $\pm 15\%$ .

**Precisión**

Corresponde al grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes, obtenidos en condiciones específicas. Es expresada en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. Sus principales parámetros son repetibilidad y reproducibilidad.

**a) Repetibilidad**

Este parámetro indica la concordancia entre 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 repetibilidad puede evaluarse entre réplicas, o bien entre lotes.

La repetibilidad se evaluó utilizando diferentes muestras, con determinaciones realizadas por triplicado. Se calcula el coeficiente de variación (% C.V.) mediante la siguiente ecuación:

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

El criterio de aceptación para muestras ambientales, de acuerdo con el LABQA, es un coeficiente de variación menor al 20%.

En los casos en que solamente se determinaron por duplicados, la precisión se evaluó utilizando la desviación porcentual relativa (DPR), mediante la siguiente ecuación:

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

Donde,

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

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

S= desviación estándar de las repeticiones

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

Con un criterio de aceptación de %DPR menor a 20%.

### **b) Reproducibilidad**

La reproducibilidad corresponde a la precisión de un método, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes, es decir, se compararon los resultados de la extracción de fracción bioaccesible en el material de referencia con diferentes analistas y en diferentes días.

### 3 Resultados y discusión

#### 3.1 Preparación y caracterización de muestras

Se caracterizaron las muestras de suelo, determinando los parámetros de pH, conductividad eléctrica, potencial redox, contenido de arsénico total y geodisponible. Se prepararon 5 muestras compuestas a partir de 15 muestras de suelos provenientes de una planta de trióxido de arsénico. Estas muestras se caracterizaron de acuerdo con los parámetros mencionados<sup>23</sup> (Cuadro 4).

Cuadro 4 Caracterización de las muestras compuestas (García Rodríguez T. , 2017).

Muestra	pH	E <sub>Ag/AgCl</sub> (mV)	C.E. (mS/cm)	As <sub>total</sub> FRX (<250 µm)		As <sub>geodisponible</sub>		% del As <sub>total</sub> que puede solubilizarse con la lluvia
				%	(mg/kg)	(mg/L)	(mg/kg)	
Compuesta 1	5.8	302.6	2.6	3.99	39,914	51.7	1,034	2.6
Compuesta 2	5.6	260	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 pH de las muestras influye de manera importante en las especies químicas de arsénico presentes, cuya solubilidad varía debido a que al aumentar el pH se pierden cargas positivas sobre la superficie de los coloides que retienen a los iones negativos, como es el caso de los arseniatos (Figura 11). Esto explica el que no exista una relación directa entre el contenido de arsénico total y el geodisponible (García Rodríguez T. , 2017).

<sup>23</sup> Estos análisis se hicieron en conjunto con la M. en C. Thalía García Rodríguez

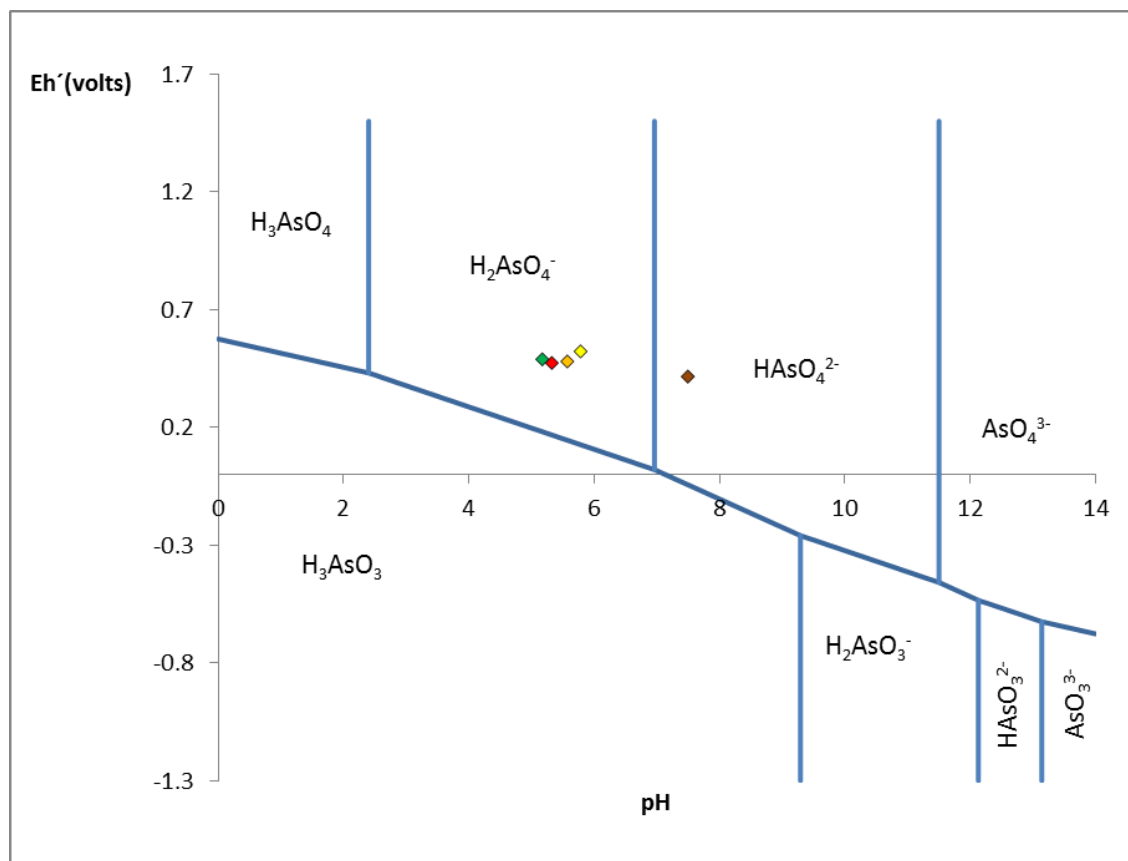


Figura 11 Diagrama de Pourbaix para As (1 M). Se presentan los intervalos de valores de  $Eh'$ , pH y las especies dominantes de arsénico, con los datos experimentales de las muestras compuestas (rombos) (García Rodríguez T. , 2017)

### 3.2 Bases de diseño

A partir de la investigación sobre los métodos preexistentes es que se sientan las bases de diseño. Para ello, y a manera de tener un mejor control sobre las variables, se clasifican las bases de diseño de la siguiente manera:

- Bases de diseño fisicoquímicas
- Bases de diseño mecánicas

Para el caso de las bases de diseño fisicoquímicas, los principales factores a controlar son el pH, el tamaño de partícula de la matriz, la temperatura, la relación



sólido-líquido, los reactivos, el tiempo de reacción, el filtrado de las muestras para análisis y la atmosfera dentro del reactor. En lo respectivo a las bases de diseño mecánicas, la agitación y los materiales de los recipientes serán los parámetros que controlar.

### 3.2.1 Bases fisicoquímicas

El cuadro 2 presenta las condiciones de operación para los principales métodos citados en la bibliografía. Se estableció un escenario extremo, es decir, condiciones de ayuno, lo cual implica que no se incluye alimento en ninguna fase del experimento *in vitro*. A continuación, se presentan las condiciones seleccionadas:

- ✓ **Temperatura.** Es el único parámetro en el cual coinciden todos los métodos, que es un valor de temperatura de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$
- ✓ **pH.** Este parámetro es uno en los que existe una variabilidad significativa entre las propuestas de cada grupo de investigación (ver cuadro 2). Tratando de establecer condiciones extremas y basándose en la investigación bibliográfica, se optó por mantener un  $\text{pH}=1.5\pm 0.3$  en la fase gástrica, mientras que para la fase intestinal el pH de  $7\pm 0.3$ . En ambos casos, se estableció el control del pH durante todo el proceso de medición.
- ✓ **Tiempo de residencia.** Para la duración de cada una de las fases, la mayoría de los grupos de investigación indican que para la fase estomacal una hora es suficiente para obtener valores confiables de la extracción de metales, mientras que, para la fase intestinal, reportan un periodo de 3 horas como el más adecuado (Medlin, 1997; Rodríguez y otros, 1999; Ruby y otros., 1996).
- ✓ **Relación sólido-líquido.** Dado que la mayoría de los métodos usan una relación sólido-líquido de 1:100, se optó por conservar este valor. Otro factor que se consideró es que el equipo debe presentar dimensiones que faciliten su manejo, y esta relación lo permite. Además, el manejar cantidades de superiores a 0.5 g hacen que la muestra sólida sea más homogénea.

- ✓ **Tamaño de partícula.** Se selecciona el tamaño de partícula menor a 250  $\mu\text{m}$ , debido a que se considera que las partículas de este tamaño son las susceptibles de ser ingeridas de manera accidental (ver Sección 1.3)
- ✓ **Tratamiento previo al análisis.** Posterior a la toma de muestra, se filtró la muestra mediante membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para que la solución presente una composición análoga a las obtenidas en las extracciones geodisponibles y de digestión ácida para determinación de metales.

### 3.2.2 Bases mecánicas

El cuadro 3 muestra los parámetros mecánicos que se requieren controlar. A diferencia de las condiciones fisicoquímicas, en donde se observó una mayor uniformidad entre las condiciones de los diferentes métodos, en el caso de las condiciones mecánicas existe una diferencia notable entre cada método reportado en la bibliografía. Por lo tanto, se llevaron a cabo una serie de pruebas preliminares con la finalidad de establecer las mejores condiciones mecánicas a considerar para el diseño del reactor. En especial, fue importante determinar el material para la construcción del reactor, así como las condiciones de agitación, parámetro sumamente relevante, ya que es un factor determinante para la repetibilidad de los resultados obtenidos.

#### *Material del reactor*

La prueba consistió en colocar muestras de suelo con alto contenido de arcillas rojas dentro de varios recipientes de diferentes materiales (HDPE, PP, PC PTEF y vidrio), en una proporción de 1:100 (sólido/agua) y ajustando a un  $\text{pH}=1\pm 0.3$  con HCl. Se colocaron en un agitador axial por un periodo de 3 horas (30 rpm) y posteriormente, se mantuvieron en reposo durante 24 horas. Al finalizar, se desecharon las suspensiones y se limpiaron. El primer paso fue eliminar el sólido restante dentro del recipiente con agua corriente, posteriormente se realizó un lavado con escobillones y jabón, se sumergió los recipientes en una solución de ácido nítrico grado industrial durante una hora. Transcurrido este tiempo, se enjuaga

nuevamente con agua corriente (3 lavados) y luego con agua destilada. Finalmente, los recipientes se dejaron secar a condiciones ambientales. Esta prueba se realizó 5 veces, siempre ocupando los mismos recipientes. Al finalizar el experimento se comparó el color de cada recipiente (Figura 12), donde se aprecia que todos los recipientes, con excepción del de vidrio presentaban una coloración rojiza. Ante los resultados obtenidos, se optó por usar recipientes de vidrio tipo Pyrex.



*Figura 12 Recipientes tradicionales, de izquierda a derecha se encuentran los recipientes de HDPE, PP, PC y PTFE*

### *Agitación*

Se compararon 5 sistemas distintos de agitación que es el paso en que se simula los movimientos peristálticos del estómago. Las condiciones de trabajo generales bajo las cuales se llevaron a cabo las pruebas de agitación son las siguientes:

- ❖ todas las muestras se secaron en estufa a 40°C durante 24 horas;
- ❖ las muestras se tamizaron para obtener la fracción de partículas menores a 250  $\mu\text{m}$ ;
- ❖ la relación sólido-líquido dentro del sistema agitado fue 1:100;
- ❖ la temperatura de operación se mantuvo en aproximadamente 37°C;
- ❖ el tiempo de agitación en todos los casos fue de una hora.

Durante la prueba se observaron los patrones de flujo y la capacidad de cada sistema para lograr un estado completo de suspensión o de solución homogénea,

evitando la concentración de partículas en ciertas zonas del recipiente, especialmente en el fondo. Al mismo tiempo, se analizaron las condiciones de operación para determinar las fortalezas y debilidades de cada mecanismo de agitación.

### 3.3 Pruebas de métodos y equipos disponibles

#### 3.3.1 Prueba PBET, equipo “Prueba de Ruby” LGA-IG

El primero de los métodos de agitación a probar fue el de suspensión de 3 fases o reactor Pachuca, en este caso representado por el equipo Prueba de Ruby, perteneciente al Laboratorio de Geoquímica Ambiental del Instituto de Geología (Figura 13). En este equipo, como su nombre lo indica, es el indicado en el método de Ruby original, PBET, aunque presenta un par de adaptaciones, ya que fue colocada una alimentación independiente de gas en cada reactor, cada una con su respectivo medidor de flujo. En el diseño original los rotámetros se encuentran en las líneas de escape de cada reactor.



*Figura 13 Equipo PBET (LGA-IG).*

La principal ventaja de este diseño es que la agitación es constante, alcanzando un estado de agitación completa casi de inmediato, con lo cual la

sedimentación de la muestra es nula. Desafortunadamente, presenta ciertas desventajas. Por la baja presión del gas que alimenta al reactor, parte de la suspensión pasan a las mangueras, y las pérdidas de este material afecta la calidad de los resultados, además de que se contaminan las líneas de gas (Figura 14).



*Figura 14 Líneas de gas contaminadas del método PBET en el equipo del LGA-IG.*

### 3.3.2 Prueba IVG-DIN, equipo “LABQA-2011”

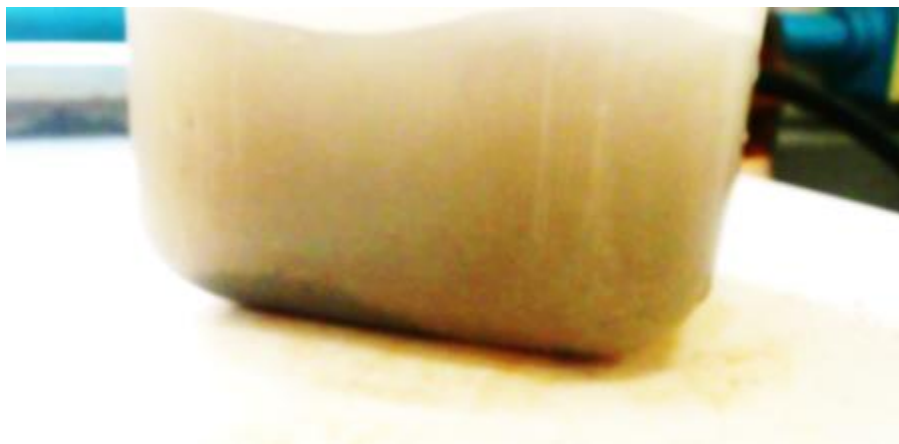
Uno de los primeros intentos del Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental por desarrollar un equipo en el que se pudiese extraer la fracción bioaccesible fue el del equipo denominado LABQA-2011 (Figura 15). Este equipo basa su funcionamiento en una combinación de equipos recomendados en los métodos IVG y DIN 19738. Los reactores son recipientes de base cuadrado a los cuales se burbujea un gas inerte y las suspensiones se agitan mediante barras magnéticas.



*Figura 15 Equipo LABQA-2011.*

Una ventaja del equipo antes descrito es que optimiza el espacio, ya que caben 20 reactores, sin embargo, el mal diseño del equipo y a errores de construcción lo hacen poco funcional, presentando las siguientes limitantes:

- ❖ Los reóstatos para el control de la velocidad no están calibrados adecuadamente, por lo que cada agitador opera a una velocidad distinta.
- ❖ No existe un monitoreo de la velocidad de giro de cada agitador.
- ❖ El peso de la tina de acrílico cuando el sistema contiene el agua para el control de la temperatura ocasiona la deformación de la misma, con lo cual dejan de moverse los motores.
- ❖ El control de la temperatura del agua no funciona correctamente, debido a que el sistema de calentamiento presenta variaciones de hasta 10 grados en la temperatura.
- ❖ La base cuadrada de los recipientes permite optimizar el espacio, pero obstaculiza el movimiento de las barras de agitación, creando depósitos del material en las esquinas. (Figura 16).



*Figura 16 Acumulación de sedimento durante la agitación con barras magnéticas.*

- ❖ No existe un control sobre la cantidad de gas que ingresa a cada reactor, ocasionando que entre cada reactor la cantidad de gas burbujeado sea diferente.
- ❖ Debido al material de los recipientes que es muy ligero, cuando ingresa el gas flotan dentro de la tina.
- ❖ Los agitadores magnéticos erosionan el material de los recipientes. (Figura 17).



*Figura 17 A la derecha, los recipientes flotando en la tina de acrílico; a la izquierda, incrustación del material en el recipiente ocasionada por el uso del agitador magnético.*

### 3.3.3 Prueba SBET/RBALP/SBRC, equipo “NOM-147” LGA-IG

En el caso de la prueba del método NOM-147 (SBET/RBALP/SBRC), se realizó la prueba en otro equipo propiedad del Laboratorio de Geoquímica

Ambiental, el cual está diseñado según lo establecido en el método original y el validado por la US EPA. El equipo tiene una capacidad de 12 lugares por lote, basando su funcionamiento en un sistema de agitación de barriles o “end to end”, en donde la agitación de los recipientes o reactores es sobre su vertical y se encuentran inmersos en un baño de agua a 37°C, donde la temperatura se mantiene por una resistencia colocada dentro de la tina de acrílico (Figura 18).



*Figura 18 Equipo NOM 147 (LGA-IG) basado en el método SBET/RBALP/SBRC.*

El sistema en si es eficiente, ya que se pueden colocar 12 recipientes a la vez y, si bien no se tiene un sistema completamente suspendido, la agitación es completa y no se aprecian depósitos de material.

En este caso, las desventajas observadas son:

- ❖ Es imposible medir y ajustar el pH, con lo cual, si el pH al finalizar la prueba sobrepasa el límite establecido ( $1.5 \pm 0.5$ ) y se tiene que repetir la prueba.
- ❖ La prueba está diseñada únicamente para llevar a cabo la fase gástrica, por lo que, para realizar posteriormente la prueba de la fase intestinal, hay que detener la prueba, abrir todo el sistema y ajustar el



pH con el bicarbonato de sodio. La prueba se vuelve muy complicada y el tiempo en que la suspensión no se agita, afecta los resultados.

### 3.3.4 Prueba DIN, equipo “Incubadora con agitación” LIA-FQ

El método DIN 19738 hace uso de dos sistemas de agitación diferentes, uno con barras magnéticas de agitación y uno de agitación orbital. En el caso de este último, las pruebas fueron realizadas con ayuda de una incubadora con agitación orbital, propiedad del Laboratorio de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Química (Figura 19).



*Figura 19 Incubadora con agitación orbital, LIA-FQ.*

La incubadora cuenta con un sistema de control de temperatura y de velocidad de giro. La agitación de las muestras se realizó a una velocidad de 160 rpm, para buscar lograr estado de suspensión completa.

Este mecanismo de agitación no presenta ninguna ventaja ya que no resultó homogénea y se observaron que los sólidos se sedimentaron. Sólo la fracción de las partículas más pequeña lograron mantenerse en agitación. Además, al igual que en el equipo de la NOM-147, no es posible monitorear las condiciones fisicoquímicas durante el proceso de extracción.

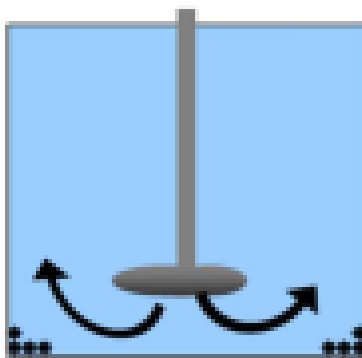
### 3.3.5 Prueba IVG, equipo “Agitador de propelas” LIQ-FQ

De manera independiente, se usó un agitador de propelas o de hélices propiedad del Laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad de Química, que es el sistema usado en el método IVG (Figura 20). La propela utilizada para la prueba fue una hélice de 4 hojas resaltada.



*Figura 20 Agitador de propelas o hélices. Equipo similar al usado en el LIQ-FQ.*

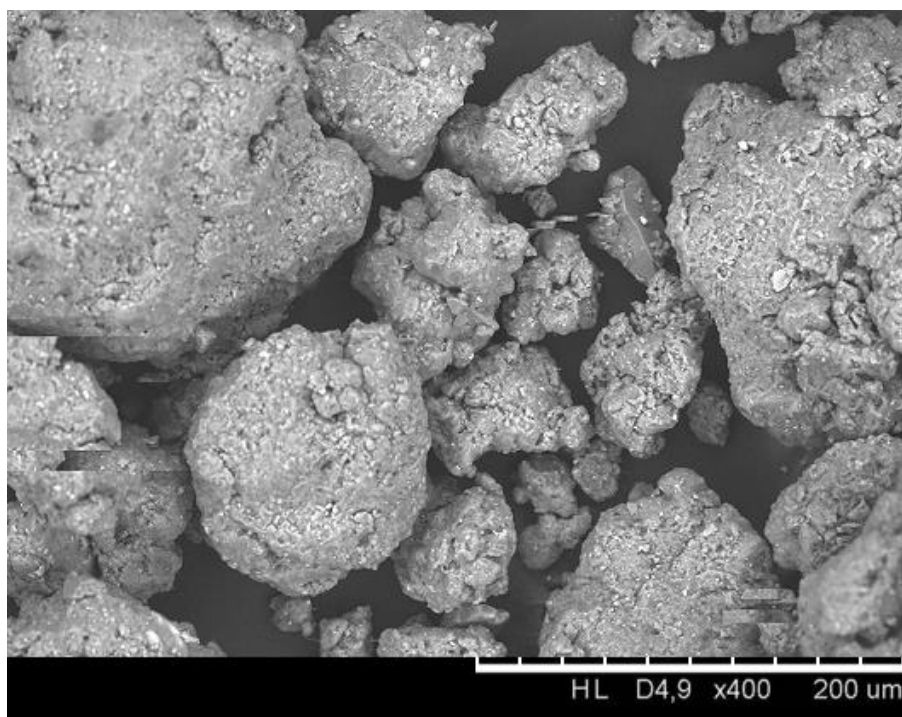
El resultado de la prueba de agitación en este equipo es similar al obtenido con el de los agitadores mecánicos, ya que se observaron zonas al fondo del recipiente en las que se formaban depósitos de muestra, por lo que no se logra un estado completo de suspensión (Figura 21).



*Figura 21 Representación esquemática del patrón de flujo y depósito de muestra en un agitador de propelas.*

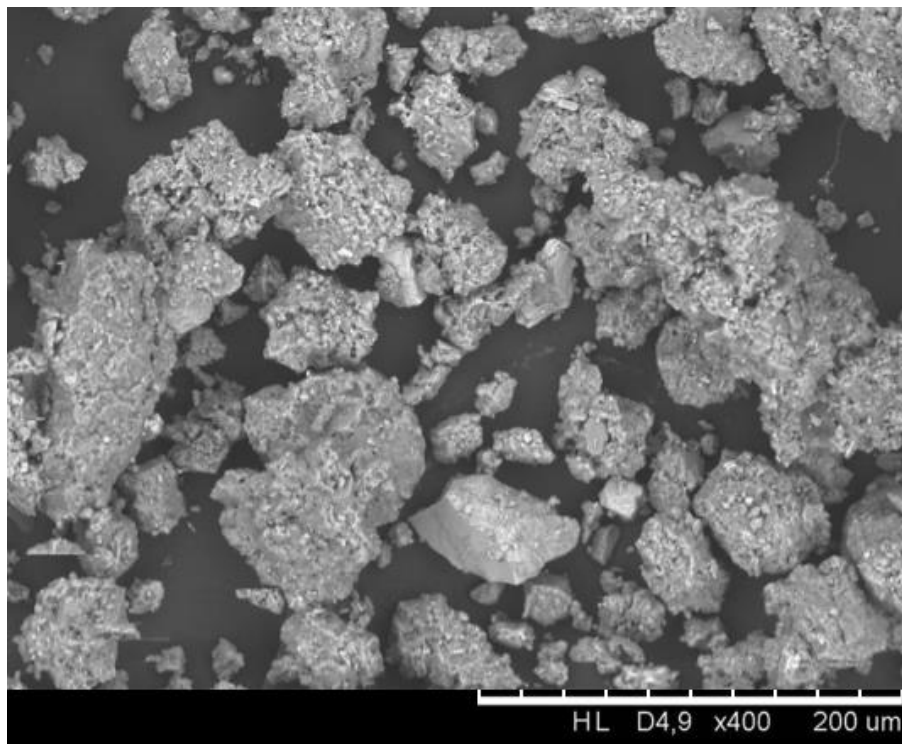
### **3.4 Efecto de la agitación sobre el tamaño de partícula.**

Después de agitar la suspensión en las diferentes pruebas antes descritas, se filtraron y la fase sólida se llevó a sequedad en estufa a 40°C. Con el apoyo de técnicos del Laboratorio Universitario de Microscopia Electrónica (LUME) de la UNAM, y usando la técnica de microscopia electrónica se observó el efecto de la agitación sobre la superficie y el tamaño de las partículas. A continuación, se presentan las imágenes obtenidas.



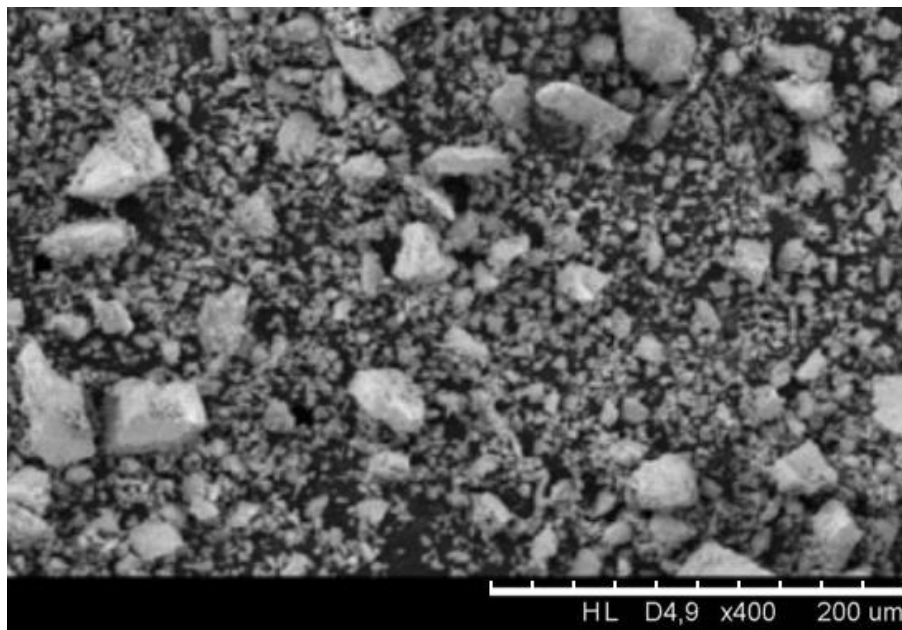
*Figura 22 Muestra de suelo previa a tratamiento.*

En la Figura 22 se observa un suelo que no se sometió a la agitación. Esta muestra únicamente fue tamizada (número 60) para obtener partículas menores a 250 micrómetros. En la imagen se observa que el suelo está formado, principalmente, por agregados o terrones de suelo, algunos de un tamaño menor a 20  $\mu\text{m}$ , así como también otros que no están agregados.



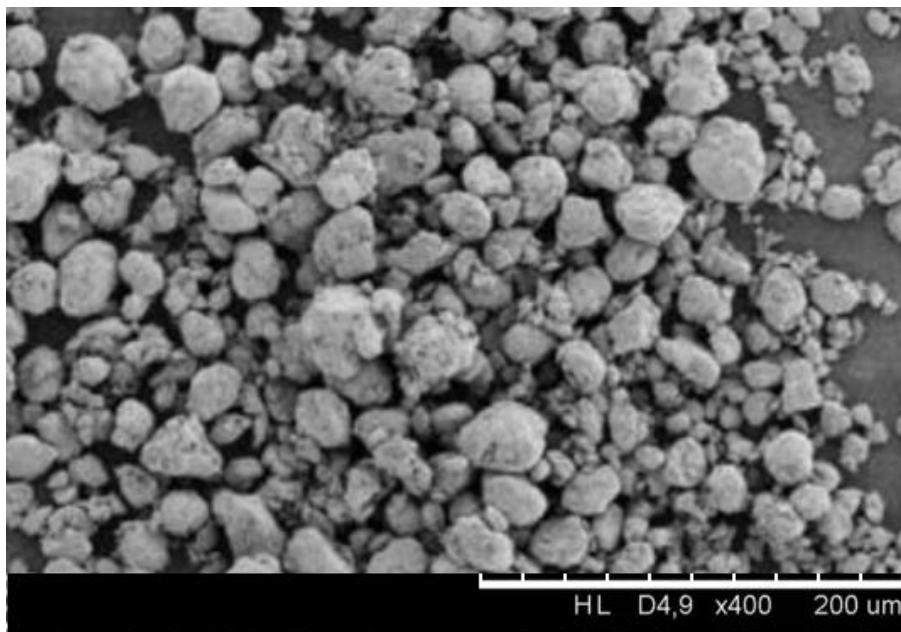
*Figura 23 Muestra posterior al tratamiento de extracción en agitador orbital.*

La imagen de la Figura 23 corresponde a la muestra después de la prueba de agitación orbital. El experimento se desarrolló con ayuda de una incubadora con agitación orbital durante una hora a una velocidad de 160 rpm y una temperatura de aproximadamente 37°C. En la imagen se puede ver que, respecto a lo observado en la figura 39, un menor tamaño de las partículas, pero todavía se observan algunos agregados de partícula, así como también la aparición de partículas con una pared lisa, lo cual podría significar que se trata de partículas sólidas.



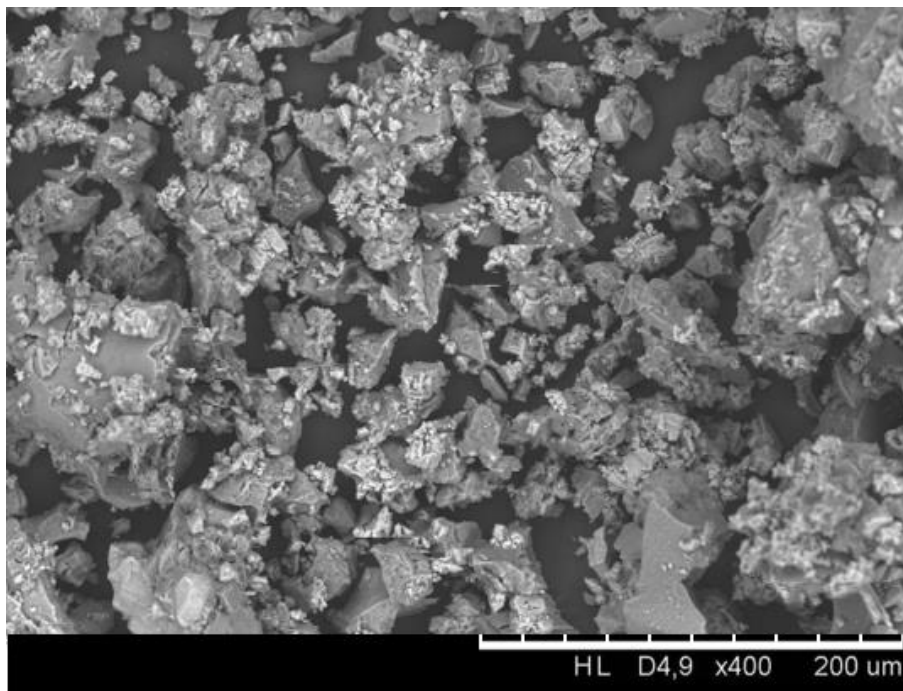
*Figura 24 Muestra posterior al tratamiento de extracción mediante agitadores magnéticos.*

En el caso de la agitación mediante pruebas con agitadores magnéticos, la Figura 24 muestra que el tamaño del particulado más fino aumenta de manera considerable, quizás como consecuencia de una agitación más violenta, aunque, posiblemente, también debido a la erosión causada por el uso del agitador magnético, el cual provoca que parte del suelo sea atrapado entre la barra magnética y el fondo del recipiente. Debido a la rotación de la barra de agitación en el fondo del recipiente, aumenta el número de partículas de suelo finas.



*Figura 25 Muestra posterior al tratamiento de extracción mediante un agitador axial o de tambor.*

Cuando el suelo se agita en un agitador tipo barril (NOM-147) se produce una importante erosión en la superficie de las partículas debido al rodamiento de las mismas y al choque entre ellas, haciendo que se redondeen los ángulos rectos que tenía el particulado original (Figura 25). En la imagen se observa como el tamaño de las partículas de suelo es más uniforme, aunque con forma esférica y no pareciera haber terrones de partículas.

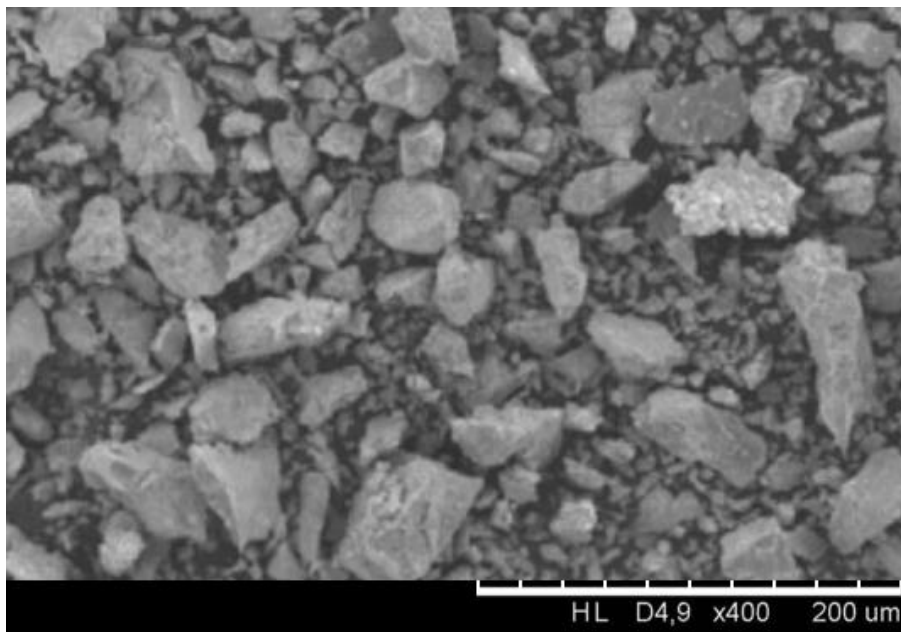


*Figura 26 Muestra posterior al tratamiento de extracción en un agitador de propelas.*

La situación de la agitación con propelas muestra que se logran deshacer los terrones de la muestra original, aunque no de manera eficiente (Figura 26).

A diferencia de lo obtenido mediante la agitación con el uso de la barra magnética, en este caso no pareciera haber un proceso de molido de la muestra, así como tampoco de erosión similar al método axial.





*Figura 27 Muestra posterior al tratamiento de extracción con gas burbujeado.*

El mecanismo de agitación usado en el método PBET original resultó ser el más efectivo para obtener la máxima área superficial para llevar la reacción de extracción sin modificar el tamaño de la partícula. En la Figura 27 se aprecia que la presencia de terrones de muestra es casi inexistente, así como también el hecho de que la superficie de las partículas no presenta signos evidentes de erosión o desgaste causados por el proceso de agitación.

Cabe recordar que, en todos los casos, las pruebas fueron realizadas con la misma muestra, en una proporción sólido-líquido 1:100 y con un tiempo de 1 hora de agitación; en todos los casos, se fijó un pH inicial de  $1.5 \pm 0.1$  con una solución de HCl, realizando la extracción a una temperatura aproximada de  $37^{\circ} \text{C}$ .

### 3.5 Propuesta de diseño de RSGB

Con las bases de diseño fijadas, y ante los resultados obtenidos en las pruebas de agitación, se optó por elegir un sistema de agitación con gas similar al de la prueba PBET, utilizando argón de alta pureza (Ar 4.8-plasma).

#### 3.5.1 Diseño del reactor

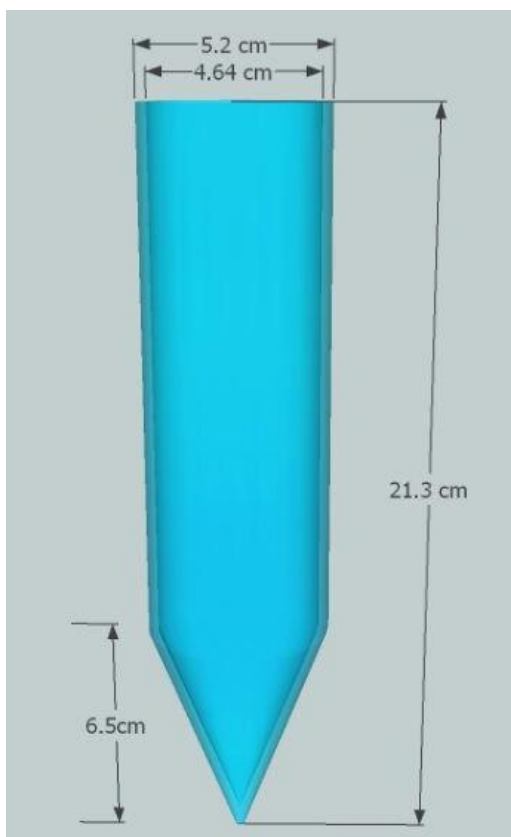
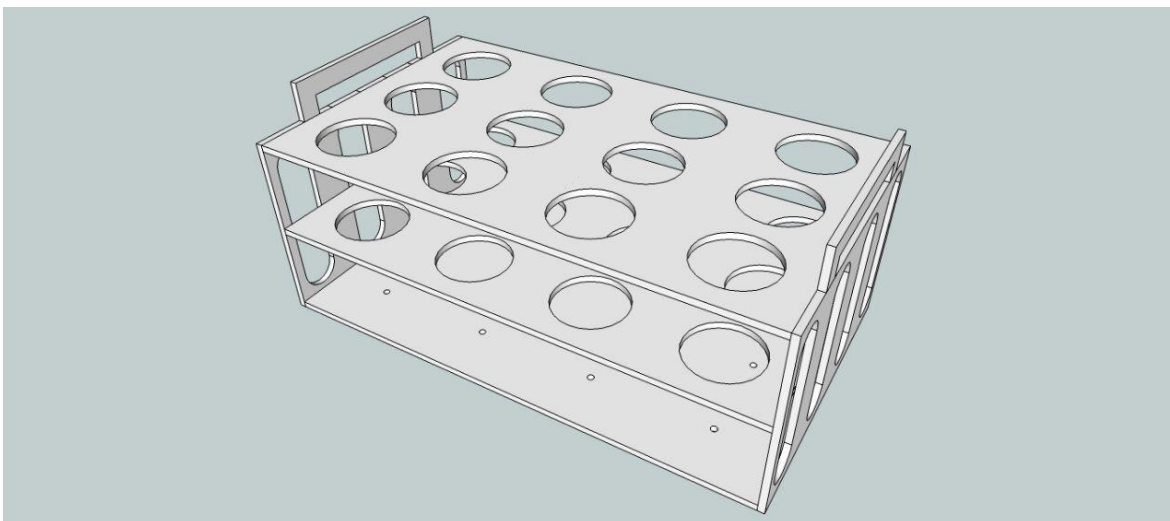


Figura 28 Esquema del reactor.

A diferencia del diseño original del método PBET, se propone que la línea de alimentación de gas sea desde la parte superior, mediante un tubo que lleve el gas hasta el fondo del reactor (Figura 30). Por ello, se eligió un reactor cilíndrico de vidrio con un fondo cónico. De esta forma, el particulado sólido que sedimenta baja hacia la zona donde entra el gas y se devuelve al seno de la suspensión (Figura 28).

Para que los reactores se encuentren completamente verticales y además tener la posibilidad de maniobrar varios reactores a la vez de manera segura, en el diseño de equipo se utilizó una gradilla especialmente diseñada para el equipo (Figura 29), con la cual se

pueden usar hasta 12 reactores de manera simultánea.



*Figura 29 Esquema en tercera dimensión de la gradilla para colocar los reactores.*

Los reactores se elaboraron en el taller de vidrio de la facultad de química, mientras que la construcción de la gradilla se hizo en un taller especializado en la construcción de equipos de acrílico. Este material es resistente al agua y es de bajo costo.

En la Figura 31 se observan los reactores colocados en la gradilla. El sistema se coloca dentro de un baño de agua con control de temperatura.

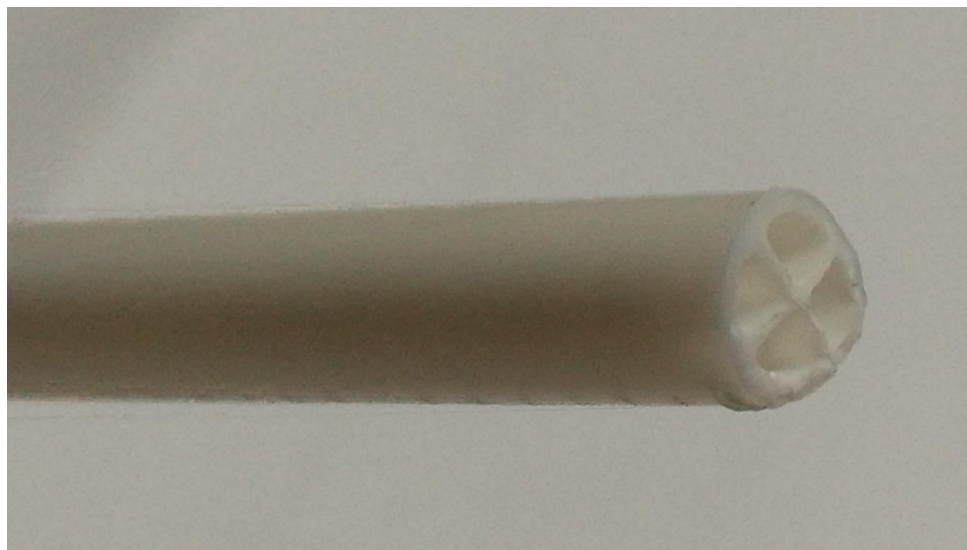


*Figura 30 Tubo de inyección de gas dentro del reactor.*

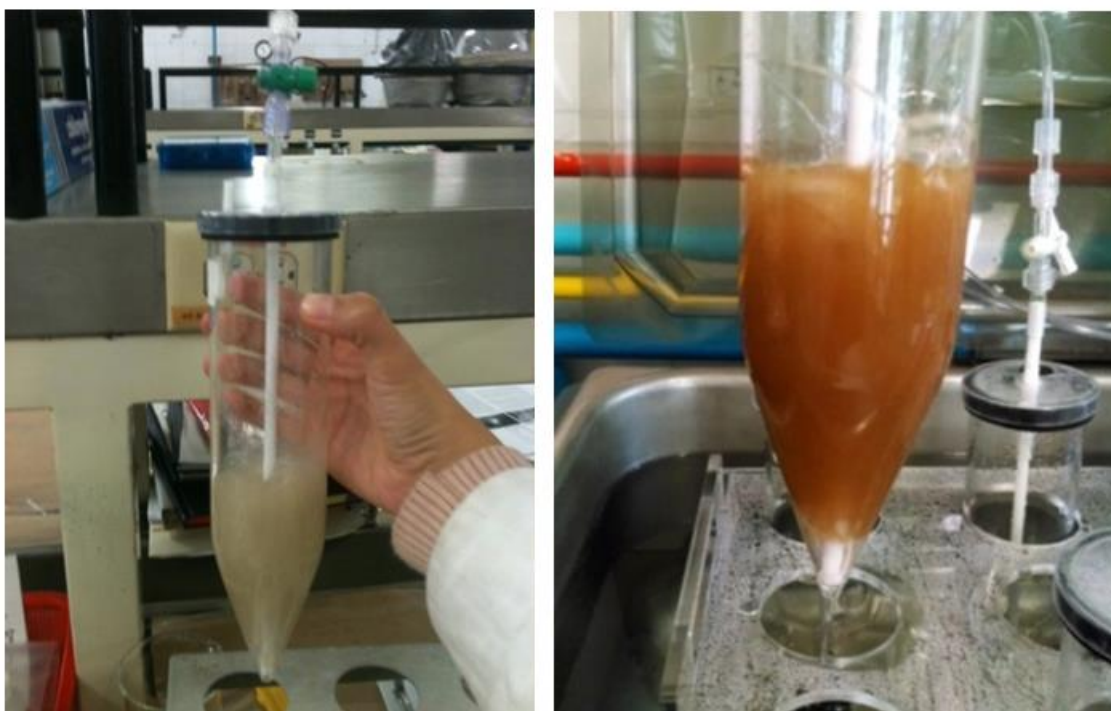


*Figura 31 Presentación de los reactores en la gradilla de trabajo.*

Para el sistema de inyección se utilizan tubos de polipropileno (PP) formado por extrusión. La característica de este tubo es que el material es muy usado en la industria alimentaria, con lo cual la interacción con la suspensión es prácticamente nula, además de que es de fácil reemplazo en caso de algún daño o desgaste. Una característica importante del tubo usado es que la parte interna del tubo está dividida en 4 secciones a lo largo del tubo (Figura 32) con lo cual el flujo de gas hacia la suspensión es el mismo en todos los puntos, evitando la acumulación de sedimentos en el fondo del reactor y alrededor del tubo de inyección (Figura 33).



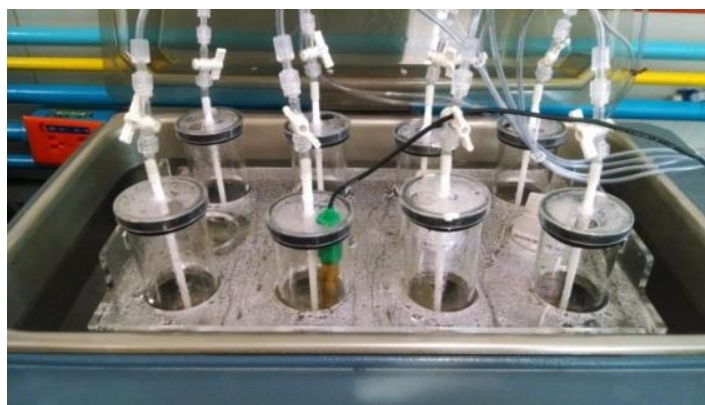
*Figura 32 Tubo de inyección de gas.*



*Figura 33 Agitación homogénea y con suspensión total dentro del RSGB.*

Para garantizar una agitación total y homogénea, el flujo del gas debe ser ascendente y alrededor del tubo de inyección, por lo que el tubo deberá estar completamente vertical, debido a que una inclinación del tubo originaría que el gas fluya de manera irregular hacia la superficie. Por ello es por lo que el diseño del

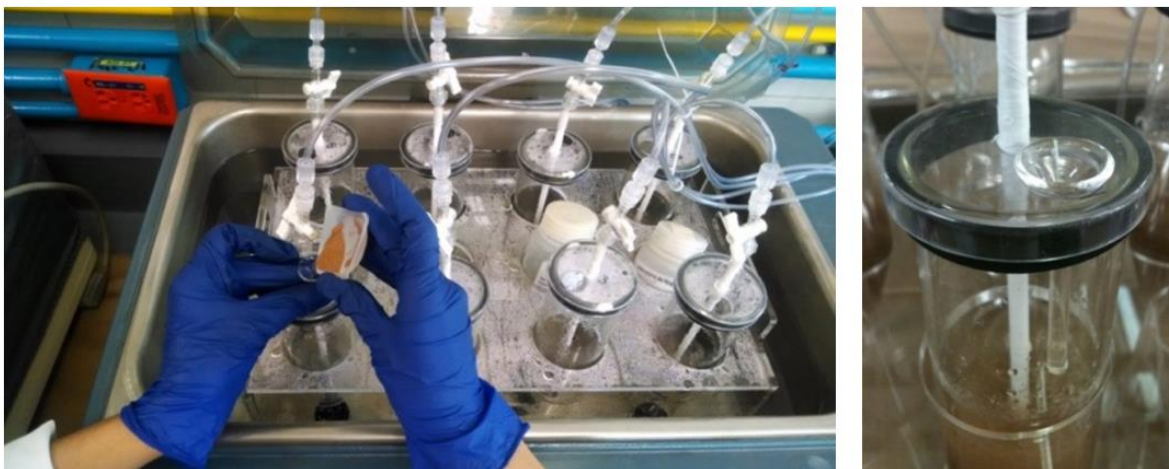
reactor incluye la colocación de una tapa que, además de mantener la vertical del tubo, disminuye la posibilidad de contaminación entre los reactores.



*Figura 34 Medición del pH a través del orificio de monitoreo.*

El diseño de la tapa del reactor incluye un orificio que permite el escape del gas de agitación, el monitoreo, control y ajuste del pH mediante el uso de un electrodo (Figura 34), así como la introducción de la muestra al sistema, la toma de muestras de manera homogénea y el poder agregar los reactivos necesarios para el cambio de fase gástrica a intestinal sin la necesidad de detener el experimento (Figura 35).

Para facilitar la colocación de las muestras dentro de cada reactor y también evitar pérdidas de material durante el proceso, es que se implementó el uso de pequeños embudos, también contruidos en el taller de vidrio de la Facultad de Química.



*Figura 35 A la izquierda, introducción de reactivos a través del orificio de monitoreo; a la derecha, embudos usados para poder introducir la muestra a los reactores.*

Con la finalidad de garantizar que el flujo de gas sea el mismo en cada reactor y así tener la seguridad de que la agitación sea la misma en todos los sistemas, se propone el uso de válvulas calibradas para que sólo permitan el paso de 1 litro por minuto de gas (Figura 36), mismas que están conectadas a un humidificador, con el cual se humedece el gas, evitando con ello pérdidas de líquido dentro del reactor causadas por el arrastre de humedad.



*Figura 36 Control de flujo de gas en los reactores.*

Se usan guías para suero con la finalidad de transportar el gas desde el humidificador hasta las válvulas de control de flujo, fabricadas en PVC traslucido.

Finalmente, en la Figura 37, se presenta el diseño del Reactor de Simulación Gastrointestinal en funcionamiento, donde se pueden ver 8 reactores en la gradilla, todos conectados a un sistema que les suministra el gas de agitación. A la derecha se observa el potenciómetro con el cual se ajusta y monitorea el pH de los reactores.



*Figura 37 Diseño del RSGB en operación.*

### 3.5.2 Pruebas de desempeño

#### *Agitación*

Para poder comparar el comportamiento del equipo propuesto con el resto de los existentes, que fueron evaluados y cuyos resultados se presentaron en anteriores secciones, se realizó la extracción de arsénico en la fracción gástrica en todos los equipos utilizando las mismas condiciones:  $\text{pH}=1.5\pm 0.3$ , una hora de agitación, temperatura de aproximadamente  $37^{\circ}\text{C}$  y realizando el filtrado por membrana  $0.45\ \mu\text{m}$  de poro. La determinación de arsénico se llevó a cabo mediante ICP-OES. Los resultados se presentan en el cuadro 5:

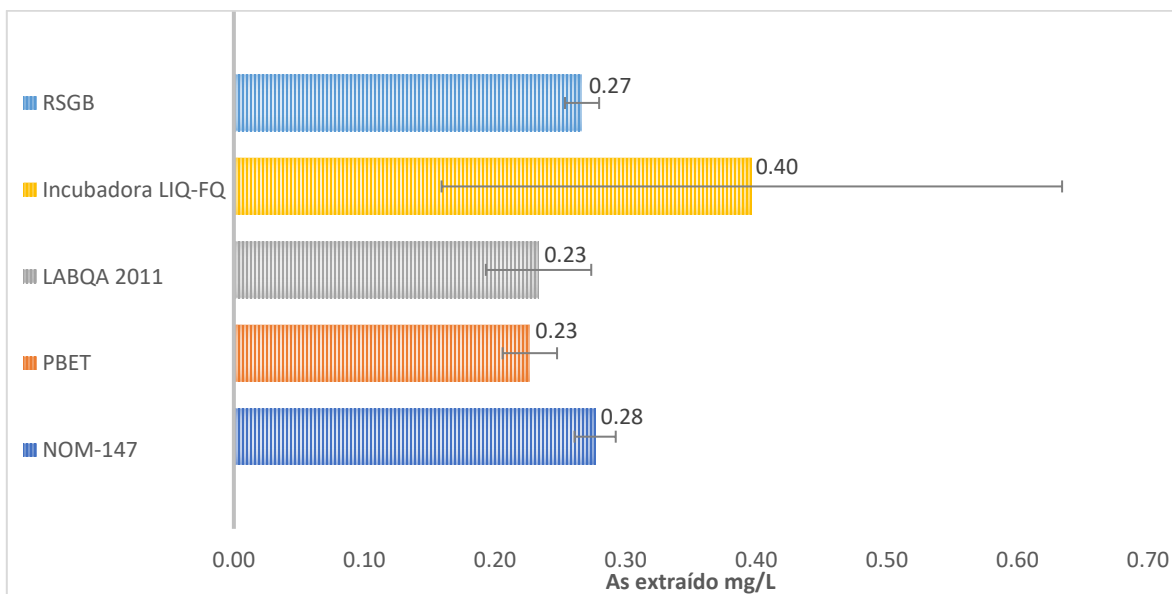


## Resultados y discusión

*Cuadro 5 Comparación del arsénico extraído para una misma muestra en los diferentes métodos de agitación probados.*

Equipo	Tipo de agitación	Muestra	As (mg/L)			%C.V.
RSGB	gas	015-14	0.28	0.25	0.27	5.7
Incubadora LIQ-FQ	orbital	015-14	0.28	0.67	0.24	59.9
LABQA 2011	magnética y gas	015-14	0.19	0.24	0.27	17.3
PBET	gas	015-14	0.22	0.25	0.21	9.2
NOM-147	axial	015-14	0.26	0.28	0.29	5.5

Los resultados (Figura 38), indican que el coeficiente de variación de los resultados obtenidos con el diseño del RSGB es similar a los del equipo de la NOM-147, y considerando que el equipo de la NOM-147 es el que cuenta con mayor aprobación de agencias de protección ambiental, con la ventaja que este nuevo equipo permite incluir la fracción intestinal.



*Figura 38 Extracción de As durante las pruebas de agitación, muestra 015-14..*

### *Continuidad de las pruebas*

Una gran virtud del RSGB es la practicidad para desarrollar las pruebas, ya que cada uno de los reactores operan de manera independiente y continua, esto

último se logra teniendo un reactor abierto mediante un puerto de monitoreo, el cual tiene la función de liberar la presión del gas de agitación, así como el permitir monitorear el pH mediante el uso del electrodo, además, con el puerto de monitoreo es posible adicionar todos los reactivos para el experimento, esto sin la necesidad de detener la prueba.

### *Repetibilidad y reproducibilidad del método*

El procedimiento utilizado para llevar a cabo las pruebas de extracción de la fracción bioaccesible en la fase gástrica usando RSGB consistió en colocar dentro de los reactores 100 mL de solución extractora<sup>24</sup>, para después colocar la tapa, en la cual ya debe estar fijo el tubo de suministro de gas. El reactor se colocó en su posición dentro de la gradilla, con la precaución de que quedará correctamente colocado sobre su vertical. Se pasó al baño de agua (temperatura de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). La temperatura se midió en forma continua con un termómetro. Posteriormente a alcanzar la temperatura antes indicada se inició la agitación con argón<sup>25</sup> y se agregó el ácido clorhídrico para alcanzar un pH de  $1.5\pm 0.3$ . Cuando todas las condiciones fueron las preestablecidas, se agregó el suelo dentro del reactor, manteniendo la agitación durante una hora. Pasado este lapso se midió el valor del pH para asegurar que no hubiera variaciones importantes y se toma una porción para realizar el análisis del As en la fase gástrica (aproximadamente 15 mL), utilizando una cánula y una jeringa (Figura 39).

---

<sup>24</sup> La solución extractora es una mezcla preparada previamente y está compuesta por 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 500 en 990 mL de agua tipo I (García Rodríguez T. , 2017) (García Rodríguez T. , 2013).

<sup>25</sup> Las pruebas de la influencia del gas, así como de las sustancias orgánicas sobre la bioaccesibilidad se encuentran detalladas en el trabajo de García Rodríguez T., (2017).



*Figura 39 Toma de muestra en el RSGB*

Terminada la toma de la fase gástrica, sin necesidad de detener la agitación en los reactores, se ajusta el pH de la solución a  $7.0 \pm 0.3$  usando una solución saturada de bicarbonato de sodio, tras lo cual se añade la solución intestinal, la cual está preparada con sales biliares y pancreatina. La agitación de la solución se mantiene durante 3 horas, conservando en todo momento la temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  y, de ser necesario, ajustando el pH dentro de cada reactor. Cabe mencionar que el uso de las sustancias orgánicas puede provocar la generación de espuma dentro de los reactores, por lo cual se adiciona algún agente antiespumante, en este caso se usó 1-decanol, tanto como fuese necesario para evitar la presencia de espuma dentro del reactor.

Transcurrido el tiempo de agitación se procedió a la toma de muestra para la fase intestinal, en forma similar a lo que se llevó a cabo en la fase gástrica.

Cada muestra tomada durante el análisis se filtró utilizando membranas de  $0.45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. El procedimiento del pretratamiento de la muestra filtrada para la determinación del EPT deseado será según el método de análisis a usar, debido a que el análisis mediante ICP-OES requiere que a los filtrados obtenidos les sea realizada una digestión ácida a fin de eliminar la materia orgánica proveniente de los reactivos usados, mientras que el análisis con el equipo de absorción atómica no requiere ningún pretratamiento del filtrado obtenido. Al procedimiento anterior se le denomina método de extracción RSGB. Por lo tanto, fue con este método que se realizó la prueba de As para determinar repetibilidad del RSGB.

## Resultados y discusión

En primer término, se analizaron las muestras compuestas, en la porción correspondiente a la fase gástrica. La concentración total de arsénico es de 10,648 mg/kg y 480 mg/kg de arsénico geodisponible. Se llevaron a cabo 8 repeticiones al día durante tres días (Cuadro 6).

*Cuadro 6 Fracción bioaccesible de arsénico en la muestra compuesta 4.*

Reactor	As (mg/L)		
	Día A	Día B	Día C
1	41.0	40.0	41.0
2	42.4	40.7	42.1
3	40.5	40.9	40.9
4	42.0	40.7	41.9
5	41.0	40.6	40.3
6	44.1	41.1	42.5
7	43.2	40.4	40.2
8	43.0	42.4	43.8
<b>Promedio</b>	<b>42.2</b>	<b>40.9</b>	<b>41.6</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>1.3</b>	<b>0.7</b>	<b>1.2</b>
<b>% C.V.</b>	<b>3.0</b>	<b>1.7</b>	<b>2.9</b>

El cálculo del coeficiente de varianza en cada día indicó que el método es repetible, ya que en ninguno de los valores es mayor al 20%<sup>26</sup>. A su vez, el que los valores del coeficiente de varianza son similares entre sí, lo mismo que los promedios de las concentraciones bioaccesibles. Se concluye que el método de extracción RSGB en la fase gástrica utilizando el equipo diseñado, es reproducible.

<sup>26</sup> El criterio de aceptación para muestras ambientales, de acuerdo con el LABQA, es un coeficiente de variación menor al 20% (García Rodríguez T. , 2017)

*Comparación con método NOM-147*

Para determinar la eficiencia del método propuesto con el propuesto dentro de la normatividad mexicana, se realizaron pruebas de extracción de la fracción de arsénico bioaccesible utilizando ambos métodos con muestras de suelo de referencia Montana 2711a, Montana soil 2710 y con muestras compuestas previamente caracterizadas. Los resultados se presentan en el Cuadro 7.

*Cuadro 7 Comparativa de la fracción bioaccesible para la fase gástrica obtenida entre los métodos NOM-147 y RSGB.*

Muestra	As total	NOM-147		RSGB	
		mg/kg	%	mg/kg	%
Montana soil 2711a	107	101	94.4	64	59.8
Compuesta 3	32490	12283	37.8	11655	35.9
Compuesta 4	10648	3816	35.8	4004	37.6
Compuesta 5	4964	3000	60.4	2735	55.1
Montana soil 2710	626	384	61.3	290	46.3

Los resultados indican que con el método NOM-147 se obtienen concentraciones más altas de arsénico bioaccesible, lo cual se debe a que su sistema de agitación reduce el tamaño de las partículas aumentando artificialmente la superficie de contacto.

*Comparación con pruebas interlaboratorios*

El uso del material de referencia Montana soil 2710 es de especial relevancia para demostrar la viabilidad del método RSGB debido a que ese estándar es el usado en ensayos *in vivo*, con diferentes especies animales. Uno de estos ensayos fue liderado por la Unidad de Servicios Analíticos (ASU) de la Queen's University en Ontario, Canadá, donde participaron 17 laboratorios de prueba, realizando la extracción de la fracción bioaccesible en el material de referencia Montana soil 2710 (Koch, y otros, 2013).

## Resultados y discusión

*Cuadro 8 Comparativa de resultados obtenidos por la ASU y el LABQA para bioaccesibilidad del NIST Montana 2710.*

Laboratorio	Fase	As <sub>bioaccesible</sub>	%As <sub>Extraído</sub>
<b>Central</b>	Gástrica	263	42
	Intestinal	194	31
<b>Independientes</b>	Gástrica	280	45
	Intestinal	206	33
<b>NOM-147</b>	Gástrica	384	61
	Intestinal	--	--
<b>LABQA (RSGB)</b>	Gástrica	290	<b>46</b>
	Intestinal	144	<b>23</b>

Además de los resultados de bioaccesibilidad (Cuadro 8), el estudio de Koch también reporta los resultados de la extracción de la fracción bioaccesible de arsénico (Cuadro 9), obtenidos a partir de pruebas con cerdos (INERIS, 2009) y ratones (Bradham, y otros, 2011).

*Cuadro 9 Biodisponibilidad de arsénico para NIST 2710.*

Referencia:	INERIS (2009)	Bradham (2011)
Animal de prueba:	cerdos	ratones
matriz:	orina	orina
Intervalo en mg/kg	288-326	232-313
Intervalo en %	46-52	37-50

Al comparar los datos de bioaccesibilidad obtenidos experimentalmente por el método RSGB con los obtenidos por la NOM-147, los del laboratorio central (responsable del estudio de ASU) y el de los laboratorios independientes se observa que el método RSGB obtiene valores de bioaccesibilidad más cercanos que los obtenidos con el método NOM-147 para la fase gástrica. Con respecto a lo obtenido en la fase intestinal, los resultados del RSGB son cercanos a los reportados por la

ASU, aunque la diferencia es mayor que en el caso del As extraído en la fase gástrica.

### *Desempeño en pruebas de rutina en casos reales*

Dado que uno de los objetivos de desarrollar un nuevo equipo (RSGB), es que permita realizar un mayor número de análisis en un menor tiempo y que se puedan llevar a cabo las dos primeras fases del sistema gastrointestinal (estómago e intestino delgado), se probaron la capacidad de carga y confiabilidad del equipo. Se analizaron 83 muestras de suelo procedentes de sitios contaminados en el norte de México.

El análisis involucra un control de calidad en el que se incluye un 20% de muestras duplicadas, blancos, blancos adicionados y material de referencia, lo que da como resultado cerca de 150 experimentos, esto bajo la consideración de que el diseño del RSGB permite tener 12 reactores funcionando al mismo tiempo, de esos 12 lugares 4 quedan asignados para los controles analíticos, dando como resultado 13 lotes de trabajo para extraer la fracción bioaccesible en todas las muestras. En total, el tiempo necesario para hacer la extracción de la fracción bioaccesible fue de 14 días laborales, requiriendo el apoyo de 3 técnicos. Mayores datos se pueden consultar en García-Rodríguez T, 2017.

Posterior a la obtención de la fracción bioaccesible se realizó el análisis de los extractos para determinar la concentración de arsénico presente en los mismos. La desviación porcentual relativa (DPR) de las determinaciones de As bioaccesible (Cuadro 10) es el permitido por el sistema de calidad del LABQA y que corresponde a los intervalos permitidos en la mayor parte de los laboratorios internacionales.

## Resultados y discusión

*Cuadro 10 Desviación porcentual relativa (DPR) en las muestras duplicadas.*

Técnica Analítica	Clave de muestra	DPR As bioaccesible	
		Fase gástrica	Fase intestinal
ICP-OES	084-15	6.9	N.A.
	083-15	4.8	13.2
	113-15	6.0	5.5
	033-15	0.9	10.5
	077-15	0.5	19.6
	041-15	2.7	0.9
	814-15	12.8	10.2
	528-15	2.8	1.1
	831-15	4.5	N.A.
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	8.0
	026-16	1.2	10.4
	034-16	16.5	6.5
	037-16	8.2	19.1
	042-16	4.0	18.1
	045-16	1.0	8.5
	050-16	6.3	N.A.
	067-16	16.1	N.A.

*\*N.A. No aplica, debido a que, la concentración de arsénico bioaccesible es menor al límite de detección del equipo*

El Cuadro 10 muestra el valor de la DPR para todos los duplicados del análisis, y el intervalo de valores obtenidos muestra que al menos 5 muestras en la fase gástrica tienen un valor de DPR relativamente alto y solamente una supera el 20% que es el valor máximo permisible para considerar que es una determinación repetible. El caso de la fase intestinal, ninguna de las muestras incumple el control de DPR.



### 3.6 Propuesta de mejoras

Con la finalidad de obtener una mejor calidad en los resultados, y con base en las observaciones detectadas durante la operación del equipo, se proponen las siguientes adecuaciones al diseño del reactor (Figura 40):

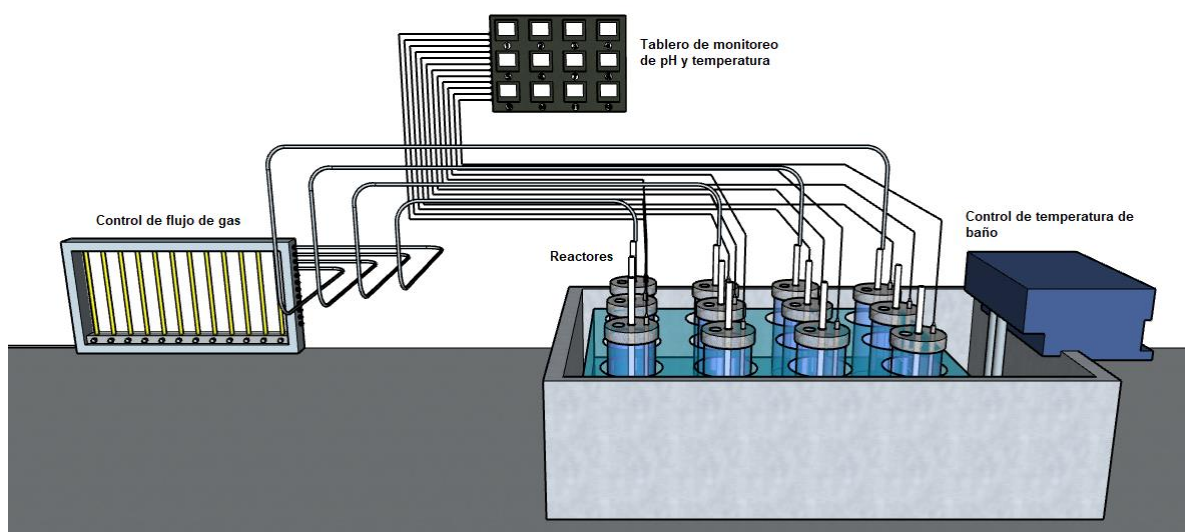


Figura 40 Esquema de las mejoras propuestas al RSGB.

- I. **Colocar flujómetros independientes para cada línea.** La finalidad de esta mejora es tener un mejor control del flujo que llega a cada reactor, así como el de tener la posibilidad de hacer estudios para medir la influencia del flujo de gas en los resultados de bioaccesibilidad.
- II. **Instalar un sistema de monitoreo del pH y temperatura para cada reactor.** Esta idea se debe a la importancia de mantener un monitoreo constante de las condiciones del pH dentro de cada reactor, debido a que, durante la extracción, el efecto amortiguador de las muestras causa variaciones en el pH de la suspensión, y dado que solo se cuenta con un electrodo para el monitoreo del pH, llegan a presentarse situaciones en las que el pH de algún reactor sobrepasa el intervalo propuesto. Otra situación por la que se propone un sistema de monitoreo independiente es para evitar una posible contaminación cruzada debido a una mala limpieza del electrodo durante el monitoreo del pH.

### III. **Mejorar el sistema de inyección de gas, así como el de cierre del reactor.**

Los tubos utilizados para inyectar el gas en la solución son desechables y de fácil reemplazo, esto con la finalidad de evitar problemas de contaminación derivados de un mal lavado, así como para facilitar su reemplazo en caso de daño del tubo. El problema radica en que el tubo debe estar bien fijo a la tapa del reactor para evitar que la fuerza del gas inyectado mueva el tubo de inyección. A su vez, la tapa debe estar perfectamente colocada, pero se presentaron problemas de operación en los que el cierre del reactor no era el correcto debido a que el empaque utilizado en la tapa se movía de su sitio, causando un mal cierre. Se sugiere una modificación en el sistema donde el cierre del reactor sea mediante una tapa roscada, lo que implica una modificación en el cuerpo del reactor. Para el caso de los tubos, la opción es colocar empaques de teflón o de silicón.

## 4 Análisis de resultados

A diferencia de los equipos existentes que fueron seleccionados y evaluados (Physiologically based extraction test (PBET), Simplified Bioaccessibility Extraction Test (SBET), PBET modificado, RIVM, IVG y DIN) el equipo diseñado (RSGB) evita la erosión de las partículas de suelo, y la agitación por medio de gas presenta una junto con el PBET los mejores niveles de homogeneidad de la suspensión durante el proceso de agitación. Asimismo, su diseño permite introducir reactivos y sacar muestras sin detener el proceso, y llevar a cabo la extracción en las dos fases del sistema gastrointestinal.

Por otra parte, el diseño del Reactor de Simulación Gastrointestinal para Bioaccesibilidad (RSGB) disminuye los errores sistemáticos observados en los otros sistemas probados, mismos que derivan de un bajo control del pH y de la agitación. Además, el contar con un puerto de monitoreo permite adicionar los diferentes reactivos y controlar las condiciones de operación dentro de cada reactor.

Los reactores de vidrio son transparentes, eliminan fenómenos de adsorción y erosión de los mismos, no presentan deformaciones con la temperatura y se pueden fabricar en talleres de vidrio locales. Otra ventaja importante del RSGB es que permite procesar la misma cantidad de muestras que el equipo señalado en la NOM-147 y es fácilmente escalable para satisfacer las necesidades analíticas. Además, este equipo reduce los requerimientos de personal y del tiempo necesario para llevar a cabo los análisis.

En cuanto a las pruebas de desempeño para la fase gástrica, el RSGB tiene una repetibilidad superior a la de los equipos de las pruebas PBET, LABQA-2011, IVG y RIVM, aunque fue similar a la del equipo NOM-147. En cuanto a la fase intestinal, se requiere realizar más estudios y pruebas, especialmente porque no existe algún método validado que simule esta fase.

Mediante el uso del RSGB se obtuvieron resultados de la fracción bioaccesible de arsénico similares a los reportados por 17 diferentes grupos de investigación, todos usando el mismo material de referencia, especialmente para la fase gástrica (Figura 41). Una parte de los experimentos realizados por los 17 grupos de investigación, fueron pruebas *in vivo*, lo cual permite suponer que con el diseño propuesto se obtienen valores de bioaccesibilidad cercanos a los obtenidos mediante pruebas *in vivo*.

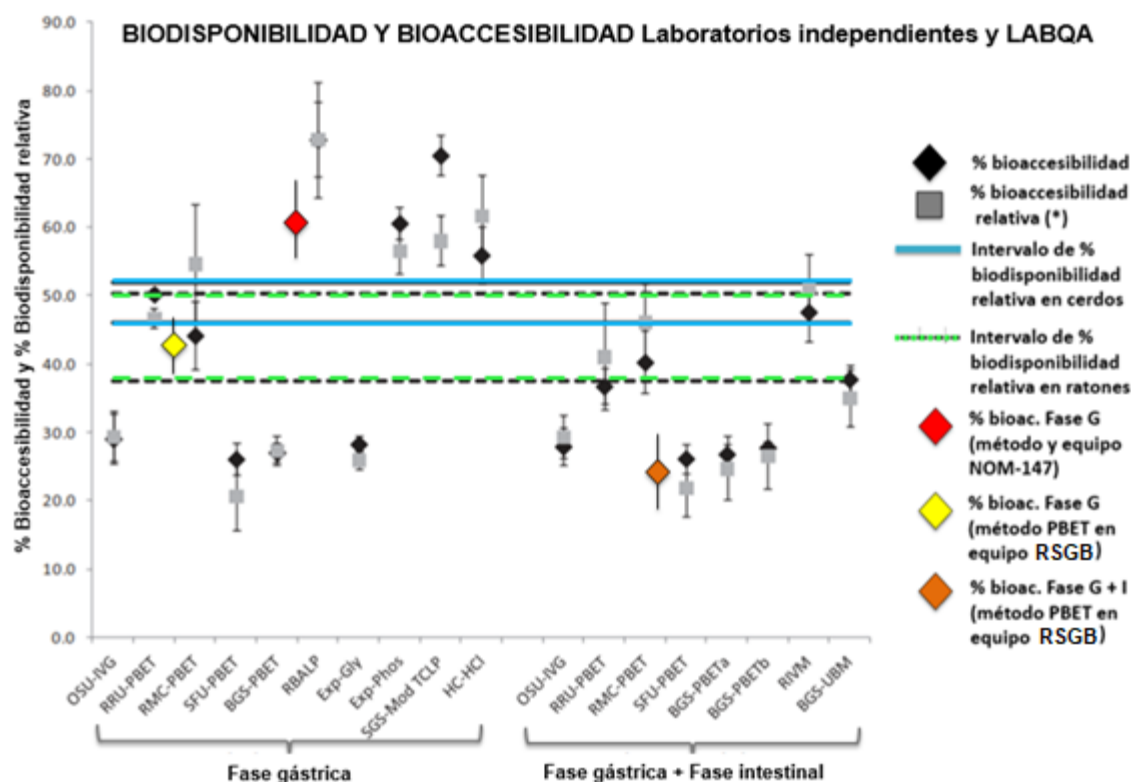


Figura 41 Porcentajes de As biodisponible y As bioaccesible, determinado en el suelo estándar NIST Montana 2710, cuantificado por los laboratorios independientes que participaron con el Laboratorio Central de la Unidad de servicios analíticos de la Queen's University Canadá por una serie de métodos diferentes de bioaccesibilidad (imagen modificada de Koch et al., 2013).

Realizando pruebas adicionales, el equipo RSGB podría ser utilizado para determinar la bioaccesibilidad de otros EPT, además de que es posible adaptarlo a otras matrices, como podría ser el caso de alimentos o juguetes.

Es posible utilizar el RSGB para análisis a nivel comercial, analizando gran cantidad de muestras, cumpliendo con los controles analíticos (blancos, material de referencia y réplicas).

Una de las principales ventajas del RSGB es que el costo de fabricación es considerablemente más bajo respecto a los equipos propuestos en los otros métodos; para el método RSGB se invirtieron cerca de \$4,500 m.n. en los reactores, la gradilla y el humidificador, aunque esta cantidad no incluye el costo de la tina de calentamiento ni el de los tanques de argón. Si se consideran las propuestas de mejora al equipo, la inversión requerida será de aproximadamente \$80,000 m.n., esto debido al costo de los flujómetros (aproximadamente \$2,000 m.n. cada uno) y de los electrodos (\$1,500 m.n. por unidad). Para disminuir costos, se sugiere involucrar a estudiantes de química para la construcción de electrodos miniatura, además de considerar la participación de alumnos de ingeniería eléctrica o mecatrónica que puedan construir una consola de control y monitoreo de las condiciones internas de los reactores.

Es, por lo tanto, muy recomendable continuar realizando experimentos para lograr la automatización del equipo y, en consecuencia, incrementar la reproducibilidad de los resultados y la facilidad de uso del equipo. Estos nuevos estudios deben de llevarse a cabo, como fue el caso de esta investigación, en colaboración con especialistas en química de suelos.

Finalmente, a pesar de ser un diseño sumamente sencillo, durante la investigación documental no se encontró algún equipo o patente similares al Reactor de Simulación Gastrointestinal para Bioaccesibilidad, por lo que se ha establecido contacto con el área de Transferencia Tecnológica y Propiedad Intelectual de la Coordinación de Innovación y Desarrollo de la UNAM para evaluar la factibilidad de obtener una patente derivada del presente proyecto.

## 5 Conclusiones

- ✓ Se logró diseñar y construir el prototipo de reactor con el cual es posible obtener la fracción bioaccesible de metales y elementos potencialmente tóxicos en matrices sólidas.
- ✓ Al comparar el resultado de la fracción bioaccesible extraída en muestras control, así como la repetibilidad, precisión y reproducibilidad se obtuvo que el RSGB mejora notablemente con respecto a los equipos preexistentes, aunque similares a lo obtenido mediante el uso del equipo de la NOM-147.
- ✓ El uso y manejo del RSGB lo hacen un equipo capaz de realizar análisis de servicio, es decir, permite realizar el análisis de muchas muestras a la vez y en poco tiempo: se pueden analizar la fracción bioaccesible en la fase gástrica e intestinal de 12 muestras en 5 horas, siempre obteniendo valores confiables y precisos.
- ✓ El diseño actual del RSGB lo hace un equipo sencillo de usar y de fácil operación. Se espera que, con las propuestas de mejora planteadas, sea posible que sólo una persona pueda realizar la extracción de la fracción bioaccesible usando el RSGB, lo cual conlleva una reducción en los gastos operativos.
- ✓ La construcción del diseño actual del RSGB requiere una inversión aproximada de \$30,000 m.n., donde el mayor costo se debe al potenciómetro y al control de temperatura; las mejoras propuestas implican que la inversión requerida sea de al menos \$80,000 m.n., lo cual es mucho menor al costo del equipo de la NOM-147, aproximadamente \$200,000 m.n., por lo que el diseño propuesto es económicamente viable.

## 6. Bibliografía

- ASTM. (D 1193-99). *Standard Specification for Reagent Water*. West Conshohocken, PA: American Society for Testing and Materials.
- BARC. (2011). *Round robin experiment: variability of bioaccessibility results using seventeen different methods on a standard reference material (NIST 2710)*.
- Bradham, K. D., Scheckel, K. G., Nelson, C. M., Seales, P. E., Lee, G. E., Hughes, M. F., . . . Thomas, D. J. (2011). Relative bioavailability and bioaccessibility and speciation of arsenic in contaminated soils. *Environmental Health Perspectives*(119), 1629-1644.
- Caboche, J. (28 de septiembre de 2009). Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité. Application à 4 éléments traces métalliques dans les sols: As, Cd, Pb et Sb. *Tesis Doctoral*.
- Calabrese, E., Stanek, E. J., Gilbert, C. E., & Barnes, R. M. (1990). Preliminary adult soil ingestion estimates: results of a pilot study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 12, 88-95.
- CENAM, & 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.
- Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M. (2012). *Bioavailability and Bioaccessibility of Pollutants in Contaminated Soils: State of Present Knowledge and Research Avenues*. Record.
- Davis, S., Waller, P., Buschbom, R., Ballou, J., & White, P. (1990). Quantitative estimates of soil ingestion in normal children between the ages of 2 and 7 years: population-based estimates using aluminum, silicon, and titanium as soil tracer elements. *Archives of Environmental Health*, 45(2), 112-22.

- Dodds, J. W. (1982). The pig model for biomedical research. *Fed. Proc.*, 41, 247-256.
- Drexler, J. W., & Brattin, W. J. (2007). An In Vitro Procedure for Estimation of Lead Relative Bioavailability: With Validation. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 13(2), 383-401.
- EPA. (2017). *Standar Operating Procedure for an In Vitro Bioaccessibility Assay for Lead and Arsenic in Soil*.
- EPA Office of Health and Environmental Assessment. (1990). *Exposure factors handbook*. Washington, DC: Environmental Protection Agency.
- García Rodríguez, T. (2013). Estudio de la bioaccesibilidad de As, Cd y Pb en suelos impactados con residuos mineros. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Química, UNAM.
- García Rodríguez, T. (2017). Estudio de los factores que influyen en la precisión de la prueba de bioaccesibilidad de arsénico en suelos contaminados. *Tesis de Maestría*. Posgrado en Ciencias de la Tierra, UNAM.
- García, B. M., Colom, V. M., & Jaramillo, S. J. (2003). *Manuel del auxiliar de laboratorio*. Sevilla, España: MAD, S.L.
- Gutiérrez-Ruiz, M., Romero, F. M., & González-Hernández, G. (2007). Suelos y sedimentos afectados por la dispersión de jales inactivos de sulfuros metálicos en la zona minera de Santa Bárbara, Chihuahua, México. *Rev. mex. cienc. geol*, 24(2).
- Harnby, N., Edwards, M., & Nienow, A. W. (1992). *Mixing in the Process Industries* (2 ed.). Oxford: Butterworth-Heinemann.
- INERIS. (2009). *Biodisponibilité et spéciation: bilan sur les modèles BLM*.
- INERIS. (2010). *UBM procedure for the measurement of inorganic contaminant bioaccessibility from solid matrices*.



- InVS, INERIS, BRGM, ICF. (2009). *Ingestion de sol: état des connaissances et propositions.*
- ISO 11074:2015. (s.f.). *Soil quality - Vocabulary (ISO 11074:2015).*
- ISO 17402:2008. (s.f.). *Soil quality -- Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials.*
- ISO/TS 17924:2007. (s.f.). *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.*
- Kleijntjens, R. H., van der Lans, R., & Luyben, K. (Junio de 1994). Particle Suspension Hydrodynamics in a Tapered Gas Agitated Reactor. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 72, 392-404.
- Koch, I., Reimer, J. K., Bakker, I. M., Basta, T. N., Cave, R. M., Denys, S., . . . Zagury, J. G. (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
- Laird, B. D., Van De Wiele, T. R., Corriveau, M. C., Jamieson, H. E., Parsons, M. B., Verstraete, W., & Siciliano, S. D. (2007). Gastrointestinal microbes increase arsenic bioaccessibility of ingested mine tailings using the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *Environmental Science Technology*, 41(16), 5542-5547.
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (segunda ed.).

- McCauley, A., Jones, C., & Olson-Rutz, K. (2017). Soil pH and Organic Matter. *Nutrient Management*, 4449-8.
- Miller, D. D., Schrickler, B. R., Rasmussen, R. R., & Van Campen, D. (1981). An in Vitro Method for Estimation of Iron Availability from Meals. *Am J. Clin Nutr*(34), 2248-2256.
- Ng, J., Juhasz, A., Smith, E., & Naidu, R. (2010). *Contaminant bioavailability and bioaccessibility, Part 1: A scientific and technical review CRC CARE Technical Report no. 14, CRC for Contamination Assessment and Remediation*. Adelaide, Australia.
- Nienow, A. W. (1968). Suspension of Solid Particles in Turbine Agitated Baffled Vessels. *Chem. Eng. Sci.*(23), 1453-1459.
- NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. (s.f.). *Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos conntaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio*. Obtenido de [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-semarnat\\_ssa1-2004.pdf](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-semarnat_ssa1-2004.pdf)
- NOM-157-SEMARNAT-2009. (s.f.). Que establece los elementos y procedimientos para instrumentar planes de manejo de residuos mineros.
- Oomen, A. G., Rompelberg, C. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. G., Pereboom, D., & Sips, A. (2003). Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(3), 281-7.
- Oomen, A., Brandon, E., Swartjes, F. A., & Sips, A. (2006). *How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated soils? Implementation and scientific basis*.

- Pamuk, E., Makuc, D., Heck, K., Reuben, C., & Lochner, K. (1998). *Socioeconomic Status and Health Chartbook. Health United States 1998*. Hyattsville, Maryland: U.S Department of health and human services.
- Robinson, L. E., & Reeves, S. (2013). A Dried Yeast Fermentate Selectively Modulates both the Luminal and Mucosal Gut Microbiota and Protects against Inflammation, As Studied in an Integrated in Vitro Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Rodríguez, R. R., Basta, N. T., Casteel, S. W., & Pace, L. W. (1999). An In Vitro Gastrointestinal Method To Estimate Bioavailable Arsenic in Contaminated Soils and Solid Media. *Environmental Science & Technology*, 33, 642-649.
- Rousell, H., Waterlot, C., Pelfrêne, A., Pruvot, C., Mazzuca, M., & Douay, F. (2010). Cd, Pb and Zn oral bioaccessibility of urban soils contaminated in the past by atmospheric emissions from two lead and zinc smelters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 54(4), 945-54.
- Ruby, M. V., Davis, A., Kempton, J. H., Drexler, J. W., & Bergstrom, P. D. (1992). Lead Bioavailability: Dissolution Kinetics under Simulated Gastric Conditions. *Environ. Sci. Technol*, 26(6), 1242-1248.
- Ruby, M. V., Davis, A., Link, T. E., Schoof, R., Chaney, R. L., Freeman, G. B., & Bergstrom, P. (1993). Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environ. Sci. Technol.*, 27(13), 2870–2877.
- Saikat, S., Barnes, B., & 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, R. A. (2003). *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*.

- Semple, K., Doick, K., Jones, K., Burauel, P., Craven, A., & Harms, H. (2004). Peer Reviewed: Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. *Environmental Science & Technology*, 38(12), 228A-231A.
- Sparks, D. L. (2005). Toxic Metals in the Environment: The Role of Surfaces. *Elements*, 1(4), 193-197.
- Sposito, G. (2008). *The chemistry of soils* (2 ed.). Oxford University Press.
- tno.nl*. (octubre de 2013). Recuperado el julio de 2017, de [https://www.tno.nl/media/4057/tim\\_gastrointestinal\\_systems.pdf](https://www.tno.nl/media/4057/tim_gastrointestinal_systems.pdf)
- U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1995). *Evaluación de riesgos en salud por la exposición a residuos peligrosos*. Atlanta, Georgia.
- Van Leeuwen, C., & Hermes, J. (1995). Terrestrial toxicity. In risk assessment of chemicals, an introduction. *Kluwer Academic: Dordrecht*, 211-216.
- Viguria Padilla, F., & Miján de la Torre, A. (2006). La pica: retrato de una entidad clínica poco conocida. *Nutr. Hosp.*, 21(5).

## 7. Apéndices

### A. Métodos para extracción de la fracción bioaccesible

#### A1. Método PBET

Uno de los primeros métodos fue el desarrollado en la Universidad de Colorado por Michael Ruby y colaboradores, que se enfocaba principalmente en la determinación de la bioaccesibilidad de arsénico y plomo. El diseño experimental del equipo fue publicado en 1993 (Ruby, y otros, 1993), donde se propone un método *in vitro* simulando el proceso de biodisponibilidad de plomo en el organismo, específicamente en lo que respecta a la fase gástrica y la fase intestinal; dicho experimento se conoce como método PBET (Physiologically Based Extraction Test). En 1996, Ruby y sus colaboradores proponen un diseño de equipo experimental para aplicar el método (Figura 42)

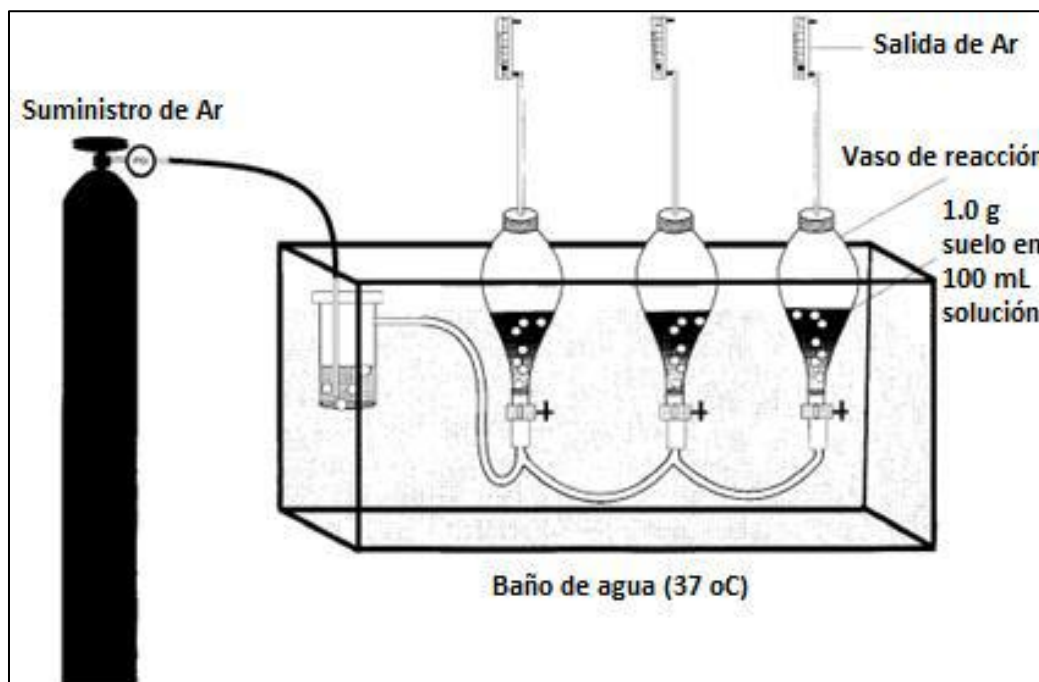


Figura 42 Diseño experimental del método PBET (imagen modificada de Ruby et al., 1996)

Posteriormente, el método *in vitro* para estimar la biodisponibilidad de plomo, aunque en algunas modificaciones posteriores se amplió su alcance para evaluar la biodisponibilidad de hierro en productos alimenticios y de metales en matrices sólidas (García Rodríguez T. , 2017).

El procedimiento (Figura 43) se lleva a cabo en un baño de agua a  $37\pm 2^\circ\text{C}$ , en un tren de reacción, utilizando inicialmente HCl para mantener un pH ácido para la fase gástrica y posteriormente, para la fase intestinal, se ajusta la solución a un pH neutro usando  $\text{NaHCO}_3$ . Además, durante la prueba se usan enzimas digestivas específicas: pepsina para la fase gástrica y enzimas pancreáticas y ácidos biliares para la fase intestinal. Las soluciones son mezcladas con el sustrato de prueba, para simular la función y condiciones químicas del tracto gastrointestinal. Durante el proceso de la prueba se colectan muestras en distintos puntos de cada fase, mismas que se analizan al final de la prueba.

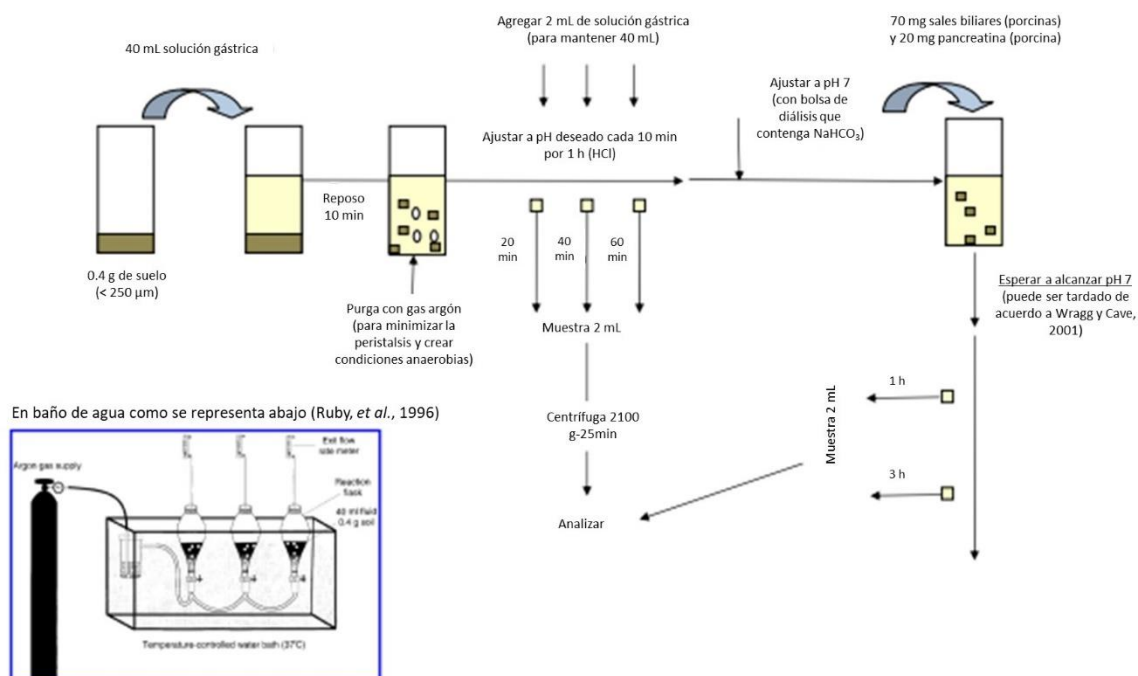


Figura 43 Representación esquemática del método PBET (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012)

Uno de los principales problemas al desarrollar este método, fue la selección de las concentraciones de enzimas digestivas, representativas en los humanos, ya que son altamente variables. Inicialmente, se fijaron los valores de pH 1.3 en el estómago y 7.0 en el intestino, condiciones identificadas en conejos Blancos de Nueva Zelanda. El proceso de mezclado en el recipiente se da utilizando gas argón, y fue diseñado para imitar los movimientos peristálticos del cuerpo humano. Para validar este modelo *in vitro* se realizó una comparación con experimentos *in vivo* de las cantidades de plomo disueltas en diferentes secciones del tracto gastrointestinal. Para establecer un escenario extremo, se dosificaron 2 gramos por cada kilogramo de peso del animal, ya que esta relación es representativa de la que podría ingerir un niño con síndrome de pica.

A pesar de existir diferencias anatómicas y funcionales entre la digestión de los conejos y de los seres humanos, como son la excreción biliar y el mecanismo de absorción de plomo durante el crecimiento, los factores comparables, como son el pH, el proceso de mezclado y el tiempo de tránsito gastrointestinal, corresponden a los principales factores que controlan la disolución de plomo. Por lo tanto, el uso de los conejos como sujetos experimentales, fue apropiado para evaluar la bioaccesibilidad de plomo en niños.

### A2. Método PBET modificado

Actualmente muchos laboratorios utilizan un equipo derivado del método PBET de Ruby (Figura 44), siendo sugerido por Drexler (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012).

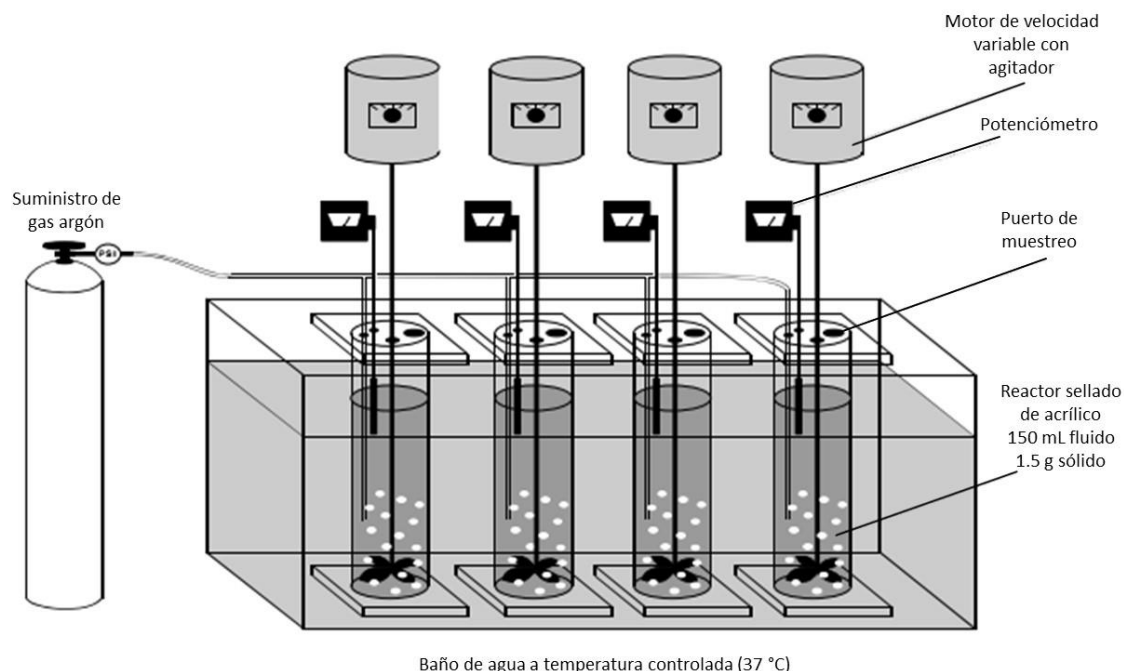


Figura 44 Diseño PBET modificado (Schoof, 2003)

En el procedimiento se sugieren cambios notables en comparación con el modelo propuesto originalmente por Ruby et al (1996):

- Los recipientes del reactor son frascos cilíndricos de vidrio
- El método de agitación es mediante el uso de propelas acopladas a un motor eléctrico.
- Las cantidades y volúmenes agregados son mayores, pero siempre conservando la relación sólido-líquido 1:100.
- El pH de la fase estomacal se cambió de 2.5 a 2, con lo cual se facilita el disolver algunos componentes del suelo.
- Para separar el particulado de las muestras tomadas durante el proceso se centrifugan las muestras en vez de filtrarlas por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ .



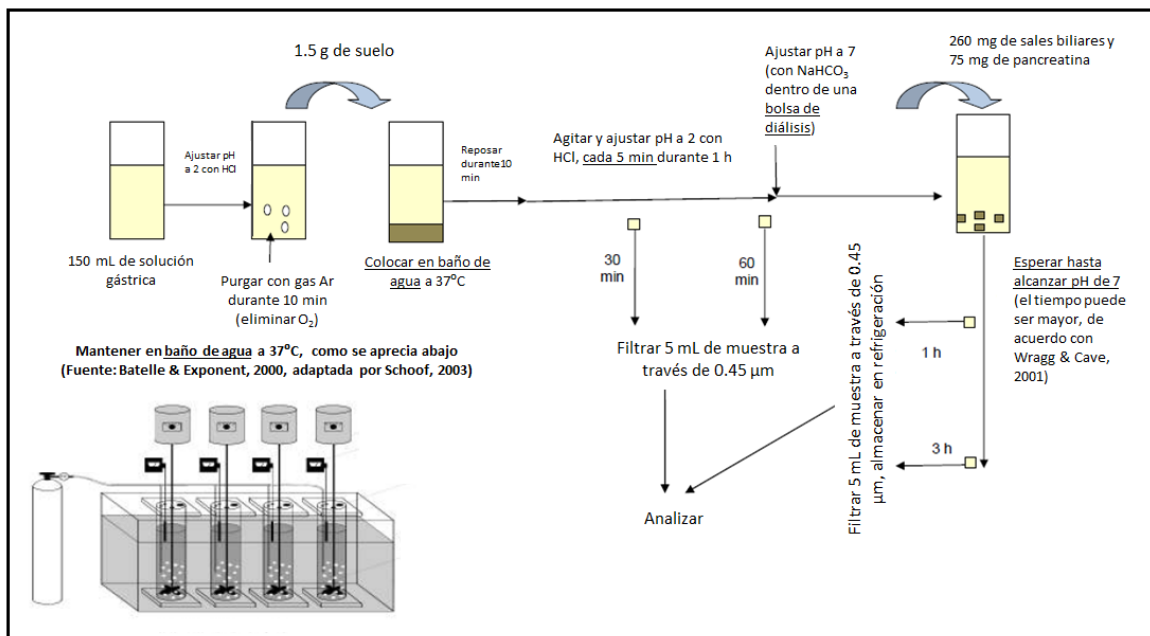


Figura 45 Esquema experimental del método PBET modificado (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algos, E.; Charissou, A.M., 2012)

A partir de este método, otros investigadores realizaron algunos cambios a fin de desarrollar sus propios métodos para determinar la bioaccesibilidad (Cuadro 11 y 12). Entre las modificaciones se encuentran:

- Durante la fase intestinal se realiza la adición directa de  $NaHCO_3$ , sin el uso de la bolsa de diálisis.
- Modificación del pH en la fase estomacal a 1.1 y 5.5 en la fase intestinal, además de no usar argón (Saikat, Barnes, & Westwood, 2007).
- Un reporte del BARC reporta 5 procedimientos que son significativamente diferentes en términos del pH tiempos de residencia, composición de las soluciones digestivas, métodos de mezclado, cantidades de extracto y tratamiento antes del análisis (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algos, E.; Charissou, A.M., 2012).

## Apéndices

*Cuadro 11 Principales características de 5 métodos basados en el método PBET (BARC, 2011).*

Parámetro	RRU - PBET	UG - PBET	RMC - PBET	SFU - PBET	BGS - PBET
<b>Cantidad de suelo</b>	1 g	10 mg en 10 alícuotas (5 para la fase estomacal y 5 para las fases estomacal e intestinal)	0.2 g (1 alícuota para la fase gástrica y 1 para la fase intestinal)	100 mg en 10 alícuotas (5 y 5)	
<b>Cantidad de solución gástrica</b>	100 mL	1 mL	20 g	20 g	
<b>Relación S-L</b>	1:100	1:100	1:100	1:100	
<b>Temperatura</b>	37 °C en baño de agua a temperatura controlada	37 °C en baño de agua a temperatura controlada	37 °C en baño de agua a temperatura controlada	37 °C en baño de agua a temperatura controlada	
<b>Composición de la solución gástrica</b>	1.25 g/L pepsina 0.50 g/L citrato de sodio 0.50 g/L sal disódica de ácido DL-málico 0.42 mL/L ácido láctico 0.5 mL/L ácido acético	1.25 g/L pepsina 0.50 g/L citrato de sodio 0.50 g/L ácido málico  0.42 mL/L ácido láctico 0.5 mL/L ácido acético	1.25 g/L pepsina 0.50 g/L citrato de sodio 0.50 g/L ácido málico  0.5 mL/L ácido acético 0.15 M NaCl	0.13 mM pepsina 1.7 mM citrato de sodio 2.8 mM ácido málico  4.84 mM jarabe de ácido láctico 8.32 mM ácido acético glacial	1.25 g/L pepsina 0.50 g/L citrato de sodio 0.50 g/L malato de sodio  0.42 mL/L ácido láctico 0.5 mL/L ácido acético
<b>pH</b>	pH 2 (ajustado con HCl concentrado)	pH 2.5 (ajustado con HCl 0.18 M)	pH 1.8 (ajustado con HCl concentrado)	pH 2.5 (ajustado con HCl 0.18 M)	pH 2.5 (ajustado con HCl concentrado)
<b>Agitación</b>	Rotación a 30 rpm	Plataforma de agitación a 70 rpm	Plataforma de agitación a 275 rpm	Rotación 60 rpm	Rotación 30 rpm

## Apéndices

*Cuadro 12 Principales características de 5 métodos basados en el método PBET (BARC, 2011).*

Parámetro	RRU - PBET	UG - PBET	RMC - PBET	SFU - PBET	BGS - PBET
<b>Duración de la fase estomacal</b>	1 h (pH ajustado a 2 cada 5 min)	2 h	1 h pH ajustado a 1.8 (a 30, 45 y 60 min)	1 h	1 h
<b>Tratamiento de los extractos de la fase estomacal</b>	Filtración por poro 0.45 µm Almacenado a 4 °C	Filtración por poro 1.6 µm + ataque ácido (1 mL HNO <sub>3</sub> 70% - 110 °C – dilución en 10 mL)	Centrifugado 30 min (2800 g) filtración por poro 0.45 µm Almacenado a 4 °C	Centrifugado 5 min (2000 g) Almacenado a 4 °C	Filtración por poro 0.45 µm Almacenado a 4 °C
<b>Duración de la fase intestinal</b>	3 h	0.5 horas después de agregar NaHCO <sub>3</sub> No especificado posteriormente	4 h	0.5 h Después 5 h	2 h + 2 h
<b>Composición de la solución intestinal</b>	Solución saturada de NaHCO <sub>3</sub> + 175 mg sales biliares 50 mg pancreatina 10 mL agua	7 mg de NaHCO <sub>3</sub> sólido 0.5 h a 37 °C Posteriormente 4 mg/mL sales biliares 1mM CaCl <sub>2</sub> 0.04 M tris buffer pH 7 100 mg/mL BSA	Solución saturada de NaHCO <sub>3</sub> 1.75 g/L bilis	7 mg NaHCO <sub>3</sub> sólido 0.5 h a 37 °C 4 mg/mL sales biliares 0.3 mg/mL pancreatina 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0.04 M tris buffer pH 7 10 mg/mL BSA	Solución saturada de NaHCO <sub>3</sub> 1.75 g/L sales biliares 0.05 g/L pancreatina
<b>pH</b>	pH 7	pH 7	pH 7	pH 7	
<b>Tratamiento de los extractos de la fase intestinal</b>	Filtración por poro 0.45 µm	Ataque ácido (1 mL HNO <sub>3</sub> 70% - 110 °C – dilución en 10 mL)	Ataque ácido (HNO <sub>3</sub> 2%; dilución 10x)	Centrifugado 5 min (2000 g) Almacenado a 4 °C	Filtración por poro 0.45 µm Almacenado a 4 °C

### A3. Método SBET/RBALP/SBRC

Uno de los métodos PBET de mayor interés para este estudio, es el denominado método SBET (por sus siglas en inglés Simplified Bioaccessibility Extraction Test) también conocido como RBALP o SBRC (Caboche, 2009), siendo el método base para diversos estudios, especialmente los establecidos por la EPA a través de un SOP<sup>27</sup> (EPA, 2017) y por las autoridades ambientales de México en la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, aunque en nuestro país solo se usa para determinar la bioaccesibilidad del plomo.

El método fue originalmente diseñado en la Universidad de Colorado bajo el nombre de Relative Bioaccessibility Leaching Procedure (RBALP) (Drexler & Brattin, 2007), estableciendo como parámetros críticos el pH, la temperatura y la velocidad y tipo de agitación.

La gran aportación e importancia de este método radica en que los resultados obtenidos del análisis de plomo en 19 diferentes sustancias de prueba y de tres laboratorios independientes, están fuertemente correlacionados con los obtenidos con pruebas *in vivo* ( $r^2=0.924$ ), con un error absoluto de 10%. Estos resultados indican que el método RBALP es bastante reproducible para determinar la bioaccesibilidad (Drexler & Brattin, 2007).

Debido a esa confiabilidad la US EPA tomó como base el diseño RBALP para establecer y validar su propio procedimiento de operación estándar (SOP), lo mismo que Solubility/Bioavailability Research Consortium (SBRC), quienes desarrollaron un reporte acerca de la operación del equipo y confirmaron los resultados obtenidos por Drexler (Schoof, 2003).

Hay que señalar que inicialmente el método Simplified Bioaccessibility Extraction Test (SBET) o RBALP fue desarrollado para estudiar la bioaccesibilidad

---

<sup>27</sup> Standar Operating Procedure.

de plomo y arsénico en suelos, pero hasta ahora los resultados más confiables y con mejor correlación con las pruebas *in vivo* se han dado con el plomo.

El hecho de que los autores se enfocasen en la fase estomacal radica en que el plomo se vuelve insoluble en un pH cercano a 5.5, tras lo cual precipita, por lo que la fase intestinal no es necesaria (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012).

Las condiciones de operación propuestas para el método SBET eliminan al argón y a cualquier otro gas, ya que el diseño del equipo (Figura 46) requiere que las muestras y las soluciones de digestión sean colocadas dentro frascos de polietileno de 125 mL de capacidad, los cuales son colocados en un sistema rotatorio de agitación. Dicho sistema está inmerso en un tanque de plexiglás o policarbonato, el cual es llenado con agua desionizada que se mantiene a una temperatura de  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  mediante un calentador de inmersión con circulación de agua.

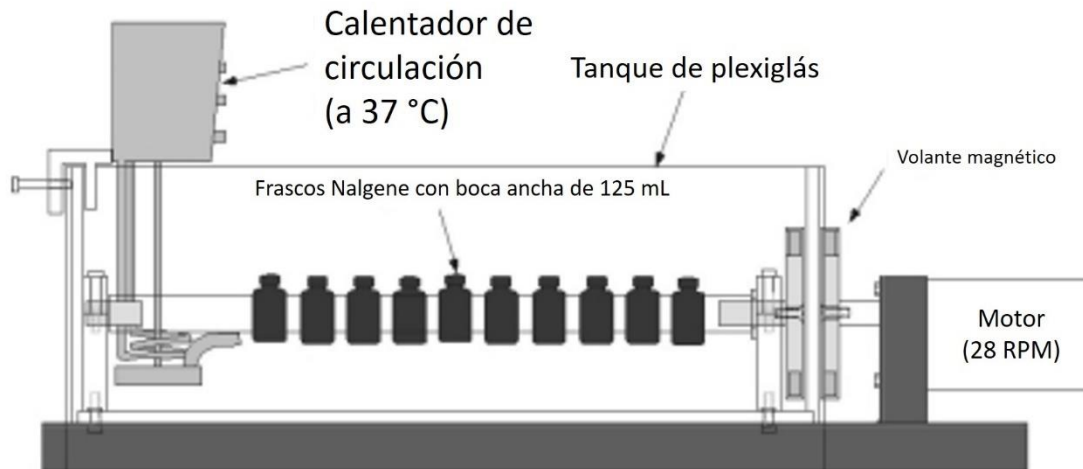


Figura 46 Representación esquemática del modelo RBALP propuesto por Drexler y otros (2007).

El sistema rotatorio originalmente estaba diseñado para trabajar a 28 revoluciones por minuto (rpm) pero en el método de la US EPA se establece que la velocidad de giro es de 30 rpm.

Al igual que para el método PBET modificado, algunos investigadores han realizado ligeras modificaciones al método original, la mayoría con respecto a las soluciones gástricas, entre ellas se encuentra el uso de glicina (Exponent-glycine test), fosfato de potasio (Exponent-phosphate test).

En México, la NOM 147 se basa en este método para realizar las pruebas de bioaccesibilidad, aunque únicamente es obligatorio en el caso de que una muestra cuente con niveles fuera de norma de plomo geodisponible.

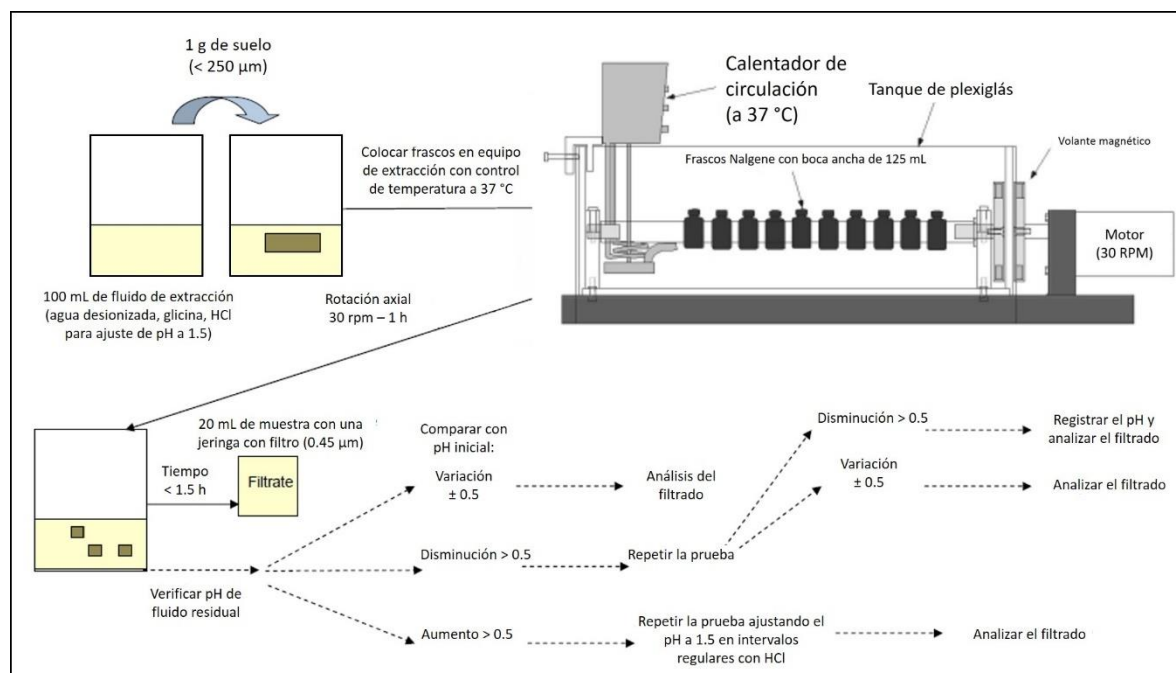


Figura 47 Esquema del método SBET o RBALP (Dabin et al., 2012)

#### A4. Método gastrointestinal *in vitro* (IVG)

El método *in vitro gastrointestinal (IVG)* es una técnica propuesta por Robin Rodríguez y colaboradores de la universidad de Oklahoma y de la universidad de Missouri Columbia (Rodríguez, Basta, Casteel, & Pace, 1999). En el método, los investigadores reemplazan las celdas propuestas por Ruby y Drexler por reactores de vidrio. Para el equipo de Rodríguez lo más importante es mantener el pH estable, en un valor de  $1.8 \pm 0.3$ , debido a que la solubilidad de la mayoría de los metales es fuertemente dependiente del pH, por lo que una fluctuación del pH afecta de manera notable los resultados (Rodríguez, Basta, Casteel, & Pace, 1999).

Al igual que los métodos anteriores, el método IVG fue desarrollado para simular el ambiente gastrointestinal del ser humano, y con ello estimar la biodisponibilidad de suelos contaminados con arsénico a la ingesta. En el método, el arsénico es extraído del suelo de manera secuencial, simulando soluciones estomacales e intestinales. Las pruebas realizadas involucraron la comparación de pruebas *in vivo* en lechones (cerdos de entre 10 y 12 kg) y pruebas *in vitro* mediante el uso de un equipo diseñado por el grupo de investigación, ilustrado en Figura 48.

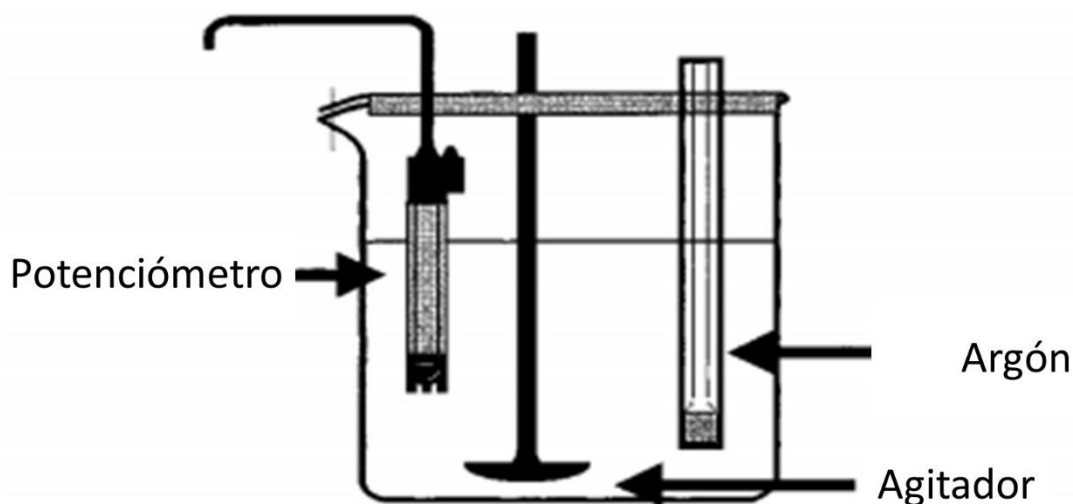


Figura 48 Diseño de reactor propuesto (Rodríguez, Basta, Casteel, & Pace, 1999)

El diseño del reactor es relativamente sencillo: el cuerpo del reactor es un recipiente de 1L hecho de vidrio; el sistema de agitación seleccionado es mediante propelas, con una velocidad de giro de 100 rpm, además de que las pruebas se realizan a una temperatura de 37°C. También se considera dentro de las condiciones de operación, un ambiente anaerobio a través del burbujeo de argón.

El método IVG (Figura 49) requiere del uso de una solución gástrica, la cual está compuesta por NaCl 0.15 M y pepsina porcina al 1% en peso, ajustando el pH a 1.8. Se toma una muestra de 4 g de suelo y se mezcla con 600 mL de la solución gástrica, tras lo cual se agregan 200 g del vehículo de alimentación (la misma sustancia o alimento usado para dosificar el suelo a los animales de las pruebas *in vivo*). Para la simulación de la fase intestinal, se ajusta el pH a 5.5 con una solución

saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , seguido de adición de extracto de bilis porcina (2.1 g) y de pancreatina porcina (0.21 g).

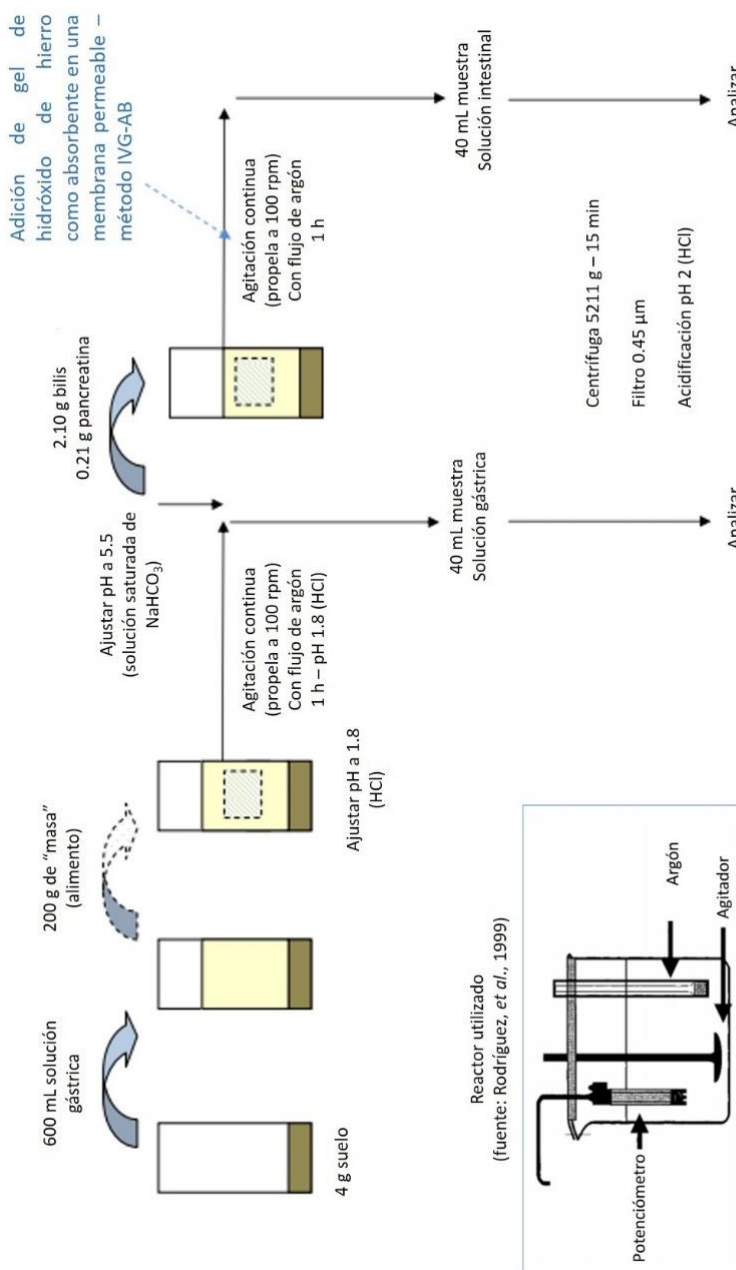


Figura 49 Representación esquemática del método IVG

Una variante del método consiste en el uso de hidróxido de hierro en forma del gel para simular la absorción de arsénico (IVG-AB). El método IVG-AB es similar al IVG, con la excepción de que se prepara una solución 0.65 M de  $\text{FeCl}_3$  a la cual



se le agrega lentamente una solución 2.7 M de  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta que el pH de la mezcla sea cercano a 6 y tenga la consistencia de un gel. Este gel tiene la función de simular lo que se absorbe a través de la membrana intestinal, y se agrega a una mezcla de la solución gástrica del método IVG, para posteriormente separar el gel centrifugando a 10000 rpm durante 15 minutos, se filtra el gel a través de un filtro de nylon de 8  $\mu\text{m}$  de poro, formando un sobre con el filtro, similar a una bolsa de té. El sobre es sumergido en la solución de la fase intestinal, tras lo cual, se desorbe el arsenato adicionando 200 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.2M y una hora de agitación orbital; finalmente, la solución resultante es filtrada a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro y se analiza la cantidad de arsénico presente. Todos los resultados obtenidos fueron comparados con los obtenidos mediante el método PBET.

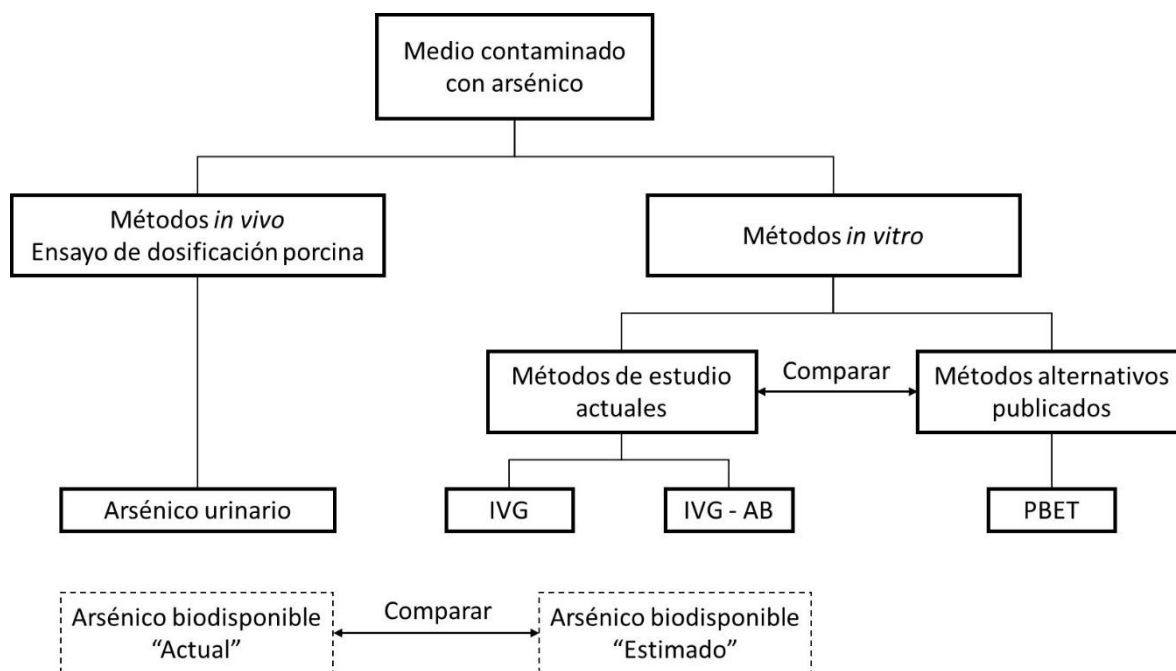


Figura 50 Diagrama de flujo del método IVG (Rodríguez, Basta, Casteel, & Pace, 1999)

Los resultados de las pruebas *in vitro* fueron comparados con los del método *in vivo*, obteniendo resultados estadísticamente comparables, extrayendo cantidades similares de arsénico.

Algunas modificaciones al método IVG con las hechas por el equipo de la universidad de Ohio (OSU-IVG) y por la Escuela Politécnica de Montreal (POLY-

IVG). Entre las modificaciones hechas por estos grupos de investigación se encuentran el uso de 150 mL de solución gástrica y de 1 g de suelo; una toma de 10 mL de muestra después de 1 hora de reacción; para el método OSU-IVG las muestras se centrifugan a 11,160 rpm, mientras que el método POLY-IVG filtra a través de membranas de 0.45  $\mu\text{m}$ ; el pH de la fase gástrica en el método OSU-IVG se ajusta a 6.1; en ambos métodos se usa  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para ajustar el pH en la fase intestinal, además, además de que se cambian las cantidades de bilis y pancreatina en comparación con el método original.

#### A5. Método estándar alemán DIN 19738<sup>28</sup>

El método desarrollado por el Instituto Alemán de Normalización (Deutsches Institut für Normung, DIN) simula una fase gástrica, una fase intestinal y como opción una fase salivar preliminar (Figura 51). El proceso se lleva a cabo en baño de agua a 37°C con agitación mediante agitador orbital o agitador magnético. El uso de nitrógeno es opcional. Este método hace posible la adición de alimento (leche en polvo) en la fase gástrica.

---

<sup>28</sup> DIN 19738, Soil quality - Bioaccessibility of organic and inorganic pollutants from contaminated soil material standard by Deutsches Institut Fur Normung E.V. (German National Standard).

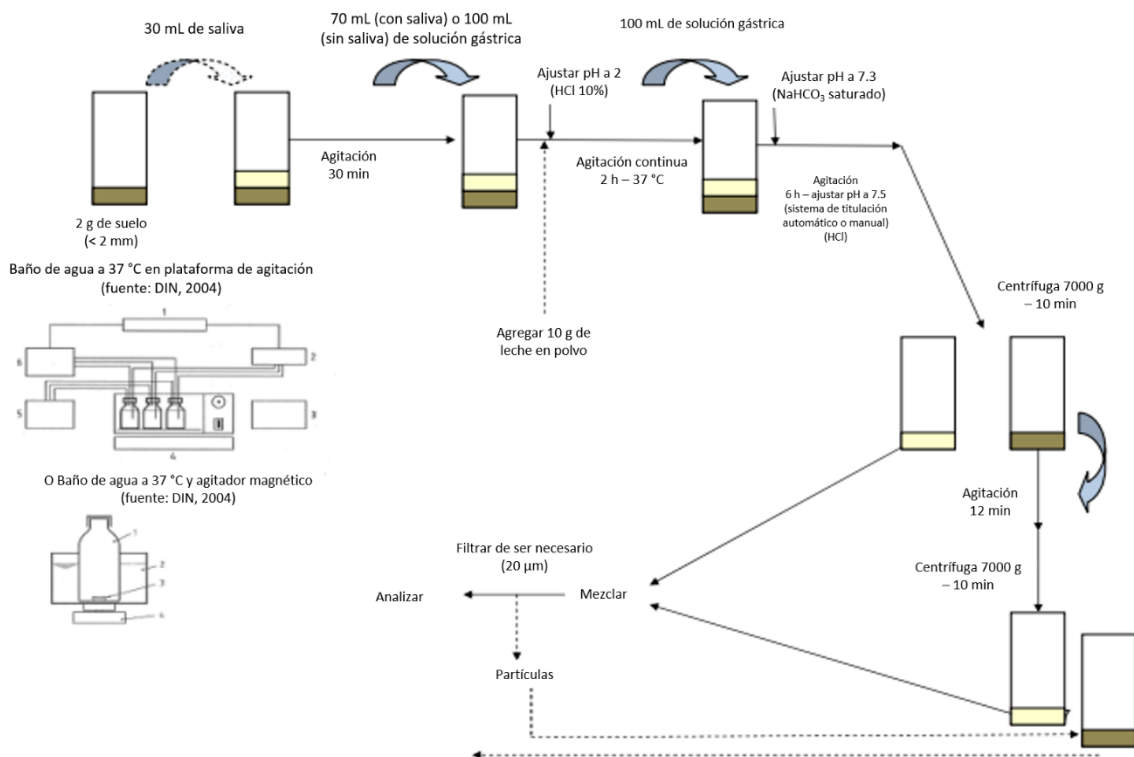


Figura 51 Representación esquemática del método DIN 19738 (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algros, E.; Charissou, A.M., 2012)

Los valores de pH son similares a aquellos del método PBET, 2 y 7.5 para las fases gástrica e intestinal respectivamente.

Una de las características particulares de este método, es que posterior a la centrifugación de la muestra tras la fase intestinal, el sobrenadante es conservado y re suspendido en agua destilada, mezclado y centrifugado nuevamente. El sobrenadante obtenido de esta manera es mezclado con el sobrenadante anterior antes de ser filtrado y analizado. La fracción retenida en el filtro también puede ser analizada.

Adicionalmente a la determinación de metales bioaccesibles, este método es recomendado para contaminantes orgánicos debido a que previo a su normalización, el método fue utilizado para determinar hidrocarburos poliaromáticos (PAH's) y bifenilos policlorados (PCB's) en suelos contaminados con estos compuestos.

A6. Método RIVM<sup>29</sup>

El método desarrollado por el RIVM originalmente fue usado para el estudio de la bioaccesibilidad de moléculas orgánicas en escorias de fundición<sup>30</sup>, simulando tres fases, salival, gástrica e intestinal (Figura 52). La prueba se lleva a cabo en condiciones aerobias dentro de tubos de centrifuga, donde las soluciones digestivas son calentadas con agua en una incubadora a 37°C y agitadas orbitalmente.

Para el desarrollo de este método, la solución biliar se prepara de forma más compleja en comparación con otros métodos, ya que la bilis puede tener mayor influencia en la bioaccesibilidad de las moléculas, debido a que la bilis disminuye la tensión superficial en la solución, la cual juega un papel muy importante para la movilidad de los contaminantes en los suelos. Al mismo tiempo, la bilis puede llegar a formar complejos con los metales, tras lo cual puede crear un ambiente apolar en el interior de las micelas de las sales biliares. En este método se prefiere utilizar la bilis liofilizada de origen animal (pollo) en lugar de las sales biliares purificadas, para así mantener los fosfolípidos y el colesterol que se encuentra en las micelas formadas por estas sales biliares de origen animal (Oomen, y otros, 2003).

---

<sup>29</sup> Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu Siglas en neerlandés para el Instituto Neerlandés Nacional de Salud Pública y del Ambiente

<sup>30</sup> Residuos provenientes de las operaciones de fundición por la acción química y la fusión, a través de la combinación de fundentes (carbonatos y silicatos) con la ganga o porción sin valor del mineral (NOM-157-SEMARNAT-2009).

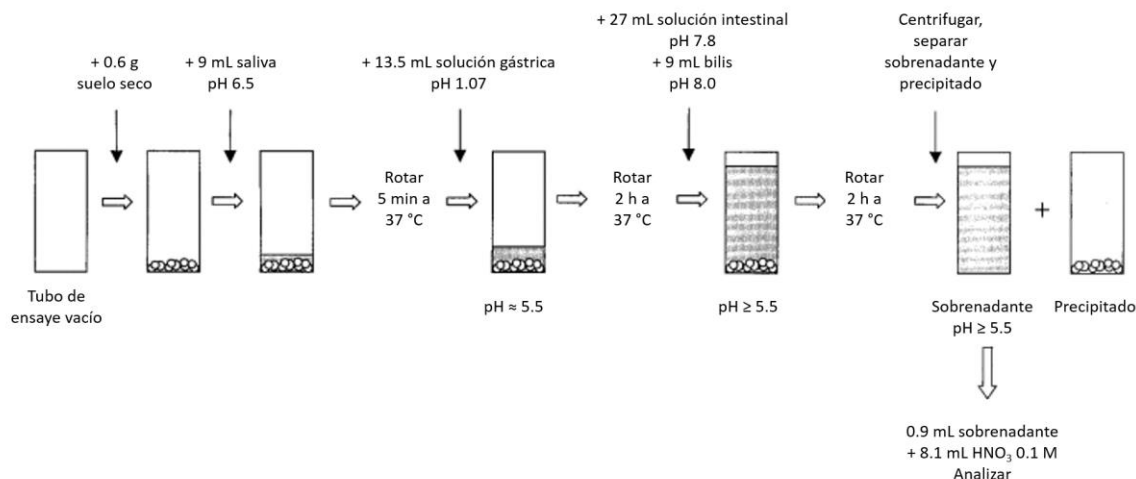


Figura 52 Representación esquemática del método RIVM (Oomen, y otros, 2003).

Una variante del método consiste en agregar alimento, con la finalidad de estimar la bioaccesibilidad de PHA's y se ha demostrado que la adición de leche incrementa la solubilidad de dichos compuestos. Esta versión del método RIVM, las diferencias son la concentración de enzimas en las soluciones digestivas, el pH y concentración biliar, que son aumentadas para reflejar los cambios fisiológicos que ocurren al agregar alimento.

#### A7. Método UBM<sup>31</sup>

El método UBM es el resultado de un proyecto conjunto entre organismos ambientales europeos para el desarrollo de un método único con la finalidad de medir la bioaccesibilidad de metales en el suelo, basado en el método RIVM, siendo considerado como el más representativo de las condiciones fisiológicas reales del tracto gastrointestinal de niños de entre 0 y 6 años de edad (Caboche, 2009).

A partir del método RIVM se llevaron a cabo múltiples modificaciones con el fin de establecer las condiciones más conservadoras, para de esta manera no subestimar el nivel de riesgo asociado a la ingestión de un suelo contaminado. Asimismo, los niveles de pH en las fases salival, gástrica e intestinal, los tiempos de

<sup>31</sup> Unified Bioaccessibility Method fue desarrollado en 2005 por el *Bioaccessibility Research Group of Europe* (BARGE).

residencia en el estómago e intestino y la concentración de  $\text{NaHCO}_3$  en la solución intestinal fueron modificados ligeramente con respecto al método RIVM (Cuadro 13).

*Cuadro 13 Condiciones de trabajo de los métodos RIVM y UBM.*

Parámetro	RIVM (ayuno)	UBM (ayuno)
pH saliva	$6.5 \pm 0.2$	$6.5 \pm 0.5$ $6.3 \pm 0.5$
pH estómago	$1.07 \pm 0.07$	$1.0 \pm 0.2$
pH intestino	$7.8 \pm 0.2$	$7.4 \pm 0.2$
Tiempo de residencia estómago	2 horas	1 hora
Tiempo de residencia intestino	2 horas	4 horas

Al igual que en el método RIVM, el protocolo UBM se lleva a cabo en tubos de centrifugación en condiciones aerobias y las soluciones gástricas son preparadas el día previo y calentadas a  $37^\circ \text{C}$  al menos 2 horas antes de su uso (Figura 53).

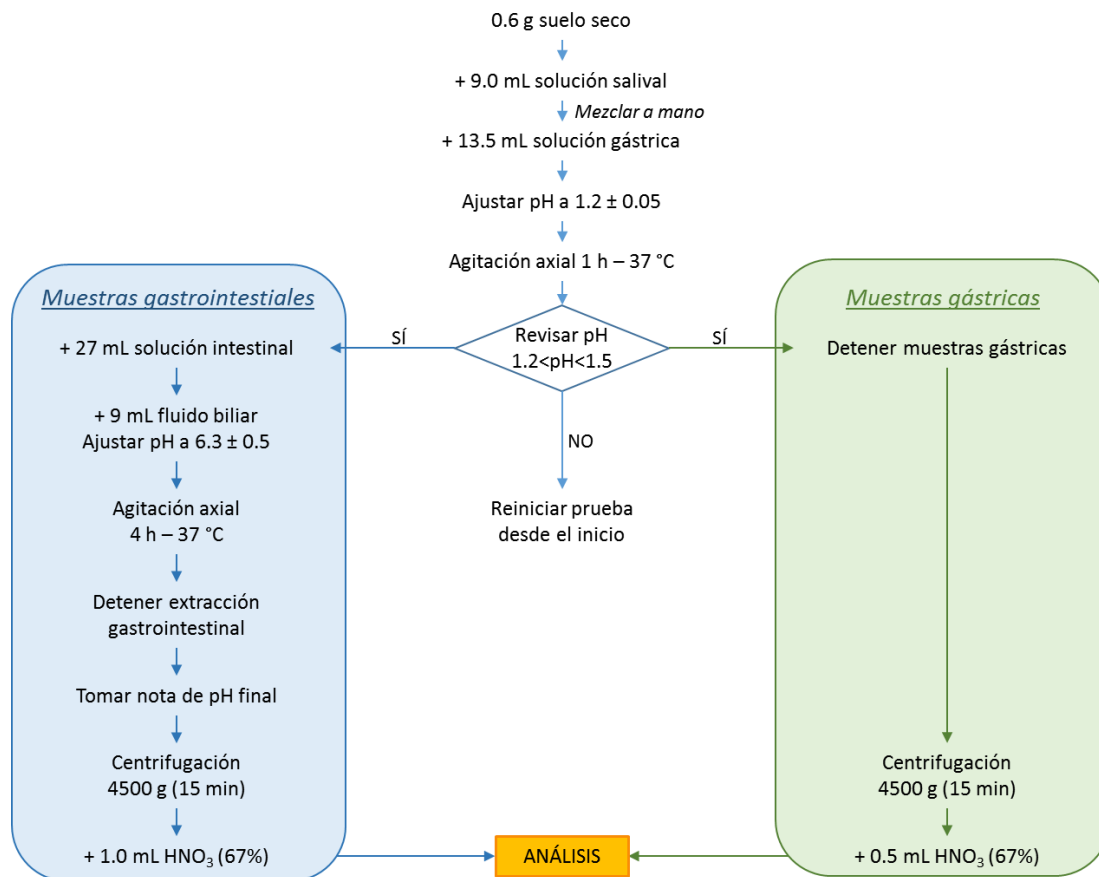


Figura 53 Representación esquemática del método UBM (INERIS, 2010)

Para el desarrollo y evaluación del método UBM participaron organismos internacionales como el instituto de salud neerlandés (RIVM), la organización danesa DHI soil and water, el instituto nacional del ambiente industrial y del riesgo (INERIS)<sup>32</sup> de Francia, La universidad de Ghent en Bélgica, la Universidad del Estado de Ohio en los Estados Unidos, el Colegio Real Militar de Canadá (RMC)<sup>33</sup> y en el Reino Unido el Estudio Geológico Británico (BGS<sup>34</sup>), éste último fue el laboratorio líder de las pruebas interlaboratorio, por lo que se encargó de llevar a cabo la evaluación del ejercicio, además, los requerimientos analíticos

<sup>32</sup> Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques.

<sup>33</sup> Royal Military College

<sup>34</sup> British Geological Survey

subsecuentes para la realización de las pruebas de bioaccesibilidad de metales fue tomado por los laboratorios de análisis geoquímicos (AGL<sup>35</sup>) del BGS.

En lo que respecta a las pruebas *in vivo*, tanto los datos fueron los obtenidos por el profesor Nick Basta de la escuela de recursos ambientales naturales de la Universidad de Ohio y por el profesor Stan Casteel del Colegio de Medicina Veterinaria de la universidad de Missouri. Los materiales que se utilizaron para el desarrollo de la investigación fueron escorias, suelos, sedimentos de ríos y polvos del hogar que contenían los contaminantes de estudio, específicamente arsénico, cadmio y plomo.

#### A8. Método FOREhST

El método Fed ORganic Estimation human Simulation Test (FOREhST por sus siglas en inglés), se basa en gran medida al RIVM en condiciones con alimento, para estudiar la bioaccesibilidad de los PAHs.

La diferencia principal entre los métodos es el alimento agregado:

- El método RIVM utiliza fórmula infantil con aceite vegetal para representar la dieta promedio de adultos de entre 19 y 65 años en Países Bajos (con respecto al consumo de energía y nutrientes).
- Para el método FOREhST inicialmente también se utilizó fórmula infantil, sin embargo, se encontró que esta es difícil de pesar y una vez abierta se degrada rápidamente. Por lo tanto, se utilizó una mezcla de avena congelada en seco y alimento infantil de papilla de arroz con aceite de girasol, para representar la dieta de niños entre 4 y 6 años en Gran Bretaña.

En el método no se especifica la composición de las soluciones digestivas, pero los valores recomendados de pH son similares a aquellos del método RIVM, los tiempos de residencia son idénticos y la relación de las soluciones digestivas es ligeramente distinta (Cuadro 14).

---

<sup>35</sup> Analytical Geochemistry Laboratories



Cuadro 14 Principales diferencias entre el método RIVM y el FOREhST propuesto por Cave y otros (2010).

Parámetro	RIVM	FOREhST
pH saliva	6.8 ± 0.2	6.8 ± 0.5
pH gástrico	1.3 ± 0.02	1.3 ± 0.5
pH duodeno	8.1 ± 0.2	8.1 ± 0.2
pH biliar	8.0 ± 0.2	8.2 ± 0.2
Tiempo de residencia estómago	2 horas	2 horas
Tiempo de residencia intestino	2 horas	2 horas
Alimento	Fórmula infantil con aceite vegetal	Avena congelada en seco, alimento infantil de papilla de arroz y aceite de girasol
Grupo de edad objetivo	19 a 65 años	4 a 6 años
Cantidad de suelo introducida	0.4 g	0.3
Relación entre las soluciones salival, gástrica, duodenal y biliar	1:1.5:3:1	1:2:2_1
Rotación	Axial	Axial

#### A9. Método SHIME

El método (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem) es un simulador multiestación del sistema digestivo para determinar la bioaccesibilidad usando un inóculo de flora intestinal humana (Figura 54). La prueba se da al colocar muestras de suelo contaminado en contacto con soluciones gástrica e intestinales al igual que en otros métodos descritos. En este método se agrega un inóculo bacteriano representativo de las bacterias en el tracto gastrointestinal humano.

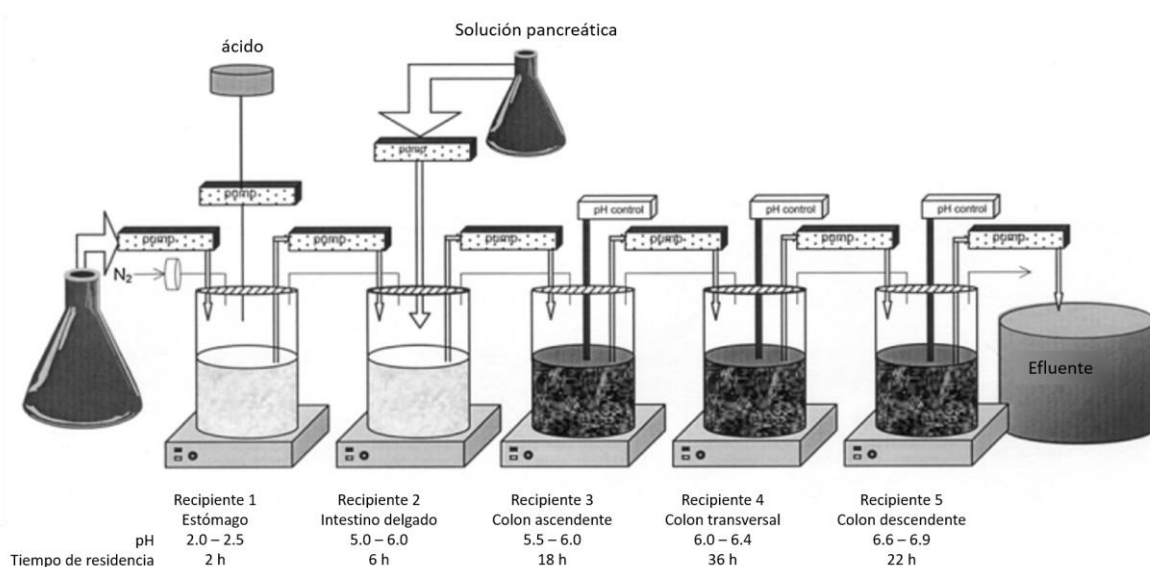


Figura 54 Representación esquemática del método SHIME (Dabin, C.; Guignonnet-Sergent, A.; Algos, E.; Charissou, A.M., 2012)

El método SHIME fue desarrollado como un modelo dinámico utilizado para estudiar el efecto de ciertos alimentos en la capacidad de fermentación de una comunidad microbiana representativa del colon, aunque posteriormente fue utilizado para estimar la bioaccesibilidad de ciertos contaminantes metálicos (Laird, y otros, 2007).

El protocolo del método incluye:

- ✓ Una fase dinámica cuyo objetivo es crear la comunidad microbiana representativa del colon. Se representan de tres a cinco compartimientos, el estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente). Los tiempos de residencia y pH varían, dependiendo el segmento. La primera fase es muy prolongada (3 semanas).
- ✓ Una fase estática durante la cual la solución digestiva (gástrica e intestinal) y el inóculo bacteriano creado previamente, se colocan en contacto con el suelo probado igual que en otras pruebas de bioaccesibilidad.



Figura 55 Simulador del ecosistema microbiano intestinal (SHIME) (Robinson & Reeves, 2013)

Este método se lleva a cabo a 37° C, con agitación magnética y en condiciones anaerobias mediante el uso de nitrógeno para mantener una atmósfera anaerobia en el proceso (Figura 55).

#### A10. Modelo intestinal TNO's: prueba TIM

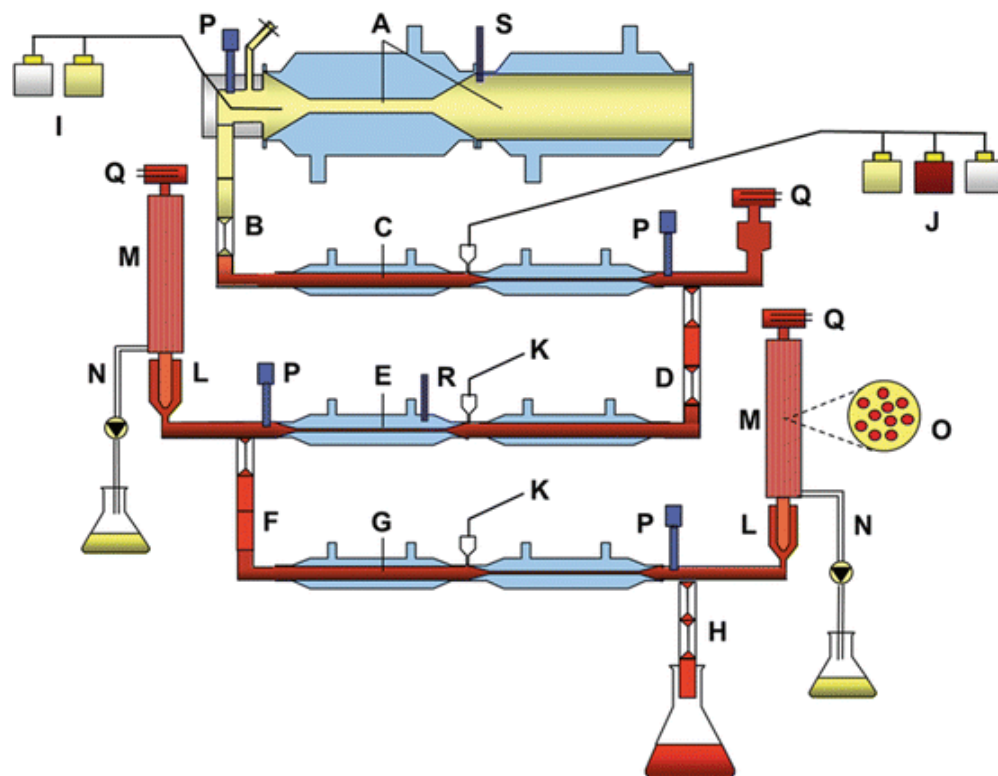
Este método fue desarrollado por el Instituto de Investigación en Nutrición y Alimentos del Departamento de Investigación Científica Aplicada (TNO<sup>36</sup>) los Países Bajos y consiste en un sistema dinámico controlado por una computadora con la cual se simulan los procesos de ingesta de alimentos y agua, la liberación de enzimas y fluidos, la mezcla por las contracciones peristálticas y el tránsito del quimo alimenticio a través del estómago y del intestino (Figura 56). El sistema consiste en muchos compartimientos interconectados por válvulas que regulan el tránsito intestinal, simulando la temperatura corporal y el movimiento peristáltico del organismo (tno.nl, 2013).

En el desarrollo del método se agregan gradualmente soluciones digestivas a cada compartimiento y el pH es ajustado con ácido clorhídrico o bicarbonato de sodio, todo a una temperatura de 37°C.

<sup>36</sup> Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek

Un segundo sistema desarrollado, el TIM-2, representa el colon y contiene flora intestinal abundante, existiendo también una versión simplificada que simula el estómago e intestino delgado.

Estos protocolos se utilizan principalmente para estudios nutricionales. No se reportan pruebas para bioaccesibilidad de contaminantes en suelos utilizando TIM-2, aunque existen algunos reportes con el TIM-1.



A. Compartimento gástrico, B. esfinter pilorico, C. compartimento duodenal, D. válvula peristáltica, E. compartimento jejunal, F. válvula peristáltica, G. compartimento ileal; H. válvula ileal-cecal; I. secreción gástrica; J. secreción duodenal; K. secreción de bicarbonato; L. pre-filtro; M. sistema de filtrado; N. filtrado con fracción bioaccesible; O. sección del sistema de filtrado; P. electrodos de pH; Q. sensores de nivel; R. sensores de temperatura; S. sensor de presión.

Figura 56 Presentación esquemática del equipo TIM-1 para el estudio de la biodisponibilidad.

**B. Planos de diseño del Reactor de Simulación Gastrointestinal para Bioaccesibilidad.**

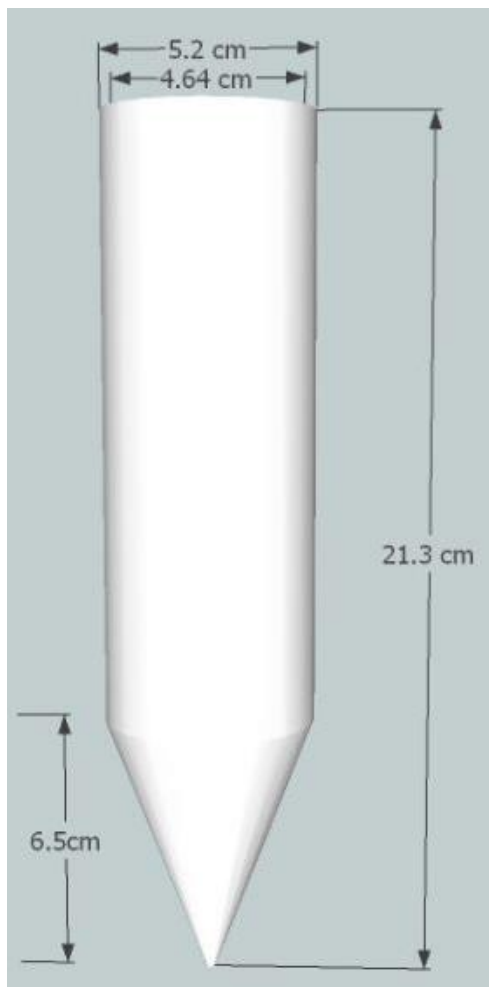


Figura 57 Esquema del RSGB.

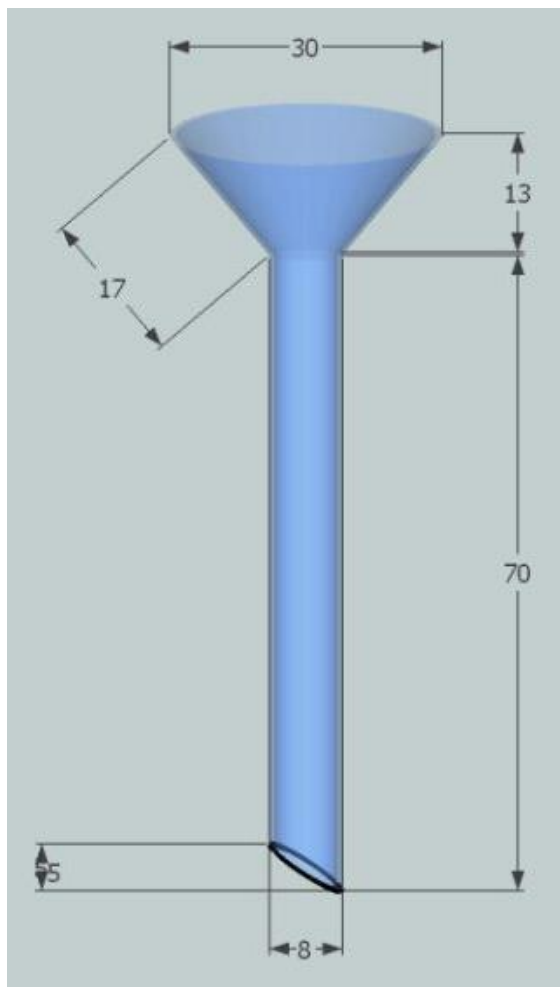


Figura 58 Dimensiones en milímetros de los embudos utilizados.

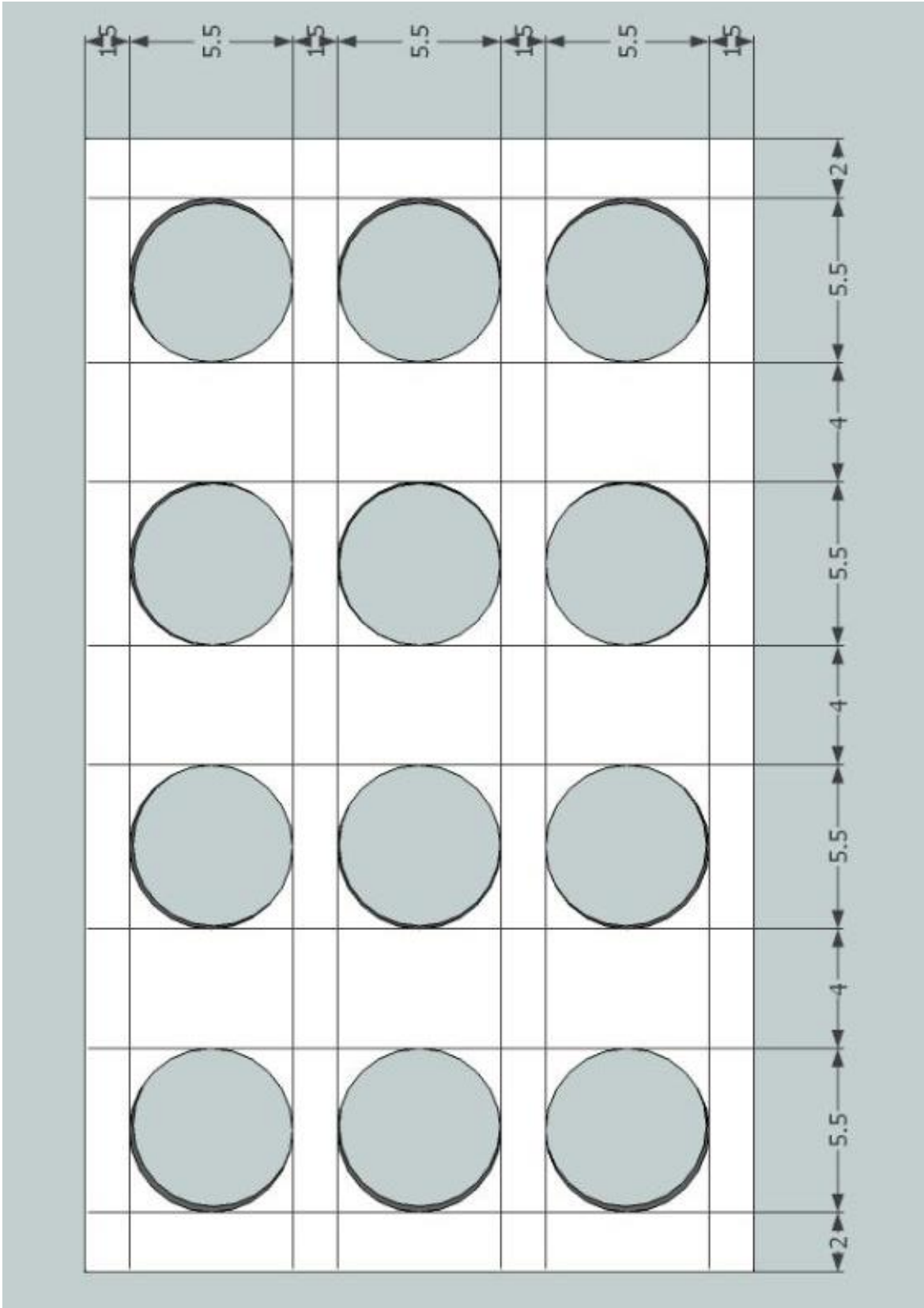


Figura 59 Vista superior de la gradilla, dimensiones en centímetros.

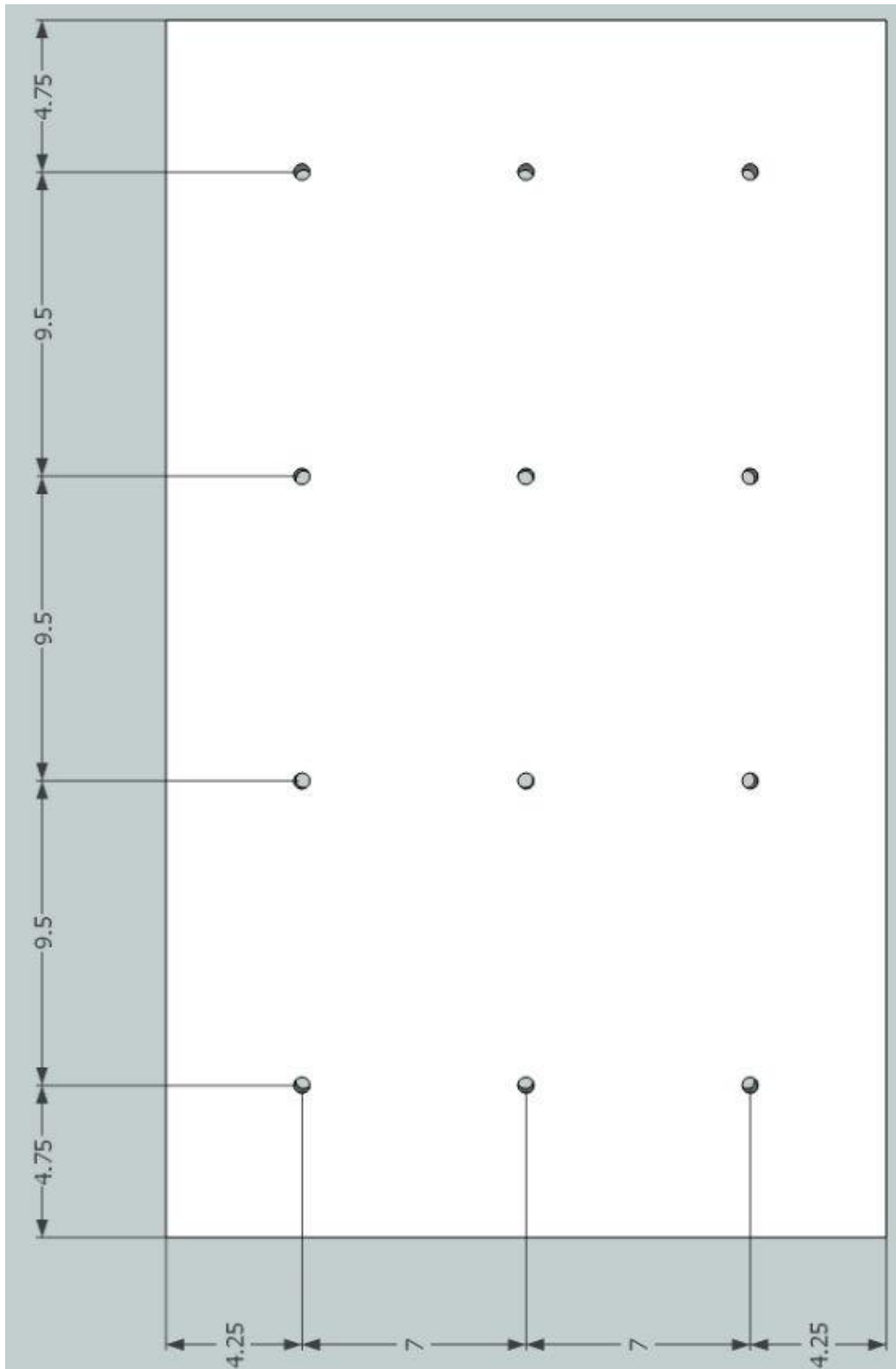


Figura 60 Vista inferior de la gradilla, dimensiones en centímetros.

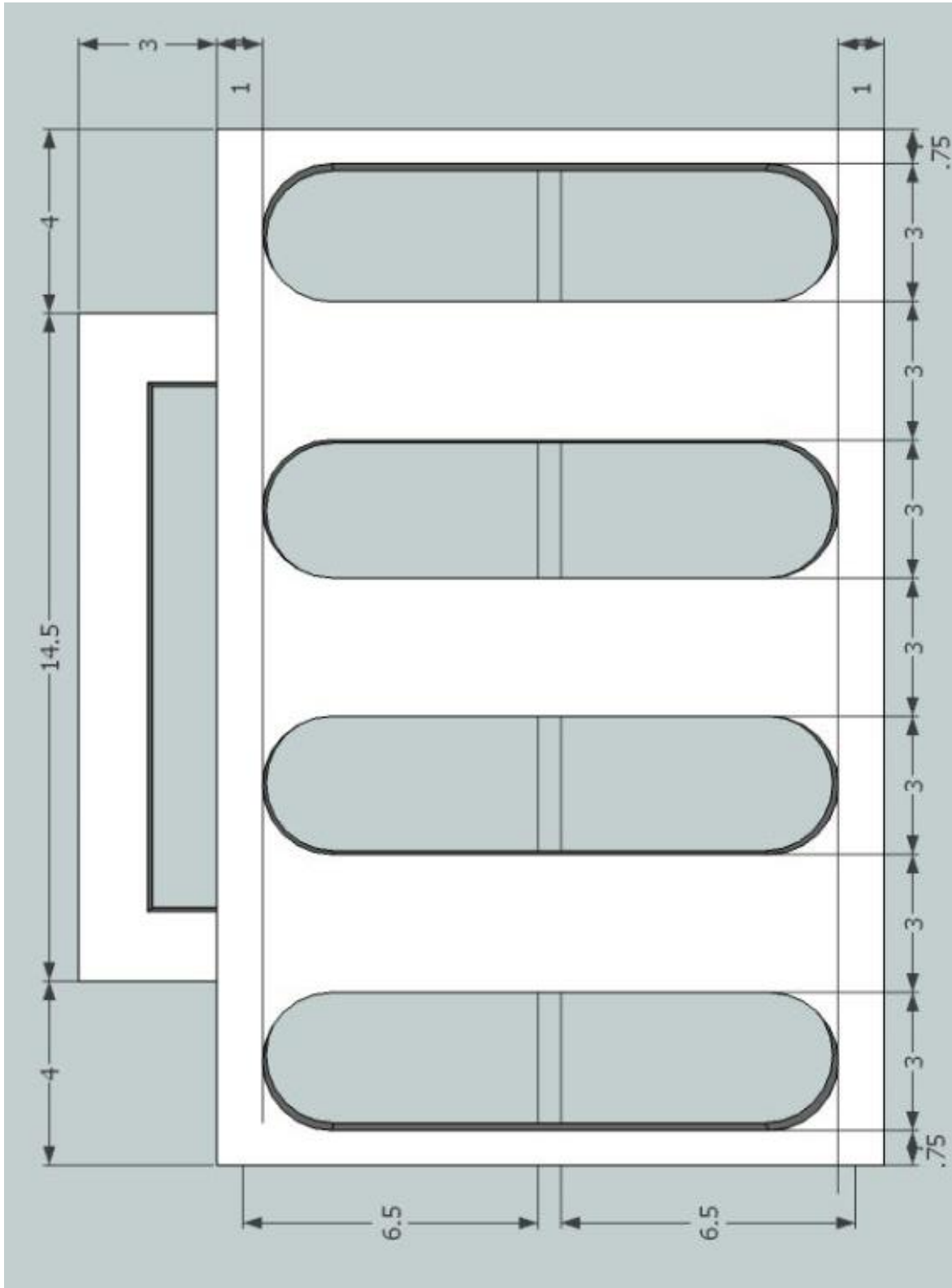


Figura 61 Vista lateral del diseño de la gradilla, dimensiones en centímetros.



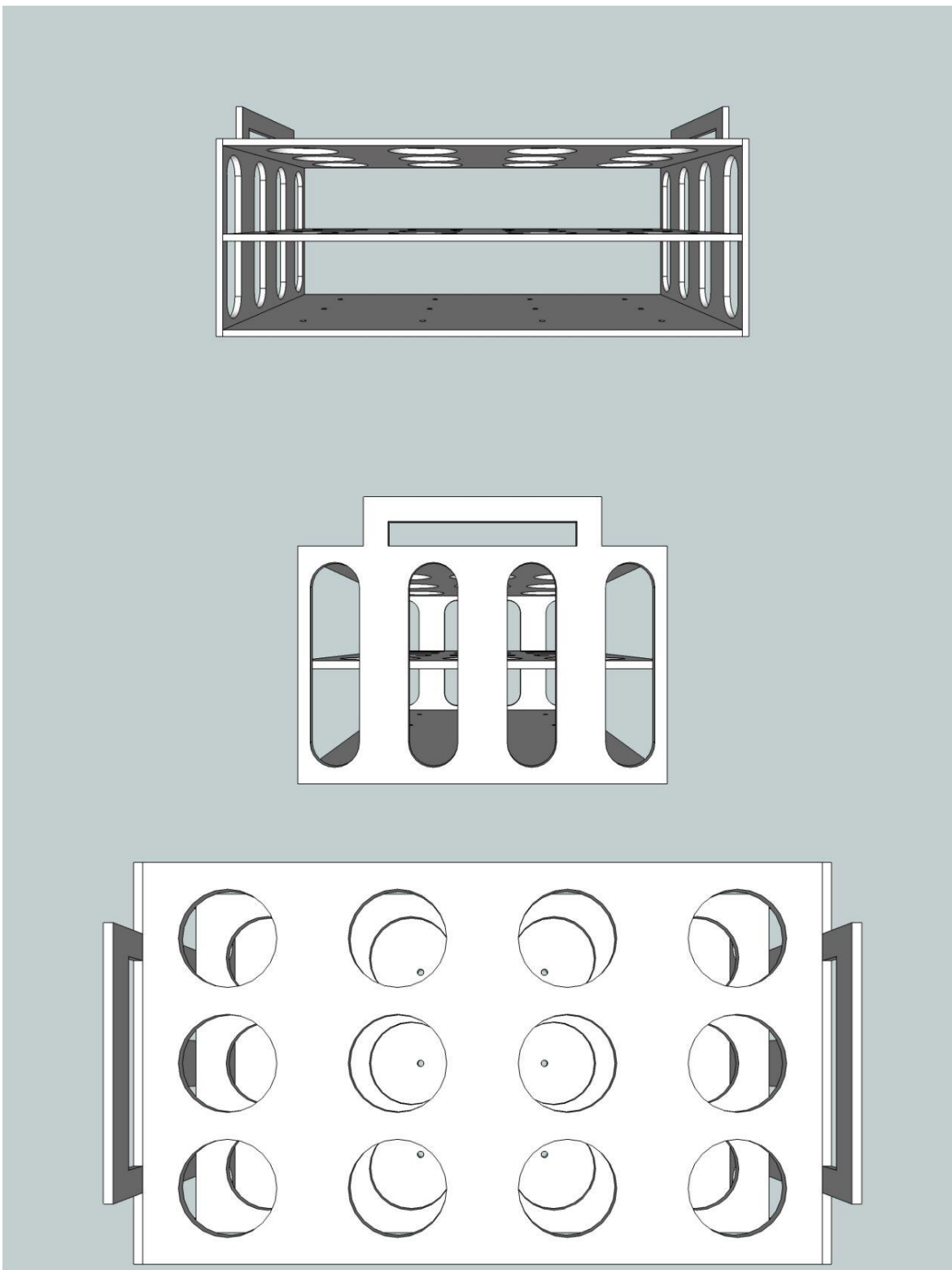


Figura 62 Vistas lateral, frontal y superior del diseño en tercera dimensión de la gradilla.

## C. Descripción de los métodos analíticos utilizados

### C1. Medición de pH

Método de referencia: U.S. EPA 9045D

#### *Equipo*

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

#### *Material*

- Pañuelos desechables
- 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 18.0 M $\Omega$ ·cm a 25 °C)

#### *Procedimiento*

En los recipientes de polipropileno se colocan 7.0 g de muestra (tamizada por malla # 60) en 21.0 mL de agua Tipo 1. La cantidad de muestra difiere de la indicada en el método (20 g/60 mL) debido a la cantidad de muestra existente. Se mantiene la relación suelo-agua (1:3). Se tapan herméticamente los recipientes y se mantienen en agitación orbital 5 min a 240 rpm. Como controles de calidad cada lote incluye un blanco (agua Tipo I), y todas las muestras por duplicado o triplicado. La muestra se mantiene en reposo 1 hora para permitir la sedimentación de los

sólidos suspendidos. Se filtra el sobrenadante, de ser necesario se centrifugan, tras lo cual se mide el pH.

Previo a la medición, se calibra el potenciómetro con las disoluciones buffer de pH 4.0, 7.0 y 10.0. La medición se lleva a cabo manteniendo la muestra en agitación, reportando el valor de pH de la lectura estable. Entre cada lectura, el electrodo se enjuaga con agua Tipo 1 para evitar la contaminación, posteriormente se seca con pañuelos desechables (sin frotar). Cada 10 muestras se verifica el funcionamiento del equipo con las disoluciones buffer. De ser necesario se calibra nuevamente el equipo.

### C2. 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 desechables
- Recipientes de polietileno de 100 mL

#### *Reactivos*

- Solución estándar de cloruro de potasio (KCl) de 12.88 mS/cm y 1413  $\mu$ S/cm
- Agua Tipo 1 con resistividad de 17 M $\Omega$ ·cm

#### *Procedimiento*

Las suspensiones preparadas para medir el pH se utilizan también para medir conductividad eléctrica. El conductímetro se calibra con dos puntos, siendo aire el primero y el segundo punto una solución estándar de KCl, de alta o baja conductividad eléctrica (12.88 mS/cm o 1413  $\mu$ S/cm), según el intervalo de la muestra. El conductímetro se enjuaga entre cada lectura con agua Tipo 1. Se verifica el funcionamiento del equipo cada 10 muestras con las soluciones estándar de KCl, de ser necesario se recalibra el equipo.

### C3. 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 desechables
- 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 preparadas para medir pH y conductividad eléctrica se utilizan para medir potencial redox. El potenciómetro consiste de un electrodo combinado de platino y un electrodo de Ag/AgCl como referencia. Antes de medir las muestras se verifica el equipo con la respuesta del electrodo, una respuesta

típica con la solución buffer de pH 7 es de  $\approx 280$  mV. El electrodo se enjuaga con agua Tipo 1 entre cada lectura, se verifica el funcionamiento del equipo cada 10 muestras con la solución buffer de pH 7.

### C4. Fluorescencia de rayos X

Esta técnica se utiliza 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 (SiO<sub>2</sub>)

#### *Material*

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

#### *Procedimiento*

Se colocan 100 g de muestra tamizada por malla # 60 (menor a 250  $\mu$ m), en el molino Pulverisette 6 marca Fritsch durante 2 min. Antes de analizar las muestras,

se verifica el funcionamiento del equipo con un blanco ( $\text{SiO}_2$ ), además de materiales de referencia estándar (SRMs): Montana soil 2710a y Montana soil 2711.

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

La muestra se coloca sobre la ventana de análisis al interior de la cámara de plomo. Cada muestra se analiza un mínimo de tres veces. El funcionamiento del equipo se verifica cada 10 muestras con un blanco (dióxido de silicio) y los materiales de referencia estándar. Las muestras se analizan por el método de mina (%) y por el método de suelo (ppm) por quintuplicado, con 45 segundos por cada filtro y 130 segundos de lectura por repetición.

#### C5. 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 desechables
- 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 colocan 5.0 g de muestra tamizada por malla # 10. El lote consta de 1 blanco y todas las muestras se realizan por triplicado. El agua meteórica es preparada burbujando aire en agua destilada hasta alcanzar un pH de  $5.5 \pm 0.2$ .

Una vez que se agregada el agua a las muestras, los recipientes se cierran herméticamente con contratapa y tapa, se mantienen en agitación orbital durante 18 horas a 30 rpm. Se dejan sedimentar las muestras, de ser necesario se centrifugan. Se filtran mediante jeringas con un dispositivo de filtración (swinex), a través de membranas de nitrocelulosa de  $0.45 \mu\text{m}$  de poro.

El filtrado se guarda en recipientes de polietileno que se conservan en refrigeración hasta su análisis por ICP-OES, con base en el método de referencia EPA 6010B (1996).

### C6. Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad de As se evalúa por los siguientes métodos:

- Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, el cual sólo considera la fase gástrica;
- 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
- método modificado, el cual es una variante del PBET: el método gástrico simplificado y el método intestinal simplificado.

C7. 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  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$
- Ácido clorhídrico concentrado (HCl) marca BAKER ACS pureza 36.0 %
- Glicina marca SIGMA pureza  $\geq 99.0$  %
- Material de referencia Montana Soil 2710 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*

Se prepara una solución de glicina con 30.0 g de glicina en 990 mL de agua desionizada Tipo 1, el agua se mantiene a 37°C y se ajusta el pH a  $1.50 \pm 0.05$  con HCl concentrado. Una vez que alcanzado el pH requerido, se completa el volumen a 1.0 L en un matraz aforado.

En un frasco de boca ancha de polietileno, se deposita 1.0 g de muestra, tamizada por malla # 60, a cada muestra se adicionan 100.0 mL de la solución de glicina.

Para el control analítico, se agrega 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 colocan en el agitador con control de temperatura a  $37 \pm 2$  °C, se mantiene la agitación a velocidad de 30 rpm durante 1 hora.

Transcurrida una hora, los frascos se sacan del agitador, se registra la temperatura y el pH. Se filtran 40 mL de cada muestra mediante jeringas con un dispositivo de filtración (swinex), a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Los filtrados se depositan en frascos de polietileno y se conservan en refrigeración, hasta su análisis en AA-flama o ICP-OES.

C8. Método de referencia para la bioaccesibilidad: Physiologically Based Extraction Test (PBET) según Ruby *et al.*, (1996)

### *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  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$
- Ácido clorhídrico concentrado (HCl) marca BAKER ACS pureza 36.5 %

- Solución estándar de As de 100 µg/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 otra 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*

Se prepara una solución gástrica con 1.25 g de pepsina, 0.5 g de ácido cítrico, 0.5 g de ácido DL-málico, 410 µL de ácido láctico y 500 µL de ácido acético en 990 mL de agua Tipo 1 a 37 ± 1 °C, el pH se ajusta a 1.50 ± 0.05 con HCl concentrado y se completa el volumen a 1 L en matraz aforado. Se prepara una solución intestinal con 1.56 g del extracto biliar y 0.46 g de pancreatina en 90 mL de agua Tipo I.

En un embudo de separación de polietileno se colocan 1.0 g de muestra tamizada por malla # 60, se agregan 100.0 mL de solución gástrica y 2 gotas de

antiespumante. Los embudos se deben encontrar sumergidos en un baño de agua a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Se mantienen abiertas las llaves de paso de los embudos para permitir la entrada de gas argón (debajo de los embudos). Se verifica que el pH se mantenga en  $1.50\pm 0.05$ , si el pH cambia después de agregar la solución gástrica se ajusta nuevamente. Se tapan los embudos y se mantiene la agitación durante 1 hora.

Se suspende la agitación y se toma una alícuota de 10 mL de muestra de cada embudo, la alícuota se filtra mediante con un dispositivo de filtración (swinex), a través de membranas de nitrocelulosa de  $0.45\ \mu\text{m}$ . El filtrado se almacena en refrigeración en recipientes etiquetados de polietileno de 60 mL. Se reinicia la agitación a través de burbujeo de argón. Se aumenta el pH de la solución de cada embudo hasta  $7.0\pm 0.05$ , agregando gotas de la solución saturada de bicarbonato de sodio, en caso de exceder el pH indicado se ajusta con HCl. Una vez estabilizado el pH, se agrega una alícuota de 10.0 mL de solución intestinal a cada embudo y se tapan nuevamente.

Transcurridas 2.5 horas después de agregar la solución intestinal, se mide el pH y de ser necesario se ajusta a  $7.0\pm 0.05$ . Posteriormente se detiene la agitación y se toman 20.0 mL de alícuota de cada embudo. La alícuota de muestra se filtra a través de membranas de  $0.45\ \mu\text{m}$ . El filtrado se deposita en recipientes etiquetados de polietileno de 60 mL, y se conservan en refrigeración.

La solución restante de los embudos se trata como residuo. Con el fin de eliminar interferencias de matriz, los filtrados de la fase gástrica e intestinal, se digieren con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) en microondas. Las digestiones se llevan a cabo con 7.0 mL de filtrado y 3.5 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado, con una rampa de calentamiento de 15 min, temperatura constante de  $130^{\circ}\text{C}$  durante 25 min y 15 min de enfriamiento.

Las digestiones ácidas en microondas de los filtrados de las fases gástrica e intestinal se conservan en refrigeración no más de 15 días hasta su análisis, para

evitar la desnaturalización de reactivos proteicos. Para determinar el contenido de EPT, las digestiones se analizan mediante ICP-OES o AA-flama, con base en el método de referencia EPA 6010B (1996).

#### C9. Método gástrico modificado para determinar bioaccesibilidad

Se realizan 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 1.5. Se agitan las suspensiones (agitación axial, orbital o por gas) a temperatura constante de  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora. El sobrenadante se filtra a través de membranas de  $0.45 \mu\text{m}$ . Finalmente, los filtrados se analizan mediante ICP-OES o AA-flama.

#### C10. Método intestinal modificado para determinar bioaccesibilidad

Se aumenta el pH de las muestras provenientes del método gástrico simplificado a  $7.00 \pm 0.05$  con una solución sobresaturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Se mantienen las suspensiones de suelo-solución a temperatura y agitación constante, es decir a  $37^\circ\text{C}$  y agitación (axial, orbital o por gas) durante 3 horas. Se verifica que el pH sea de  $7.00 \pm 0.05$ , de no ser así, se ajusta con HCl concentrado o con  $\text{NaHCO}_3$ . Los filtrados se analizan mediante ICP-OES o AA-flama.

#### C11. Método PBET 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  $\mu$ 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 sustancias 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*

Se calibra el potenciómetro con los buffers de pH 4.0 y 7.0 a 37 °C. Se preparan dos soluciones, una gástrica y otra intestinal, de la misma manera que en el método PBET: La solución gástrica con 1.25 g de pepsina, 0.5 g de ácido cítrico,

0.5 g de ácido DL-málico, 410  $\mu$ L de ácido láctico y 500  $\mu$ L de ácido acético en 990 mL de agua Tipo 1 a  $37\pm 1$  °C, ajustando el pH a  $1.5\pm 0.3$  con HCl concentrado y completando el volumen a 1.0 L en matraz aforado. La solución intestinal se prepara con 1.56 g de extracto biliar y 0.46 g de pancreatina en 90 mL de agua Tipo 1.

Se sumergen los reactores en un baño de agua a  $37\pm 1$  °C Se agregan 100.0 mL de solución gástrica a cada reactor y se abre la llave general de gas argón, la cual suministra 1 L/min a cada reactor, el sistema se purga 5 min. Se adiciona 1.0 g de muestra tamizada por malla #60 con ayuda de un pequeño embudo de vidrio, y 2 gotas de antiespumante. Se verifica que el pH se mantenga en  $1.5\pm 0.3$ , ajustando de ser necesario. Tras estabilizar el pH, se mantiene en agitación 1 hora.

Se suspende la agitación y se toma una alícuota de 10 mL de muestra de cada reactor con ayuda de micropipeta o pipeta volumétrica. La alícuota se filtra mediante jeringas con un dispositivo de filtración (swinex), a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m. El filtrado se almacena en refrigeración en recipientes etiquetados de polietileno de 60 mL. Se reanuda la agitación a través de burbujeo con argón. Se aumenta el pH de la solución de cada reactor hasta  $7.0\pm 0.3$  con gotas de solución saturada de bicarbonato de sodio, en caso de exceder el pH indicado se ajusta con HCl. Una vez estabilizado el pH, se agrega una alícuota de 10.0 mL de solución intestinal a cada reactor y se tapan nuevamente.

Transcurridas 2.5 horas de agregada la solución intestinal, se mide el pH, de ser necesario se ajusta a  $7.0\pm 0.3$ . Se suspende la agitación y se toman 20.0 mL de alícuota de cada reactor con micropipeta o pipeta volumétrica y se filtra por membranas de 0.45  $\mu$ m. El filtrado se almacena en refrigeración en recipientes etiquetados de polietileno de 60 mL.

La solución sobrante de los reactores se trata como residuo. El filtrado proveniente de la fase gástrica se analiza de forma directa mediante ICP-OES o AA-flama. El filtrado proveniente de la fase intestinal se digiere con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) en microondas para evitar interferencias de matriz por los reactivos lipídicos y proteicos. Las digestiones se llevan a cabo con 7.0 mL de filtrado intestinal y 3.5 mL

de HNO<sub>3</sub> concentrado con 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 conservan 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 analizan las digestiones mediante ICP-OES o AA-flama, con base en el método de referencia EPA 6010B (1996).

C12. 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 se utilizan los equipos mencionados, con base en el método de referencia EPA 6010B (1996), usando los filtrados provenientes de cada extracción, siempre usando la respectiva curva de calibración, en los intervalos lineales del elemento correspondiente. Todos los filtrados son acidificados con ácido nítrico.