



S.E.P.

S.E.S.

Tec.N.M.

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

“EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS (Cd, Cu, Pb y Zn) ASOCIADOS A MATERIA PARTICULADA AEROTRANSPORTADA EN LA ZMVT MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA DE CULTIVO EN BOLSAS DE MUSGOS”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

PRESENTA:

I.Q. ELVIRA LOPEZ SOLORIZANO

No. CONTROL: 1028M0256

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. GUADALUPE MACEDO MIRANDA

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. PEDRO ÁVILA PÉREZ



Metepec, Méx., **19/junio/2018**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-732-/2018

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

C. ELVIRA LÓPEZ SOLÓRZANO
CANDIDATA AL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE.

De acuerdo con el Reglamento de Titulación del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica de la Subsecretaría de Educación Superior de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis titulado "EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS (Cd, Cu, Pb y Zn) ASOCIADOS A MATERIA PARTICULADA AEROTRANSPORTADA EN LA ZMVT MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA DE CULTIVO EN BOLSAS DE MUSGO" la División de Estudios de Posgrado e Investigación concede autorización para que proceda a la impresión del mismo.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE
"Educación, Integridad y Ciencia"



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación

JLGR/magj





Metepec, Méx., 07/junio/2018

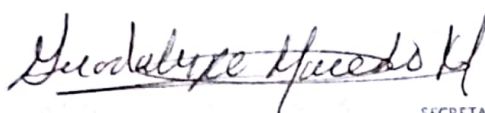
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DEPI-395-620/2018

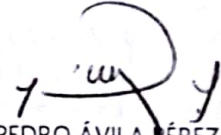
DR. JOSÉ LUIS GARCÍA RIVAS
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE.

Por este medio comunicamos a usted que la Comisión Revisora designada para analizar la tesis denominada "EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS (Cd, Cu, Pb y Zn) ASOCIADOS A MATERIA PARTICULADA AEROTRANSPORTADA EN LA ZMVT MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA DE CULTIVO EN BOLSAS DE MUSGO", que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias en Ingeniería Ambiental presenta la C. Elvira López Solórzano, con número de control 1028M0256 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad necesario para proceder a la impresión del mismo.

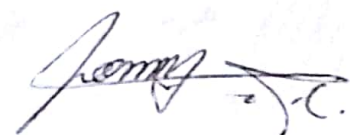
ATENTAMENTE

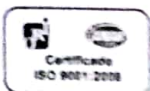

DRA. MA. GUADALUPE MACEDO MIRANDA
DIRECTORA DE TESIS


SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
TECNOLÓGICO NACIONAL
DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN


DR. PEDRO ÁVILA PÉREZ
CO-DIRECTOR DE TESIS


DR. NELSON AVONCE VERGARA
REVISOR


DR. JULIO CÉSAR GONZÁLEZ JUÁREZ
REVISOR



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Tecnológico de Toluca, por abrirme las puertas de sus instalaciones y brindarme la oportunidad de realizar la maestría aquí mismo.

Agradezco al CONACyT por las becas otorgadas para la realización de Estudios de maestría y la estancia en el extranjero.

A mis directores de tesis, Pedro y Lupita por haberme hecho participe del proyecto y confiar en mí para su realización, así como el financiamiento de las pruebas y todo el apoyo en cada decisión que se tomó. El trabajo involucrado nos correspondió a todos. El esfuerzo en cada paso llevo hasta la culminación de este proyecto. Gracias por los consejos y la oportunidad que me otorgaron para poder salir fuera del país.

A la universidad autónoma del estado de Morelos (UAEM), por el material, equipo e instalaciones prestadas, en especial al doctor Nelson Avonce por compartirme sus conocimientos sobre cultivos y estar siempre al pendiente de todo, así mismo a Fernando Plata becario de esta institución, por ser un buen compañero y apoyarme en todo lo que requerí para llevar a cabo la experimentación.

A la red automática de monitoreo atmosférico de la zona metropolitana del valle de Toluca (RAMA-ZMVT) por el apoyo semanal que me brindaron para la exposición del musgo en sus estaciones de monitoreo, en especial a los señores Rodrigo y Luis por llevarme a los recorridos y apoyarme con la elaboración de rosas de los vientos y la interpretación de los datos que proporcionan los equipos, su experiencia ha sido una enseñanza para mi formación.

A Martha Manjarrez y Verónica Albiter por su apoyo para la elaboración de los estudios de metales en el musgo, así como la esterilización del material de cultivo.

A la universidad autónoma del Estado de México-Facultad de Ciencias, en especial a la doctora Carmen Zepeda por su apoyo para la identificación del musgo y del árbol donde prevalece la especie en estudio.

Al instituto nacional de investigación nuclear (ININ) por aceptarme como becaria, en especial al maestro Alberto Cedillo Cruz, al ingeniero Ricardo Soria Juárez y al ingeniero Gerardo Nava Solares por su colaboración en la realización de las técnicas de ICP-MS.

A mis compañeras de trabajo Itzel y Lupita, que me apoyaron en el laboratorio siempre muy activas e interesadas en aprender, dándome no sólo una buena compañía si no también la experiencia de poder impartir yo mi conocimiento.

Agradezco al Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica, de la Facultad de Química de la Universidad de Barcelona, por abrirme sus puertas para poder realizar la culminación del proyecto de maestría en sus instalaciones. Especialmente al grupo de electroanálisis que me recibió para trabajar con ellos y me brindaron todo tipo de ayuda, así como todo el material que necesite.

Gracias Miquel Esteban por darme la oportunidad de realizar la estancia y ser el contacto directo para realizarla, al igual que el apoyo desde el primer día que llegué. Agradezco enorme y profundamente a Cristina Ariño por impartirme sus conocimientos y tener la paciencia necesaria para enseñarme, siempre estuviste al pie del cañón y al pendiente de los resultados que se iban presentando.

A José Manuel por instruirme en el análisis de PCA y a Nuria Serrano por enseñarme a trabajar con nuevos programas para poder presentar los resultados de una manera sencilla y entendible.

A mis compañeros de trabajo con los cuales no sólo tuve buenas pláticas de intercambio, sino que hicieron mi estancia más fácil al interactuar conocimiento: Mark, Eva y Cristina.

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico principalmente a mi familia: papá sé que no solo es una meta para mí, sino también para ti, ya que siempre nos has impulsado a ser mejores en todo lo que hagamos y arriesgarnos, sin olvidar ser humildes y agradecidos con las personas que nos apoyan. A mi mamá por escucharme y preocuparse, aunque no entendiera de lo que le hablaba. Gracias papis por confiar en mí, por dejarme volar y motivarme cuando me estresaba. A mis hermanas Eli y Rosy por soportar mis malos momentos y entusiasmarse conmigo. A mi hermano Arturo por confiar y estar al pendiente de mí. Los quiero y los amo, agradezco a Dios por brindarme una excelente familia y sobre todo servir de ejemplo para nuestras futuras generaciones.

A Diego, por estar siempre conmigo, aunque la distancia nos separó nuestro sentimiento siempre ha sido constante, una meta más para los dos. Ha sido bueno coincidir en esta etapa y poder compartir estos momentos contigo. Agradezco todo el apoyo que me has otorgado y sobre todo por impulsarme a ser mejor.

RESUMEN

La contaminación atmosférica es un problema característico de las grandes ciudades, causado principalmente por el desarrollo urbano, industrial y demográfico, que demanda el uso de bienes y servicios con la consecuente generación de emisiones contaminantes a la atmósfera. La ZMVT, integrada por 22 municipios, no escapa a esta situación, observándose actualmente aspectos preocupantes en materia de contaminación del aire. El presente trabajo describe los principales contaminantes atmosféricos y sus efectos toxicológicos sobre la salud humana y diferentes organismos, así como aborda un tema extenso sobre el uso de musgos como bioindicadores ambientales. De igual forma se describen los principios de las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica HPLC-ED, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), espectroscopia de absorción atómica (AAS), al igual que su metodología aplicada en este estudio. Se presentan los resultados, observaciones y conclusiones sobre el estudio de musgos. En el presente trabajo se evaluó la contaminación por metales pesados asociados a la materia particulada aerotransportada en la ZMVT mediante el uso de musgo *Physcomitrella patens* y *Leskea angustata* con la técnica de cultivo en bolsas en las 7 estaciones de monitoreo atmosférico (RAMA de la ZMVT) y 3 puntos fijos de contaminación: Alameda, Parque Reforma y Tollocan. La exposición de las 2 especies de musgo se realizó durante 6 meses en donde se tuvo pérdida total del musgo *Physcomitrella patens*. Los resultados demostraron que el musgo *Leskea angustata* no induce las fitoquelatinas en sus tejidos durante 6 meses de exposición. Los elementos con mayor concentración promedio en el musgo *Leskea angustata* en la ZMVT son Zn > Pb > Cu > Cd. Mientras que el grado de contaminación de los 10 sitios de exposición de estudio se dio en el siguiente orden: San Mateo > Ceboruco > Aeropuerto > Centro > San Cristóbal > Oxtotitlán > Reforma > Metepec > Tollocan > Alameda. La contaminación de estos sitios se debe principalmente a la zona industrial, al transporte vehicular, a la construcción y a los vientos. El musgo *Leskea angustata*, puede ser usado como biomonitor de la contaminación atmosférica.

ABSTRACT

Air pollution is a characteristic problem of large cities, caused mainly by urban, industrial and demographic development, which demands the use of goods and services with the consequent generation of polluting emissions into the atmosphere. The ZMVT, made up of 22 municipalities, does not escape this situation, and currently there are worrying aspects regarding air pollution. The present work describes the main atmospheric pollutants and their toxicological effects on human health and different organisms, as well as addresses an extensive topic on the use of mosses as environmental bioindicators. Likewise, the principles of high-performance liquid chromatography techniques with electrochemical detection HPLC-ED, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), atomic absorption spectroscopy (AAS), as well as their applied methodology are described in this studio. The results, discussion and conclusions about the study of mosses are presented. In the present work, the pollution by heavy metals associated with the airborne particulate matter in the ZMVT was evaluated by using moss *Physcomitrella patens* and *Leskea angustata* with the bag culture technique in the 7 atmospheric monitoring stations (RAMA of the ZMVT) and 3 fixed points of pollution: Alameda, Reforma Park and Tollocan. The exposure of the 2 species of moss was carried out during 6 months where there was total loss of the moss *Physcomitrella patens*. The results showed that the moss *Leskea angustata* does not induce phytochelatin in its tissues during 6 months of exposure. The elements with the highest average concentration in the moss *Leskea angustata* in the ZMVT are Zn > Pb > Cu > Cd. While the degree of contamination of the 10 study exposition sites occurred in the following order: San Mateo > Ceboruco > Airport > Downtown > San Cristóbal > Oxtotitlán > Reforma > Metepec > Tollocan > Alameda. The pollution of these sites is mainly due to the industrial zone, the vehicular transport, the construction and the winds. The moss *Leskea angustata*, can be used as a biomonitor of atmospheric pollution.

ÍNDICE

1.	FUNDAMENTOS	1
1.1	Zona Metropolitana del Valle de Toluca.....	1
1.2	Contaminación por metales pesados (MP).....	2
1.2.1	Fuentes de metales pesados en el ambiente.....	3
1.2.2	Toxicidad y bioacumulación de los metales pesados.....	4
1.2.3	Toxicidad del plomo.....	4
1.2.4	Toxicidad del cobre.....	5
1.2.5	Toxicidad del cadmio.....	5
1.2.6	Toxicidad de zinc.....	6
1.3	Bioindicadores.....	7
1.3.1	Biomonitores y bioacumuladores.....	7
1.3.2	Musgos como biomarcadores.....	9
1.4	Estrés en musgos.....	9
1.5	Tioles.....	10
1.5.1	Cisteína y Glutación.....	11
1.5.2	Fitoquelatinas.....	11
1.5.3	Biosíntesis de fitoquelatinas.....	12
1.6	Quelación de metales.....	14
1.7	Ciclo de vida del musgo.....	15
1.7.1	Cultivo <i>in vitro</i> de briofitas.....	16
1.7.2	Condiciones de crecimiento de musgo.....	16
1.8	Técnica bolsas de musgo.....	17
1.9	Acumulación de metales pesados en musgos.....	19
1.10	Determinación de fitoquelatinas en musgos.....	22
1.11	Técnicas instrumentales.....	23
1.11.1	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	23

1.11.2	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).....	25
1.11.3	Espectrometría de Absorción Atómica (AAS).....	26
1.12	Técnicas quimiométricas.....	27
1.12.1	Análisis por componentes principales (PCA).....	27
2.	PARTE EXPERIMENTAL	29
2.1	Cultivo en laboratorio de musgo <i>Physcomitrella patens</i>	30
2.1.1	Propagación del musgo.....	30
2.2	Muestreo de musgo <i>Leskea angustata</i>	31
2.3	Caracterización del musgo <i>Leskea angustata</i>	34
2.3.1	Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)....	34
2.3.2	Área Superficial.....	34
2.3.3	Elaboración de bolsas de musgo <i>Leskea angustata</i>	35
2.3.4	Elaboración de bolsas de musgo <i>Physcomitrella patens</i>	36
2.3.5	Exposición de bolsas de musgo.....	36
2.3.6	Retiro de bolsas de musgo.....	38
2.4	Bioensayo musgo <i>Leskea angustata</i>	38
2.4.1	Preparación de soluciones.....	39
2.4.2	Propagación de metales en el musgo.....	40
2.4.3	Limpieza y secado del musgo.....	41
2.4.4	Molienda y tamizado del musgo.....	41
2.5	Bioensayo del musgo <i>Physcomitrella patens</i>	41
2.5.1	Secado y limpieza de musgo <i>Physcomitrella patens</i>	42
2.6	Digestión acelerada de las muestras por horno de microondas y lectura de MP por AAS.....	42
2.7	Lectura de fitoquelatinas y sus isoformas.....	44
2.7.1	Reactivos y disoluciones.....	44
2.7.2	Preparación de la fase móvil.....	45
2.7.3	Intrumentación.....	45
2.7.4	Fase móvil y patrones cromatográficos.....	47

2.7.5	Electrodos de trabajo	48
2.7.6	Preparación de los extractos de musgo.....	49
2.7.7	Extracción de las fitoquelatinas y lectura de muestras.....	49
2.8	Preparación y análisis de muestras de musgo <i>Leskea agustata</i> en ICP-MS.....	50
2.8.1	Factor de acumulación relativa.....	51
2.8.2	Análisis estadístico.....	51
3.	RESULTADOS	52
3.1	Conservación del musgo.....	52
3.2	Análisis de FTIR.....	52
3.3	Análisis de área superficial.....	54
3.4	Bolsas de musgo.....	57
3.5	Seguimiento de vientos en exposición de musgos.....	61
3.6	Seguimiento de temperatura en tiempo de exposición de musgo....	64
3.7	Seguimiento de partículas PM ₁₀ y PM _{2.5}	65
3.8	Cuantificación de metales por AAS en muestras de bioensayo.....	68
3.9	Análisis de fitoquelatinas e isoformas en musgo <i>Leskea angustata</i> .	74
3.9.1	Análisis del musgo <i>Leskea angustata</i>	78
3.9.2	Análisis de PCA de HPLC líquida.....	82
3.10	Metales pesados en musgo <i>Leskea angustata</i> expuesto en ZMVT..	83
3.10.1	Análisis estadístico y PCA.....	88
	CONCLUSIONES	96
	RECOMENDACIONES	98
	FUENTES DE CONSULTA	99
	ANEXOS	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Principales componentes del medio para cultivos vegetales <i>in vitro</i>	16
Tabla 1.2	Concentraciones de metales pesados.....	20
Tabla 2.1	Muestreos realizados en temporada de lluvias.....	31
Tabla 2.2	Condiciones de operación de equipo BET.....	34
Tabla 2.3	Concentraciones de soluciones para bioensayo	40
Tabla 2.4	Longitudes de onda de lámparas usadas en AAS.....	44
Tabla 3.1	Propiedades y valores obtenidos por el método BET para el musgo <i>Leskea angustata</i>	56
Tabla 3.2	Propiedades y valores obtenidos por el método BET para el musgo <i>Physcomitrella patens</i>	57
Tabla 3.3	Pesos de material de bolsas de musgo.....	57
Tabla 3.4	Pesos de bolsas en las estaciones.....	57
Tabla 3.5	Pesos de bolsas después de exposición.....	60
Tabla 3.6	Peso de musgo <i>Leskea angustata</i> perdido durante la exposición.....	60
Tabla 3.7	Concentraciones del material de referencia Tomato Leaves.....	68
Tabla 3.8	Concentración de Zn en el musgo <i>Leskea angustata</i> después de 30 días de exposición.....	68
Tabla 3.9	Concentración de Cd en el musgo <i>Leskea angustata</i> después de 30 días de exposición.....	69
Tabla 3.10	Concentración de Cu en el musgo <i>Leskea angustata</i> después de 30 días de exposición.....	69
Tabla 3.11	Concentración de Pb en el musgo <i>Leskea angustata</i> después de 30 días de exposición.....	70
Tabla 3.12	Concentración de metales en bioensayo de musgo <i>Leskea angustata</i>	71

Tabla 3.13	Factor de acumulación del musgo <i>Leskea angustata</i>	71
Tabla 3.14	Concentración de Cd en el musgo <i>Physcomitrella patens</i>	73
Tabla 3.15	Rectas de calibración para los analitos en estudio.....	80
Tabla 3.16	Concentraciones del material de referencia Tomato Leaves.....	84
Tabla 3.17	Concentraciones del material de referencia IAEA-336.....	84
Tabla 3.18	Concentración inicial y final de Cu, Cd, Pb y Zn en musgos de la ZMVT (mg/Kg).....	85
Tabla 3.19	Concentración bioacumulable de Cu, Cd, Pb y Zn en musgos de la ZMVT (mg/Kg).....	86
Tabla 3.20	Acumulación relativa del metal en el musgo (RAF).....	86
Tabla 3.21	Prueba de normalidad Shapiro-Wilk.....	89
Tabla 3.22	Coeficientes de correlación de Spearman-Pearson.....	90
Tabla 3.23	Prueba T Cd y Cu.....	90
Tabla 3.24	Prueba de Kruskal-Wallis para Pb y Zn.....	91
Tabla 3.25	Prueba de Wilcoxon para Pb y Zn.....	92
Tabla A1	Medio de Cultivo BCD.....	107
Tabla A2	Solución de elementos traza (1000X).....	107
Tabla A3	Medio de Cultivo BCD-AT.....	108

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Mapa de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca.....	1
Figura 1.2	Climograma de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca....	2
Figura 1.3	Estructura general de una fitoquelatina.....	12
Figura 1.4	Síntesis de fitoquelatinas, modelo de localización celular de los complejos M-PC.....	13
Figura 1.5	Ciclo de vida del musgo <i>Physcomitrella patens</i>	15
Figura 1.6	Electrodos de trabajo utilizados para la detección electroquímica disponibles comercialmente.....	25
Figura 2.1	Diagrama de flujo del método.....	29
Figura 2.2	Jiffys esterilizadas.....	31
Figura 2.3	Musgo cultivado en jiffy.....	31
Figura 2.4	Mapa de las zonas de muestreo en el ININ.....	32
Figura 2.5	Cambio fisiológico en musgo.....	33
Figura 2.6	Musgo en domos.....	33
Figura 2.7	Especies mezcladas con musgo <i>Leskea angustata</i>	33
Figura 2.8	Colocación de jiffys.....	35
Figura 2.9	Método del cuarteo.....	35
Figura 2.10	Armado de bolsas de musgo.....	35
Figura 2.11	Bolsas de musgo en conservación.....	35
Figura 2.12	Elaboración de bolsas <i>Physcomitrella patens</i>	36
Figura 2.13	Puntos de exposición del musgo.....	37
Figura 2.14	Exposición de musgo <i>Leskea Angustata</i>	37
Figura 2.15	Secado de bolsas de musgo.....	38
Figura 2.16	Limpieza del musgo para bioensayo.....	39
Figura 2.17	Musgo de bioensayo en cajas de plástico.....	39
Figura 2.18	Molienda del musgo con mortero de ágata y tamizado.....	41
Figura 2.19	Bioensayo de musgo <i>Physcomitrella patens</i>	42
Figura 2.20	Pesado de las muestras.....	42
Figura 2.21	Adición de reactivos a vasos de teflón.....	43
Figura 2.22	Muestras primera digestión.....	43
Figura 2.23	Muestra con segunda digestión.....	43
Figura 2.24	Estructura de los compuestos tiólicos estudiados.....	45
Figura 2.25	Representación de todo el equipo HPLC Agilent 120.....	46
Figura 2.26	Gradiente utilizado con la fase móvil 0.1% de TFA en agua y 0.1% de TFA en ACN.....	47
Figura 2.27	Gradiente utilizado con la fase móvil 0.1% de TFA en agua y 0.1% de TFA en ACN-isoformas.....	47

Figura 2.28	Celda de flujo cruzado de acero inoxidable donde se sitúan tres electrodos.....	48
Figura 2.29	Trituración del musgo <i>Leskea angustata</i> con N ₂ líquido	49
Figura 2.30	Extracción del grupo tiol.....	50
Figura 3.1	Espectro de IR de musgo <i>Leskea angustata</i>	53
Figura 3.2	Espectro de IR de musgo <i>Physcomitrella patens</i>	54
Figura 3.3	Isoterma de adsorción-desorción de N ₂ en el musgo <i>Leskea angustata</i>	55
Figura 3.4	Modelo BET aplicado a la isoterma de adsorción del musgo <i>Leskea angustata</i>	55
Figura 3.5	Puntos de muestreo.....	59
Figura 3.6	Rosa de los vientos de estaciones de monitoreo (enero-julio 2017).....	63
Figura 3.7	Seguimiento de temperatura en las estaciones.....	65
Figura 3.8	Seguimiento de PM ₁₀ en estaciones de monitoreo.....	66
Figura 3.9	Seguimiento de PM _{2.5} en estaciones de monitoreo.....	67
Figura 3.10	Concentración de metales en bioensayo de musgo <i>Leskea angustata</i>	73
Figura 3.11	Comparación de <i>Physcomitrella patens</i> y <i>Leskea angustata</i> con Cd de 10 mg/Kg.....	74
Figura 3.12	Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo <i>Leskea angustata</i>	75
Figura 3.13	Cromatogramas superpuestos de muestra de musgo <i>Leskea angustata</i> expuesta en el laboratorio durante 30 días.....	76
Figura 3.14	Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo expuestas durante el periodo enero-julio (2017).....	77
Figura 3.15	Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo <i>Leskea angustata</i> expuestas con metales pesados (Cu, Pb, Cd y Zn) durante 30 días.....	77
Figura 3.16	Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo <i>Leskea angustata</i> expuestas durante el periodo enero-julio (2017).....	78
Figura 3.17	Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo <i>Leskea angustata</i> expuestas durante el periodo enero-julio (2017).....	79
Figura 3.18	Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo <i>Leskea angustata</i> expuestas durante el periodo enero-julio (2017).....	80

Figura 3.19	Representación de los cromatogramas superpuestos de patrones de CysGly y GSH a diferentes concentraciones utilizando el gradiente de elución.....	81
Figura 3.20	Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo <i>Leskea angustata</i> expuestas durante el enero-julio (2017) flujo de 1.2 mL/min.....	82
Figura 3.21	Gráfico de scores del análisis por PCA de los cromatogramas de musgo <i>Leskea angustata</i> expuestas durante el segundo periodo.....	83
Figura 3.22	Gráfico de concentraciones de metal en las estaciones de monitoreo.....	87
Figura 3.23	Distribución normal evaluada con la prueba de Ryan Joiner..	89
Figura 3.24	Gráfica de scores de concentración de metal.....	93
Figura 3.25	Gráfica relación de sitios de muestreo con metales.....	94
Figura 3.26	Gráfica relación de sitios de muestreo con metales sin Cd....	95
Figura A-1	Espectro de IR de musgo <i>Didymodon rigidulus</i>	108
Figura A-2	Espectro de IR de musgo <i>Brachilecium ruderale</i>	109
Figura A-3	Espectro de IR de musgo <i>Cryphaea patens</i>	109
Figura A-4	Isoterma de adsorción-desorción de N ₂ en el musgo <i>Physcomitrella patens</i>	110
Figura A-5	Modelo BET aplicado a la isoterma de adsorción del musgo <i>Physcomitrella patens</i>	110
Figura A-6	Constancia de participación en Congreso.....	111
Figura A-7	Estándar de referencia: Hojas de tomate.....	112
Figura A-8	Estándar de referencia: Liqueen IAEA-336.....	114

ABREVIATURAS

Atomic absorption spectroscopy	AAS	Espectroscopia de Absorción Atómica
	AE	Aeropuerto
	AL	Alameda
	ATP	Adenosín trifosfato
	CB	Ceboruco
	CE	Centro
Electrochemical detection	ED	Detección electroquímica
	EPA	Agencia de Protección Ambiental
Glassy carbón electrode	GCE	Electrodo de carbono vitrificado
	HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
High density lipoproteins	HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
High Molecular Weight	HMW	Alto peso molecular
High-performance liquid chromatography	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
High-performance liquid Chromatography with electrochemical detection	HPLC-ED	Cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica
Inductively coupled plasma optical emission spectrometry	ICP-OES	Espectrometría de plasma acoplado inductivamente de emisión óptica
Inductively coupled plasma mass spectrometry	ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
Instrumental neutron activation analysis	INAA	Análisis de activación instrumental neutrónica
	ININ	Instituto Nacional de Investigación Nuclear
Low molecular weight	LMW	Bajo peso molecular
Limit of detection	LD	Límite de detección
	ME	Meteppec
	MP	Metales Pesados

	MTs	Metalotioneínas
Phytochelatins	PCs	Fitoquelatinas
Principal component analysis	PCA	Análisis de componentes principales
	PCS	Fitoqueatina Sintasa
	RE	Reforma
Rare Earth Elements	REE	Elementos de Tierras Raras
Reactive oxygen species	ROS	Especies de Oxígeno Reactivo
	SC	San Cristóbal
	SM	San Mateo
	TOLL	Tollocan
Ultraviolet-visible	UV-vis	Ultravioleta-visible
Volatile organic compounds	COV	Compuestos Orgánicos Volátiles
	ZMVT	Zona Metropolitana del Valle de Toluca

Reactivos

ACN	Acetonitrilo
BCD-AT	Medio de cultivo
Cys	Cisteína
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GCS	γ -Glutamyl-Cisteína-Sintasa
GSH	Glutación (γ -GluCysGly)
MeOH	Metanol
M- PC_n	Complejo metal-fitoquelatina n (n=2-5)
NTA	Ácido Nitrilo Acético
PC_n	Fitoquelatina n (n=2-5)
TFA	Ácido trifluoracético
γGluCys	γ GlutamylCisteína

INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire es un problema que se ha incrementado en los últimos años, particularmente en los países en desarrollo debido a la creciente urbanización e industrialización. Razón por la cual han surgido distintas técnicas y métodos para evaluar el grado de contaminación existente. Para determinar la cantidad de contaminación atmosférica que se genera se recurre a realizar una serie de actividades que involucran el monitoreo y control constante de las condiciones ambientales presentes, con el propósito de no llegar a transgredir límites que atenten contra la vida humana.

El monitoreo continuo de la calidad del aire forma parte del sustento técnico para la elaboración de proyectos encaminados a la prevención y control de la contaminación atmosférica en beneficio de los habitantes. El uso de bioindicadores ambientales los cuales son una especie o grupo de especies que responden predeciblemente a perturbaciones o cambios ambientales (por ejemplo, acumuladores y organismos utilizados en bioensayos) (Gerhardt, 2002), favorecen el control de la contaminación de una manera más sencilla y económica.

Una manera de monitorear la calidad del aire es mediante el uso de briofitas (también conocidos como musgos, antocerotes y hepáticas), los cuales suelen ser tolerantes al estrés causado por perturbaciones naturales o antropogénicas (Zepeda *et al.*, 2014). Los musgos proporcionan una alternativa barata y eficaz para la identificación de zonas de riesgo con altos flujos de contaminación atmosférica con metales pesados (Harmens *et al.*, 2010). Particularmente, en los últimos 40 años, se han usado musgos trasplantados en bolsas, las llamadas "bolsas de musgo", para obtener indicaciones de las deposiciones de contaminantes inorgánicos y orgánicos, especialmente los relacionados con material particulado (Capozzi *et al.*, 2016).

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la concentración de metales pesados en los tejidos del musgo *Leskea angustata* con la técnica de cultivo en bolsa en la ZMVT y su relación con la concentración de fitoquelatinas inducidas en sus tejidos. Los objetivos específicos fueron: 1. Establecer las condiciones óptimas de crecimiento del musgo *Physcomitrella patens* en condiciones de laboratorio; 2. Preparar las muestras de musgo mediante la técnica de cultivo en bolsas y exponer el musgo (*Leskea angustata* y *Physcomitrella patens*) a la contaminación de la ZMVT; 3. Determinar la acumulación de Cd, Pb, Cu y Zn, en las muestras de musgo *Leskea angustata* y *Physcomitrella patens* expuestas; 4. Cuantificar las fitoquelatinas inducidas en el musgo *Leskea angustata* y correlacionarlas con la concentración y tipo de metal expuesto. La hipótesis planteada en este proyecto fue: el uso de la técnica de cultivo en bolsas mediante el musgo *Physcomitrella patens* y *Leskea angustata* permitirá evaluar la contaminación por metales pesados asociados a la materia particulada aerotransportada en la ZMVT.

En el primer apartado del trabajo, se resumen los fundamentos en los que se basa la investigación sobre metales pesados, biomarcadores y fitoquelatinas, así como el biomonitoreo ambiental y los principios de las técnicas que se realizaron. En el segundo apartado se describen las actividades realizadas que constituyeron la parte experimental, como el muestreo, tratamiento y exposición de las bolsas de musgo, al igual que los análisis de laboratorio. En el tercer apartado, se presentan y discuten los resultados obtenidos. Y por último se describen las conclusiones y recomendaciones obtenidas en la investigación.

1. FUNDAMENTOS

1.1 Zona Metropolitana del Valle de Toluca

La Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT) se localiza en la parte central del Estado de México (Figura 1.1), entre los paralelos 18°59'07" y 19°34'47" de latitud norte y los meridianos 99°38'22" y 99°56'13" de longitud oeste con respecto al meridiano de Greenwich, (Secretaría del Medio Ambiente del Estado de México, 2012).

La zona está conformada por 22 municipios (Almoloya de Juárez, Almoloya del Río, Atizapán, Calimaya, Capulhuac, Chapultepec, Lerma, Metepec, Mexicaltzingo, Ocoyoacac, Otzolotepec, San Antonio la Isla, San Mateo Atenco, Rayón, Temoaya, Tenango del Valle, Texcalyacac, Tianguistenco, Toluca, Xalatlaco, Xonacatlán y Zinacantepec), que corresponde al 11.9% del territorio estatal (Secretaría del Medio Ambiente del Estado de México, 2012).

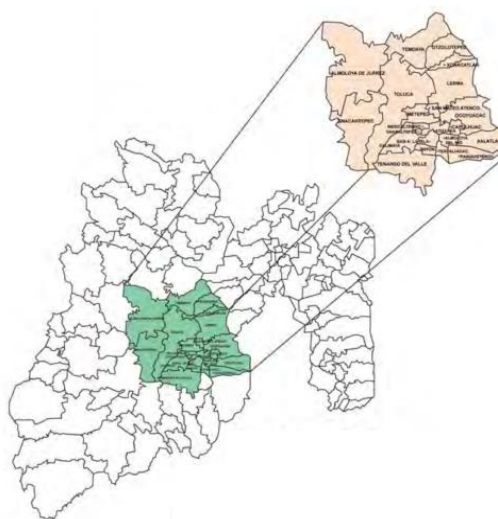


Figura 1.1 Mapa de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca

Fuente: Programa Aire Limpio (2012)

Se encuentra rodeada por grandes sierras y sistemas volcánicos individuales, entre ellos se encuentra: al suroeste, la Sierra Nevado de Toluca que funciona de manera determinante en la dinámica del viento del valle, a partir de los sistemas de baja y alta presión que se generan sobre esta región a lo largo del año; al este, la Sierra de las Cruces y Sierra de Ocoyotepec; al noreste, la Sierra de Monte Alto y al sur, la Sierra Matlazinca; además se encuentran en forma aislada algunas elevaciones, entre las

que destaca, el volcán Molcajete en la Sierra Morelos, al noreste del municipio de Toluca (ProAire, 2012).

A lo largo del año se presentan tres épocas climatológicas:

1. Época seca-fría, expresa la temperatura promedio mensual más baja durante el año y comprende los meses de noviembre a febrero (9° y 11° C).
2. Época seca-cálida, dentro de los meses de marzo a mayo se presenta un ascenso en la temperatura hasta llegar a los 15° C.
3. Época de lluvia, definida por los meses de junio a octubre (11° y 13° C), se caracteriza por la presencia de precipitaciones (160 y 210 mm). En la Figura 1.2 se representa el climograma que muestra el comportamiento de la temperatura promedio mensual y la precipitación pluvial sobre el espacio geográfico de la ZMVT (ProAire, 2012). No obstante, el crecimiento económico y desarrollo urbano del Valle de Toluca han traído consigo retos ambientales, sociales y económicos que inciden en las condiciones de vida para las generaciones actuales y futuras (Molina, 2014).

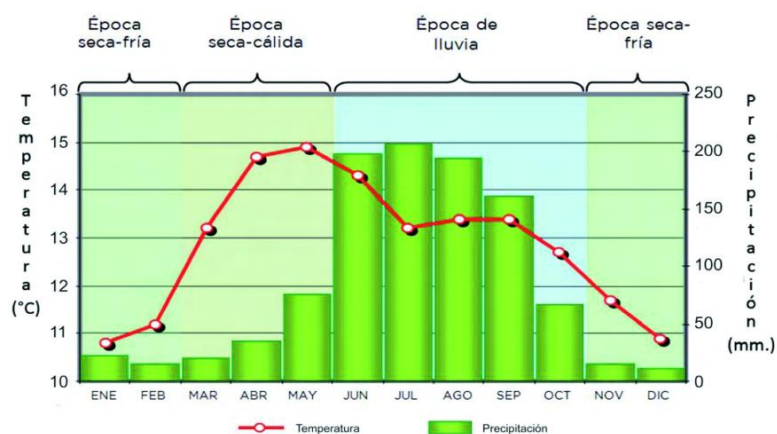


Figura 1.2 Climograma de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca

Fuente: ProAire 2012-2017

1.2 Contaminación por metales pesados (MP)

La contaminación atmosférica en las zonas urbanas e industriales representa una preocupación importante debido a los efectos negativos que causa en los seres vivos (Gerdol *et al.*, 2014). Los metales se dispersan en la atmósfera a partir de una gran

variedad de fuentes, tales como el proceso natural del ciclo biogeoquímico; contribuciones antropogénicas; industriales, agrícolas y urbanas (Caballero *et al.*, 2014). Los metales pesados son elementos naturales que tienen un alto peso atómico y una densidad al menos 5 veces mayor que la del agua (Tchounwou *et al.*, 2012), son productos químicos peligrosos ya que son tóxicos, persistentes y/o bioacumulables (Lazo, Bekteshi and Shehu, 2013). Algunos son carcinógenos, mutagénicos, teratogénicos y disruptores endocrinos, mientras que otros causan cambios neurológicos y de comportamiento, especialmente en los niños (Ali *et al.*, 2013).

Se acumulan en los organismos vivos alcanzando concentraciones mayores que la que alcanzan en los alimentos o medioambiente, estas concentraciones aumentan a medida que asciende la cadena trófica (Caballero *et al.*, 2013). Se clasifican en metales pesados esenciales los cuales son necesarios para los organismos vivos en pequeñas cantidades, ayudan a las funciones fisiológicas y bioquímicas vitales (Fe, Mn, Cu, Zn y Ni), mientras que los metales pesados no esenciales son aquellos que no son necesarios por los organismos vivos para ninguna función fisiológica y bioquímica (Cd, Pb, As, Hg y Cr) (Ali *et al.*, 2013).

1.2.1 Fuentes de metales pesados en el ambiente

Las partículas del aire urbano son ricas en metales pesados tóxicos tales como cromo, hierro, plomo y otros, que pueden ser un auténtico peligro para salud (Sawidis *et al.*, 2011). Las fuentes naturales más importantes son la meteorización de los minerales, la erosión y la actividad volcánica, mientras que las fuentes antropogénicas incluyen minería, fundición, galvanoplastia, y uso de plaguicidas, así como biosólidos en la agricultura (Ali *et al.*, 2013). El transporte es una fuente importante de contaminación del aire en zonas urbanas cuando se trata de elementos tóxicos como el plomo y, por tanto, se presta especial atención a los contaminantes emitidos por fuentes móviles (Sawidis *et al.*, 2011). La contaminación en zonas urbanas proviene de la actividad del tráfico urbano y el polvo del suelo, mientras que en zonas metalúrgicas de la actividad industrial (Viet *et al.*, 2010).

1.2.2 Toxicidad y bioacumulación de los metales pesados

La toxicidad del metal puede ocurrir debido a la sobrecarga de metales esenciales o por la exposición a metales pesados de diversas fuentes (Flora y Pachauri, 2010) y es dependiente de la propia naturaleza del metal y de su disponibilidad en el ambiente.

Se clasifican en tres categorías (Coelho, 2012) :

No tóxicos: Na, K, Mg, Ca, H, N, C, P, Fe, S, Cl, Br, F, Li, Rb, Sr, Si, Mn y Al.

Tóxicos pero muy insolubles: Ti, Hf, Zr, W, Nb, Ta, Re, Ga, Os, Rh, Ir, Ru y Ba.

Muy tóxicos: Be, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, Cr, As, Se, Te, Pd, Ag, Cd, Pt, Au, Hg, Pb y Bi.

Otro factor a tener en cuenta es el estado molecular que presente el metal.

Los metales considerados en este trabajo son el Cd, Cu, Pb y Zn, los cuales son metales considerados muy tóxicos.

1.2.3 Toxicidad del plomo

El plomo (Pb) es bien conocido por su toxicidad y efectos adversos sobre la salud humana (Kamran *et al.*, 2013). Este metal puede presentarse bajo diferentes formas químicas: Pb (0) metal, Pb (I), Pb (II) y Pb (IV). Todas ellas, con la probable excepción del Pb (I), tienen importancia en el medio ambiente (Coelho, 2012). Los órganos más sensibles al daño son el sistema nervioso central en desarrollo, sistema hematológico y cardiovascular (Nava y Méndez, 2011). Las fuentes de contaminación de plomo más usuales son: fabricación de baterías, herbicidas e insecticidas. Mientras que los efectos dañinos causan problemas en los niños, tales como inteligencia reducida, pérdida de memoria a corto plazo, problemas de aprendizaje o de coordinación, insuficiencia renal y aumento del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Ali *et al.*, 2013). El plomo se une a los componentes del grupo sulfhidrilo y amida de las enzimas, alterando su configuración química. Puede competir con cationes metálicos esenciales en sitios de unión o alterar el transporte de cationes esenciales como el calcio (Flora y Pachauri, 2010). Este metal afecta el crecimiento de las plantas,

la elongación de las raíces, la germinación de las semillas, el desarrollo de las plántulas, la transpiración, la producción de clorofila y la división celular. Sin embargo, la extensión de estos efectos varía y depende de la concentración de plomo ensayada, la duración de la exposición, la intensidad del estrés, la etapa de desarrollo de la planta y los órganos particulares estudiados (Pourrut *et al.*, 2011).

1.2.4 Toxicidad del cobre

El cobre (Cu) es maleable y dúctil, es un excelente conductor del calor y la electricidad, y su capacidad funcional se altera muy poco con la exposición al aire seco. Es un elemento esencial del metabolismo humano, debido a sus propiedades eléctricas, más del 75% del cobre que se produce se utiliza en la industria eléctrica (Nordberg *et al.*, 2001). Este metal en la forma masiva (tamaño de material particulado >1mm) no es peligroso, sin embargo, los síntomas gastrointestinales son los primeros de la alta ingesta oral de compuestos de cobre soluble. El órgano más importante para los efectos a largo plazo es el hígado. La irritación del sistema respiratorio puede ser un síntoma que ocurre después de la inhalación de los vapores, polvos o nieblas que contienen cobre (LAFARGA, 2015).

Las fuentes de contaminación son los plaguicidas y fertilizantes. Se ha reportado que los niveles elevados (>3mg/día) causan daños en el cerebro y riñón, cirrosis hepática y anemia crónica, irritación del estómago e intestino (Ali *et al.*, 2013). El cobre es capaz de inducir especies de oxígeno reactivo a través de un mecanismo de ciclo redox tipo Fenton y participa en la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica (Xu *et al.*, 2011).

1.2.5 Toxicidad del cadmio

El cadmio (Cd) es muy resistente a la corrosión y se utiliza para su electrodeposición en otro metal, especialmente el hierro (Nordberg *et al.*, 2001). Es uno de los iones metálicos más tóxicos del medio ambiente y se encuentra en el aire, alimentos y agua.

Los iones de Cd son absorbidos por la mayoría de los tejidos del cuerpo y se concentran principalmente en el hígado y los riñones, y tiene una larga vida media biológica de 11 a 20 años en humanos. El cadmio está listado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos como uno de los 126 contaminantes prioritarios (Flora y Pachauri, 2010).

El pulmón es un órgano muy susceptible a la exposición a cadmio. La inhalación crónica subaguda, puede producir bronquitis con daño progresivo alveolar, fibrosis secundaria y enfisema (Nava y Méndez, 2011). Tienen efectos carcinógenos, mutagénicos y teratógenicos; además interfieren en la regulación del calcio en sistemas biológicos; y pueden causar insuficiencia renal y anemia crónica. Sus fuentes de contaminación son: plaguicidas y conservantes de la madera, pinturas y pigmentos, los estabilizadores de plástico, la galvanoplastia, la incineración de plásticos que contienen cadmio, y los fertilizantes fosfatados (Ali *et al.*, 2013). La forma más común del cadmio es el sulfuro (CdS). Durante la erosión penetra en el medio ambiente sobre todo en forma soluble, Cd^{2+} . El pH y el potencial redox son los principales factores que controlan su movilidad. También forma especies iónicas como hidróxidos (CdOH^+ , $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$ y $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$), cloruros (CdCl^+ , CdCl_3^- , CdCl_4^{2-}) así como iones complejos con grupos amonio y cianuro, además de una variedad de complejos estables como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido nitrilotriacético (NTA). Sus iones forman compuestos insolubles de color blanco, normalmente hidratados, con carbonatos, arseniatos, fosfatos, oxalatos y ferrocianuros (Coelho, 2012). Compite con los metales esenciales para los sitios de unión a proteínas, lo que conduce a la liberación de iones Fe^{2+} y Cu^{2+} , esto provoca una mayor producción de especies de oxígeno reactivo y estrés oxidativo (Xu *et al.*, 2011).

1.2.6 Toxicidad del zinc

El zinc (Zn) es un metal muy abundante en la corteza terrestre. Según estudios realizados se ha demostrado que una persona adulta excreta entre 7 y 20 mg/L de zinc al día. La forma química bajo la que aparece en el medio ambiente es Zn (II), también

puede darse el Zn (0) y el Zn (I) (Coelho, 2012). Cuando se expone a la acción del aire, el Zn se recubre de una película de óxido que protege el metal de oxidaciones posteriores. En esta resistencia a la corrosión atmosférica reside uno de sus principales usos: la protección del acero mediante galvanización (Nordberg *et al.*, 2001).

El zinc en los organismos vivos está relacionado con sus propiedades antioxidantes, un exceso de Zn causa efectos severos en la producción de biomasa y resulta en estrés oxidativo (Xu *et al.*, 2011). La sobredosis puede causar mareos y fatiga (Ali *et al.*, 2013). Produce un riesgo significativamente mayor de cáncer avanzado de próstata, así como la inhibición de los efectos beneficiosos de los biofosfonatos, incrementa los niveles de testosterona y de colesterol, reduce los niveles de HDL (colesterol de lipoproteínas de alta densidad) y puede fomentar una disfunción inmune (Rubio *et al.*, 2007).

1.3 Bioindicadores

Los bioindicadores son organismos que manifiestan síntomas particulares en respuesta a cambios medioambientales, generalmente de manera cualitativa (Hawksworth *et al.*, 2005). Un bioindicador es sensible a la contaminación y permite estimaciones indirectas de la calidad del aire a través de sus cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos, evaluables a nivel individual, poblacional o comunitario, debido a la exposición a contaminantes (Palma, 2016).

1.3.1 Biomonitores y bioacumuladores

Un biomonitor se define como un organismo (o una parte de un organismo) que proporciona información cuantitativa o semicuantitativa de la calidad del medio ambiente. Hay dos tipos de biomonitores: los biomonitores sensibles los cuales proporcionan información sobre el ambiente que lo rodea mediante alteraciones medibles en el propio organismo (por ejemplo, morfológica, fisiológica o bioquímica),

y los acumuladores que proporcionan información después de la determinación de las concentraciones en los tejidos de los contaminantes tomadas desde el medio ambiente (Boquete *et al.*, 2011). Un bioacumulador es un organismo resistente a los contaminantes, lo que permite detectar los niveles de contaminación en la atmósfera mediante la evaluación de las concentraciones de contaminantes (por ejemplo, metales pesados, compuestos orgánicos y radionúclidos) adsorbidos o acumulados en sus tejidos (Palma, 2016).

El primer uso de biomarcadores fue atribuido a Isaakson en 1980, cuando propuso utilizar la medida del nitrógeno urinario como un marcador independiente de la medida de la ingesta de proteínas (Corella y Ordovás, 2015). La definición clásica de McCarthy y Shugart (1990), dice que son "medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante" (Cajaraville, 2010). El uso de biomarcadores permite: proporcionar rápidamente datos de contaminación, identificar áreas con riesgo real o potencial de exposición a contaminantes y evaluar la eficacia de las medidas adoptadas para reducir las emisiones contaminantes (Palma, 2016).

El biomonitoreo es una novedosa técnica de la utilización de organismos o biomateriales para examinar la calidad del aire (Kayee *et al.*, 2015). Se basa en el uso de organismos para obtener información cuantitativa y cualitativa sobre el estado del medio ambiente y su posible desviación de una condición de control normal debido a la contaminación atmosférica (Palma, 2016). Este método es comúnmente utilizado por los investigadores debido a su facilidad de muestreo y no requiere equipo costoso para el muestreo (Arshad *et al.*, 2016). Representa la ocurrencia de los contaminantes sobre la base de síntomas específicos, reacciones, cambios morfológicos o concentración (Bekteshi *et al.*, 2014). El método se ha desarrollado en las últimas décadas para el monitoreo de contaminantes peligrosos tales como metales pesados (Demková *et al.*, 2016).

Debe tenerse en cuenta, para que un organismo pueda ser clasificado como un "buen biomonitor", no sólo es esencial que el organismo puede capturar elementos del medio, sino también que una simple relación lineal se mantenga entre la concentración de contaminantes a los que está expuesto y la concentración de contaminantes en el organismo (Boquete *et al.*, 2011). Los indicadores biológicos deben ser comunes, resistentes, disponibles en cualquier época del año y adaptables a la zona de estudio, acumular contaminantes de la misma forma y en el mismo grado bajo condiciones diferentes y la medición de los contaminantes debe ser sencilla (Caballero *et al.*, 2013).

1.3.2 Musgos como biomarcadores

Los musgos son plantas pequeñas que carecen de tejido vascular o leñoso. Requieren de un ambiente temporalmente saturado de agua para completar su ciclo de vida (Conabio, 2009). Se utilizan como biomarcadores de la contaminación del aire porque son altamente dependientes de las fuentes atmosféricas de nutrientes y absorben elementos a través de toda su superficie (Basile *et al.*, 2012; Andrzej *et al.*, 2012). Obtienen nutrientes directamente de la precipitación y el depósito seco, y tienen una gran superficie en contacto con la atmósfera y la capacidad de acumular elementos en altas concentraciones (Caballero *et al.*, 2014; Gribacheva *et al.*, 2016). Se utilizan para evaluar los niveles de contaminación atmosférica ya que recogen los nutrientes de la atmósfera y la deposición de muchos elementos traza (Fernández *et al.*, 2015; Arshad *et al.*, 2016). Las hojas de musgo son unicelulares, por lo que se exponen en todas las direcciones para capturar el nutriente (Bekteshi *et al.*, 2014). El biomonitoreo es una alternativa simple y rentable para monitorear la calidad del aire, especialmente en los lugares donde la presencia de musgo nativo es limitada o ausente (Demková *et al.*, 2016).

1.4 Estrés en musgos

Los metales pesados causan estrés oxidativo por la formación de radicales libres. El estrés oxidativo se refiere a la generación aumentada de especies de oxígeno reactivo

(ROS), que puede sobrecargar las defensas antioxidantes intrínsecas de las células y puede conducir al daño celular o la muerte (Ali *et al.*, 2013). Algunos metales pesados como el Cu son esenciales para el crecimiento de las plantas y los componentes importantes de muchas enzimas de importancia metabólica. Sin embargo, los problemas surgen cuando las células se enfrentan con un exceso de estos iones vitales o con iones no nutricionales que los conducen a un daño. El estrés causa que los musgos se sequen, y cuando están secos, los tejidos muertos son frágiles y susceptibles a la pérdida de material durante exposiciones prolongadas (Lazo *et al.*, 2013).

El objetivo de la eliminación de los factores de estrés ambiental es permitir una clara identificación de las relaciones entre las concentraciones de algunos contaminantes en los tejidos de musgo y sus efectos sobre diferentes variables fisiológicas (Ares *et al.*, 2012). Sobre el estrés de metales pesados, las plantas exhiben mecanismos diferentes para unir el metal pesado (Esposito *et al.*, 2012).

1.5 Tioles

Como se ha mencionado antes, en el medio ambiente y en los organismos vivos los metales pesados se asocian con diferentes sustancias, formando complejos estables, igual que los oligoelementos presentes en los organismos forman complejos con las enzimas, las proteínas y otras sustancias. Entre todos los grupos funcionales responsables de la asociación de metales destaca el grupo tiol (-SH), que es muy activo en las células, reacciona específica y cuantitativamente con muchos compuestos, entre ellos una gran variedad de iones metálicos. Los iones metálicos que suelen formar sulfuros estables (incluso en presencia de ácidos) también forman complejos estables de baja solubilidad. Los metales como Fe, Mo, Co o Zn forman complejos menos estables con el grupo SH, pero se enlazan con los grupos amino o carboxílico, y de esta manera pueden formar quelatos donde el anillo proporciona una estabilidad extra al enlace S-metal (Coelho, 2012).

1.5.1 Cisteína y Glutati3n

La cisteína (Cys) es uno de los veinte aminoácidos que utilizan las células para sintetizar las proteínas. A pesar de su abundancia en la forma enlazada, sólo una baja fracción de Cys libre está presente en las células o en los flujos extracelulares. Las excepciones se producen en algunas enfermedades metabólicas (cistinosis y cistinuria) donde el disulfuro cistina se acumula en los tejidos o se excreta en cantidades anormales (Coelho, 2012).

El glutati3n (GSH) es un tiol tripeptídico que contiene azufre (γ -glutamato-cisteína-glicina) y es un precursor para la síntesis de fitoquelatinas (Srivastava, 2016). Puede actuar como un quelante de metal a través de sus grupos tiol, que tienen afinidad de unión metálica alta. Juega un papel importante en la desintoxicación de metales pesados y metal inducido por la respuesta de estrés oxidativo (Aarts y Lin, 2012). Está presente en eucariotas, sirve de funciones fisiológicas incluyendo regulación redox, conjugación de metabolitos y detoxificación de xenobióticos. Sin embargo, con la aparición de tensiones ambientales, incluyendo los metales pesados, desempeña un papel vital en la protección de las plantas, esto se debe a su papel como un antioxidante (Anjali, 2012).

1.5.2 Fitoquelatinas

Las fitoquelatinas (PCs) son pequeños péptidos sintetizados enzimáticamente en el interior de las células, derivados del glutati3n, que unen metales y son parte principal del sistema de desintoxicación de metales en las plantas. Tienen la estructura general de (c-glutamilcisteinil)_n-glicina donde $n=2-11$. Son producidas por la enzima fitoquelatina sintasa (PCS). La modificación o sobreexpresi3n de GSH y el gen PCS tiene un potencial significativo para aumentar la acumulaci3n de metales pesados y la tolerancia en las plantas (Srivastava, 2016). La Figura 1.3 muestra la estructura general de las fitoquelatinas.

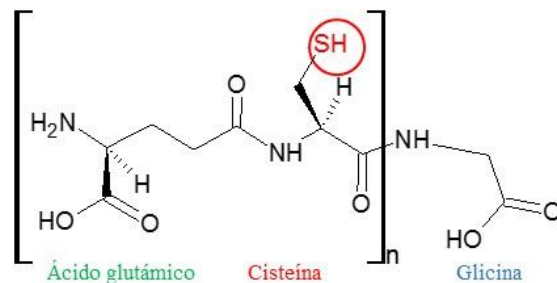


Figura 1.3 Estructura general de una fitoquelatina

1.5.3 Biosíntesis de fitoquelatinas

El principal mecanismo de las plantas para combatir la toxicidad del metal es la síntesis de fitoquelatinas (Dago *et al.*, 2014). El mecanismo catalítico de síntesis de PCs por la PCS es un mecanismo de sustitución enzimática en que la enzima presenta dos sitios de unión y acilación de los sustratos: uno de alta y otro de baja afinidad por el glutatión (GSH) (Coelho, 2012). El GSH es el sustrato para la biosíntesis de PCs. Se ha informado que las PCs no sólo tienen una alta capacidad de unión a metal sino también una fuerte actividad de barrido contra especies reactivas de oxígeno (ROS). Por lo tanto, la tolerancia y la acumulación de metales pesados tóxicos en las plantas (Srivastava, 2016).

La síntesis del glutatión es producida a partir de tres péptidos por vía secuencial mediante dos enzimas y con la aportación de energía de moléculas de ATP (Figura 1.4). La primera enzima γ -glutamylcisteína sintetasa (GCS), cataliza la formación de los enlaces poco habituales entre el grupo γ -carboxil del ácido glutámico y el grupo α -amino de la cisteína (Figura 1.4a). El glutatión sintetasa (GS) cataliza el segundo paso combinando la γ GluCys con una Gly para formar una molécula de γ GluCysGly (Figura 1.4b) (Dago *et al.*, 2011).

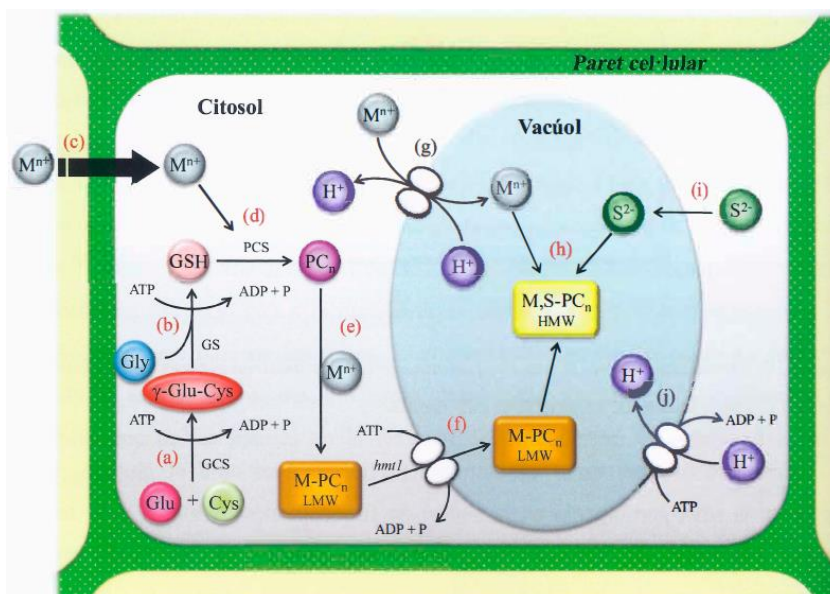


Figura 1.4 Síntesis de fitoquelatinas, modelo de localización celular de los complejos M-PC y resumen del mecanismo de transporte asociado (Dago *et al.*, 2014)

La fitoquelatina sintasa (PCS), es la enzima encargado de sintetizar fitoquelatinas a partir del glutatión transfiriendo una unidad γ GluCys de un donador a un aceptor (Figura 1.4d). La reacción involucra la transpeptidación de la unidad γ GluCys del GSH a una segunda molécula de GSH para formar la $(\gamma$ GluCys)₂-Gly (PC₂), o a una molécula de $(\gamma$ GluCys)_n-Gly (PC_n) para formar un oligomero n+1. La síntesis de fitoquelatinas es activada por la presencia de metales pesados en el citosol de la célula (Figura 1.4b). Se sintetizan en el citosol, uniéndose con los metales formando complejos (Figura 1.4e). La principal función de las PCs es la complejación de algunos metales pesados, se diferencian por su peso molecular, los de alto peso molecular (HMW) que proporcionan más estabilidad y la posibilidad de enlazar más iones metálicos los complejos de bajo peso molecular (LMW) (Dago *et al.*, 2014).

La proteína *hmt1* es capaz de transportar eficazmente los compuestos M-PC LMW al interior de las vacuolas a través de la membrana vacuolar en un proceso dependiente del ATP (Figura 1.4f). Los iones de metal libre, entran en las vacuolas mediante un puerto M^{n+}/H^+ (Figura 1.4g) y son añadidos al complejo LMW, junto con los sulfuros, para formar un complejo HMW (Figura 1.4h). Estos complejos ricos en iones sulfuro

son más estables en el medio ácido de las vacuolas y tienen más capacidad de enlazar iones metálicos para moléculas que no pasan los complejos LMW. Las fuentes de sulfuro (Figura 1.4i) se atribuyen al metabolismo de la cisteína. Para contrarrestar la entrada de iones sulfuro, se genera un gradiente de protones a través de la membrana vacuolar (Figura 1.4j) (Dago *et al.*, 2014).

1.6 Quelación de metales

La quelación es una de las funciones químicas que tienen lugar en el interior de casi todos los organismos vivos. Es un proceso por el cual las plantas y los animales captan metales (Srivastava y Goyal, 2010). Tiene su origen en la palabra griega *chele* que significa garra de langosta, representando así el concepto de aferrarse o sostenerse con un fuerte agarre (Flora y Pachauri, 2010; Srivastava y Goyal, 2010). El enlace formado entre el metal y el agente quelante es de naturaleza coordinada que es generalmente similar al tipo covalente, el compuesto resultante se denomina complejo metálico o compuesto coordinado (Srivastava y Goyal, 2010). Los metales de estado de oxidación mayor a uno (es decir, una carga de +2 o más) están predominantemente unidos en los tejidos por enlaces iónicos (en minerales esqueléticos) o de coordinación (por ejemplo, unidos a albúmina, enzimas, péptidos pequeños y aminoácidos como cisteína, metionina y selenometionina) (Sears, 2013). Principalmente átomos como S, N y O funcionan como átomos de ligando en forma de grupos químicos como -SH, -S-S, -NH₂, =NH, -OH, -OPO₃H, o >C=O (Flora y Pachauri, 2010).

Los agentes quelantes son de gran importancia en el tratamiento de las intoxicaciones y la sobrecarga de metales (Aaseth *et al.*, 2015). Generalmente contienen más de un grupo funcional, a fin de proporcionar una "garra" química para quelar el metal tóxico (Srivastava y Goyal, 2010). En el ambiente biológico, los cationes metálicos Na⁺, Mg²⁺, Cu⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺ y especialmente los metales de transición como Mn, Fe y Co están involucrados en la formación de complejos (Flora y Pachauri, 2010). La clorofila, materia verde de las plantas, es un quelato de magnesio (Srivastava y Goyal, 2010). Un agente quelante que forma un complejo estable con un metal tóxico puede proteger

los organismos biológicos del ion metálico, reduciendo así la toxicidad local. Los ligandos preferidos para iones suaves tales como Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} y As^{3+} son tiolatos y aminas (Flora y Pachauri, 2010).

1.7 Ciclo de vida del musgo

Como todas las plantas terrestres, el ciclo de vida de musgo se compone de una generación gametofito haploide multicelular que alterna con una generación esporofito diploide morfológicamente distinto. Pero a diferencia de las plantas vasculares, el gametofito es la parte dominante del ciclo de vida del musgo (Cove, 2005). En la Figura 1.5 se muestran las etapas del ciclo de vida del musgo *Physcomitrella patens*, la etapa protonema en algunas especies es transitoria y está ausente en unos pocos. Las células especializadas con un papel en la propagación son producidas en la fase protonémica de muchas especies de musgos (Cove *et al.*, 2006). Los gametos masculinos o espermatozoides, se producen en anteridios y son móviles, con flagelos, mientras que los gametos femeninos se producen en arquegonios. Una condición húmeda es esencial para permitir la movilidad de espermatozoides. El cigoto fertilizado se desarrolla en un esporofito que consiste en una seta corta que lleva una cápsula de esporas, que, cuando madura, contiene aproximadamente 4,000 esporas (Cove, 2005).

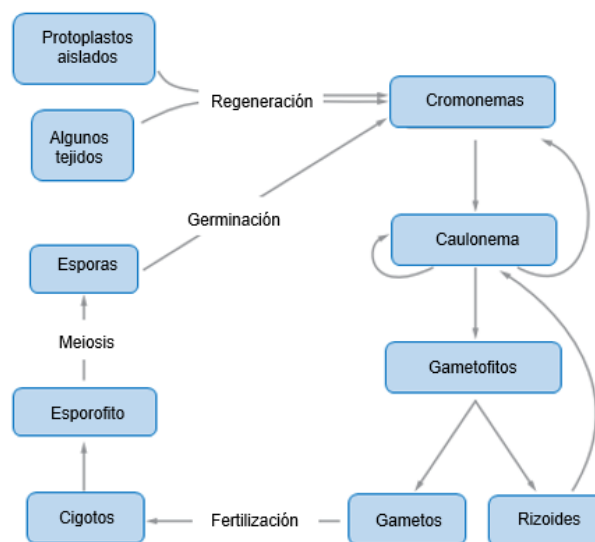


Figura 1.5 Ciclo de vida del musgo *Physcomitrella patens*

1.7.1 Cultivo *in vitro* de briófitas

Los musgos están involucrados en el ciclo de los nutrientes, la regulación del flujo de agua y el almacenamiento de carbono. En comparación con muchas plantas vasculares, los briofitas son relativamente fáciles de cultivar (Rowntree *et al.*, 2011).

Los cultivos *in vitro* de briofitas suelen crecer foto autotróficamente. Por lo tanto, la fisiología vegetal y el desarrollo *in vitro* es probablemente bastante similar en comparación con la planta en su medio ambiente natural (Hohe y Reski, 2005). En la Tabla 1.1 se observan los principales componentes del medio para cultivos vegetales *in vitro* (Badillo *et al.*, 2009).

Tabla 1.1 Principales componentes del medio para cultivos vegetales *in vitro*.

Componentes	Características
Fuente de carbono	Generalmente, la mayoría de los cultivos de células vegetales no son autótrofos y por lo tanto dependen completamente de una fuente externa de carbono. En muchos casos, se prefiere sacarosa, y ocasionalmente glucosa (cultivos de algodón) o maltosa (cultivo de anteras).
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I) en proporciones adecuadas.
Vitaminas	Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Hormonas reguladoras del crecimiento	Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, en ocasiones, inhiben la embriogénesis. Citocininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales. Otras: giberelinas, ácido absícico, etileno.

1.7.2 Condiciones de crecimiento de musgo

Las temperaturas entre 24 °C y 26 °C se utilizan para el cultivo, aunque poca diferencia en la tasa de crecimiento se observa desde 20 °C a 26 °C. Para el cultivo se utiliza luz continua de tubos fluorescentes con una intensidad de entre 5 y 20 W/m² es en general satisfactorio. Muchos laboratorios utilizan la luz intermitente, más comúnmente de 8 h de oscuridad a 16 h

de luz (Cove, 2005). Las condiciones de crecimiento normales varían entre los diferentes laboratorios en términos de temperatura (20-25 °C), flujo de luz (50-100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) y la luz / régimen oscuro (Beike *et al.*, 2010).

1.8 Técnica bolsas de musgo

En las zonas urbanas, donde los musgos que crecen de forma natural a menudo son escasos o ausentes, el biomonitoreo se realiza utilizando la "técnica de bolsas" la cual ha sido desarrollada con el fin de evaluar la contaminación del aire urbano (Aničić *et al.*, 2009). La técnica de la bolsa de musgo es el método aplicado para el monitoreo activo de oligoelementos aerotransportados en ambientes urbanos e industriales (Capozzi *et al.*, 2016). La técnica del análisis de musgo proporciona una medida sustitutiva, integrada en el tiempo de los patrones espaciales de deposición de metales pesados de la atmósfera a los sistemas terrestres (Aboal *et al.*, 2010). La riqueza de musgos epífitos de la ZMVT es de 41 especies y variedades incluidas en 16 familias: la familia Pottiaceae es la más numerosa y frecuente. Las colonias de musgos epífitos están representadas en orden de importancia por *Syntrichia amphidiacea*, *Leskea angustata*, *Syntrichia fragilis*, *Syntrichia pagorum* y *Fabronia ciliaris*, siendo las especies con mayor peso ecológico (Zepeda *et al.*, 2014).

Ares *et al.* (2012), realizaron una revisión de artículos científicos de biomonitoreo con bolsas de musgo en el cual se indica que la composición del material de red de malla se especifica normalmente (91%), y es por lo general un tipo de plástico, tal como nylon (71%), polipropileno (5%), polietileno (3%) o plástico no especificado (17%). La selección del tamaño de malla puede conducir a la pérdida de grandes cantidades de musgo como resultado de la acción del viento sobre las bolsas de malla. Aunque se utiliza una amplia variedad de formas de bolsas de musgo, estos pueden agruparse en tres categorías: las bolsas de musgo esféricas, las bolsas de musgo planas, cuadradas o rectangulares, y las bolsas de musgo cilíndrica.

Vuković *et al.* (2015), examinaron el nivel de contaminantes atmosféricos: 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP) y 41 elementos principales,

oligoelementos y elementos de tierras raras (REE) utilizando la técnica de bolsa de musgo *Sphagnum girgensohnii*. La elaboración de las bolsas de musgo consistió en 1.5 g de musgo en una bolsa aproximada de 7 x 7 cm² con tamaño de malla de 2 mm. La altura de las bolsas se colocó de 3-4 m y fueron 22 sitios de exposición (3 bolsas por cada punto). Las bolsas estuvieron expuestas durante 2 meses. Se tuvo pérdida de material de 1 a 2 bolsas en 6 sitios de muestreo. Como resultado observaron concentraciones marcadamente más altas de todos los HAP, Sb, Cu, V, Ni y Zn en el musgo expuesto en comparación con los valores iniciales. El biomonitoreo de bolsas de musgo aplicado demostró que el sistema de calefacción residencial es un contribuyente significativo a la contaminación del aire durante la temporada de invierno.

Ares *et al.* (2015), realizaron un estudio de la correlación entre las concentraciones de elementos traza (Cd, Cu, Hg, Pb y Zn) en bolsas de musgo desvitalizadas (*Sphagnum denticulatum*) y la deposición durante 12 períodos de exposición en 21 sitios de muestreo (SS) afectados por diferentes grados de contaminación. Las bolsas fueron preparadas con 2.5 mg de musgo por cm², el musgo se secó a 120°C durante 24 horas y las bolsas se almacenaron a -20°C hasta su uso. Fueron 21 sitios de muestreo y la altura de exposición de las bolsas fue de 2.5 m. La mayoría de las correlaciones significativas involucraron Cd y en menor medida Cu y Zn; sin embargo, no encontraron correlaciones significativas para Pb y Hg. Concluyeron que las condiciones ambientales y particularmente la abundancia de precipitación son las causas principales de la ausencia de correlaciones en algunos casos, presumiblemente debido a la pérdida de elementos a través del lavado.

Capozzi *et al.* (2016), realizaron un estudio sobre la exposición de las bolsas de musgo en cuanto a las características de las bolsas (forma de las bolsas, superficie), la duración y la altura de la exposición comparando bolsas de musgo tradicionales con una bolsa de concepto nueva, "Mossphere (esfera de musgo)". La captación de metal desde el aire fue evaluada en 3 zonas: urbana, industrial y agrícola. Los resultados evidenciaron que la forma, el tamaño de malla de las bolsas y la altura de exposición

(en los rangos probados: 4, 7 y 10 m), no influyeron significativamente en la capacidad de captación del musgo trasplantado. Los aspectos que más afectan a la absorción de los elementos fueron representados por la densidad del musgo dentro de las bolsas y la relación entre su peso y la superficie de la bolsa. Encontraron que cuanto menor es la densidad, mayor es la captación registrada.

Capozzi *et al.* (2017), realizaron una comparación directa de la acumulación de metal entre las bolsas llenas con musgo clon de *Sphagnum palustre* L. y con *Pseudoscleropodium purum* nativo. La prueba se realizó en 10 sitios con diferentes niveles de contaminación atmosférica seleccionados en áreas urbanas, industriales, y agrícolas. Se prepararon Mosspheres (forma esférica, proporción de peso de musgo / superficie de bolsa de 10 mg/cm², tamaño de malla de 2 mm, \varnothing ~ 11 cm) con 3 g de musgo desvitalizado. La exposición se realizó por 6 semanas durante primavera del 2014 a 4 metros de altura. Entre los 18 elementos investigados, *S. palustre* se enriqueció significativamente en 10 elementos (Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Sr, V y Zn), mientras que *P. purum* se enriqueció sólo en 6 elementos (Al, Ba, Cu, Hg, Pb y Sr). El excelente rendimiento de captación del clon de *S. palustre* comparado con el *P. purum* nativo y su bajo contenido elemental basal y estable, son características clave para la mejora del enfoque de la bolsa de musgo y su aplicación a gran escala.

1.9 Acumulación de metales pesados en musgos

Los musgos son organismos capaces de absorber metales pesados como Cd, Co, Cu, Cr, Pb, V y Zn. Por esa razón, se han utilizado ampliamente como un bioindicador para la evaluación de la calidad del aire (Kayee *et al.*, 2015). Las técnicas con uso de musgos se han aplicado para medir los niveles de metales pesados y tendencias dentro de las zonas urbanas e industriales. Estos estudios permiten analizar las tendencias temporales y/o espaciales de deposición de metales pesados, y los resultados se expresan como gradientes de contaminación (Lazo *et al.*, 2013).

Ite *et al.* (2014), investigaron sobre la deposición atmosférica de algunos metales pesados en líquenes y musgos. Las concentraciones de metales pesados en las muestras de líquenes y musgos cuantificadas se muestran en la Tabla 1.2. La significación estadística de las correlaciones entre las concentraciones de Mn-Zn, Cu-Pb, Cu-Zn, Pb-Ni son debido a fuentes antropogénicas: emisiones del tráfico vehicular, la combustión de combustibles fósiles, la eliminación de residuos sólidos y otras actividades antropogénicas locales.

Tabla 1.2 Concentraciones de metales pesados (Ite *et al.*, 2014)

Elemento	Concentración (µg/g)	Elemento	Concentración (µg/g)
Cd	0.001 – 0.092	Mn	10.530 – 153.320
Cr	0.004 – 8.793	Ni	1.425 – 21.730
Co	0.989 – 1.950	Pb	0.001 – 17.380
Cu	2.350 – 110.760	Zn	23.530 – 130.600

Zarazúa *et al.* (2013), evaluaron la deposición atmosférica de metales pesados mediante el género epífita del musgo *Fabronia ciliaris* precedente en seis sitios urbanos. Los resultados mostraron la disminución media de concentración de metal en el siguiente orden: Fe (8207 mg/Kg) > Ca (7315 mg/Kg) > K (3842 mg/Kg) > Ti (387 mg/Kg) > Mg, Zn (191 mg/Kg) > Sr (71 mg/Kg) > Pb (59 mg/Kg) > Cu, V (32 mg/Kg) > Cr (24 mg/Kg) > Rb (13 mg/Kg) > Ni (10 mg/Kg). Los factores de enriquecimiento mostraron un alto grado de enriquecimiento para Cr, Cu, Zn, y Pb lo cual proporciona una evidencia del impacto antropogénico en las zonas industriales y urbanas, principalmente debido al tráfico vehicular intenso y la quema de combustibles fósiles.

Caballero *et al.* (2014), compararon la espectrometría de plasma acoplado inductivamente de emisión óptica (ICP-OES) y espectrometría de fluorescencia de reflexión total de rayos X (TXRF) para la determinación simultánea de contenido de metales (Cr, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn) en musgos de la Área Metropolitana del Valle de Toluca en los musgos epífitos (*Fabronia ciliaris* y *Leskea angustata*). Los resultados

estadísticos no mostraron valores significativamente diferentes para Cu, Mn, Pb y Zn. Los resultados promedio de Cr (30.3 ± 11.4 mg/Kg para ICP-OES y 18.6 ± 9.8 mg/Kg para TXRF) y los valores de Fe (10.810 ± 2.980 mg/Kg en el caso ICP-OES y 8.380 ± 2.350 mg/Kg para TXRF) fueron significativamente diferentes en ambos métodos.

Mejía *et al.* (2015), realizaron un estudio de vigilancia ambiental en diferentes sitios de muestreo desde el Área Metropolitana del Valle de Toluca (AMVT) usando musgos (*Leskea angustata* y *Fabronia ciliaris*) en muestras de suelo. Las muestras de musgos epífitos en suelos se tomaron en dos períodos del año: estación lluviosa y seca-fría. Las muestras se analizaron para determinar As, Cr, Hg, y Se, también se detectaron Cs, Co, Sc, Sb, Rb, Ce, La, Eu y Yb. El análisis estadístico se llevó a cabo con los componentes principales y métodos de análisis de clúster; este reveló que existe una buena correlación entre el contenido de metal en musgos y el grado de contaminación en las áreas muestreadas. Los resultados obtenidos en musgos mostraron que las concentraciones de As, Cr, Co, Cs, Rb, Ce, La, y Yb aumentaron con respecto a las concentraciones obtenidas durante la primera toma de muestras, mientras que las concentraciones de Se, Sc, Sb y Eu, se redujeron.

Macedo *et al.* (2016), realizaron un estudio de biomonitorio ambiental con los musgos *Fabronia ciliaris* y *Leskea angustata* en 11 sitios del área metropolitana del valle de Toluca AMVT, México, para establecer la deposición atmosférica de metales pesados (Zn, Pb, Cr y Cd). Los resultados mostraron las concentraciones medias de metal en los musgos en el orden de: Zn > Pb > Cr > Cd. Las capacidades de concentración de metales pesados fueron mayores en *Fabronia ciliaris* que en *Leskea angustata*. Las concentraciones más bajas de metales pesados presentes en los tejidos del musgo corresponden a áreas no contaminadas, mientras que las medias de metales pesados en los musgos están presentes en el orden siguiente: Zn > Pb > Cr > Cd, y las más altas se presentan en zonas urbanas. Las concentraciones más altas de metales pesados en los sitios urbanos están relacionadas con el alto tráfico vehicular y la emisión de contaminantes industriales.

1.10 Determinación de fitoquelatinas en musgos

Para determinar la cantidad de fitoquelatinas en musgos es necesario utilizar técnicas analíticas muy sensibles. Entre los métodos de detección más comunes están la espectroscopia de UV-visible, la espectroscopia de fluorescencia y la espectroscopia de masas, aunque la utilización de detección electroanalítica aparece como una opción muy competitiva. El uso de detección electroquímica toma la ventaja del carácter electroactivo de los compuestos tiólicos, los límites de detección bajos ($\mu\text{mol/L}$) que estas técnicas pueden proporcionar y la conveniencia económica de este detector en comparación con otros sistemas (Dago *et al.*, 2009). Entre los detectores electroquímicos, los amperométricos, son en los que se registra la intensidad al aplicar un potencial constante. La intensidad registrada es proporcional a la cantidad de analito que se oxida o reduce en la superficie del electrodo. En el presente trabajo se ha aplicado esta metodología al estudio de musgos y se ha determinado las fitoquelatinas, y algunas de sus isoformas.

1.11 TÉCNICAS INSTRUMENTALES

1.11.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (o cromatografía líquida de alta presión, HPLC) es una forma específica de cromatografía en columna generalmente utilizada para separar, identificar y cuantificar los compuestos activos. HPLC utiliza principalmente una columna que contiene material de relleno (fase estacionaria), una bomba que mueve las fases móviles a través de la columna, y un detector que muestra los tiempos de retención de las moléculas. La muestra a analizar se introduce en un volumen pequeño al flujo de la fase móvil y se retarda mediante interacciones químicas o físicas específicas con la fase estacionaria. Los solventes comunes usados incluyen cualquier combinación miscible de agua o líquidos orgánicos (los más comunes son metanol y acetonitrilo) (Malviya *et al.*, 2010).

La voltamperometría abarca un grupo de métodos electroanalíticos en los que la información sobre el analito se deduce de la medida de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización de un electrodo indicador, o de trabajo. Esta medida se realiza con un consumo mínimo de analito (Coelho, 2012). La propiedad analítica fundamental que caracteriza los detectores amperométricos es su elevada sensibilidad que va acompañada de una relativa sencillez y economía (Horakova *et al.*, 2016). En estos detectores, todos los compuestos susceptibles de oxidarse o reducirse (electroreactivos) pueden, principalmente, ser analizados. La intensidad registrada es proporcional a la cantidad de analito que se oxida o reduce en la superficie del electrodo y es proporcional a la concentración de la sustancia electroactiva en la disolución. El paso de cada sustancia electroactiva por el detector provoca una variación de la intensidad y se representa su variación con el tiempo, obteniéndose los cromatogramas. Si se compara la intensidad del pico de la sustancia con la obtenida por patrones, es posible determinar la concentración de estas sustancias electroactivas. La intensidad generada depende tanto de la concentración del analito como del potencial aplicado, ya que cada sustancia tiene un potencial característico de óxido-reducción y una

determinada cinética electródica, por lo que la adecuada selección del potencial aplicado es muy importante (Dago *et al.*, 2009). El detector utiliza un potenciostato que suministra el potencial a la celda electroquímica que consta de tres electrodos: electrodo de trabajo, de referencia y auxiliar (Wang, 2004). Las principales características que ha de tener una celda para obtener una respuesta electródica reproducible son: un bajo volumen muerto, una hidrodinámica bien definida, una elevada velocidad de transferencia de materia, una elevada relación señal/ruido un diseño robusto y un fácil mantenimiento (generalmente pulir el electrodo) (Dago *et al.*, 2011). La reacción redox es inducida en el electrodo de trabajo, mientras que el electrodo auxiliar suministra la carga de neutralización complementaria. En este estudio, la reacción que tiene lugar en el electrodo de trabajo es la oxidación del grupo tiol.

Los materiales de los electrodos de trabajo comúnmente más utilizados son de platino, el oro, el carbono y el mercurio (López y Galán, 2013). El platino presenta una buena inercia electroquímica y una facilidad de fabricación en muchas formas, una de sus desventajas además de su alto costo, es que la presencia de pequeñas cantidades de agua o de ácido en el electrolito conduce a una reducción de iones hidrogeno para formar hidrogeno gas a potenciales poco negativos. Los electrodos de oro se comportan de manera similar al platino, pero tienen una utilidad limitada en el rango de potencial a causa de la oxidación de su superficie (Dago *et al.*, 2014). Los electrodos de carbono permiten trabajar a potenciales más negativos que el platino o el oro, así como una buena carga de potenciales anódicos. La forma más común del electrodo de carbono es el carbono vitrificado, que es relativamente caro y difícil de mecanizar. Los electrodos de gotas de mercurio en el que se forman gotas y caen varias veces durante una lectura voltamperométrica permite trabajar con una superficie nueva cada cierto tiempo, son los que se utilizan en las medidas polarográficas, o el de gota colgante que utiliza una única gota para todo el barrido de potencial que permite hacer medidas voltamperométricas. Estos electrodos se caracterizan por tener una amplia zona de trabajo a potenciales negativos. Un buen material electródico capaz de sustituir al mercurio y ampliamente utilizado es el bismuto, presenta un rango de potenciales de

trabajo comparable al electrodo de mercurio, pero con la ventaja que es más amigable con el medio ambiente (Dago *et al.*, 2011). Las superficies electroquímicamente activas reales en los electrodos de trabajo son los "puntos" localizados centralmente en el bloque de electrodo de trabajo, tal como se ilustra a continuación Figura 1.6.



Figura 1.6 Electrodo de trabajo utilizados para la detección electroquímica disponibles comercialmente

1.11.2 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La ICP-MS proporciona información multielemental en una gran variedad de muestras. El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización a presión atmosférica que junto a un espectrómetro de masas (MS) a vacío, constituye el equipo de ICP-MS. La muestra líquida es vaporizada e ionizada gracias a un plasma de Ar. Los iones una vez formados pasan al espectrómetro de masas donde son separados mediante un analizador y detectados. El proceso se puede dividir en cuatro etapas; introducción de muestra, lámpara ICP, interfaz y MS. El primer paso en ICP-MS es la introducción de una muestra. Hay múltiples formas en que una la muestra puede ser introducida, y el método de introducción depende de las características físicas de la muestra (Bazilio y Weinrich, 2012). La muestra típicamente se introduce en el plasma de ICP como un aerosol, ya sea aspirando una muestra sólida líquida o disuelta en un nebulizador o usando un láser para convertir directamente las muestras sólidas en un aerosol. Una vez que el aerosol de muestra se introduce en la linterna ICP, se desolva completamente y los elementos en el aerosol se convierten primero en átomos

gaseosos y luego se ionizan hacia el extremo del plasma. Los aspectos más importantes sobre el plasma de argón ICP son: la descarga de argón, con una temperatura de alrededor de 6000-10000 K, es una excelente fuente de iones. Los iones formados por la descarga del ICP son típicamente iones positivos, M^+ o M^{+2} , por lo tanto, los elementos que prefieren formar iones negativos, como Cl, I, F, entre otros, son muy difíciles de determinar a través de ICP-MS (Wolf, 2005).

1.11.3 Espectrometría de Absorción Atómica (AAS)

La espectroscopia de absorción atómica (AAS), tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada. Esta radiación es absorbida selectivamente por átomos que tengan niveles energéticos cuya diferencia en energía corresponda en valor a la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos, está determinada por la ley de Beer, que relaciona ésta pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda o recipiente que contiene los átomos absorbedores (Razmilic, 2016). Los componentes instrumentales son una fuente de radiación que emita una línea para efectuar una transición en los átomos del elemento analizado. Un nebulizador, que, por aspiración de la muestra líquida, forma pequeñas gotas para una atomización más eficiente. Un Quemador, en el cual por efecto de la temperatura alcanzada en la combustión y por la reacción de combustión misma, se favorezca la formación de átomos a partir de los componentes en solución. Un sistema óptico que separa la radiación de longitud de onda de interés. Un detector o transductor, que sea capaz de transformar las señales de intensidad de radiación en señales eléctricas. Una amplificador o sistema electrónico, y por último se requiere de un sistema de lectura en el cual la señal de intensidad de corriente, sea convertida a una señal que el operario pueda interpretar (ejemplo: transmitancia o absorbancia) (Castro, 2000).

1.12 TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS

1.12.1 Análisis por componentes principales (PCA)

La quimiometría o análisis de datos multivariados se define como la ciencia que aplica métodos matemáticos y estadísticos óptimos para procesar datos (Olivieri, 2011; Grupo de Quimiometría de, 2002). Trata, específicamente, de todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos más o menos complejos en información (Jolliffe, 2002). Incluye el diseño de experimentos y el análisis de datos para obtener información valiosa después de tomar medidas. Este campo científico consiste en una gran variedad de métodos matemáticos, con el objetivo de procesar numerosos conjuntos de datos para lograr diversos objetivos (Roussel *et al.*, 2014). También ha fijado nuevos rumbos a la química y definido nuevas áreas de investigación en tres aspectos relevantes: el diseño y la optimización de experimentos; el análisis descriptivo, y el análisis predictivo (Olivieri, 2011).

Se trata de un conjunto de técnicas matemático estadísticas capaces de modelar la relación entre la concentración de los componentes de una muestra y la información instrumental que puede registrarse, para dicha muestra, en forma de múltiples variables. Algunos investigadores la llaman cromatografía virtual debido a su semejanza con la cromatografía real, en la que los componentes de una muestra se separan físicamente, mientras que con la cromatografía virtual, que es parte de la quimiometría, los separa matemáticamente (Olivieri, 2011). El primer paso del análisis quimiométrico consiste en realizar un análisis exploratorio en el espacio multivariable, también denominado análisis descriptivo o análisis no supervisado, que se produce sin conocimiento previo ni sobre la naturaleza ni la pertenencia grupal de las muestras. Inicialmente, los datos deben preprocesarse o "limpiarse" antes del tratamiento exploratorio (Roussel *et al.*, 2014). El PCA es una técnica multivariante que analiza una tabla de datos en la que las observaciones se describen mediante diversas variables dependientes cuantitativas interrelacionadas (Abdi y Williams, 2010) y no requiere mediciones de variables objetivo (Sliskovic *et al.*, 2012). Los componentes principales más grandes se utilizan para la estimación de la variable de proceso,

mientras que los más pequeños se utilizan para la detección de fallas y la identificación de fallas. El punto de partida en cualquier análisis multivariante es la matriz de datos, \mathbf{X} , cuyos elementos son los datos medidos obtenidos en las mediciones realizadas durante el proceso, m son las columnas de la matriz \mathbf{X} y se llaman objetos (a menudo corresponden a algunas muestras de medidas químicas o de proceso), y n son las filas de matriz que representa la dimensión del espacio de entrada (corresponde al número de variables medidas que forman el objeto) (Sliskovic *et al.*, 2012). El PCA descompone matemáticamente la matriz de datos experimentales X en el producto de dos matrices ortogonales T y P' (Eq. 1) (Vidal *et al.*, 2016).

$$X=TP' + E \quad (\text{Eq. 1})$$

Una hipótesis básica del PCA es que los vectores de *carga* y de *puntaje* que corresponden a los valores propios más grandes, contienen la información más útil en relación con el problema específico, y que los restantes comprenden principalmente el ruido. Por lo tanto, estos vectores se escriben normalmente en orden descendente de valores propios. El uso más común del PCA es en la conversión de una matriz de datos a gráficas informativas, donde se representan las columnas t_a de la matriz de *puntaje* T . Se obtiene una gráfica de los objetos y su configuración en un espacio-M. Las gráficas de los primeros componentes, el t_1-t_2 o el t_2-t_3 , muestran los patrones más dominantes en X . Esto supone que las direcciones de máxima varianza representan las direcciones de máxima información. Las gráficas de *puntajes* de los primeros dos o tres vectores pueden ser útiles para mostrar los agrupamientos de las diferentes muestras, los *valores atípicos* (puntos que se desvían del modelo) y otros patrones que pueden seguir los datos (Vidal *et al.*, 2016).

En la presente investigación el PCA se ha aplicado en el estudio de comparación del efecto de la concentración de metales en el bioensayo con musgos y su distribución por zonas en muestras expuestas en la ZMVT.

2. PARTE EXPERIMENTAL

En la Figura 2.1, se muestra el diagrama general de las principales etapas que se desarrollaron en la presente investigación.

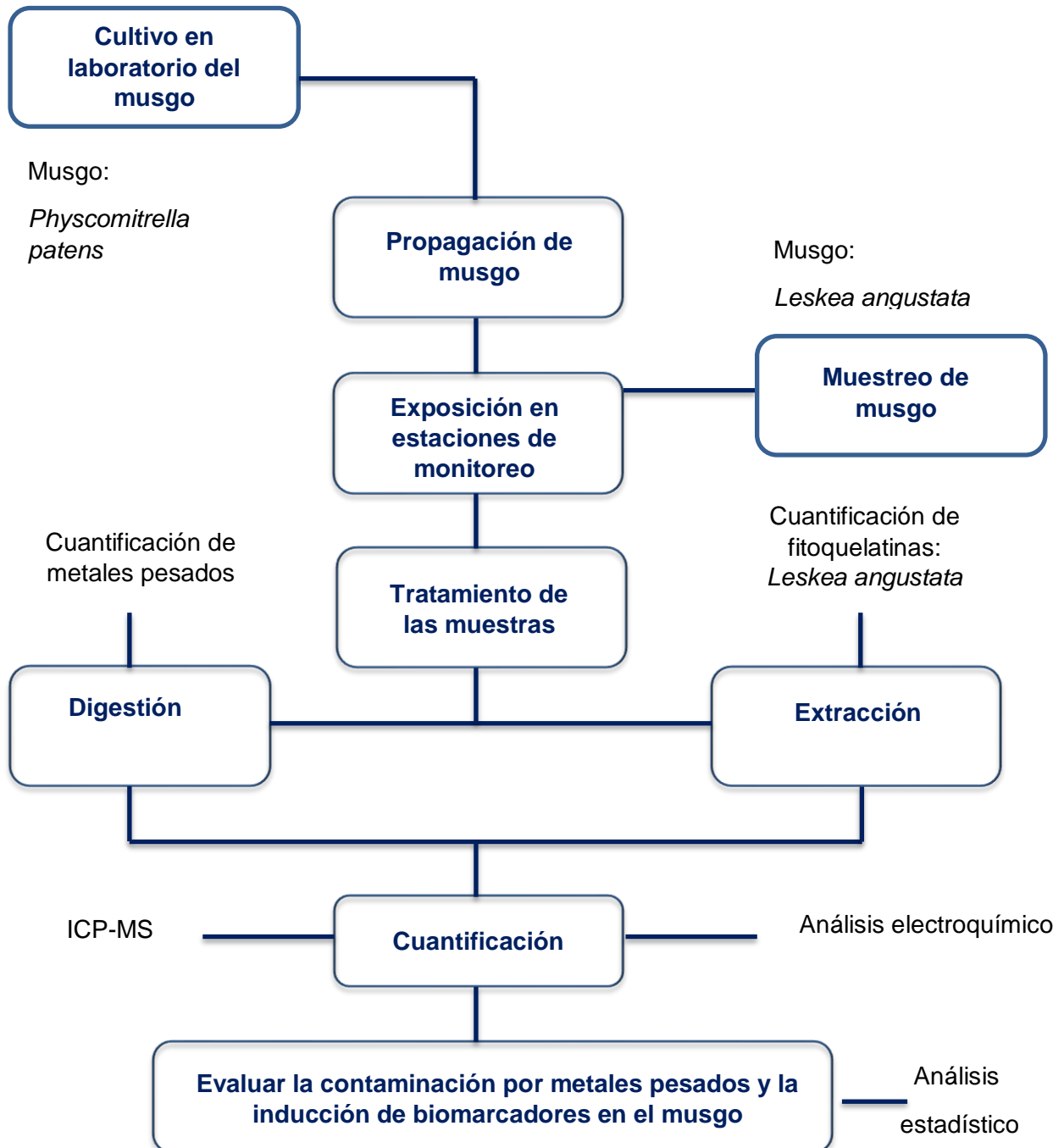


Figura 2.1 Diagrama de flujo del Método

2.1 Cultivo en laboratorio del musgo *Physcomitrella Patens*

Medio de crecimiento: El cultivo *in vitro* se realizó en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar exclusiva para cultivos vegetales. Para cultivos *in vitro* se recomienda (Cove, 2015) el medio BCD-AT (Tabla A3). Se colocó una cubierta de celofán (previamente esterilizado) sobre la superficie del medio de cultivo sólido (30 mL en cada caja), esto para evitar que los rizoides del musgo se introduzcan al medio de cultivo y para facilitar su colecta posterior. Para esterilizar el celofán es recomendable cortarlo previamente en forma circular y del tamaño de la caja petrí y colocarlos entre círculos de papel whatman de forma que queden intercalados para que con la esterilización no se peguen unos con otros. Una vez colocados varios celofanes entre los círculos de papel whatman, se colocaron dentro de cajas de Petri de cristal para esterilizarlos en autoclave.

2.1.1 Propagación del musgo

Para la propagación del musgo *Physcomitrella patens* se retiró con ayuda de unas pinzas el musgo de la caja petrí (musgo que ya se tenía cultivado) y se molió en 20 mL de agua destilada esterilizada hasta lograr que el musgo quedará completamente molido y lograr una solución homogénea, se añadió 1 mL de musgo molido en cada una de las jiffys que previamente se esterilizaron (doble esterilización a 121 °C, 100 kPa por 20 min y perfectamente bien hidratadas (Figura 2.2), se sellaron con cinta microporo y se colocaron en la incubadora. La misma cantidad se usó para propagar en cajas petrí, solo que el lugar de crecimiento es una cámara exclusiva para plantas cultivadas en medio agar (no tierra).

El crecimiento se dio aproximadamente en 2 meses, a una temperatura de 25 ° C. Se usaron lámparas fluorescentes con una intensidad entre 30 y 80 mol/m²s. El régimen de luz fue de 16 h de luz por 8 h de oscuridad(Cove *et al.*, 2015). Se recomienda mantener la humedad por encima del 40%. En la Figura 2.3 se observa una jiffy con musgo *Physcomitrella patens* en etapa joven.



Figura 2.2 Jiffys esterilizadas



Figura 2.3 Musgo cultivado en jiffy

2.2 Muestreo de musgo *Leskea angustata*

El muestreo del musgo se realizó en el Instituto Nacional de Investigación Nuclear ININ, se encuentra ubicado en Carretera México-Toluca s/n, La Marquesa, Ocoyoacac, Estado de México, C.P. 52750, a una distancia de 200 metros de la carretera México-Toluca, es por ello que se eligió este lugar para obtener el musgo libre de contaminantes provenientes de fuentes móviles. Los muestreos que se realizaron se observan en la Tabla 2.1, la mayor parte del área está cubierta por bosque de *Abies religiosa* (oyamel), y en la partes más altas se encuentran entremezclados el bosque de *Pinus hartwegii* (pino) y pastizales amacollados (Ambiental Del Ordenamiento Territorial, 2009). Su clima es frío de 12° a 18° C y una altura de 2300 msnm.

Tabla 2.1 Muestreos realizados en temporada de lluvias

Muestreo	Fecha
1	19 Agosto 2016
2	19 Septiembre 2016
3	17 Octubre 2016
4	24 Octubre 2016

El muestreo se realizó en época de lluvias, y lo que se hizo fue buscar en la zona boscosa del ININ árboles que tuvieran presencia del musgo *Leskea angustata* (Figura

2.4), además de que se buscó que el gametofito del musgo oscilará entre 1 a 2 cm de largo, para no tener pérdida de material en el momento de quitar la corteza del árbol y que no estuviera muy combinado con otras especies de musgo. Se muestrearon un total de 14 árboles. La muestra de musgo se tomó con ayuda de una espátula de acero inoxidable y se colocó en bolsas de polietileno para su transporte. La toma de muestra se realizó con todo y la corteza del árbol, para garantizar su preservación. Conforme a lo observado, esta especie de musgo en particular crece mejor en los árboles delgados (*Salix babylonica*), además de que su crecimiento se da en lugares húmedos con poca exposición al sol.



Figura 2.4 Mapa de las zonas de muestreo en el ININ

Una vez muestreado el musgo se llevó al Laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental (LIIA), para conservarlo hasta su exposición en las estaciones de monitoreo y puntos de control. Las muestras de musgo se depositaron en un refractario de vidrio y fue colocado en una campana de flujo laminar expuesto a 8 horas de luz blanca y 16 horas de oscuridad. El riego de musgo se realizó diariamente. Posteriormente, se observó que el musgo comenzó a sufrir cambios en su fisiología, como se muestra en la Figura 2.5, las orillas del musgo se comenzaron a decolorar, por lo que se retiró de la campana de flujo laminar y se colocó en domos, a los cuales se les hicieron pequeños orificios distribuidos en las paredes del domo de plástico para que pudiera

respirar y facilitar el riego como se muestra en la Figura 2.6. Se limpió el musgo durante dos semanas, retirando con ayuda de unas pinzas los gametofitos de musgo y otras especies que no pertenecen a la especie en estudio.



Figura 2.5 Cambio fisiológico en musgo



Figura 2.6 Musgo en domos

Para la identificación de especie, se contó con el apoyo de la Dra. Carmen Zepeda Gómez en la universidad de Ciencias de la UAEMex, y con el apoyo de un microscópio modelo: IROSCOPE NZ-14 T. Se encontraron 4 especies de musgos mezclados con *Leskea angustata* como se observa en la Figura 2.7: a) *Didymodon rigidulus*, b) *Cryphaea patens*, c) *Herpetineuron toccoae* y d) *Brachilecium ruderale*.

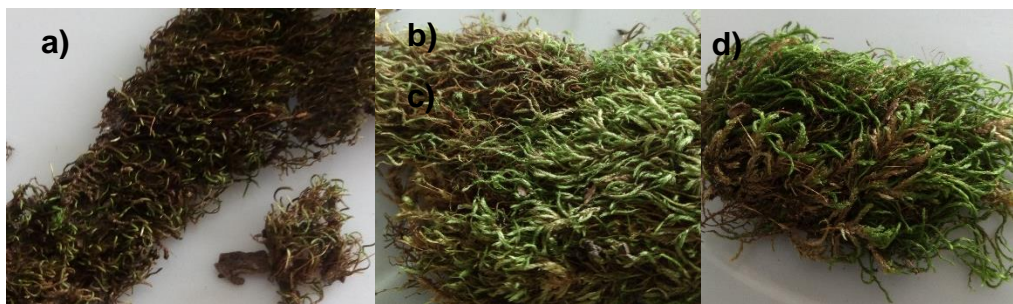


Figura 2.7 Especies mezcladas con musgo *Leskea angustata*

Para la conservación del musgo *Leskea angustata* se regó una vez por semana la corteza, y cada tercer día se regó por la parte superficial de manera suave y esparcida por toda la superficie de la charola. Se colocó cerca de la ventana cerrada para que le diera el sol y no dejara de realizar la fotosíntesis.

2.3 Caracterización del musgo *Leskea angustata*

2.3.1 Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Se realizó la caracterización del musgo a través de la técnica de espectroscopia de infrarrojo (IR), para determinar los grupos funcionales que componen el musgo *Leskea angustata*. La caracterización de la biomasa de musgo se realizó mediante FTIR en un equipo VARIAN 640-IR, marca AGILENT configuración MID-IR. Previo al análisis, una muestra de 30 mg se mantuvo a temperatura ambiente durante dos semanas para finalmente realizar la determinación.

2.3.2 Área Superficial

El Área Superficial se realizó utilizando un equipo de medición de área superficial y volumen de poro modelo BELSORP-max, marca BELJAPAN; de igual manera se usó el desgasificador Belprep Vac II con un rango de distribución de poro de 0.01 m²/g. Previamente, muestras de 0.0345 g (secadas a temperatura ambiente durante 2 semanas) se sometieron a desgasificación en bajo vacío durante 5 h a 60°C. Posteriormente se realizó el análisis y se obtuvieron los valores de área superficial y el volumen de poro. Las curvas de adsorción/desorción se determinaron a las 22 h a 45°C. Las condiciones con las que trabajo el equipo BET se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Condiciones de operación de equipo BET

Propiedad	Valor	Unidad
Peso de la muestra	0.0345	[g]
Volumen estándar	27.659	[cm ³]
Volumen muerto	26.449	[cm ³]
Tiempo de equilibrio	0	[s]
Adsorativo	N ₂	
Temperatura del aparato	0	[°C]
Temperatura de adsorción	77	[K]
Presión de vapor saturado	77.439	[kPa]
Área de sección transversal de adsorción	0.162	[nm ²]

2.3.3 Elaboración de bolsas de musgo *Leskea angustata*

La elaboración de las bolsas se realizó conforme a la siguiente metodología:

Se usó tul (tamaño de malla 5 mm) blanco. Las medidas fueron de 15 x 20 cm, las cuales al doblarlas y elaborar las bolsas quedaron de 15 x 10 cm. Se lavaron en agua desionizada por 10 minutos y se secaron a temperatura ambiente de 14 °C por 2 horas y sobre papel absorbente. Se hidrataron las jiffys (800 mL de agua desionizada para hidratar 22 jiffys) durante 5 horas. Las jiffys hidratadas se cortaron por la mitad y se colocaron sobre el tul, formando una base de aproximadamente (10 x 8) cm como se observa en la Figura 2.8. Se realizó el método de cuarteo para homogenizar todo el musgo (NMX-AA-15-1985) como se observa en la Figura 2.9.

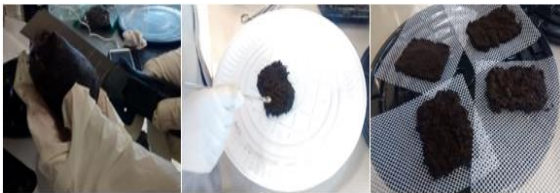


Figura 2.8 Colocación de jiffys



Figura 2.9 Método del cuarteo

Se pesaron aproximadamente 2.5 gramos de musgo, tomando como referencia lo reportado por Capozzi *et al.* (2016), de 30 mg por 1 cm², como se observa en la Figura 2.10. Se cerraron las bolsas y se cocieron con hilo de nylon y se colocaron en domos de plástico como se observa en la Figura 2.11. Se dejaron secar por dos días a temperatura ambiente de 14° C, antes de colocarlas en las bases de las estaciones para pesarlas y tener un peso más exacto en seco de cada bolsa.



Figura 2.10 Armado de bolsas de musgo



Figura 2.11 Bolsas de musgos

Se construyeron 10 bases de madera de 36 cm de largo x 22 cm de ancho (Figura 2.18), para colocar las bolsas en las estaciones de monitoreo, el tamaño fue diseñado de acuerdo al espacio que ocuparon las bolsas (3 bolsas en cada estación). Además, los soportes fueron entintados para proteger la madera de los rayos del sol y evitar que se deformaran. Se colocaron 2 bolsas de musgo en cada soporte de madera y se regó antes de exponerlo a las estaciones de monitoreo y parques. Se colocaron con 4 tachuelas (una en cada extremo), para evitar que se desprendieran con el aire.

2.3.4 Elaboración de bolsas de musgo *Physcomitrella patens*

Se realizaron 6 bolsas con este musgo, debido a la existencia de poco material vegetal. El procedimiento fue exactamente igual a las bolsas de musgo *Leskea angustata* con excepción de que se colocó una esponja perfectamente hidratada bajo la jiffy, esto para mantener mayor la humedad en el musgo. En la Figura 2.12 se muestran las etapas de la elaboración de la bolsa del musgo *Physcomitrella patens*.

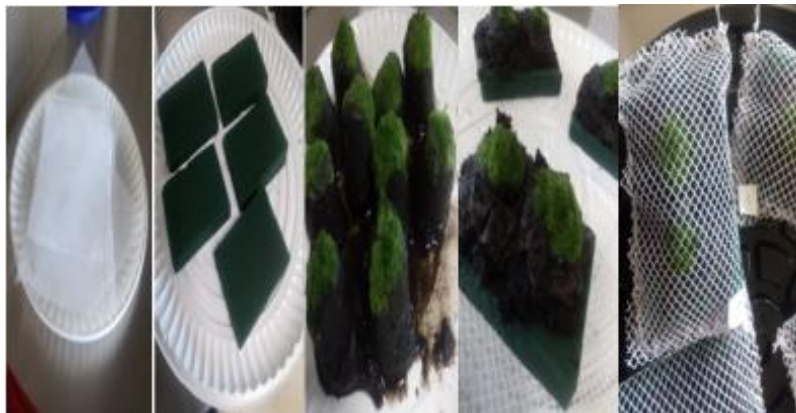


Figura 2.12 Elaboración de bolsas *Physcomitrella patens*

2.3.5 Exposición de bolsas de musgo

En la Figura 2.13 están representados los puntos de las estaciones de monitoreo y parques, donde se colocaron las bolsas de musgo. En la Figura 2.14, se observa cómo quedaron colocados los soportes con las bolsas de musgo *Leskea angustata* a 4 metros de altura (Capozzi *et al.*, 2016), y de acuerdo a la dirección del viento (sur a

norte) (AMBIENTE, 2007), observando de izquierda a derecha: parque la Alameda (AL), Metepec (ME), Ceboruco (CB), Oxtotitlán (OX), San Cristóbal Huichotitlán (SC), Aeropuerto (AE), San Mateo Atenco (SM) y Centro (CE).

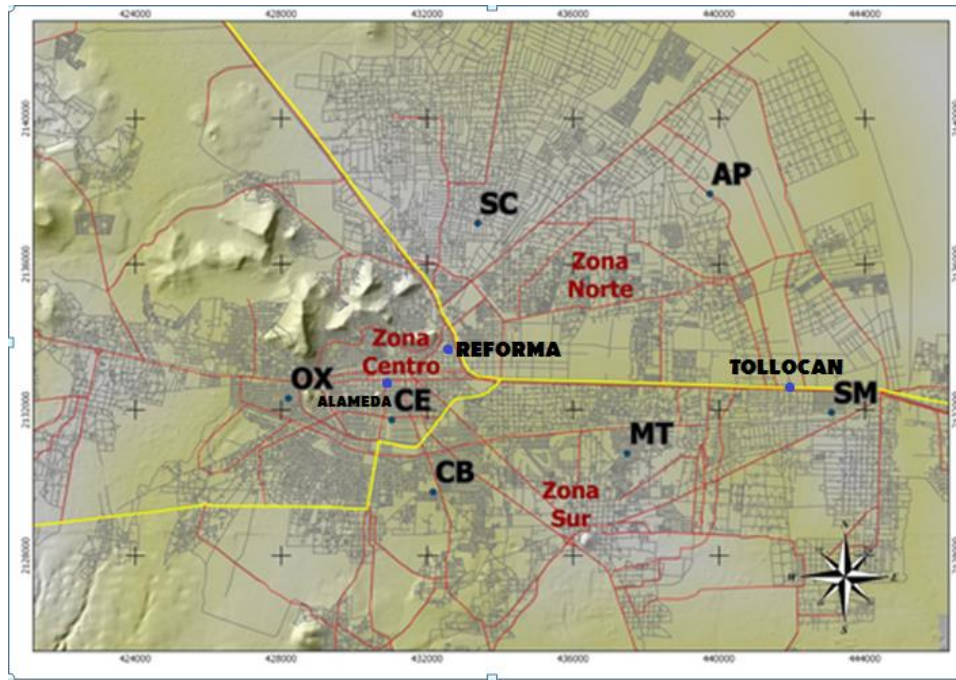


Figura 2.13 Puntos de exposición del musgo



Figura 2.14 Exposición de musgo *Leskea Angustata*

2.3.6 Retiro de bolsas de musgo

La recolección de las muestras de musgo en estaciones de monitoreo y parques se realizó a los 6 meses de exposición. Las bolsas de musgo se retiraron con todo y su base y así fueron llevadas al laboratorio LIIA. Una vez en el laboratorio las bolsas se retiraron de las bases de madera y se colocaron en charolas identificadas por estación para ponerlas a secar a temperatura ambiente durante 2 días como se observa en la Figura 2.15.



Figura 2.15 Secado de bolsas de musgo

Una vez ya seca la bolsa, se abrió cada una y se retiró el musgo, dejándolo nuevamente en charolas para limpiarlo de las cortezas que aún tenía y eliminar el exceso de tierra, producto de la jiffy de soporte. El musgo seco (0.3 g) se molió en un mortero de ágata para los análisis de AAS, el cual es ideal para la preparación de muestras de alta pureza mediante la trituración, tiene poca porosidad, característica que minimiza la pérdida de muestra y reduce la contaminación cruzada entre muestras (ABI, 2017). Una vez molido el musgo, se tamizó en malla #50 (diámetro de poro de 0.050 mm) y se almacenó en frascos de vidrio previamente etiquetados con nombre de la muestra, fecha y peso para su posterior análisis.

2.4 Bioensayo con el musgo *Leskea angustata*

Las muestras de musgo se tomaron en el ININ como se realizó en el apartado 2.2 (tomando el musgo con corteza de 15 árboles). Las muestras se trasladaron al

laboratorio en bolsas de polietileno (Ziploc) y se extendió en charolas de plástico para su limpieza. La limpieza se realizó de manera minuciosa para eliminar todo tipo de residuos de tierra, insectos y gametofitos de musgos que no correspondían a la especie de estudio con ayuda de pinzas de acero inoxidable como se puede observar en la Figura 2.16.



Figura 2.16 Limpieza del musgo para bioensayo

El musgo ya limpio (3 g aproximadamente para cada muestra) se depositó sobre cajas de plástico, a las cuales se les hicieron 4 orificios en forma cuadrada (uno por cada cara alrededor $1 \times 1 \text{ cm}^2$) para que el musgo pudiera respirar y no se concentrará la humedad. La Figura 2.17 muestra la manera en que se acomodó el musgo donde se realizó cada bioensayo.

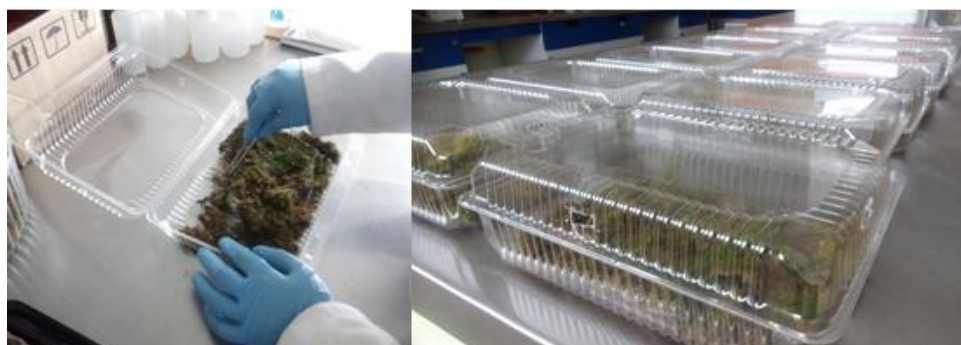


Figura 2.17 Musgo de bioensayo en cajas de plástico

2.4.1 Preparación de soluciones

Se prepararon soluciones en el laboratorio de los 4 metales en estudio, esto con la finalidad de estudiar por separado la acumulación e inducción de fitoquelatinas en el

musgo expuesto a diferentes concentraciones de metales. Los reactivos que se utilizaron fueron marca SPEX CertiPrep. Las concentraciones que se prepararon fueron las que se observan en la Tabla 2.3 de acuerdo a lo reportado por Xu *et al.*, 2011, en base a su investigación se tomaron una concentración alta, media, baja y un blanco de prueba.

Tabla 2.3 Concentraciones de soluciones para bioensayo

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN
Pb (NO ₃) ₂	10 mg / L	60 mL
Pb (NO ₃) ₂	20 mg / L	60 mL
Pb (NO ₃) ₂	40 mg / L	60 mL
Cu (NO ₃) ₂	35 mg / L	60 mL
Cu (NO ₃) ₂	55 mg / L	60 mL
Cu (NO ₃) ₂	75 mg / L	60 mL
Zn (NO ₃) ₂	5 mg / L	60 mL
Zn (NO ₃) ₂	25 mg / L	60 mL
Zn (NO ₃) ₂	45 mg / L	60 mL
Cd (NO ₃) ₂	.5 mg / L	60 mL
Cd (NO ₃) ₂	1 mg / L	60 mL
Cd (NO ₃) ₂	10 mg / L	60 mL

2.4.2 Propagación de metales en el musgo

El riego del musgo se llevó a cabo durante 30 días (Basile *et al.*, 2012; Koz y Cevik, 2014) atomizando 2 mL de solución cada 24 horas (Smolyakov *et al.*, 2017), el riego se realizó de manera uniforme y con el equipo de seguridad apropiado (guantes de nitrilo, lentes de seguridad, bata de laboratorio y cubrebocas) para evitar cualquier riesgo ocasionado por la exposición a metales, después del riego se cerraba inmediatamente la caja.

2.4.3 Limpieza y secado del musgo

Una vez transcurridos los 30 días de exposición del musgo a las distintas concentraciones de metales, se procedió a quitar el musgo de la corteza utilizando unas pinzas de acero inoxidable. Se retiró la corteza del musgo y se colocó en las mismas cajas de exposición dejándolo secar a temperatura ambiente (14°C). Una parte del musgo se secó por separado (para espectroscopia de absorción atómica AAS) en pequeñas bolsas de plástico.

2.4.4 Molienda y tamizado del musgo

El musgo seco se molió en un mortero de ágata, y posteriormente se tamizó en malla 50 (Figura 2.18). El musgo molido se colocó en frascos de vidrio previamente bien lavados (6 horas en ácido nítrico al 10%, agua desionizada y extrán).



Figura 2.18 Molienda del musgo con mortero de ágata y tamizado

2.5 Bioensayo del musgo *Physcomitrella patens*

Para la elaboración del bioensayo de *Physcomitrella patens* se utilizaron 12 jiffys con musgo (propagadas el 30 de marzo en la Universidad Biocientífica de Morelos), debido a la poca biomasa que se tenía el musgo solo fue expuesto a Cadmio 10 mg/L por duplicado y un blanco. El material se retiró de la jiffy y fue colocado en cajas Petri de vidrio para mejor visualización (Figura 2.19). El riego se realizó durante 10 días colocando 2 mL cada 24 horas como el bioensayo de *Leskea angustata*. La exposición del metal en el musgo se realizó todos los días entre las 10 de la mañana y para que no estuviese muy húmedo y sin oxígeno se mantuvo la tapa medio abierta de un lado.



Figura 2.19 Bioensayo de musgo *Physcomitrella patens*

2.5.1 Secado y limpieza de *musgo Physcomitrella patens*

Una vez terminada la exposición del musgo con el metal, se dejaron abiertas las cajas durante 2 días y se secaron a temperatura ambiente, posteriormente se inició la limpieza del material para eliminar los restos de tierra que pudiese tener, una vez limpia la muestra se almacena en cajas de polietileno para su posterior análisis.

2.6 Digestión acelerada por horno de microondas y lectura de MP por AAS

Se pesaron 0.25 g de cada una de las muestras de musgo molidas, las cuales se depositaron en contenedores de plástico identificadas con el nombre de cada una de las muestras como se observa en la Figura 2.20. Las muestras pesadas se depositaron en cada uno de los vasos de teflón (OMNI PLUS XP-1500). Cuidando que la muestra cayera lo más abajo posible evitando que se quedará muestra en las paredes superiores del vaso esto con la finalidad de no tener pérdida de material, posteriormente se adicionaron 2mL de agua UP, 5mL HNO₃ y 1mL HF como se visualiza en la Figura 2.21.



Figura 2.20 Pesado de las muestras



Figura 2.21 Adición de reactivos a vasos de teflón

Se cerraron los vasos y se colocaron en estuches individuales los cuales se sellaron utilizando unas pinzas de presión para evitar que los vasos se salieran del estuche, se colocaron en el carrusel y se introdujeron al horno de microondas. Se realizó una digestión acelerada en un horno de microondas (CEM, modelo Mars X 907600 serie XM3047). En este equipo se procesaron 12 muestras simultáneamente. El proceso de digestión se efectuó en dos etapas (usando el Método “Musgo OMNI – XP 1500”).

Etapa 1.- Se alcanzó una temperatura de 187°C y una presión de 240 psi, durante un tiempo total de 30 min. Dentro de esta etapa hubo un tiempo de mantenimiento con una duración de 20 min. Aquí la temperatura aumentó lentamente hasta llegar a 200°C. Se dejan enfriar los vasos para la siguiente etapa del proceso.

Etapa 2.-La presencia de residuos de HF en las muestras producen daño a la óptica de los espectros por lo que se neutralizó con 15 mL de disolución de H_3BO_3 al 4%, la cual se adicionó a cada vaso. En la Figura 2.22 se observa el producto de la primera digestión, tornándose la muestra de color amarillo.



Figura 2.22 Muestras primera digestión

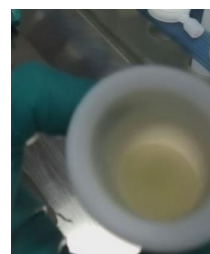


Figura 2.23 Muestra con segunda digestión

El set de vasos se colocó en un carrusel y se introdujeron en el horno de microondas, iniciándose el proceso de neutralización (utilizando el método Neutra- Omni-XP1500), incrementándose la temperatura hasta alcanzar 170°C, la cual se mantuvo por 10 min

y posteriormente se realizó la fase de enfriamiento. Las muestras digeridas se decantaron a envases de polietileno y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis. La Figura 2.23 muestra el resultado de la segunda digestión.

La cuantificación de los metales se realizó en un equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica (Perkin Elmer, modelo 3110), de acuerdo a lo establecido en la NMX-AA-051-SCFI-2001. Se utilizaron lámparas de cátodo hueco (Perkin Elmer o GBC) para cada metal y las longitudes de onda, las cuales se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Longitudes de onda de lámparas usadas en AAS

Metal	Longitud de onda (nm)
Cd	228.7
Zn	213.9
Cu	324.7
Pb	216.9

Para evaluar la precisión (repetibilidad) de los métodos analíticos, cada muestra se preparó por duplicado. Se utilizó un estándar de referencia certificado 1573: Tomato Leaves como control de calidad. Los límites de detección (LD) fueron: Zn=0.10 mg/L, Cd=0.10 mg/L, Pb=0.50 mg/L y Cu=0.15 mg/L.

2.7 Lectura de fitoquelatinas y sus isoformas

2.7.1 Reactivos y disoluciones

La γ GluCys (80% de pureza) fue suministrada por Sigma-Aldrich y el glutatión en su forma reducida (GSH) por Merk. La fitoquelatina PC₂ y sus isoformas PC₂-Ala, PC₂-Glu y Cys PC₂ (con pureza superior al 95%) fueron sintetizadas y suministradas por Genosphere Biotechnologies; las fitoquelatinas PC₃, PC₄ y PC₅ por Driver Dugs S.L. como sales de trifluoroacetato, con una pureza entre 86.2% y 99%. La Figura 2.24 muestra los compuestos tiólicos estudiados.

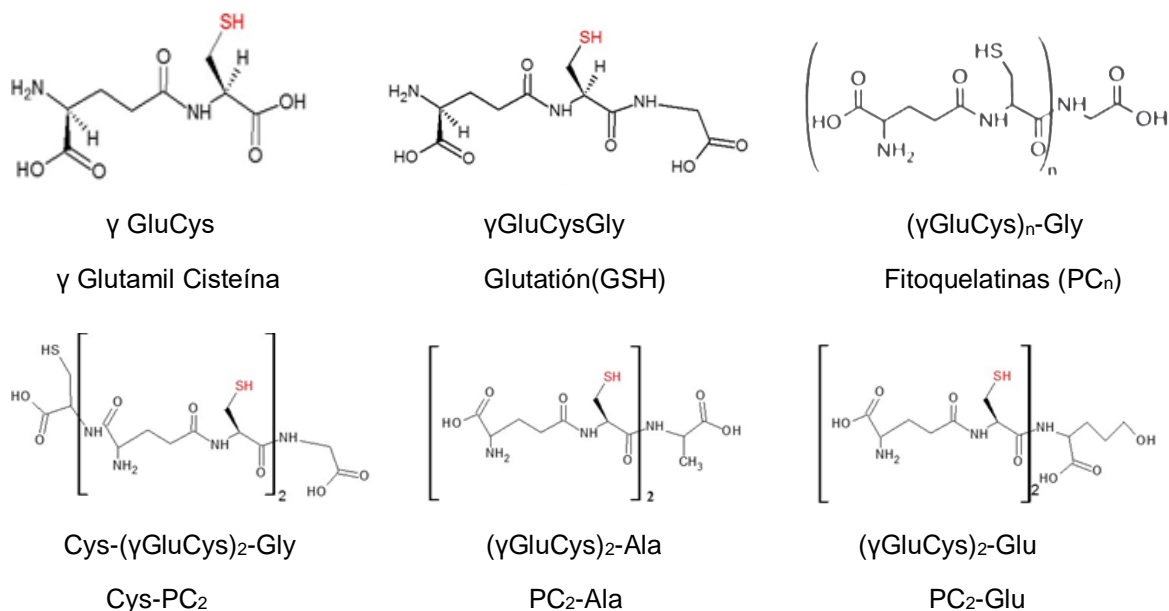


Figura 2.24 Estructura de los compuestos t6iolicos estudiados

2.7.2 Preparaci6n de la fase m6vil

La fase m6vil fue una mezcla de una soluci6n acuosa de 6cido trifluoroac6tico (TFA) al 0.1% y una de acetonitrilo tambi6n al 0.1% de TFA. Se trabaj6 con gradiente de eluci6n. El (TFA) fue suministrado por Sigma-Aldrich y el acetonitrilo (ACN) por Panreac ApliChem. Para la limpieza del electrodo de trabajo se utiliz6 etanol (96%) suministrado por Panreac. Todas las disoluciones usadas se prepararon con agua ultrapura (equipo de purificaci6n Mili-Q Purelab Plus de USF).

2.7.3 Instrumentaci6n

Para la determinaci6n de PCs se utiliz6 un equipo cromatogr6fico de l6quidos HPLC Agilent de la serie 1200, el cual est6 compuesto por un detector UV-vis, un inyector autom6tico, una bomba cuaternaria, un desgasificador y un 6rea de soluciones, a 6l est6 conectada una columna anal6tica. La columna anal6tica C18 Ascentis (25 cm x 4.6 mm) estuvo acoplada una pre columna modelo Eclipse XDB-C18, 4.6x12.5 mm, 5 μm. El equipo HPLC se encuentra conectado a un ordenador con software CHEMSTATION por LC (Copyring Agilent Technologies 1900-2003) por el cual se controla el

cromatógrafo. No se utiliza el detector de UV-vis ya que no tiene suficiente sensibilidad para detectar las PCs. La Figura 2.25 muestra todo el conjunto.



Figura 2.25 Representación de todo el equipo HPLC Agilent 1200

La columna se acondicionó realizando una purga con acetonitrilo durante 4 minutos con un flujo de 5 mL/min. Posteriormente se pasó una mezcla de 70% agua UP y 30% de acetonitrilo a 1 mL/min durante 30 minutos. Todas las soluciones se sonicaron para eliminar la presencia de aire durante 10 minutos en un sonicador BRANSON 2510. Para la detección voltamperométrica se utilizó una celda de flujo cruzado Bionalitycal System, colocada dentro de una caja metálica que actúa de jaula de Faraday. La celda voltamperométrica estuvo formada por un electrodo de trabajo de disco dual, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (almacenado en una solución de NaCl 3 mol/L), un electrodo auxiliar de acero inoxidable que es el propio soporte de la celda y una conexión a tierra. Se utilizó un gasket de 0.005 pulgadas de espesor para crear la cavidad de medida. El sistema estuvo conectado a un potenciostato μ AUTOLAB tipo III (Eco Chemie) que aplicó un potencial constante al electrodo de trabajo, y a un ordenador el cual contó con el software GPES versión V4.9.006 para el registro del cromatograma.

2.7.4 Fase móvil y patrones cromatográficos

Para el presente estudio se utilizó un gradiente de elución para la separación de las PCs y otro para la separación de las PCs de cadena corta y las isoformas de la PC₂. Las Figuras 2.26 y 2.27 muestran la representación gráfica de los gradientes utilizados.

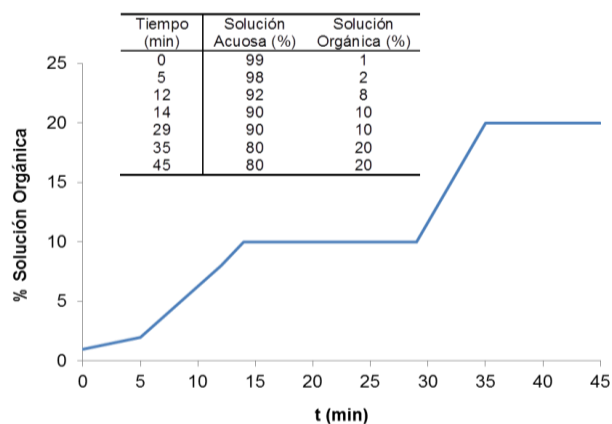


Figura 2.26 Gradiente de elución utilizado con la fase móvil 0.1% de TFA en agua y 0.1% de TFA en ACN, para la separación de fitoquelatinas, flujo de 1.2 mL/min

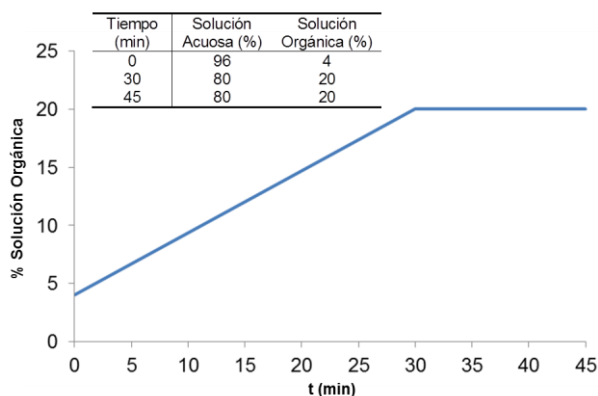


Figura 2.27 Gradiente de elución utilizado con la fase móvil 0.1% de TFA en agua y 0.1% de TFA en ACN, para la separación de las isoformas de la PC₂ flujo de 1.2 mL/min

Se prepararon soluciones madre de todos los patrones (CysGly, Glutati3n, y GluCys, Cys-PC₂, PC₂-Ala, PC₂-Glu, PC₂, PC₃, PC₄ y PC₅) con una concentraci3n de 10⁻³ mol/L (mantenidas a 4°C), y de ah3 se preparaban las disoluciones en el momento de inyectar.

2.7.5 Electrodo de trabajo

El electrodo de trabajo que se utilizó fue de carbón vitrificado con dos áreas de contacto, antes de su uso se pulió para eliminar posibles impurezas que pudiese tener de lecturas previas. El método fue siguiente:

1. Se humedeció la superficie de pulido con agua ultrapura
2. Se añadió una punta de espátula de alúmina y se reparte homogéneamente por toda la superficie con ayuda de la espátula.
3. Se colocó la superficie del electrodo sobre la superficie de pulido y se realizaron movimientos en forma de 8 siempre en el mismo sentido.
4. Se limpió la superficie del electrodo con etanol y después con agua ultrapura para eliminar las partículas del pulido (durante 2 minutos).
5. Se cubrieron las conexiones del electrodo con parafilm, y se sumergieron en un vaso de precipitados con etanol y se colocó en un ultrasonido durante 5 minutos con el fin de eliminar las posibles partículas adheridas a la superficie del electrodo. Se repitió la misma operación sumergiendo el electrodo en agua ultrapura.

Una vez lavado se colocó en la celda voltamperométrica después de colocar el gasket tal como se muestra en la Figura 2.28.

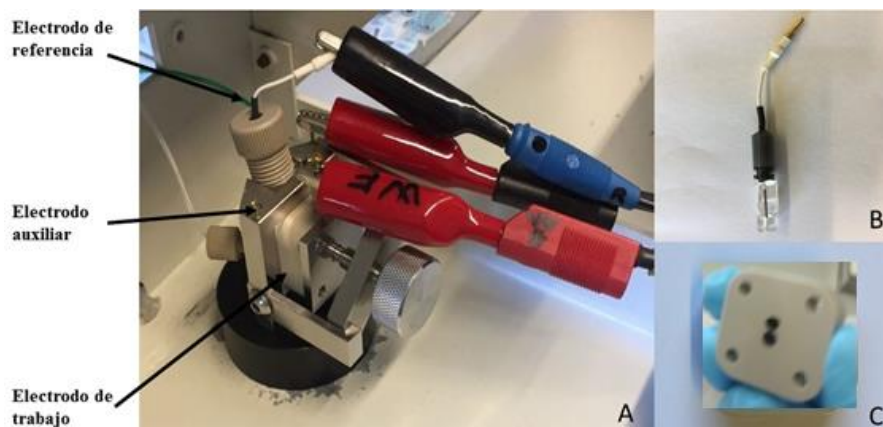


Figura 2.28 A). Celda de flujo cruzado de acero inoxidable donde se sitúan tres electrodos. B). Electrodo de referencia de Ag/AgCl (NaCl 3 mol/L). C). Electrodo de trabajo de carbono vitrificado de dos discos

2.7.6 Preparación de los extractos de musgo

La trituración del musgo *Leskea angustata* se realizó en presencia de N₂ líquido en un mortero de porcelana. El procedimiento de trituración (Figura 2.29) consistió en colocar una pequeña parte de la muestra seca en el mortero y junto con un poco de N₂ líquido (hasta cubrir la muestra), realizando movimientos circulares hasta que la muestra quedó hecha polvo (Dago *et al.*, 2014). Debido a que el musgo es bastante fino y no tiene raíz, fue muy fácil de triturarlo. Una vez terminada la trituración la muestra se colocó en recipientes de plástico y se almacenaron en el congelador a -80°C hasta su análisis.



Figura 2.29 Trituración del musgo *Leskea angustata* con N₂ líquido

2.7.7 Extracción de las fitoquelatinas y lectura de muestras

Para la extracción del grupo tiol se pesaron 100 mg del musgo previamente triturado criogénicamente y se colocaron en un tubo eppendorf al cual se añadió 500 µL de agua ultrapura. Se colocó en un equipo eppendorf MixMate y se agitó a 1500 rpm durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó (CENTRONIC P Selecta) a 4000 rpm durante 15 minutos. El líquido fue extraído con ayuda de una jeringa de 5 mL (marca BD Discardit II) con aguja (marca BD Microlance 3) y se filtró (0.20 µm), se guardó en un vial y se colocó en refrigeración a 4°C para su uso el mismo día de trabajo. El proceso se muestra en la Figura 2.30.



Figura 2.30 Extracción del grupo tiol

Las metodologías utilizadas fueron desarrolladas por el grupo de investigación de electroanálisis de la Universidad de Barcelona (Dago *et al.*, 2014). Dicho estudio se llevó a cabo en dos partes, primero se determinó la presencia de CysGly, GSH, γ GluCys y PC₂₋₅, para posteriormente determinar las isoformas de PC₂, CysPC₂, PC₂ala, PC₂Glu, junto con el GSH y PC₃.

2.8 Preparación y análisis de muestras de musgo *Leskea agustata* en ICP-MS

La digestión cerrada de las muestras se llevó a cabo en los laboratorios de investigación (LANAFONU) del ININ pesando de 300 a 350 mg de musgo previamente molido en mortero ágata, en vasos de teflón adicionando 5 mL de HNO₃ purificado y 0.4 mL de HF suprapur (Millour *et al.*, 2015), la digestión se dio en dos etapas en sistema de digestión y extracción de microondas marca MARS 6, ONE TOUCH TECHNOLOGY. En la primera etapa la digestión se llevó a 200°C (285-290 psia) durante 15 min, posteriormente se mantuvo a la misma temperatura otros 10 min, esto con la finalidad de garantizar completamente la degradación de la materia orgánica. Una vez que el equipo termino la fase de enfriamiento las muestras se colocaron en matraces aforados de plástico (50 mL) teniendo cuidado de no derramar ni una gota de la solución digestionada. Se añadieron 2 mL de H₃BO₃ sobresaturado y se usó como patrón interno Ge el cual se adicionó a cada muestra hasta tener una concentración de 10 ppb, las muestras fueron aforadas con agua ultrapura y agitadas antes de su análisis.

La lectura de las muestras se llevó acabo en el equipo ICP-MS 7700, Agilent Technologies, G3281A. Para el control de calidad de los análisis, dos materiales de referencia certificados: IAEA-336 liquen y Tomato Leaves fueron analizados en las mismas condiciones que las muestras (Figura A-7.1-Figura A-8.1).

2.8.1 Factor de acumulación relativo

Con el objeto de evaluar el contenido de elementos en el musgo, se determinó el factor de acumulación relativo (RAF), el cual se calculó en función de la concentración de musgo de cada elemento después de la exposición dividido por la concentración del elemento antes de la exposición (Vuković *et al.*, 2015):

$$RAF = \frac{C_{\text{exposición}} - C_{\text{inicial}}}{C_{\text{inicial}}}$$

2.8.2 Análisis estadístico

Para determinar la relación entre las concentraciones de los metales en estudio de cada estación se realizaron pruebas estadísticas. Se determinó la parametría de los datos realizando el análisis de distribución normal con el apoyo de *Minitab® 18.1* y *IBM® SPSS® Statistics 25*. El análisis de PCA se realizó con el software PLS_Workspace Browser utilizando *Matlab®2013*, para determinar si existía alguna relación entre las muestras mediante sus componentes, de igual manera su clasificación por metales y por sitios de exposición.

3. RESULTADOS

3.1 Conservación del musgo

Durante la conservación del musgo en laboratorio se observó que: si el musgo se mantiene encimado (uno sobre otro), el que se encuentra en la parte inferior retiene humedad, esto provoca que haya decoloración del mismo en la parte inferior.

Si el musgo se coloca en la sombra por más de dos días, se observa presencia de moho debido a que no existe presencia de luz para que el musgo pueda realizar la fotosíntesis, esto se debe a que el factor principal que determina si una especie crecerá o no en la sombra es la cantidad de material alimenticio almacenado disponible presente en sus tejidos (Gross, 2009).

Si el musgo permanece más de 2 horas expuesto directamente a los rayos del sol este comienza a deshidratarse y secarse. Como el musgo tiene propiedades regenerativas, a los 5 minutos posterior al riego se vuelven a levantar los gametofitos que lo forman. Esto se debe a que la mayoría tiene una cutícula muy delgada o, en otros casos, carece de ella, por lo que si hay sequedad en el ambiente se secan y si hay humedad se humedecen (Allen, 2011).

Si bien los musgos son sensibles a los cambios de humedad ambiental y la tolerancia a la desecación, que por ejemplo, especies que habitan bosques húmedos sombríos son muy sensibles a desecarse, mientras otras que habitan zonas áridas y desérticas, sobreviven efectivamente a los periodos de desecación (Ardiles *et al.*, 2008). Es por ello que el musgo sufrió deshidratación durante su conservación en el laboratorio.

3.2 Análisis de FTIR

Los resultados del análisis de FTIR del musgo *Leskea angustata* se observan en la Figura 3.1, en la cual se muestran las bandas originadas por los grupos funcionales presentes en los compuestos del gametofito (hoja del musgo) como son la banda intensa a 3345 cm^{-1} correspondiente al alargamiento de los grupos hidroxilos que se encuentran en la celulosa (Fernández *et al.*, 2013) así mismo la torsión del grupo OH

a 1250 cm^{-1} perteneciente a la molécula de agua. De igual forma se encontraron bandas a 2355 cm^{-1} correspondiente al grupo C-C, 1630 cm^{-1} con el grupo C=C y 1025 cm^{-1} indica un alargamiento del grupo C-O. También se observaron pequeñas bandas en 2840 y 2912 cm^{-1} correspondientes al enlace S-H (grupo tiol), el cual es muy activo en las células y reacciona específica y cuantitativamente con muchos compuestos, entre ellos una gran variedad de iones metálicos (Coelho, 2012). La celulosa, uno de los principales polisacáridos de la pared celular, es un polímero lineal y a menudo se lo conoce como el esqueleto de la pared celular debido a su resistencia y rigidez (Pelloux *et al.*, 2007). De igual manera se obtuvieron los IR de las muestras de musgo con el que venía mezclado con *Leskea angustata*, para poder identificar cuales grupos son los que difieren entre ellos (Figura A1-A3).

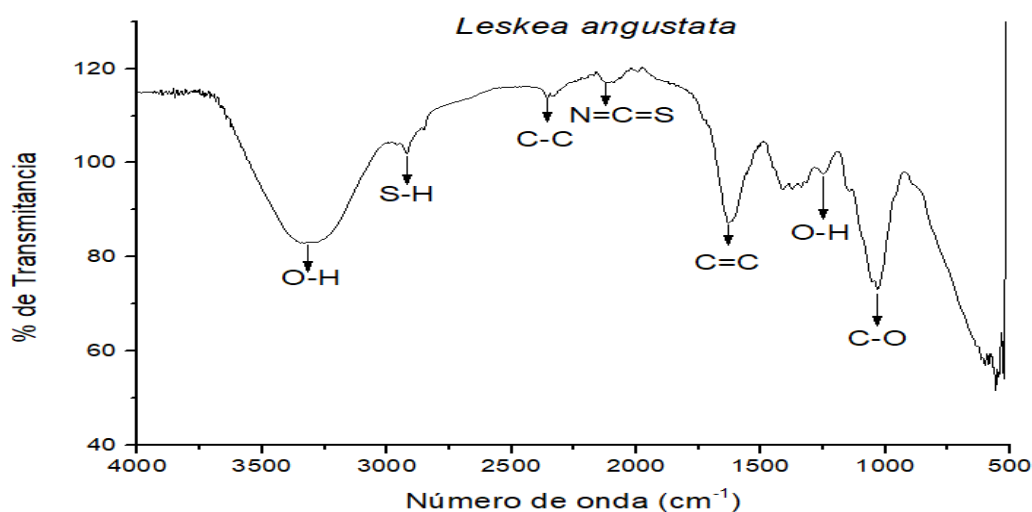


Figura 3.1 Espectro de IR del musgo *Leskea angustata*

En la Figura 3.2 se observa el IR del musgo *Physcomitrella patens*, en la banda a 3282 cm^{-1} hubo un estiramiento de ácido carboxílico $-\text{CO}=\text{OH}$, mientras que en la banda a 2357 cm^{-1} pertenece al grupo C-C, 1606 cm^{-1} con el grupo C=C y 1029 cm^{-1} el grupo C-O. Las bandas 2920 cm^{-1} y 1848 cm^{-1} , corresponden a enlaces S-H. Mientras que en la banda de 2160 cm^{-1} corresponde a tiocianato aromático ($-\text{S}-\text{C}\equiv\text{N}$) y a 1978 cm^{-1} isotiocianato alifático ($\text{N}=\text{C}=\text{S}$) (Callejas, 2012).

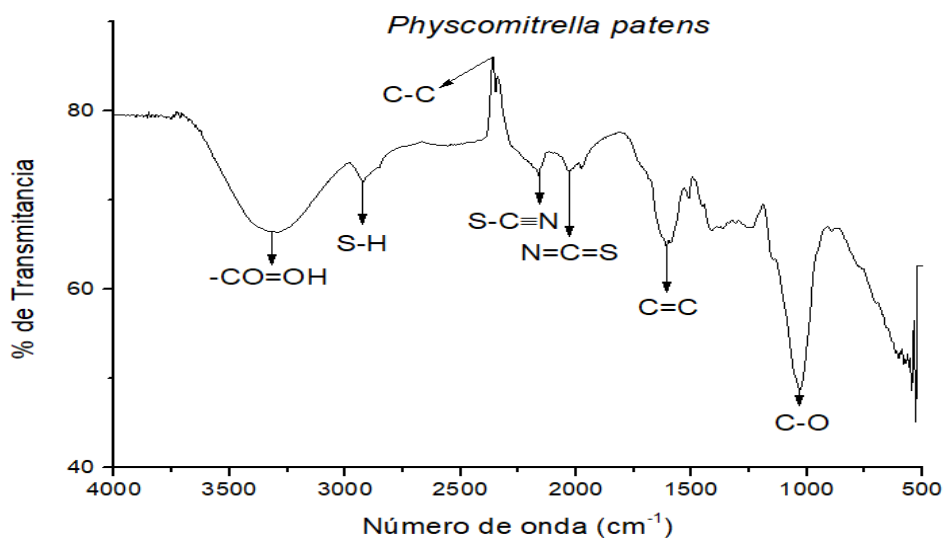


Figura 3.2 Espectro de IR del musgo *Physcomitrella patens*

Haciendo una comparación de todos IR analizados anteriormente, se encuentra que los musgos *Leskea angustata*, *Didymodon rigidulus*, *Brachilecium ruderale* y *Cryphaea patens* presentan la misma estructura referente a los grupos funcionales, en cambio el musgo *Physcomitrella patens* están presentes los grupos aromático y alifáticos. El cambio generado en la estructura de un musgo, se presenta en las pectinas que son los componentes principales de las paredes celulares de las plantas (Pelloux *et al.*, 2007). Las células vegetales están rodeadas por una pared celular dinámica que desempeña muchos papeles biológicos esenciales, incluida la regulación de la expansión celular y el intercambio iónico (Popper, 2008), a través del cual se da la absorción del metal en el musgo. El cambio en la estructura influyen en el desarrollo de la planta y en las respuestas al estrés (Pelloux *et al.*, 2007).

3.3 Análisis de área superficial

La isoterma de adsorción-desorción del musgo *Leskea angustata* se observa en la Figura 3.3, corresponde al tipo IV, y es característica de sólidos mesoporosos. Presenta un área superficial de 19.87 m²/g, que en comparación con la cascará de cacahuete como lo reportan Ali *et al.* (2013), tiene un área superficial de 0.57 m²/g, esto indica que el musgo tiene una mayor área superficial en comparación con otros materiales. Las raíces de plantas acuáticas *Eichornnia crassipes* y *Typha latifolia*

tienen un área 3.02 y 3.08 m^2/g (Martínez *et al.*, 2013), sin embargo, un bagazo de caña activado tiene un área superficial de 378.9 m^2/g (Colpas *et al.*, 2017). El área del musgo *Leskea angustata* se encuentra entre los dos materiales anteriormente mencionados. La Figura 3.4, representa una tendencia lineal, es decir, no existe una inclinación a partir del segundo punto que indique un incremento en el área de superficie.

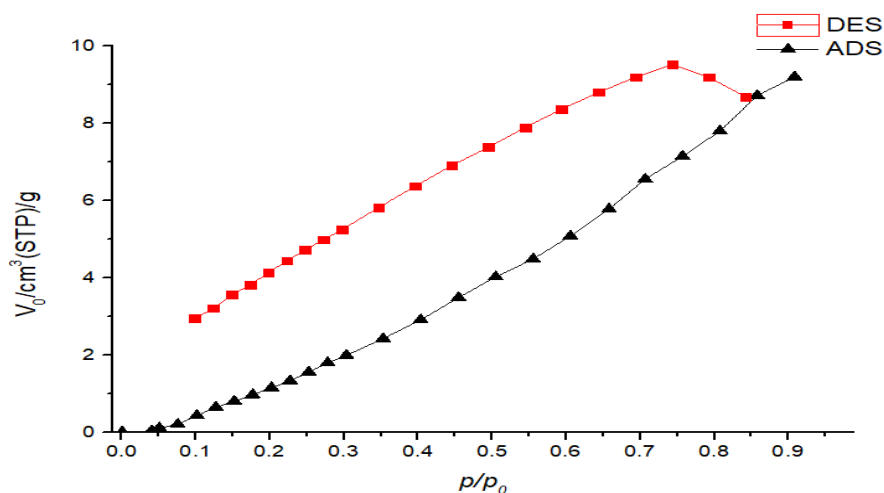


Figura 3.3 Isoterma de adsorción-desorción de N_2 en el musgo *Leskea angustata*

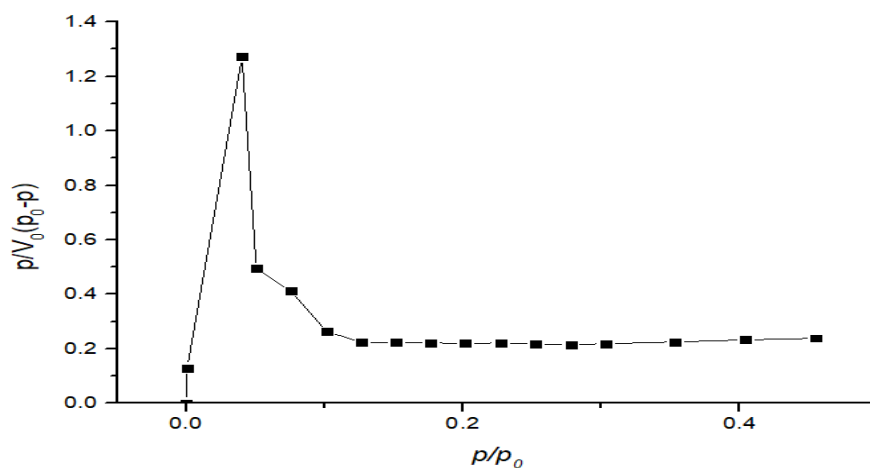


Figura 3.4 Modelo BET aplicado a la isoterma de adsorción de *Leskea angustata*

El análisis del diámetro y del volumen de poro, desempeña un papel importante en el proceso de adsorción. Los valores obtenidos muestran que el musgo contiene mesoporos (2-50 nm) por tener un diámetro medio de poro igual a 2.86 nm y un volumen total del poro de 0.0142 cm³/g, dichos resultados se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Propiedades y valores obtenidos por el método BET para el musgo *Leskea angustata*

Propiedad	Valor
$a_{s,BET}$	19.871 [m ² /g]
Volumen de poro total ($p/p_0=0.908$)	0.0142 [cm ³ /g]
Diámetro promedio de los poros	2.8621 [nm]

El área superficial tiene un efecto importante en el proceso de adsorción, Koz y Cevik (2014), demostraron que existe una correlación positiva entre las capacidades de adsorción y las áreas foliares de las especies de musgo, a través de un estudio de capacidad de adsorción de plomo, concluyeron que estos organismos son buenos bioindicadores y pueden ser utilizados para monitorear la contaminación de metales pesados en entornos urbanos.

Por otro lado la isoterma de adsorción-desorción del musgo *Physcomitrella patens* que se observa en la parte de anexos, corresponde al tipo IV, al igual que para el musgo *Leskea angustata* es característica de materiales mesoporosos, debido a que como se muestra en la Tabla 3.2 tiene un diámetro medio de poro mayor a 2, mientras que presenta un área de superficie igual a 4.9697 m²/g, por lo que tiene un área 4 veces menor al área del musgo *Leskea angustata*, esto indica que su superficie tiene menor volumen de poros y por lo tanto, posiblemente menor espacio para la bioacumulación de metales. Ares *et al.* (2012) redacta que la morfología y tamaño pueden determinar las características estructurales que lo haría inadecuado para manipular y capturar contaminantes. Para el caso de ambos musgos, son capaces de absorber contaminantes debido a las características que presentan.

Tabla 3.2 Propiedades y valores obtenidos por el método BET para el musgo *Physcomitrella patens*

Propiedad	Valor
$a_{s,BET}$	4.9697 [m ² /g]
Volumen de poro total ($p/p_0=0.908$)	0.0033[cm ³ /g]
Diámetro promedio de los poros	2.6866 [nm]

3.4 Bolsas de musgo

En la Tabla 3.3 se muestran los promedios de peso del material que se utilizó para realizar las bolsas. Los pesos de las bolsas que se colocaron en los soportes se observan en la Tabla 3.4, cabe destacar que el peso corresponde al musgo junto con todo el material mencionado en la tabla anterior. Las bolsas 1 y 2 pertenecen al musgo *Leskea angustata*, mientras que la bolsa 3 pertenece al musgo *Physcomitrella patens*.

Tabla 3.3 Pesos de material de bolsas de musgo

Material	Peso (g)
Jiffy seca	6.812 ± 0.96
Jiffy hidratada	39.507 ± 1.90
Peso de Tul (15 x 20) cm	1.767 ± 0.05
Peso del musgo <i>Leskea angustata</i> (13 x 7) cm ²	2.791 ± 0.13

Tabla 3.4 Pesos de bolsas en las estaciones

	Estación	Bolsa 1 (g)	Bolsa 2 (g)	Bolsa 3 (g)
1	Oxtotitlán	45.9 ± 0.13	43.58 ± 0.13	75.85 ± 0.18
2	Toluca Centro	51.98 ± 0.13	52.78 ± 0.13	S/C
3	Meteppec	50.98 ± 0.13	53.28 ± 0.13	75.85 ± 0.18
4	Ceboruco	43.03 ± 0.13	48.78 ± 0.13	85.32 ± 0.18
5	San Mateo Atenco	43.58 ± 0.13	42.58 ± 0.13	78.7 ± 0.18
6	Aeropuerto	47.48 ± 0.13	48.03 ± 0.13	S/C

Tabla 3.4 Pesos de bolsas en las estaciones (*continuación*)

	Estación	Bolsa 1 (g)	Bolsa 2 (g)	Bolsa 3 (g)
7	San Cristóbal Huichotitlán	50.98 ± 0.13	53.28 ± 0.13	79.96 ± 0.18
8	Alameda	48.58 ± 0.13	49.48 ± 0.13	S/C
9	Reforma	51.07 ± 0.13	51.78 ± 0.13	S/C
10	Tollocan	48.5 ± 0.13	44.73 ± 0.13	77.9 ± 0.18

S/C Sin Colocar

En la Figura 3.5 se observa los 10 sitios donde se colocaron las bolsas preparadas, las cuales se mantuvieron durante 4 meses de exposición. Durante esta exposición el musgo se vio afectado por las condiciones meteorológicas como lo son: temperatura, humedad, radiación solar, velocidad del viento y precipitación; lo que originó, que el musgo sufriera cambios en su estructura fisiológica. La radiación solar estresa el musgo y provoca que haya disminución de su capacidad fotosintética (Robinson y Waterman, 2014).

En la temporada de seca-caliente (marzo-abril), el musgo se regó dos veces por semana (no una vez por semana como se estaba haciendo). El riego fue de manera uniforme y cuidando que en el musgo no se lavaré el material adsorbido. La especie *Physomitrella patens*, presentó deshidratación en la primera semana de exposición, mientras que en la tercer semana cambio de color verde a amarillo, lo que indica que hubo disminución de clorofila (Allen, 2011) y presentándose desecación en su estructura.



Figura 3.5 Puntos de muestreo: a) OX, b) CE, c) ME, d) CB, e) SM, f) AE, g) SC, h) AL, i) RE y j) TOLL

En la Tabla 3.5 se muestran los pesos de las bolsas después de la exposición, al igual que su peso real, el cual se obtuvo restando el peso inicial antes de la exposición menos el peso final. Como se observa la diferencia de peso oscila entre 16 a 40 g aproximadamente, este valor corresponde a la humedad que se tenía en un principio en la jiffy la cual tenía un contenido de agua de ± 30 g, cabe destacar que no todas las bolsas tuvieron el mismo peso y la jiffy también presento un peso variado. Otro punto en cuestión es que no solo se perdió agua del musgo sino pequeñas partículas del cuerpo de la jiffy y del propio musgo. La pérdida de material se asocia principalmente a la velocidad del viento en el tiempo de exposición y al tamaño de malla utilizado.

Tabla 3.5 Pesos de bolsas después de exposición

Pesos de las bolsas de musgo después de la exposición				Peso real de las bolsas de exposición		
Estación	Bolsa 1 (g)	Bolsa 2 (g)	Bolsa 3 (g)	Bolsa 1 (g)	Bolsa 2 (g)	Bolsa 3 (g)
01 Oxtotitlán	27.50 ± 0.001	26.82 ±0.001	38.40 ±0.001	18.40 ± 0.001	16.76 ± 0.001	37.45 ± 0.001
02 Toluca Centro	33.61 ±0.001	26.34 ±0.001	S/C	18.37 ± 0.001	26.44 ± 0.001	S/C
03 Metepec	29.00 ±0.001	32.10 ±0.001	34.18 ±0.001	21.98 ± 0.001	21.18 ± 0.001	41.67 ± 0.001
04 Ceboruco	10.30 ±0.001	9.77 ±0.001	36.2 ±0.001	32.73 ± 0.001	39.01 ± 0.001	49.12 ± 0.001
05 San Mateo Atenco	10.84 ±0.001	11.19 ±0.001	7.90 ±0.001	32.74 ± 0.001	31.39 ± 0.001	70.80 ± 0.001
06 Aeropuerto	9.61 ±0.001	10.35 ±0.001	S/C	37.87 ± 0.001	37.68 ± 0.001	S/C
07 San Cristóbal Huichotitlán	15.20 ±0.001	23.21 ±0.001	30.596 ±0.001	35.78 ± 0.001	30.07 ± 0.001	49.36 ± 0.001
08 Alameda	34.10 ±0.001	41.00 ±0.001	S/C	14.48 ± 0.001	8.48 ± 0.001	S/C
09 Reforma	29.31 ±0.001	M/P	S/C	21.76 ± 0.001	M/P	S/C
10 Tollocan	10.58 ±0.001	10.40 ±0.001	10.00 ±0.001	37.92 ± 0.001	34.33 ± 0.001	67.90 ± 0.001

S/C Sin Colocar

M/P Material Perdido

La Tabla 3.6 muestra el peso del musgo perdido durante la exposición, la pérdida de material representa cerca del 50 % de la muestra total, esto es una desventaja para la investigación ya que, al tener menor cantidad de muestra, las cantidades predestinadas para cada análisis se redujeron.

Tabla 3.6 Peso de musgo *Leskea angustata* perdido durante la exposición

Estación	Peso inicial	Peso final	Peso perdido	% Peso perdido
01 San Mateo	5.39 ±0.13	2.49 ±0.001	2.90 ±0.13	54
02 Toluca Centro	6.11 ±0.13	3.10 ±0.001	3.06 ±0.13	50
03 Metepec	5.73 ±0.13	2.61 ±0.001	3.12 ±0.13	54
04 Ceboruco	5.35 ±0.13	2.29 ±0.001	3.06 ±0.13	57
05 San Mateo Atenco	5.57 ±0.13	3.18 ±0.001	2.39 ±0.13	43

Tabla 3.6 Peso de musgo *Leskea angustata* perdido durante la exposición (*continuación*)

06	Aeropuerto	5.50 ±0.13	3.16 ±0.001	2.34 ±0.13	43
07	San Cristóbal Huichotitlán	5.52 ±0.13	1.79 ±0.001	3.72 ±0.13	67
08	Alameda	5.60 ±0.13	2.65 ±0.001	2.94 ±0.13	53
09	Reforma	5.57 ±0.13	1.40 ±0.001	4.17 ±0.13	75
10	Tollocan	5.56 ±0.13	2.29 ±0.001	3.28 ±0.13	59

3.5 Seguimiento de vientos durante la exposición de musgos

Medir la dirección y velocidad del viento es un factor importante para la adsorción de partículas (metales pesados) en el musgo, debido a que los vientos transportan polen, materia orgánica, humedad, nubes, masas de aire frío o caliente, plagas y partículas de la erosión de suelos (Flores, 2010). Con apoyo de la RAMA-ZMVT y los datos medidos con el equipo Met-one 034B, se elaboró la rosa de los vientos (Figura 3.6) para cada una de las estaciones de monitoreo (Aeropuerto no se contempla debido a que no se encuentra funcionando), correspondientes al periodo de exposición (enero-julio 2017). Dichas rosas se realizaron con el programa WRPLOT View Freeware Wind Rose Plots for Meteorological Data 8.0.0, para lo cual se registraron los datos por hora de dirección (grados) y velocidad del viento (m/s). Para los puntos de muestreo en los parques no se realizaron por no contar con datos de dirección y velocidad del viento. La dirección del viento representada por las flechas con tendencia más larga corresponde a las estaciones de Oxtotitlán y Centro, las cuales mantuvieron la misma dirección del este al oeste, mientras que en Metepec la dirección fue del sureste al noroeste, en Ceboruco fue del noroeste al sureste, en San Mateo del norte al sur y en San Cristóbal del sur al norte.

Los datos de la intensidad del viento se tomaron conforme a lo descrito en la escala de Beaufort, en la parte derecha de cada rosa se muestra la barra de colores los cuales indican la intensidad del viento que se presentó. El color azul claro representa a vientos fuertes con \geq a 11.10 m/s de velocidad, donde las ramas grandes se mueven y las

sombrillas son difíciles de controlar. El color verde representa vientos frescos con una velocidad de 8.8 a 11.10 m/s donde los árboles pequeños comienzan a moverse. El color azul rey representa vientos moderados con velocidad de 5.7 a 8.8 m/s donde el polvo y pequeñas ramas se mueven. El color rojo representa vientos suaves o flojos con una velocidad de 3.6 a 5.7 m/s, donde las banderas semiextendidas y las hojas se empiezan a mover. El color amarillo representa vientos ligeros con una velocidad de 2.10 a 3.6 m/s, donde se siente el aire ligero en el cuerpo. El color gris representa calma o vientos muy menores, con una velocidad menor a 2.10 m/s, donde hay viento suave verticalmente (VentDepot, 2011).

Las estaciones que presentaron mayor velocidad de vientos fueron San Cristóbal y Oxtotitlán con vientos suaves, mientras que en Metepec y Centro se mantuvieron los vientos ligeros durante la exposición. Caballero *et al.* (2013), reportó que la ZMVT se encuentra en la zona de influencia de los vientos alisios, cuya intensidad se expresa más bien débil e incluso estable en el período que comprende la época fría predominando los vientos provenientes del sur y con dirección norte.

En el período que comprende la época seca-cálida (meses de marzo a mayo), los vientos se intensifican más y modifican su curso así es como se encuentran estos vientos del este con los del sur para rotar hacia el noroeste describiendo una prominente curvatura en sentido de las manecillas del reloj. Lo anterior se refleja en las direcciones mostradas, ya que no todas tienen la misma tendencia y en cada una de ellas hay variaciones como los son las construcciones que rodean cada estación, así como su ubicación.

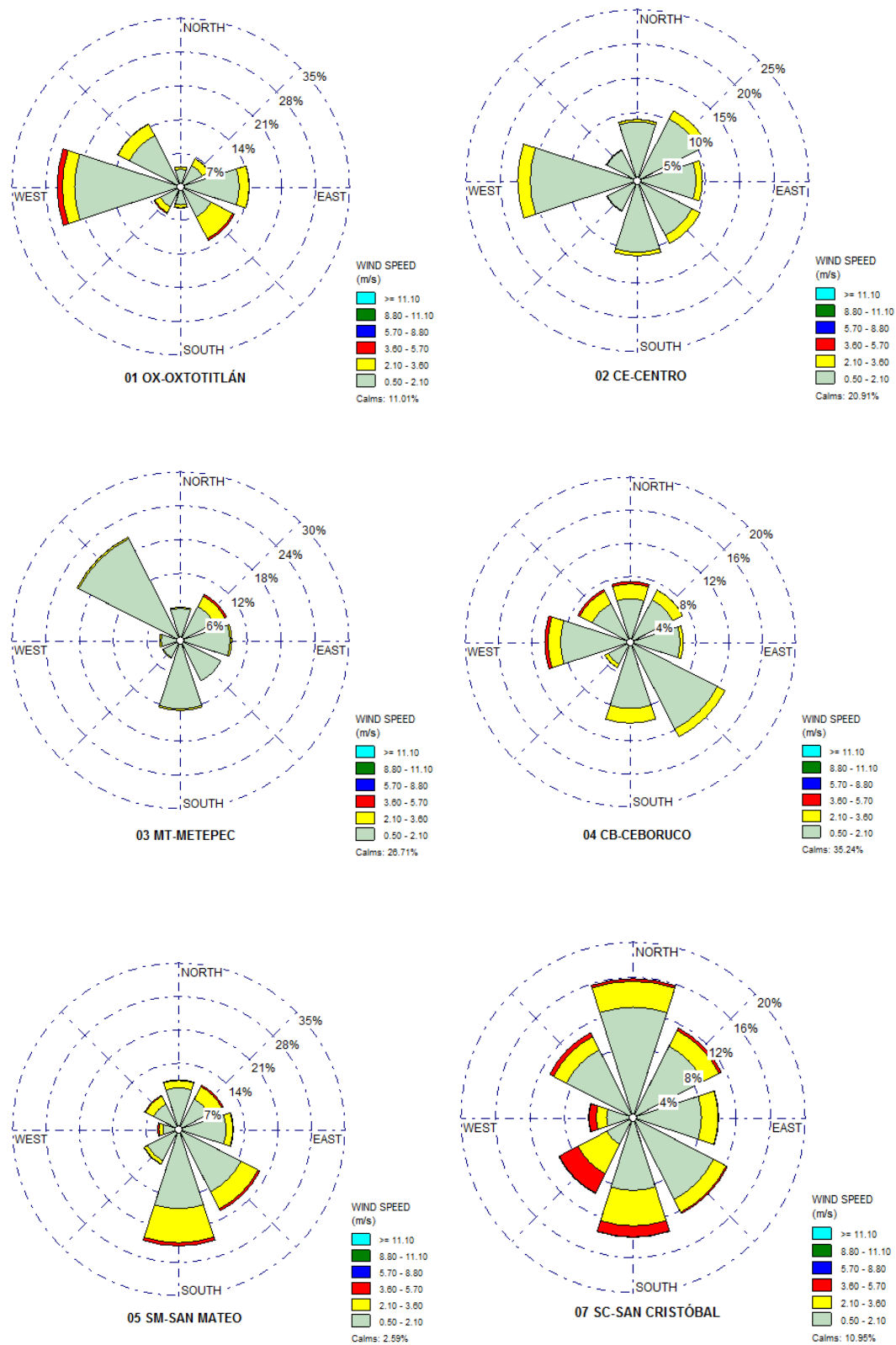


Figura 3.6 Rosa de los vientos de estaciones de monitoreo (enero-julio 2017)

3.6 Seguimiento de temperatura en tiempo de exposición de musgo

Durante la exposición de musgo en las estaciones de monitoreo, el musgo estuvo bajo condiciones ambientales que provocaron su estrés y deshidratación. Una de ellas es la temperatura, la cual afecta las condiciones favorables de crecimiento del musgo. Otra condición es el crecimiento adecuado para el musgo *Physcomitrella pantens*. La temperatura óptima en laboratorio es de 20°C a 26°C (Cove *et al.*, 2015), puede crecer a 15°C pero más lentamente, mientras que el musgo *Leskea angustata* crece a 22°C (Badillo *et al.*, 2009). La cual a condiciones controladas tienen un efecto positivo en ambos musgos, pero al exponerlos al medio ambiente, sufren efectos y cambios drásticos de temperatura, que originan que se sequen y pierdan estabilidad para mantenerse fijos, por lo que se justifica la pérdida de material durante la exposición. La Figura 3.7, representa los promedios de temperatura para los meses de enero a julio proporcionados por la RAMA-ZMVT (medidos en un equipo Global WE 700), el mes que presentó mayor temperatura es mayo con (16.3°C-18.8°C), mientras que enero fue el mes donde se registraron las temperaturas más bajas (11.1°C-13.1°C) durante la exposición.

La estación que presentó mayor temperatura fue Metepec con 18.8°C, seguido de Ceboruco con 18.2°C, San Mateo con 18°C, Centro con 17.8°C, San Cristóbal con 17.7°C y Oxtotitlán 16.3°C. Dichas temperaturas provocaron que el musgo se secará en todas las estaciones, a pesar que se realizaba un riego semanal. El musgo no fue capaz de tolerar las condiciones exteriores, lo que provocó un estado de estrés, su deshidratación, pérdida de color y reducción en su tamaño debido a la falta de agua. Frontasyeva *et al.*, (2009) realizaron un estudio en el cuál encontraron que el musgo aun estando seco es capaz de seguir acumulando metales, pero en menor proporción que un musgo húmedo.

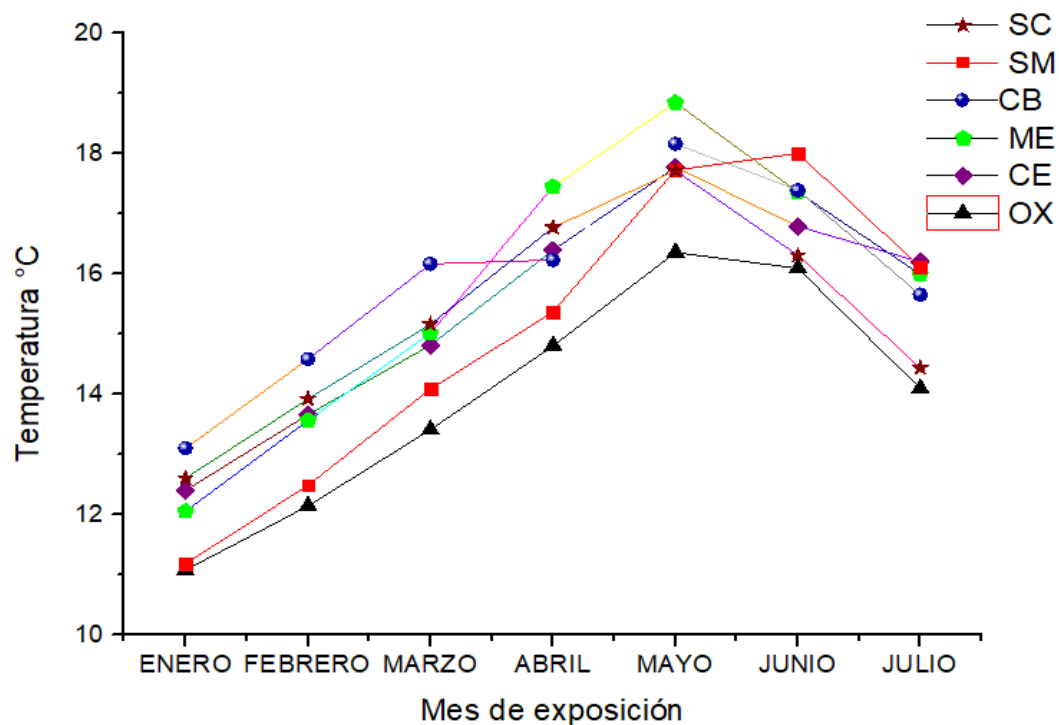


Figura 3.7 Seguimiento de temperatura en las estaciones de muestreo

3.7 Seguimiento de partículas PM_{10} y $PM_{2.5}$

En la Figura 3.8, se muestra la concentración de las partículas PM_{10} en cada una de las estaciones donde se expusieron los musgos. Como se observa, la estación con mayor concentración de partículas es San Cristóbal con $125 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durante el mes de enero, seguido de San Mateo con $114 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en el mes de febrero, Metepec con $103 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en enero, Oxtotitlán con $101 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en enero, Ceboruco con $97 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en febrero y Centro con $88 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en febrero. En enero y febrero se observó mayor presencia de partículas, mientras que junio y julio una menor concentración, esto se debe a la presencia de lluvias y a la disminución los vientos, debido a que las partículas son arrastradas en el ambiente. De acuerdo a los límites que marca la norma NOM-025-SSA1-2014 todas las estaciones sobrepasan el valor límite con concentraciones mayores a $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por día durante la mayor parte de exposición, sin embargo, en los meses de junio-julio dichas concentraciones se encuentran dentro de norma.

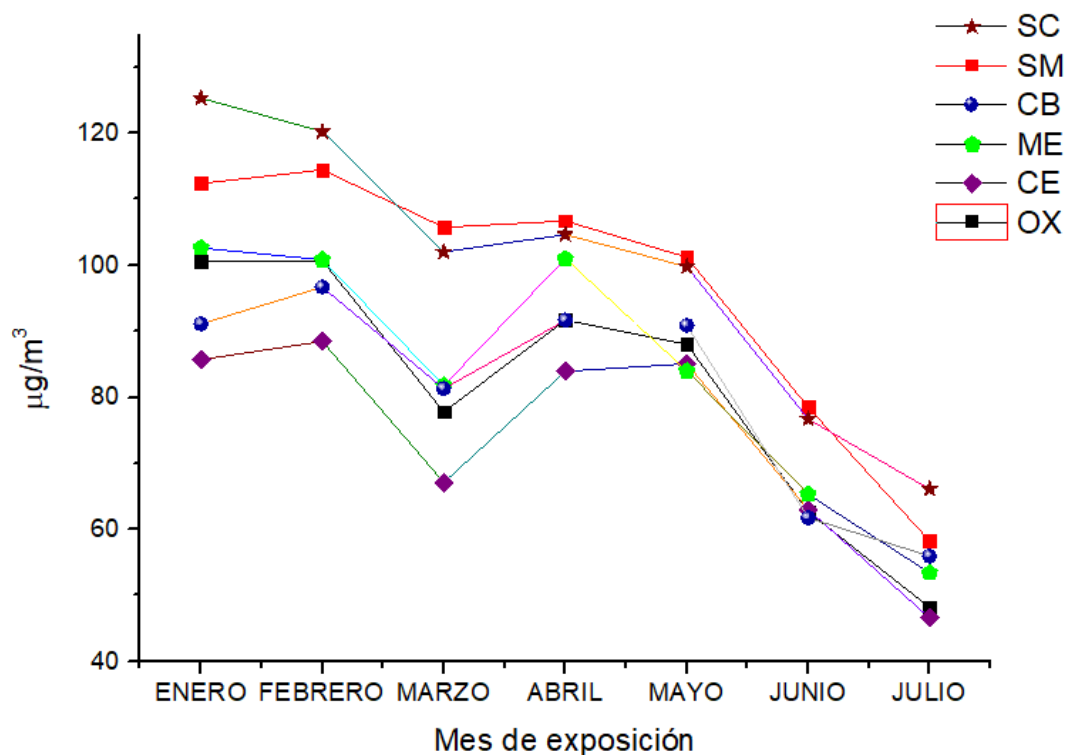


Figura 3.8 Seguimiento de PM_{10} en estaciones de monitoreo

Las partículas menores a 10 micrómetros (PM_{10}) son emitidas principalmente en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca, por los suelos erosionados y zonas agrícolas, la resuspensión del polvo de vialidades sin pavimentar y de las actividades de la construcción, así como por las emisiones vehiculares. El tamaño de estas partículas ocasiona su sedimentación rápida y en condiciones de viento débil recorren distancias cortas (Secretaría del Medio Ambiente del Estado de México, 2012).

Las partículas PM_{10} y $PM_{2.5}$ son los contaminantes más comunes debido a que exceden frecuentemente los límites establecidos en las normas mexicanas de calidad del aire (Macedo *et al.*, 2016). Este seguimiento durante el periodo de exposición del musgo tuvo la finalidad de observar los tiempos en que el organismo pudo tener mayor contacto con la presencia de metales los cuales se encuentran presentes en dichas partículas, para lo cual la RAMA-ZMVT, cuenta con un analizador automático Met-One BAM 1020 para medir las partículas suspendidas a través del cual se obtuvieron los datos del presente seguimiento durante los meses de enero a julio del presente año.

La Figura 3.9 muestra la concentración de $PM_{2.5}$ en las estaciones de monitoreo donde se observó que todas las estaciones sobrepasan el límite que marca la norma de $45 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por día, durante el mes de marzo y la primera semana de abril, las concentraciones se mantuvieron por debajo del límite en todas las estaciones, esto se debe a la menor velocidad de los vientos durante este periodo.

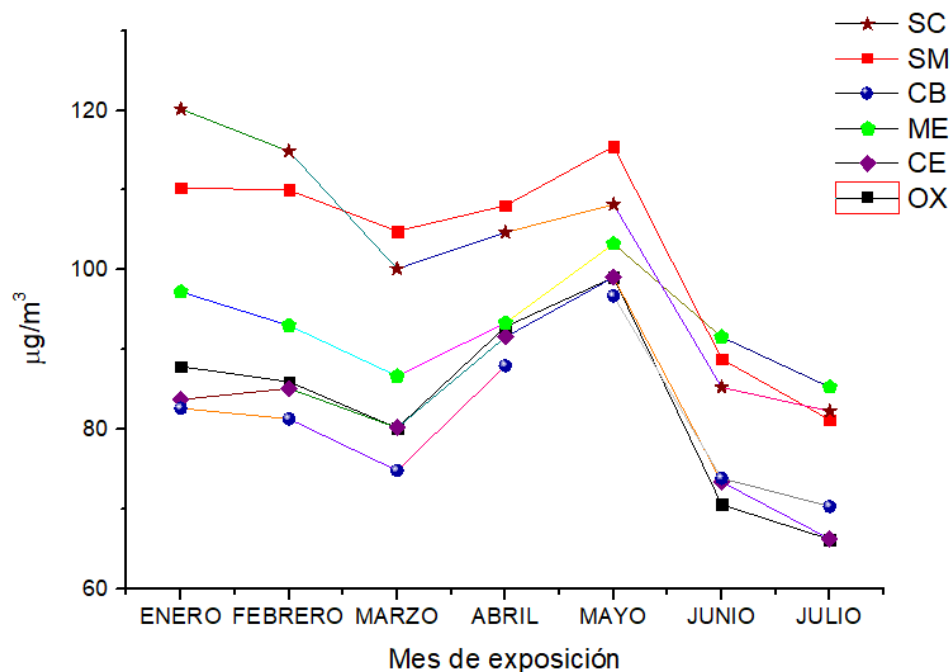


Figura 3.9 Seguimiento de $PM_{2.5}$ en estaciones de monitoreo

Analizando las figuras 3.8 y 3.9 las cuales difieren en el tamaño de partícula, se han tenido altos índices de concentraciones de partículas para PM_{10} , ya que se han reportado concentraciones de $195 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por día en San Cristóbal seguido con $144 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por día en San Mateo, para las $PM_{2.5}$ de $85 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por día en San Mateo y $82 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por día en San Cristóbal; la ubicación de dichas estaciones está cerca de la zona industrial y del aeropuerto, mientras que San Cristóbal está ubicada en una comunidad que cuenta con talleres textiles. Cabe mencionar que la acumulación de metales en el musgo está en relación con la escala geográfica y/o la dinámica temporal local, de modo que las tendencias a pequeña escala de la concentración de metales traza en el tejido de musgo están fuertemente afectadas por fuentes locales de contaminación y/o factores ambientales específicos del sitio (Gerdol *et al.*, 2014). Se

observa que, en los meses de junio y julio, ambas concentraciones bajan radicalmente. La abundancia de precipitación son las causas principales de la ausencia de absorción de metales en algunos casos, presumiblemente debido a la pérdida de elementos a través del lavado (Ares *et al.*, 2015).

3.8 Cuantificación de metales por AAS en muestras de bioensayo

Los resultados de la lectura de metales en musgo de los bioensayos mediante EAA se muestran a continuación:

Tabla 3.7 Concentraciones del material de referencia Tomato Leaves

Tomato Leaves	Metal	Concentración de referencia (mg/Kg)	Concentración leída (mg/Kg)	% de recuperación
	Cu	11 ± 1	10.8	98.2
	Cd	3.0	2.97	99
	Pb	6.3 ± 0.3	6	95.64
	Zn	62 ± 6	61.33	98.92

En la tabla 3.7 se muestran las concentraciones del estándar certificado Tomato Leaves, el cual nos indica que la técnica es confiable de acuerdo a las lecturas obtenidas, el % de recuperación se encuentra cerca del 100 por ciento para todos los metales.

Tabla 3.8 Concentración de Zn en el musgo *Leskea angustata* después de 30 días de exposición

Muestra	Concentración inicial (mg/Kg)	Concentración leída (mg/Kg)	Concentración acumulable en musgo (mg/Kg)
Zn 5	98.49 ± 6.62	155.34 ± 6.62	56.85 ± 6.62
Zn 25	98.49 ± 5.30	268.54 ± 5.30	170.06 ± 5.30
Zn 45	98.49 ± 4.06	415.50 ± 4.06	317.01 ± 4.06

Los resultados de la determinación de Zn en el musgo se presentan en la Tabla 3.8, el número seguido del metal, indica la concentración a la que fue expuesto en el laboratorio (Zn 5= Zn 5 mg/L). Se observa que conforme aumenta la concentración del metal, mayor es la concentración de acumulación en el tejido del musgo. El Zn es usado por el musgo como nutriente, pero en grandes cantidades le causa daño en su estructura (Xu *et al.*, 2011).

Tabla 3.9 Concentración de Cd en el musgo *Leskea angustata* después de 30 días de exposición

Muestra	Concentración inicial (mg/Kg)	Concentración leída (mg/Kg)	Concentración acumulable en musgo (mg/Kg)
Cd 0.5	0.82 ± 0.5	9.78 ± 0.5	8.96 ± 0.5
Cd 1	0.82 ± 0.5	9.07 ± 0.5	8.24 ± 0.5
Cd 10	0.82 ± 0.25	28.30 ± 0.25	27.48 ± 0.25

La Tabla 3.9 presenta los valores obtenidos para el Cd, se observa que la diferencia entre las dos primeras concentraciones es menor que 1 mg/Kg, sin embargo, se debía esperar que la concentración inicial fuera menor, en este caso, la segunda concentración tuvo una menor cantidad. Para la concentración de 10 mg/L la concentración acumulada es tres veces mayor a las anteriores. El cadmio causa una reducción más fuerte y más rápida en el contenido de proteína soluble que los otros metales probados (Xu *et al.*, 2011), por lo que la presencia de este metal en el tejido del musgo provoca su estrés.

Tabla 3.10 Concentración de Cu en el musgo *Leskea angustata* después de 30 días de exposición

Muestra	Concentración inicial (mg/Kg)	Concentración leída (mg/Kg)	Concentración acumulable en musgo (mg/Kg)
Cu 35	19.33 ± 8.67	299.67 ± 8.67	280.34 ± 8.67
Cu 55	19.33 ± 0.73	357.04 ± 0.73	337.71 ± 0.73
Cu 75	19.33 ± 0.94	384.48 ± 0.94	365.15 ± 0.94

La Tabla 3.10 presenta los valores obtenidos para el Cu, se visualiza que la concentración de metal acumulado en el tejido del musgo aumenta de manera drástica con una concentración mayor a 200 mg/Kg, en comparación con la concentración inicial. Cuando el musgo se somete a concentraciones elevadas de contaminantes es capaz de absorber una mayor concentración en sus tejidos.

Tabla 3.11 Concentración de Pb en el musgo *Leskea angustata* después de 30 días de exposición

Muestra	Concentración inicial (mg/Kg)	Concentración leída (mg/Kg)	Concentración acumulable en musgo (mg/Kg)
Pb 10	19.33 ± 2.98	100.17 ± 2.98	80.84 ± 2.98
Pb 20	19.33 ± 6.30	128.12 ± 6.30	108.79 ± 6.30
Pb 40	19.33 ± 12.06	223.64 ± 12.06	204.31 ± 12.06

La Tabla 3.11 presenta los valores obtenidos para el Pb, se observa que la diferencia de concentración entre las dos primeras muestras de exposición oscila entre ± 20 mg/Kg, mientras que la tercer muestra tiene una diferencia de más de 100 mg/Kg, comparada con la muestra de Pb expuesta a 10 mg/L. Como se observa la cantidad de acumulación de este metal es considerablemente mayor respecto a la concentración inicial. En la Tabla 3.12 se observa un resumen de las concentraciones de los metales acumuladas en el musgo. En las cuales a la concentración leída se le resta la cantidad acumulada en el musgo blanco, para poder saber la concentración real bioacumulada durante la exposición.

Se observa que para todos los metales la concentración aumento, lo cual es proporcional a la concentración de exposición. El metal que presento una diferencia menor fue el Cd, para las dos primeras concentraciones, se calculó el coeficiente de variación que dio de 5.92% lo cual indica que fue el metal que menos se bioacumulo en el musgo *Leskea angustata*. En cuanto al Cu sus concentraciones fueron más dispersas, así como las que presentaron mayor bioacumulación.

Tabla 3.12 Concentración de metales en bioensayo de musgo *Leskea angustata*

Muestra	Concentración de exposición (mg/Kg)	Concentración bioacumulada en musgo (mg/Kg)
Zn	5	56.85 ± 6.62
Zn	25	170.06 ± 0.00
Zn	45	317.01 ± 4.06
Blanco	NA	98.49 ± 0.00
Cd	0.5	8.96 ± 0.00
Cd	1	8.24 ± 0.00
Cd	10	27.475 ± 0.25
Blanco	NA	0.82 ± 0.00
Cu	35	280.34 ± 8.67
Cu	55	337.71 ± 0.73
Cu	75	365.15 ± 0.94
Blanco	NA	19.33 ± 0.00
Pb	10	80.84 ± 2.98
Pb	20	108.79 ± 6.30
Pb	40	204.31 ± 12.06
Blanco	NA	19.33 ± 0.00

NA: No Aplica

Tabla 3.13 Factor de acumulación en bioensayo del musgo *Leskea angustata*

Muestra	Concentración de exposición (mg/Kg)	Factor de acumulación	Promedio
Zn	5	11.37	8.41
Zn	25	6.80	
Zn	45	7.04	
Cd	0.5	17.92	9.64
Cd	1	8.24	
Cd	10	2.75	
Cu	35	8.01	6.34
Cu	55	6.14	
Cu	75	4.87	
Pb	10	8.08	6.21
Pb	20	5.44	
Pb	40	5.11	

En la Tabla 3.13 se observa que las muestras con concentración más baja de exposición en cada metal, presentaron un factor de acumulación mayor, mientras que dicho factor fue reduciendo mientras que aumentaba la concentración de exposición. En el caso de estudio, todas las muestras acumularon metal de forma constante, con

excepción del Cd 0.5, el cuál presento un alto factor en relación con los demás metales. Los valores con un $AF < 3$ representan una acumulación mínima del metal, los $3 < AF < 10$ representan una acumulación moderada y los $AF > 10$ una alta acumulación del metal (Lazo *et al.*, 2013), esto indica que las muestras mayormente contaminadas son el las de Cd seguido del Zn, lo cual se puede deber a que este es un metal no esencial y al entrar en contacto con el musgo ingresa y posteriormente los mecanismos de regulación impiden que altas concentraciones puedan ingresar (destoxificación del metal). Sin embargo, el promedio de cada metal calculado indica que la acumulación fue constante principalmente para el Cu y el Pb, lo cual indica que el musgo *Leskea angustata* puede ser usado como un buen biomonitor de la contaminación con metales pesados, debido a que refleja de manera constante la concentración que hay en su entorno, por lo tanto, cuando el musgo se somete a diferentes concentraciones de metales y la relación entre lo acumulado y lo expuesto es semejante (AF), es capaz de reflejar de forma adecuada lo que hay en el medio.

La Figura 3.10, representa la concentración de metales en el bioensayo de musgo *Leskea angustata* en la cual se visualiza que todas las concentraciones de exposición están por debajo de la concentración acumulada, esto se debe a la acumulación que presentó el musgo, ya que cada que se exponía al metal, este es capaz de retenerlo y mantenerlo, conforme se expone, aumenta la concentración del metal bioacumulado. Conforme a lo que se observa, los metales con mayor concentración en el musgo son: $Cu > Zn > Pb > Cd$, es decir, a mayor concentración de exposición, mayor bioacumulación del metal.

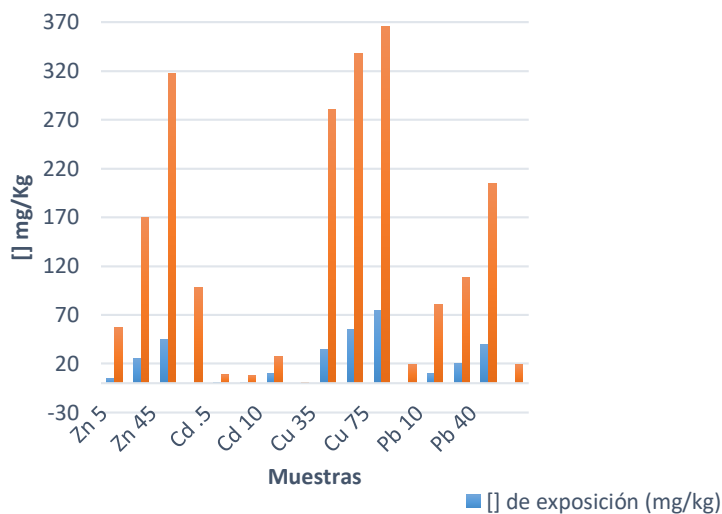


Figura 3.10 Concentración de metales en bioensayo de musgo *Leskea angustata*

Como los musgos toman sus nutrientes del entorno que los rodea, son bioindicadores adecuados en las zonas urbanas e industriales ya que los metales se depositan en ellos (Palma, 2016). Sin embargo, la concentración de contaminantes no suele permanecer localizada, sino que con frecuencia se difunde por medio de los vientos en diferente época del año atravesando fronteras (Macedo *et al.*, 2016).

Tabla 3.14 Concentración de Cd en el musgo *Physcomitrella patens* (10 días de exposición)

Muestra	Concentración inicial (mg/Kg)	Concentración leída (mg/Kg)	Concentración acumulable en musgo (mg/Kg)
Cd 10	11.59	124.73 ± 2.89	115.18 ± 2.89

Por otro lado, la Tabla 3.14 presenta los valores obtenidos para el *Physcomitrella patens*, expuesto en el laboratorio durante 10 días con una concentración de Cd a 10 mg/L. Se observa un aumento de la concentración acumulada en el musgo mayor a 100 mg/Kg. En la exposición del musgo con una solución de 10 mg/L, se observa una mayor bioacumulación en *Physcomitrella patens* que en *Leskea angustata*.

La Figura 3.11 representa la comparación de ambos musgos con respecto al metal de exposición Cd a una concentración de 10 mg/L, la cual muestra una mayor bioacumulación en el musgo *Physcomitrella patens* que en *Leskea angustata*, aunque los tiempos de exposición fueron diferentes, el musgo *Physcomitrella patens* fue capaz de absorber una mayor cantidad de metal en su tejido, lo que puede atribuirse a que tiene una mayor cantidad de poros en su tejido, recordando que a menor tamaño de poro, mayor área superficial. Otro factor a considerar es la cantidad de muestra de exposición, ya que el mismo volumen de la solución del metal se usó en una masa menor del musgo *Physcomitrella patens* (una tercera parte), por lo que puede atribuirse a que estuvo presente a una mayor cantidad de solución, en la misma concentración, pero menor tiempo.

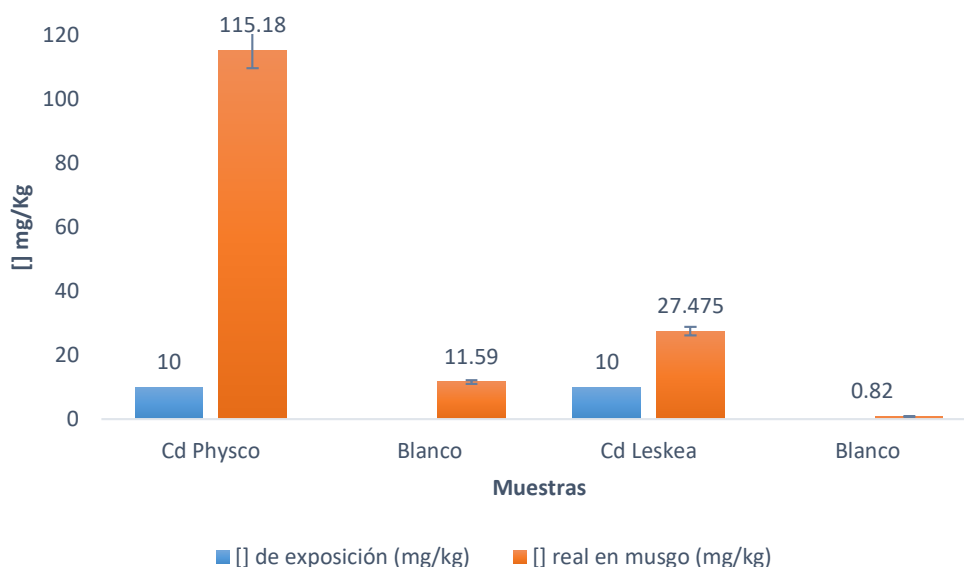


Figura 3.11 Comparación de *Physcomitrella patens* y *Leskea angustata* con Cd de 10 mg/Kg

3.9 Análisis de fitoquelatinas e isoformas en musgo *Leskea angustata*

El análisis de las muestras se divide en dos grupos que son muestras del bioensayo (musgo expuesto en el laboratorio a diferentes concentraciones de metales Cd, Pb, Cu y Zn durante 30 días), y el segundo grupo de muestras expuestas durante el periodo enero-julio (2017).

La Figura 3.12 muestra los cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas a metales pesados (Cu, Pb, Zn y Cd) a diferentes concentraciones en el laboratorio durante 30 días y patrones de tioles junto con sus complejos a una concentración de 3×10^{-5} mol/L. Se utilizó una fase móvil compuesta por 1% de TFA en agua y 1% de TFA en ACN, con un flujo de 1.2 mL/min. Tal como se observa, se descarta la presencia de fitoquelatinas, así como de GSH y γ GluCys; sin embargo, se observa un pico que puede ser característico de CysGly en las muestras y con más intensidad en la muestra del blanco.

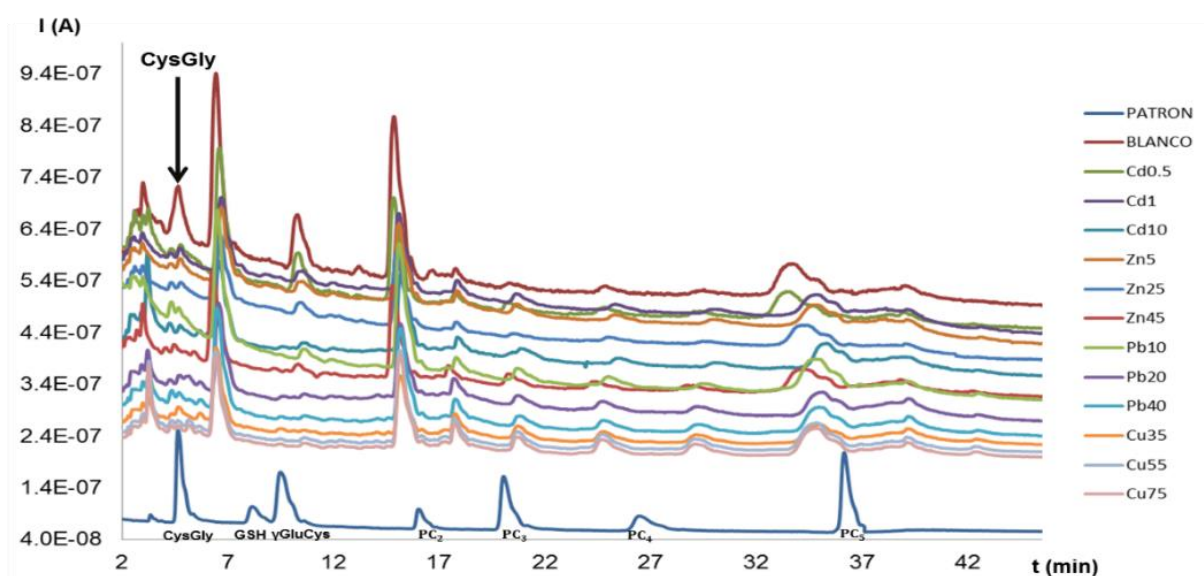


Figura 3.12 Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata*

Como no se detectó en ningún caso la presencia de GSH, el cual es el precursor de las PCs y para asegurar que la extracción había sido correcta se realizó una prueba utilizando ácido trifluoroacético (TFA) y ácido dietiltri Aminopentaacético (DTPA) en vez de agua. En la Figura 3.13 se muestran los cromatogramas superpuestos de muestra de musgo *Leskea angustata* expuesta en el laboratorio durante 30 días con Cu (75 mg/L) utilizando dos métodos de extracción con agua y TFA, así como una adición de GSH y patrones de tioles junto con sus complejos (3×10^{-5} mol/L), una fase móvil compuesta por 1% de TFA en agua y 1% de TFA en ACN, con un flujo de 1.2 mL/min, en donde se pudo ver que no hay diferencias significativas en la extracción con agua ultrapura y con TFA, salvo en los picos iniciales que se visualizan con una

mayor intensidad. De igual forma se realizó una adición de GSH ($30 \mu\text{mol/L}$) a la muestra extraída con TFA y no se detectó este compuesto en las muestras de bioensayo, por lo que se procedió a realizar las siguientes extracciones con agua ultrapura. De este estudio se deduce que no se detecta la presencia de estos compuestos en las muestras analizadas.

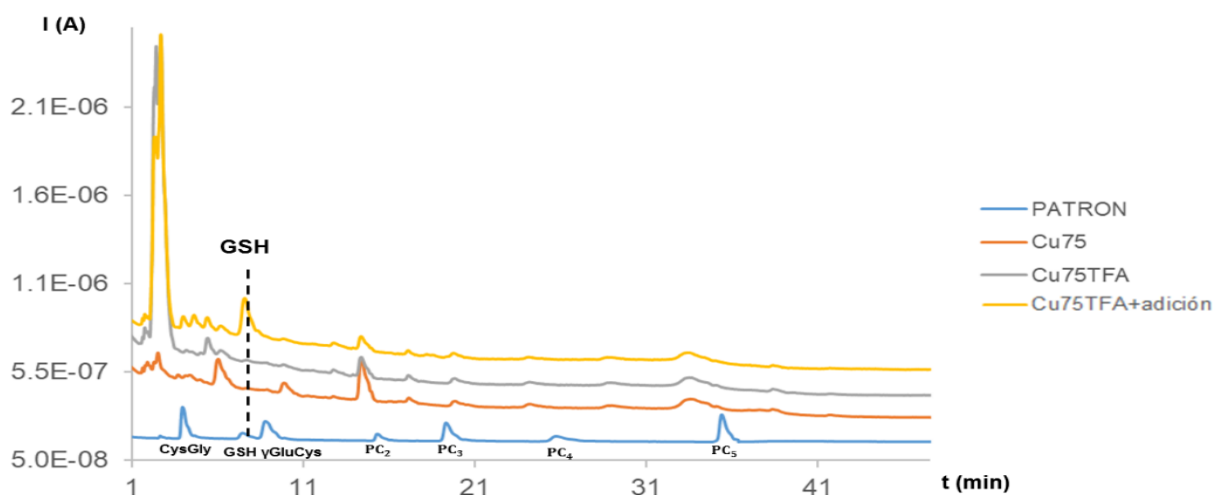


Figura 3.13 Cromatogramas superpuestos de muestra de musgo *Leskea angustata* expuesta en el laboratorio durante 30 días

La Figura 3.14 representa los cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas durante el periodo enero-julio (2017) y patrones de tioles junto con sus complejos ($3 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), utilizando una fase móvil compuesta por 1% de TFA en agua y 1% de TFA en ACN, con un flujo de 1.2 mL/min . Igual que en el caso anterior no se detectó la presencia de fitoquelatinas. En este caso en ninguna muestra se visualizó la presencia de GSH. Cabe resaltar que los cromatogramas no solo varían en cuanto al lugar de exposición si no por la intensidad de los picos. En este caso, la muestras con menor intensidad en sus picos corresponden al punto de muestreo de Aeropuerto y Alameda, mientras que San Cristóbal, Reforma, Oxtotitlán y Tolloacan muestran mayor intensidad en sus señales. No obstante, al igual que en caso anterior, no se pueden adjudicar estos picos a los compuestos estudiados.

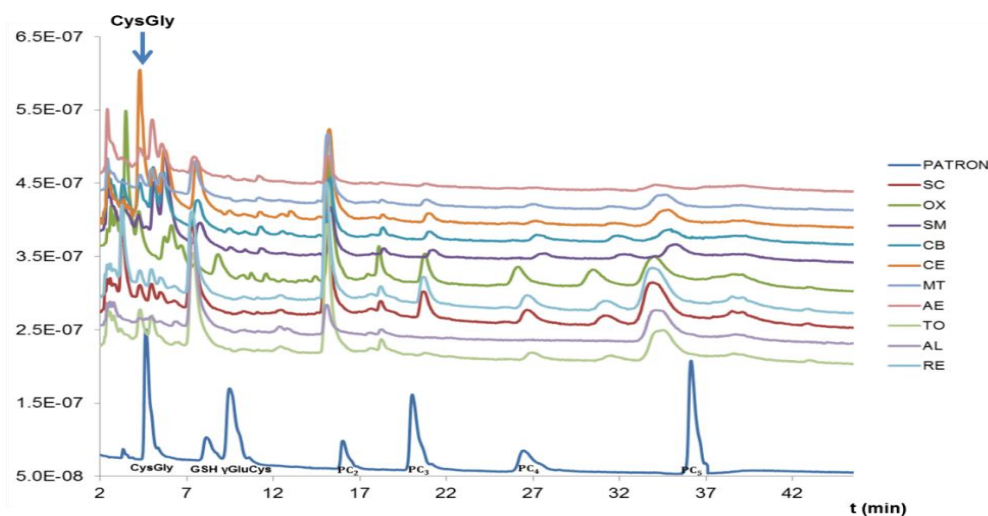


Figura 3.14 Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas durante el periodo enero-julio (2017)

En la Figura 3.15 se presentan los cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas con metales pesados (Cu (35, 55 y 75 mg/L), Pb (10, 20 y 40 mg/L), Cd (0.5, 1 y 10 mg/L), y Zn (5, 25 y 45 mg/L)) a diferentes concentraciones durante 30 días en el laboratorio y patrón de GSH, PC₃, PC₂ y sus isoformas (6×10^{-5} mol/L), utilizando una fase móvil compuesta por 1% de TFA en agua y 1% de TFA en ACN, con un flujo de 1.2 mL/min.

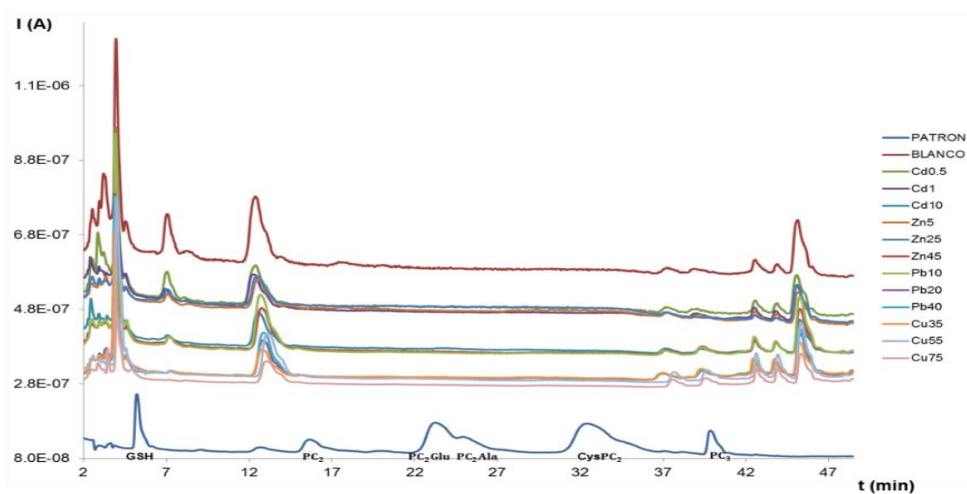


Figura 3.15 Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas con metales pesados (Cu, Pb, Cd y Zn) durante 30 días

La forma de los cromatogramas no parece indicar la presencia de ninguno de estos compuestos. Se observó que las concentraciones de metales tienden a agruparse, es

decir, de acuerdo a las concentraciones las muestras presentan las mismas señales, aunque estén expuestas a diferentes concentraciones y diferentes metales, además de que las diferencias radican en la intensidad de algunos picos.

La Figura 3.16 contiene los cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas durante el periodo enero-julio (2017) y patrón de GSH, PC₃, PC₂ y sus isoformas (6x10⁻⁵mol/L), utilizando una fase móvil compuesta por 1% de TFA en agua y 1% de TFA en ACN, con un flujo de 1.2 mL/min.

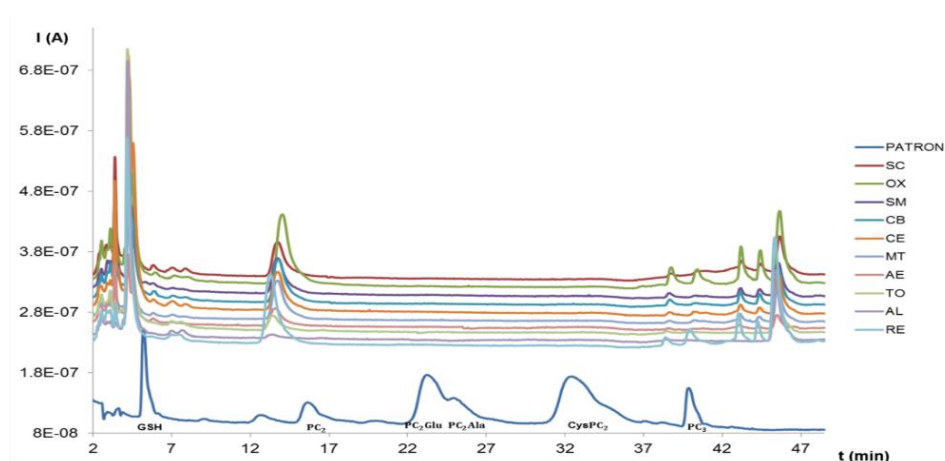


Figura 3.16 Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas durante el periodo enero-julio (2017)

Como se observa no se detectó la presencia de ninguna isoforma. Se realizaron adiciones de patrones a diferentes extractos por si pudieran asociarse algunos de los picos dudosos a alguno de los compuestos estudiados y en ningún caso se confirmó la presencia de ninguno de ellos tal como se puede ver en el apartado siguiente.

3.9.1 Análisis del musgo *Leskea angustata*

De acuerdo a los resultados anteriormente mostrados, se realizaron adiciones de patrones para corroborar la presencia o no de los compuestos que se sospechaba que pudiesen haber, para lo cual se hizo el duplicado de las muestras y si parecía haber presencia de un compuesto se procedía hacer una adición de 30 µmol/L. En las

muestras expuestas del periodo de muestreo se realizó la adición correspondiente a 30 μL c/u de CysGly, GSH, γGluCys y PC_{2-5} . Los cromatogramas obtenidos se observan en la Figura 3.17 donde se visualiza posible presencia de CysGly en las muestras.

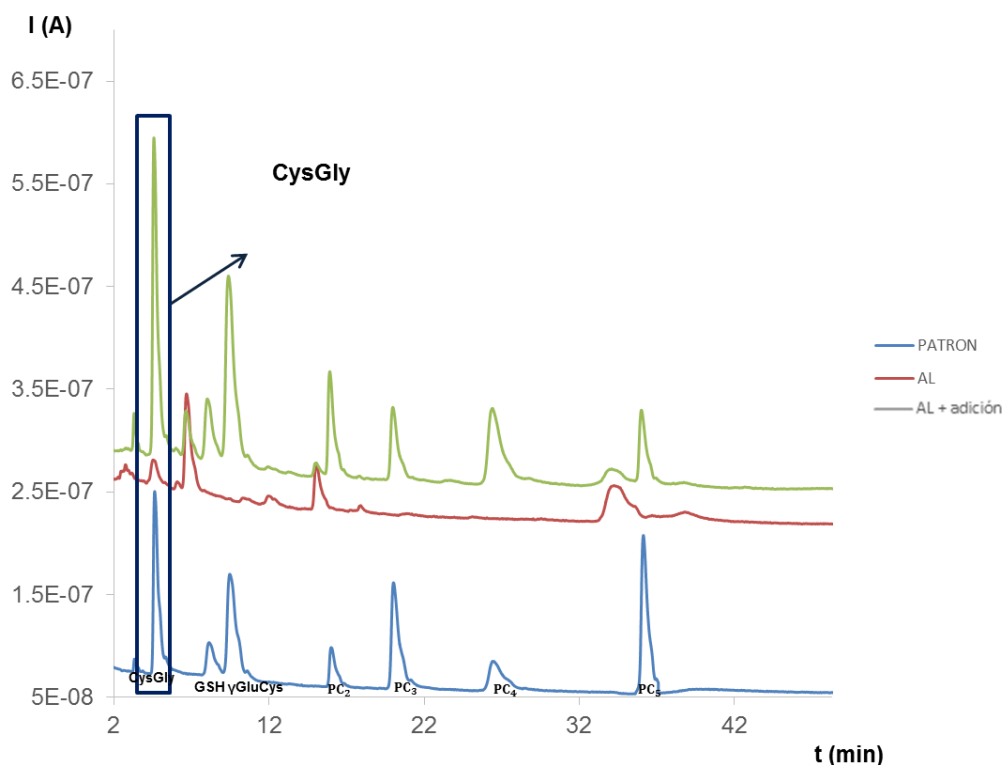


Figura 3.17 Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas durante el periodo enero-julio (2017)

Se procedió a realizar adiciones de las isoformas en el duplicado. En la Figura 3.18 se visualizan los cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas durante el periodo enero-julio (2017) con adición de GSH, CysGly y γGluCys , así como patrón de GSH, PC_3 , PC_2 y sus isoformas ($6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), utilizando una fase móvil compuesta por 1% de TFA en agua y 1% de TFA en ACN, con un flujo de 1.2 mL/min.

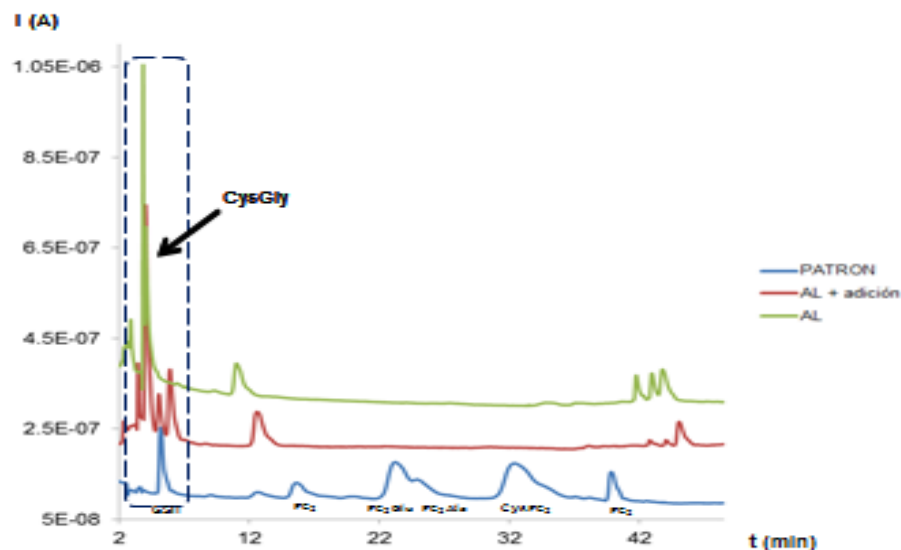


Figura 3.18 Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas durante el periodo enero-julio (2017)

Para corroborar si algunas muestras podían tener CysGly o GSH, se realizaron las rectas de calibrado para estos compuestos, las cuales se determinaron el mismo día que se realizó el triplicado de las muestras. En la Figura 3.19 se muestran los cromatogramas superpuestos de patrones de CysGly y GSH a diferentes concentraciones utilizando el gradiente de elución para isoformas, en una fase móvil compuesta por 1% de TFA en agua y 1% de TFA en ACN, con un flujo de 1.2 mL/min. Así como las curvas de calibrado para estos dos compuestos, del lado derecho se visualiza la representación gráfica de las rectas de calibrado. La Tabla 3.15 muestra las rectas de calibración obtenidas para la CysGly y el GSH.

Tabla 3.15 Rectas de calibración para los analitos en estudio

COMPUESTO	RECTA DE CALIBRADO	R ²
GSH	$y = 3E-08x + 1E-07$	0.9935
CysGly	$y = 6E-08x - 5E-07$	0.9782

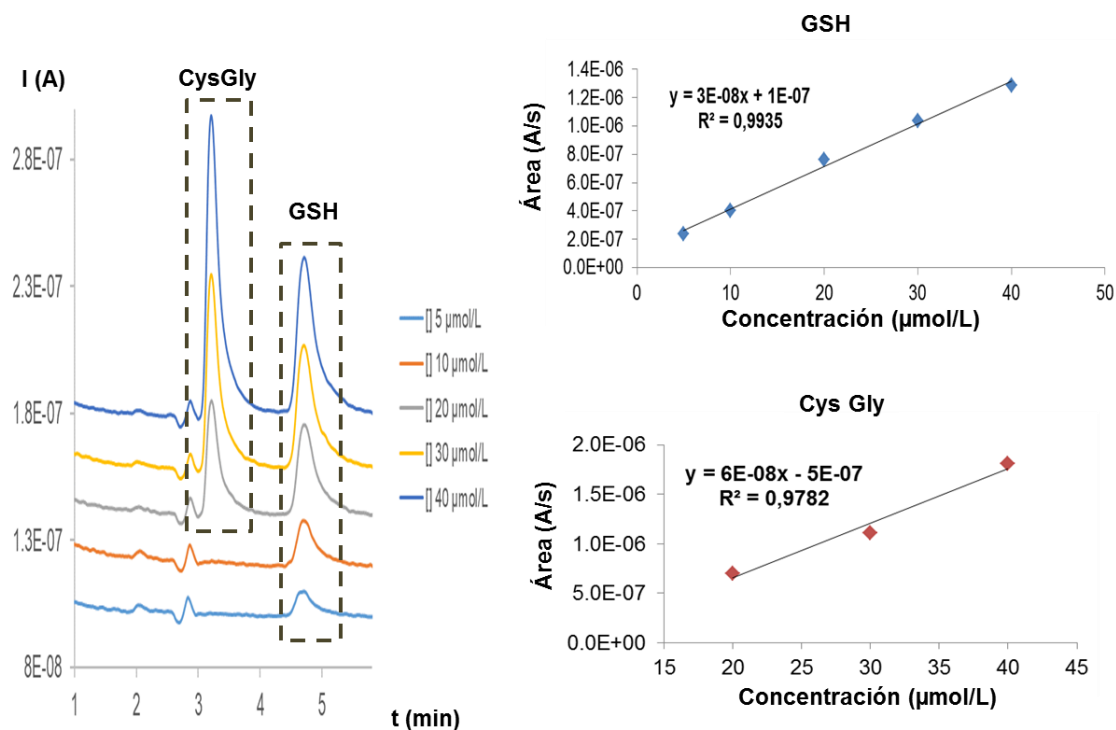


Figura 3.19 Representación de los cromatogramas superpuestos de patrones de CysGly y GSH a diferentes concentraciones utilizando el gradiente de elución

A continuación, se realizó el triplicado de las muestras correspondientes del periodo de muestreo ya que fueron las que podían tener CysGly y GSH. Antes de las lecturas se prepararon patrones de los analitos a diferentes concentraciones y se inyectaron el mismo día que se leyeron las muestras, para poder estar seguros que realmente correspondían. Los cromatogramas obtenidos en el triplicado de las muestras del primer periodo de exposición se muestran en la Figura 3.20, donde se comprueba que no existe presencia de ningún analito en estudio. Los picos de las muestras son comparados con patrones (30 µmol/L) de CysGly y GSH. También se visualiza que en estas muestras no hay presencia de CysGly ni GSH.

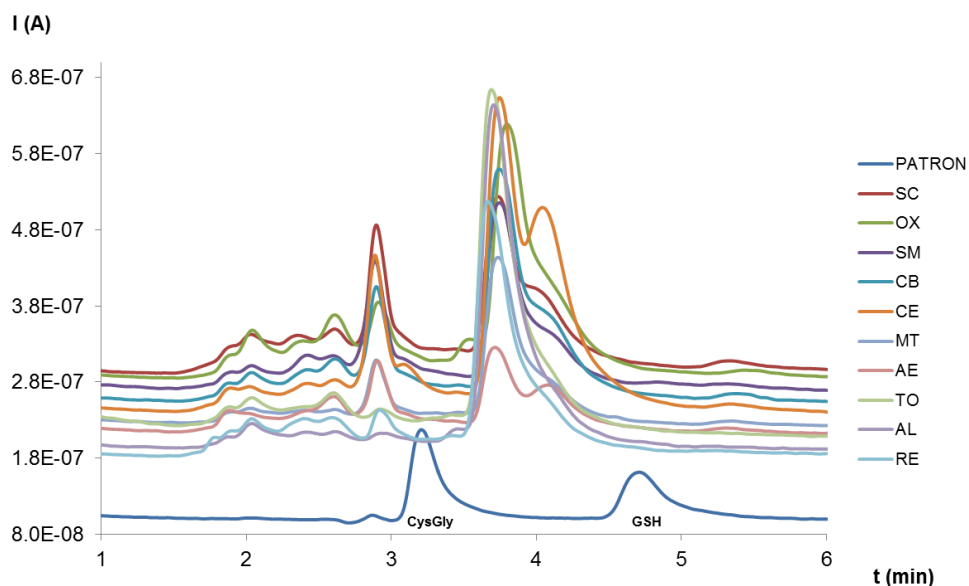


Figura 3.20 Cromatogramas superpuestos de muestras de musgo *Leskea angustata* expuestas durante el periodo enero-julio (2017) flujo de 1.2 mL/min

3.9.2 Análisis de PCA de HPLC líquida

Con los cromatogramas obtenidos se construyó una matriz sobre la que se realizó una corrección de línea de base, en concreto se aplica la corrección Automatic Weighted Least Squares. En la Figura 3.21 se muestran los resultados del análisis por PCA de los cromatogramas de las muestras del periodo de muestreo, los (tres componentes principales y un 66.2% de varianza acumulada) permiten igualmente separar claramente la zona de parques del resto de las zonas.

Como se visualiza, los sitios de las muestras de los parques se relacionan directamente con la muestra de blanco, es decir, se agrupan notablemente respecto a las muestras de la zona sur que están más mezcladas. Las diferentes distribuciones observadas, también nos muestran además de las zonas, su distribución en cuanto a sus componentes. La zona centro tuvo una distribución dispersa de sus datos diferente a la de los parques, es cambio, presenta mayor similitud a la zona sur en sus componentes.

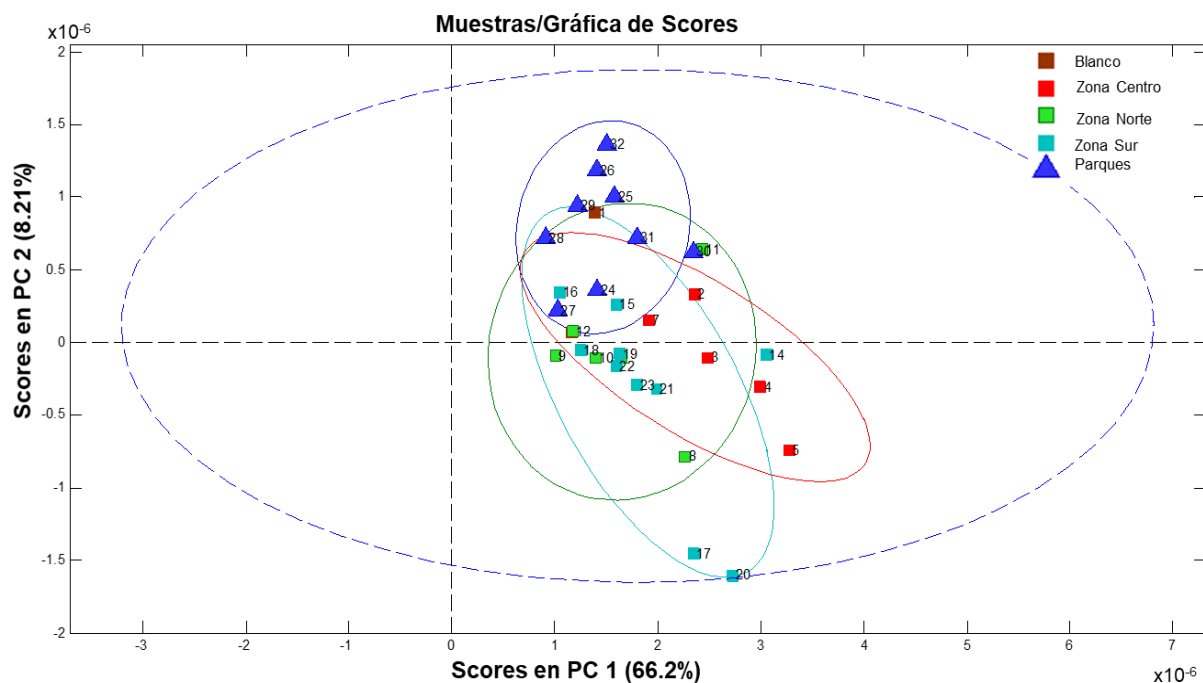


Figura 3.21 Gráfico de scores del análisis por PCA de los cromatogramas de musgo *Leskea angustata* expuestas en los sitios de monitoreo.

De acuerdo al análisis de PCA a través del estudio de HPLC líquida, la zona sur (Meteppec, Ceboruco y San Mateo) presentan una mayor dispersión en sus componentes, seguido de la zona norte (Aeropuerto y San Cristóbal) y la zona centro (Oxtotitlán y Centro). Por último, la zona de parques (Alameda, Tollocan y Reforma). Esta diferencia entre sus componentes por zonas, puede ser atribuida a las características de los sitios de exposición. Debido a que el musgo es capaz de absorber los componentes de su entorno, lo que indica que, a diferencia de la zona de parques, las otras zonas presentan características diferentes lo que provocó que el musgo tuviera cambios en su estructura.

3.10 Metales pesados en musgo *Leskea angustata* expuesto en la ZMVT

Los resultados del análisis mediante ICP-MS se muestran en las Tablas 3.16 y Tabla 3.17, donde se representan las concentraciones de los estándares certificados

utilizados en esta técnica: Tomato Leaves y IAEA-336, así como de las muestras de musgo:

Tabla 3.16 Concentraciones del material de referencia Tomato Leaves

Tomato Leaves	Metal	Concentración de referencia (mg/Kg)	Concentración Leída (mg/Kg)	% de Recuperación
	Cd	3.0	1.46 ± 0.20	48.67
	Cu	11 ± 1	4.70 ± 0.30	42.73
	Pb	6.3 ± 0.3	5.60 ± 0.45	88.89
	Zn	62 ± 6	31.00 ± 1.40	50

Se puede observar que el porcentaje de recuperación para este material oscila del 40% al 80%, es decir, la exactitud del método con este patrón de referencia tiene una veracidad media para los metales de Cd, Cu y Zn. Sin embargo, para el caso del Pb, presento una exactitud cerca del 90%. Por lo anterior, se procedió a buscar otro material de referencia más próximo a la muestra de estudio, en su caso un IAEA-336 liquen, como se muestra a continuación.

Tabla 3.17 Concentraciones del material de referencia IAEA-336

IAEA-336	Metal	Concentración de referencia (mg/Kg)	Concentración Leída (mg/Kg)	% de Recuperación
	Cd	0.117	0.10 ± 0.005	85.47
	Cu	3.6	3.03 ± 0.20	84.17
	Pb	4.9	4.20 ± 0.25	85.71
	Zn	30.4	25.81 ± 0.75	84.90

Se observa que todos los porcentajes de recuperación se encontraron por encima del 80%, teniendo una mejor veracidad del método. Para realizar este análisis, a las concentraciones leídas se les resta el porcentaje de humedad (8.39 ± 0.64), para poder tener hacer las comparaciones con este material de referencia (Figura A-8.1).

Para este estudio se contó con una muestra de blanco representativa de todas las estaciones de monitoreo, la cual nos da la concentración inicial. De igual forma la lectura de las muestras después de la exposición dio una segunda concentración. Ambas concentraciones se representan en la Tabla 3.18.

Tabla 3.18 Concentración inicial y final de Cu, Cd, Pb y Zn en musgos de la ZMVT (mg/Kg)

Estación	Cd		Cu		Pb		Zn	
	*A	*B	A	B	A	B	A	B
01 OX	0.66 ± 0.04	ND	15.54 ± 0.75	26.60 ± 0.90	13.39 ± 1.11	30.10 ± 0.20	92.49 ± 2.88	486.2 ± 12.2
02 CE		0.75 ± 0.05		26.64 ± 0.62		31.29 ± 2.27		817.0 ± 32.4
03 ME		ND		21.77 ± 0.35		35.98 ± 2.79		370.9 ± 9.1
04 CB		ND		22.96 ± 0.50		22.93 ± 1.66		1759 ± 45
05 SM		0.73 ± 0.05		22.28 ± 0.50		91.23 ± 6.32		2832 ± 70
06 AE		0.76 ± 0.05		25.46 ± 0.90		62.47 ± 4.81		1084 ± 40
07 SC		ND		19.95 ± 0.71		30.43 ± 1.87		692.9 ± 22.4
08 AL		0.73 ± 0.06		31.00 ± 2.99		20.40 ± 1.93		136.5 ± 8.5
09 RE		ND		20.96 ± 1.72		26.26 ± 2.21		106.6 ± 5.8
10 TOLL		0.89 ± 0.05		22.55 ± 0.35		105.5 ± 8.0		113.7 ± 2.5
PROM	0.66	0.63	15.54	24.02	13.39	45.66	92.49	839.88

*A Concentración inicial

*B Concentración final

ND: No Detectado

La concentración inicial para todas las muestras de los 4 metales es la misma (cada metal su concentración). La variación se encuentra en la concentración final. La diferencia entre ambas concentraciones nos da la concentración bioacumulada (Tabla 3.19) en el tejido del musgo, que es la concentración que logro absorber el musgo durante el tiempo al que fue expuesto.

El promedio que se encuentra en la parte inferior de la tabla anterior, representa la concentración media del metal en todas las estaciones, en cuanto al promedio de la parte derecha, es la cantidad media de concentración por cada estación de exposición. La estación con mayor bioacumulación de metales fue San Mateo con un promedio de 706.04 mg/Kg, mientras que la estación de la Alameda fue la menor con un promedio de 16.94 mg/Kg. Referente a la concentración por metal, el Zn presentó mayor

concentración, siendo el Cd quien presentó la menor concentración con 0.11 mg/Kg. La acumulación relativa está representada en la Tabla 3.20.

Tabla 3.19 Concentración bioacumulable de Cu, Cd, Pb y Zn en musgos de la ZMVT (mg/Kg)

Estación	Cd	Cu	Pb	Zn	Promedio
01 OX	ND	11.06 ± 0.90	16.71 ± 0.20	393.71 ± 12.2	105.33
02 CE	0.09 ± 0.05	11.1 ± 0.62	17.9 ± 2.27	724.51 ± 32.4	188.4
03 ME	ND	6.23 ± 0.35	22.59 ± 2.79	278.41 ± 9.1	76.78
04 CB	ND	7.42 ± 0.50	9.54 ± 1.66	1666.51 ± 45	420.85
05 SM	0.07 ± 0.05	6.74 ± 0.50	77.84 ± 6.32	2739.51 ± 70	706.04
06 AE	0.1 ± 0.05	9.92 ± 0.90	49.08 ± 4.81	991.51 ± 40	262.65
07 SC	ND	4.41 ± 0.71	17.04 ± 1.87	600.41 ± 22.4	155.42
08 AL	0.07 ± 0.06	15.46 ± 2.99	7.01 ± 1.93	44.01 ± 8.5	16.94
09 RE	ND	5.42 ± 1.72	12.87 ± 2.21	14.11 ± 5.8	80.3
10 TOLL	0.23 ± 0.05	7.01 ± 0.35	92.11 ± 8.0	21.21 ± 2.5	30.14
Promedio	0.11	8.48	32.27	747.39	

Tabla 3.20 Acumulación relativa del metal en el musgo (RAF)

Estación	Cd	Cu	Pb	Zn
01 OX	ND	0.71	1.25	4.26
02 CE	ND	0.48	0.71	18.02
03 ME	ND	0.40	1.69	3.01
04 CB	ND	0.48	0.71	18.02
05 SM	0.11	0.43	5.81	29.62
06 AE	0.15	0.64	3.67	10.72
07 SC	ND	0.28	1.27	6.49
08 AL	0.11	0.99	0.52	0.48
09 RE	ND	0.35	0.96	0.15
10 TOLL	0.35	0.45	6.88	0.23

El metal con mayor acumulación relativa en el musgo fue Zn con 29.62 en la estación de San Mateo, seguido con 18.02 en la estación de Ceboruco. Para el caso del Cd, no se detectó acumulación en 6 estaciones (Reforma > San Cristóbal > Oxtotitlán > Metepec > Centro \geq Ceboruco). El Cu tuvo mayor acumulación en la estación de la Alameda, siendo San Cristóbal la de menor acumulación de este metal. El Pb presento mayor acumulación en la estación de Tollocan y menor en Alameda. A continuación, se presentan las concentraciones por separado de cada metal (Figura 3.22) y se diferencian de la concentración inicial.

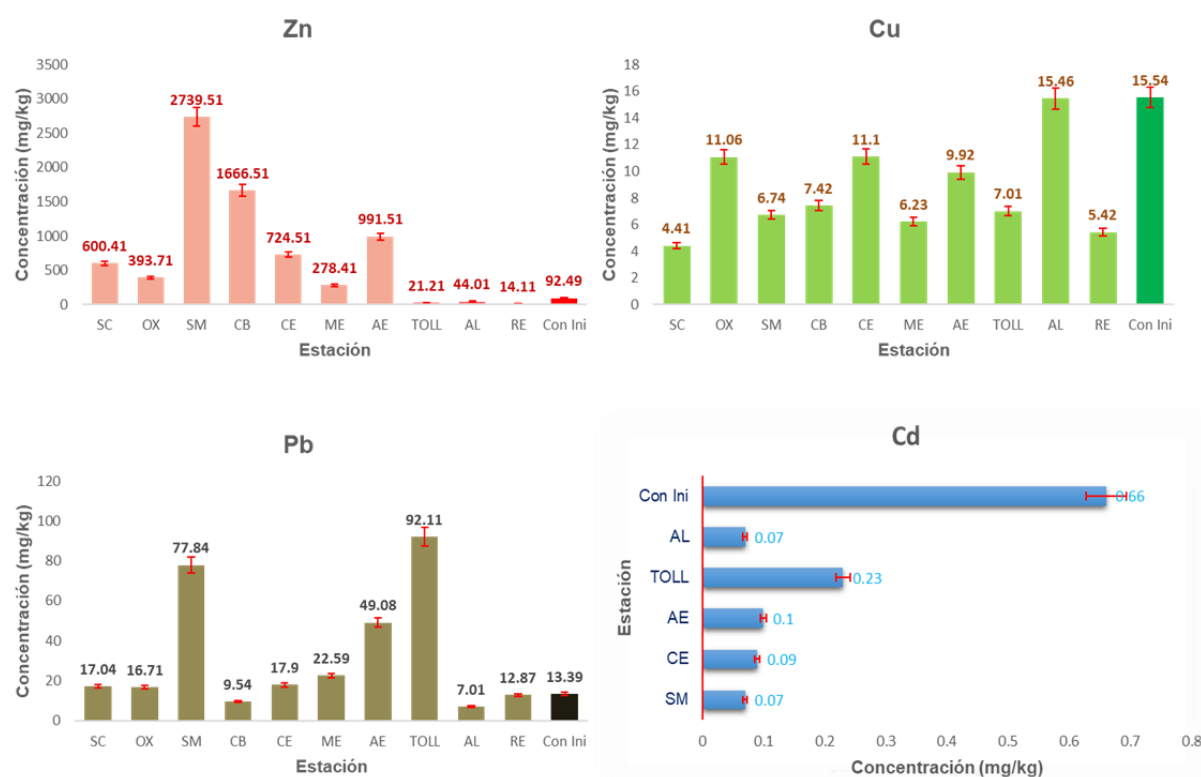


Figura 3.22 Gráfico de concentraciones de metal en las estaciones de monitoreo

La concentración del Zn más alta se encontró en la estación de San Mateo, seguido de Ceboruco y Aeropuerto, mientras que la zona de parques fueron las estaciones con menor acumulación de este metal. La presencia de Zn es posiblemente atribuida al transporte (fuentes móviles) y a la zona industrial ya que San Mateo se encuentra muy cerca del corredor industrial (Zarazúa *et al.*, 2013). Cabe mencionar, que este metal

forma parte de un micronutriente, por lo que no sólo se bioacumulo en el musgo, sino que también sirvió de sustrato. El Cu se bioacumulo en el musgo de manera más uniforme en todas las estaciones, concentrándose mayormente en la Alameda y Centro, siendo San Cristóbal el de menor concentración. De igual manera, este es un elemento esencial en musgo. La contaminación de este metal en los sitios, se puede atribuir a la presencia de edificios y materiales de tubería cerca de las estaciones (Fernández *et al.*, 2002). Cabe señalar que cerca de la estación de Alameda se construyó un edificio departamental, además de las fuentes móviles que diario circulan cerca de los sitios de exposición. La concentración mayor de Pb se encontró en la estación de Tollocan seguido de San Mateo, siendo Ceboruco y Alameda, las estaciones con menor concentración de este metal. Como bien se sabe, el Pb es uno de los principales componentes de la emisión de gases de los vehículos. En este caso, el sitio que presento mayor concentración de este metal fue debido a que se encontró en un paso vehicular, que no solamente es transitado día y noche, sino también se encontró dónde comienza la zona industrial de Toluca. El Cd se encontró con mayor concentración en Tollocan. Cabe destacar que la acumulación de este metal es menor en comparación con los otros metales.

De acuerdo a los resultados anteriores, los elementos con mayor concentración promedio en el musgo fueron $Zn > Pb > Cu > Cd$. La presencia de Pb, así como de otros metales pesados (por ejemplo, Cd, Cu y Zn), se atribuye principalmente al tráfico rodado y a las emisiones de los vehículos (Palma, 2016). Estos elementos se pueden depositar y volver a suspender en forma de polvo, una mezcla compleja de partículas y contaminantes derivados de diversas fuentes, como los frenos, los neumáticos y las llantas (Iodice *et al.*, 2016).

3.10.1 Análisis estadístico y PCA

Se realizaron las pruebas de Ryan Joiner y Shapiro-Wilk (menor 50 muestras), para poder determinar el análisis posible a aplicar con los datos que se tuvieron. La Figura

3.23 muestra las normalidades obtenidas para cada concentración de metal por la prueba de Ryan Joiner.

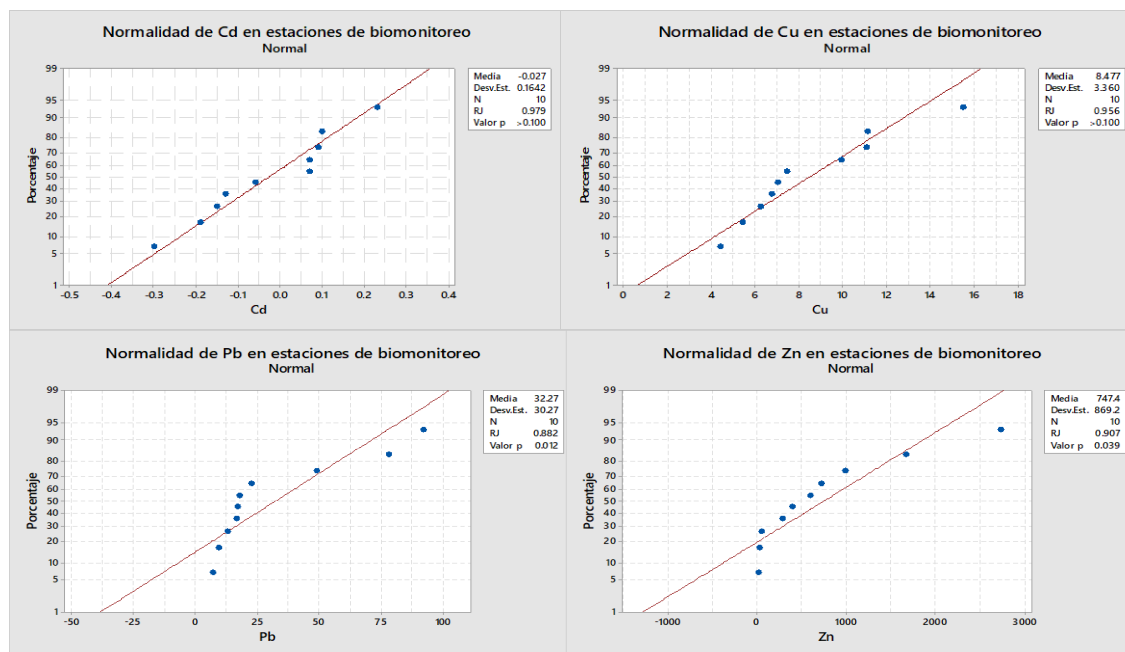


Figura 3.23 Distribución normal evaluada con la prueba de Ryan Joiner

La tabla que se encuentra del lado derecho de cada distribución mostró el valor del coeficiente de Ryan Joiner (RJ), el cual indica que entre más cercano este a 1 el comportamiento de los datos es normal (Cabrera, 2015). De acuerdo al criterio anterior, los metales que presentaron mejor distribución normal fueron Cd y Cu. En el caso del Pb y Zn, se encontraron más alejados de la línea de tendencia, por lo cual no tuvieron un comportamiento normal. Para corroborar estos resultados, se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk dando los resultados presentados en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21 Prueba de normalidad Shapiro-Wilk

Metal	Estadístico	P
Cd	0.952	0.697
Cu	0.916	0.328
Pb	0.773	0.007
Zn	0.827	0.031

En el valor de significancia de la prueba Shapiro-Wilk, el Cd y Cu presento un valor de significancia mayor a 0.05, por lo que tienen un comportamiento normal, en cuanto al Pb y Zn su nivel de significancia estuvo por debajo de 0.05, lo que marca que sus datos no son normales. La prueba de normalidad se realizó para saber qué tipo de variables se tenían y poder realizar las pruebas estadísticas correspondientes. Se encontraron dos variables paramétricas (Cd y Cu, distribución normal) y dos variables no paramétricas (Pb y Zn, distribución no normal). Para determinar la correlación entre las concentraciones de metales, se llevó acabo el estudio de correlación de Spearman en las concentraciones de Pb y Zn, y para las concentraciones de Cd y Cu la correlación de Pearson (Tabla 3.22).

Tabla 3.22 Coeficientes de correlación de Spearman-Pearson

Correlación\ Metal	Pb	Zn	Cd	Zn
*CC Spearman Pb	1.00	0.188	-	-
CC Spearman Zn	0.188	1.00	-	-
CC Pearson Cd	-	-	1.00	0.417
CC Pearson Cu	-	-	0.417	1.00

*CC: Coeficiente de Correlación

De acuerdo a Martínez Ortega (2009), se consideró para ambas correlaciones que un coeficiente mayor a 0.5, indica que las variables son dependientes, en caso contrario, las variables son independientes. Conforme a este criterio, todas las concentraciones de metales son independientes. Es decir, la concentración de un metal no tiene ninguna proporción con respecto a otra. Para la concentración de Cd y Cu se realizó la prueba de medias T (muestras emparejadas), esto con el fin de determinar si existe una diferencia significativa entre la concentración final y la concentración inicial del metal en las estaciones de monitoreo (Tabla 3.23).

Tabla 3.23 Prueba T Cd y Cu

Metal	Desviación	P
Cd	0.052	0.616
Cu	1.063	0.000

$P \leq 0.05$: Se rechaza H_0

La prueba T para la concentración del Cd indica que no existe una diferencia significativa ($P > 0.05$) en la concentración de metal antes y después de la exposición. Por lo cual se concluye que la concentración del Cd no tiene efectos significativos en la absorción del metal en el musgo. En cuanto al Cu, presento una significancia menor, por lo tanto, la concentración de Cu, si tuvo efectos significativos durante la exposición del musgo en las estaciones de monitoreo.

Referente a las concentraciones del Pb y Zn, se realizó la prueba de Kruskal Wallis para determinar si hay diferencia significativa en las medias, es decir, si la concentración del metal en el musgo tiene efectos significativos (Tabla 3.24).

Tabla 3.24 Prueba de Kruskal-Wallis para Pb y Zn

Estación	Rango promedio Pb	Rango promedio Zn
SC	5.00	6.00
OX	4.00	5.00
SM	9.00	10.00
CB	2.00	9.00
CE	6.00	7.00
ME	7.00	4.00
AE	8.00	8.00
TOLL	10.00	2.00
AL	1.00	3.00
RE	3.00	1.00
P	0.437	0.437

Para ambos metales, el valor de significancia ($P > 0.05$) es igual. Por lo cual se concluye que las medianas no son significativas, es decir, no existen diferencias significativas entre la concentración de los metales en las diferentes estaciones de monitoreo. De igual forma se evaluó el efecto entre ambos metales con respecto a su concentración antes y después de la exposición con la prueba de Wilcoxon (Tabla 3.25).

Tabla 3.25 Prueba de Wilcoxon para Pb y Zn

Relación/Metal	Pb	Zn
P	0.005	0.005

Conforme a los resultados de la prueba anterior ($P < 0.05$), se rechazó la hipótesis nula, con esto se concluye si existen diferencias significativas entre las concentraciones antes y después de la exposición en las estaciones de monitoreo. Con esto se verifica que realmente el musgo logró absorber metales en sus tejidos durante el tiempo de exposición, y que no existe relación entre cada metal, es decir, no depende de un metal la concentración de otro. Más bien depende del entorno en el que fue expuesto el musgo.

De acuerdo al seguimiento de partículas PM_{10} y $PM_{2.5}$ durante el tiempo de exposición (apartado 3.7), San Cristóbal y San Mateo fueron las zonas más contaminadas, mientras que Ceboruco y Centro fueron las de menor concentración. En este estudio se encontró que tomando en cuenta sólo las 6 estaciones con las que se cuentan datos de partículas, el orden de bioacumulación del musgo de metales es el siguiente: San Mateo > Ceboruco > Centro > San Cristóbal > Oxtotitlán > Metepec. Comparando ambos resultados, la estación más contaminada para ambos casos es SM, esto es una forma de verificar que los niveles de contaminantes transportados por el aire y la concentración de elementos acumulados en las bolsas de musgo se correlacionan bien (Vuković *et al.*, 2015).

Aunque no se tienen datos cuantitativos sobre partículas en los sitios de muestreo de los parques, se pueden hacer comparaciones con otros estudios realizados en los mismos lugares. Macedo *et al.* (2016), encontraron que las concentraciones más bajas de metales pesados en la ZMVT corresponden a áreas no contaminadas. En este estudio, el sitio con menor concentración de metales fue el parque Alameda, sin embargo, Zarazúa *et al.* (2013), encontraron que Alameda, Reforma y Tolloca, fueron los sitios con mayores concentraciones de metales de la ZMVT, en nuestro estudio se adjudica a que a pesar de ser el sitio con menor concentración no deja de estar

contaminado. La contaminación de este sitio se asocia principalmente a fuentes móviles.

Para poder concluir cuales fueron las variaciones de cada estación conforme a las concentraciones de metales bioacumuladas en el musgo se realizó un análisis de PCA. En la Figura 3.24 se representa la gráfica de los sitios de exposición, la muestra de blanco y sus concentraciones bioacumuladas con 2 componentes principales y un pretratamiento de autoescalado.

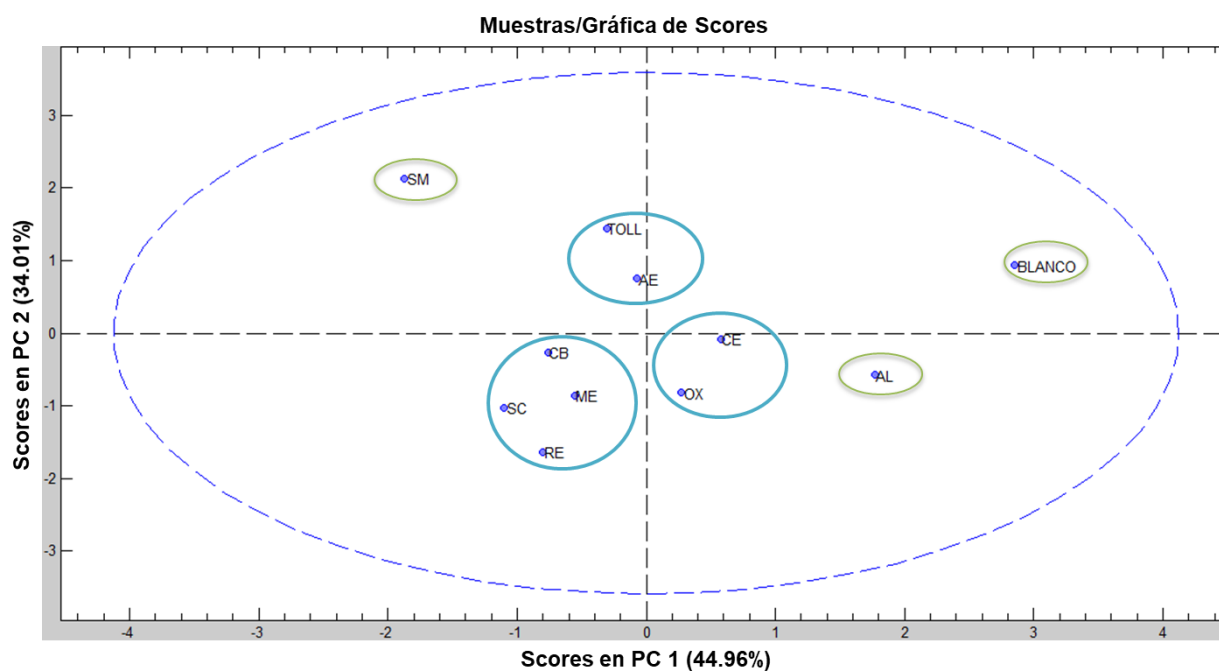


Figura 3.24 Gráfica de scores de concentración de metal

En la Figura anterior se observan tres muestras diferentes que son San Mateo, Alameda y BLANCO. Además, se observan muestras agrupadas, como lo son Tollocan-Aeropuerto, Oxtotitlán-Centro, San Cristóbal-Ceboruco-Metepec-Reforma. Esta clasificación que se muestra, de acuerdo a la concentración de cada sitio de exposición, podría estar referida las características similares que se asemejan entre sí, sin embargo, no es segura, por ello se realizó un Biplot para ver la relación de los sitios con los metales (Figura 3.25), se observa que efectivamente, la muestra de

BLANCO, es diferente a las demás en Pb y Zn. De acuerdo a discusiones anteriores, la concentración de Cd no solamente fue la menor, si no que las concentraciones obtenidas estuvieron muy cerca de 0, es por ello que se realizó un siguiente análisis sin tomar en cuenta este metal, ya que, por tener concentraciones tan pequeñas, y en algunos sitios nulas, es una variable que puede no utilizarse. Esto podría ayudar a tener una mejor clasificación y agrupación de las muestras.

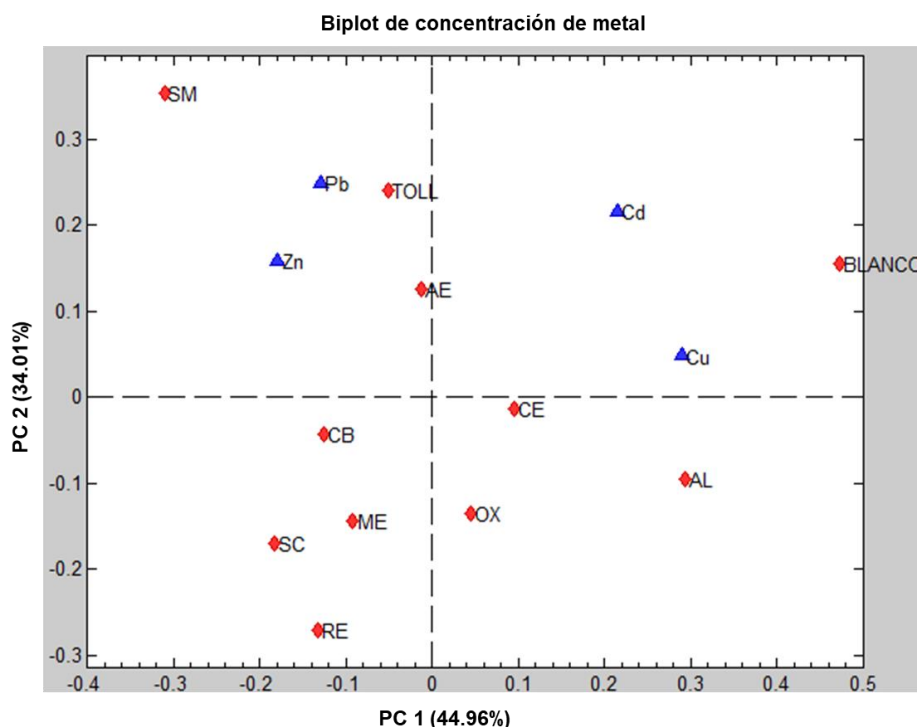


Figura 3.25 Gráfica relación de sitios de muestreo con metales

En la Figura 3.26 se representa la relación de tres metales (Cu, Pb y Zn) en los distintos sitios de exposición. Se observa una distribución más específica de cada una de las muestras, formándose 6 grupos de acuerdo a sus componentes: 1° Alameda-BLANCO, 2° Oxtotitlán-Centro, 3° Ceboruco-Aeropuerto, 4° San Mateo, 5° Reforma-Metepec-San Cristóbal y 6° Tollocan. Referente al primer grupo, AL fue el sitio con menor promedio de concentración por lo que sus componentes se asemejan a la muestra de blanco y mayormente enriquecido en Cu. En cuanto al segundo grupo, contienen concentraciones promedio medias de metales. El tercer grupo mantuvo

concentraciones altas principalmente en Zn. El cuarto grupo, fue el sitio con mayor promedio de concentración de metales, y por lo que se observa en la figura es la muestra diferente del análisis. El quinto grupo, contienen concentraciones variadas de metales, pero no tan altas comparadas con el grupo anterior. El sexto grupo, tuvo un mayor enriquecimiento de Pb seguido del Zn.

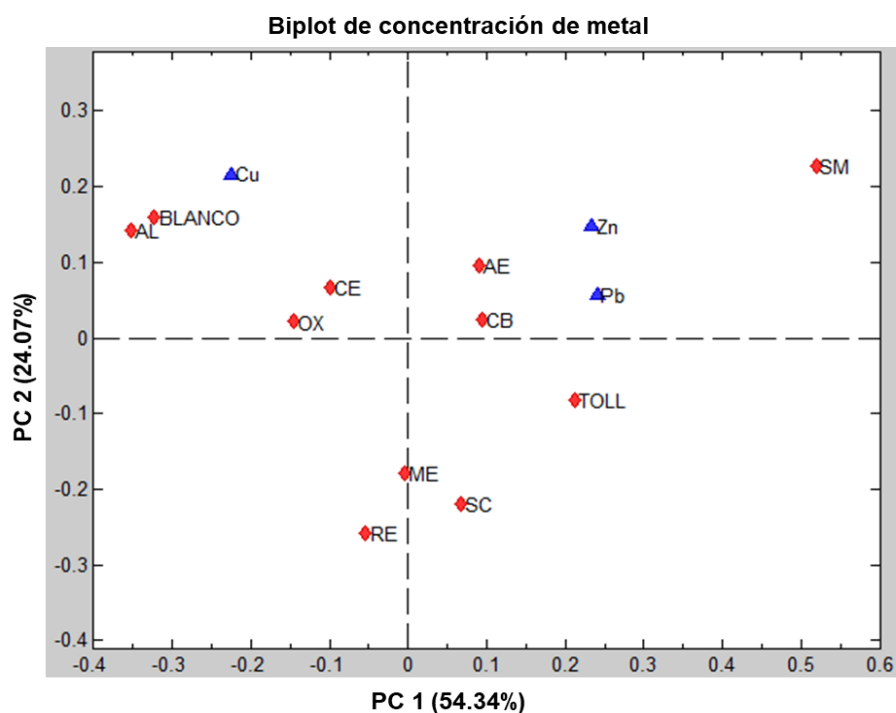


Figura 3.26 Gráfica relación de sitios de muestreo con metales sin Cd

Este análisis de PCA rectifica que el sitio con mayor contaminación con metales pesados es San Mateo, y el metal mayormente concentrado fue el Zn. Tomando en cuenta la relación de metales pesados asociados a la contaminación atmosférica, el grado de contaminación de los 10 sitios de exposición de estudio se dio en el siguiente orden: San Mateo > Ceboruco > Aeropuerto > Centro > San Cristóbal > Oxtotitlán > Reforma > Metepec > Tollocan > Alameda.

CONCLUSIONES

El musgo *Leskea angustata* al ser un material orgánico, está compuesto principalmente por carbono y agua. De igual forma contiene grupos tiol –SH a través del cual se realiza el intercambio iónico (enlace covalente coordinado) con los metales pesados.

El musgo *Leskea angustata* podría ser usado como adsorbente mesoporoso, debido al área superficial de 19.871 m²/g y al tamaño de poro de 2.86 nm.

La hidratación del musgo en temporada de seca-caliente es importante ya que su deshidratación es rápida cuando se encuentra expuesto directamente al medio ambiente.

El musgo *Physcomitrella patens* es capaz de absorber una mayor cantidad de metal en su tejido que el musgo *Leskea angustata*.

El musgo *Leskea angustata* bioacumula metales pesados, pero no induce fitoquelatinas, durante 6 meses de exposición, debido a que posiblemente no alcanzó a ser activada para producir el GSH que es sustrato de la fitoquelatina.

Los elementos con mayor concentración promedio en el musgo *Leskea angustata* en la ZMVT son Zn>Pb>Cu>Cd.

La concentración de un metal en el musgo no es estadísticamente proporcional con respecto a otra, es decir, no existen diferencias significativas entre la concentración de los metales en las diferentes estaciones de monitoreo. Sin embargo, las concentraciones dependen del sitio donde está expuesto el musgo.

El grado de contaminación de los 10 sitios de exposición de estudio se dio en el siguiente orden: San Mateo > Ceboruco > Aeropuerto > Centro > San Cristóbal > Oxtotitlán > Reforma > Metepec > Tollocan > Alameda. Esto se debe a la zona industrial, al transporte vehicular, a la construcción y a los vientos dominantes que se tuvieron durante la exposición.

El musgo *Leskea angustata* puede ser usado como un buen biomonitor de la contaminación con metales pesados, debido a que refleja de manera constante la concentración que hay en el medio.

RECOMENDACIONES

Para la exposición del musgo *Physcomitrella patens* es necesario tener un peso de muestra mayor a 3 gramos, con el cuerpo de gametofito mayor a tres meses de crecimiento, así como el tamaño de malla de la bolsa menor, todo esto con la finalidad de que haya menor cantidad de pérdida del musgo.

Es necesario realizar un bioensayo de saturación para saber hasta que concentración y que volumen el musgo es capaz de seguir absorbiendo.

Realizar bioensayos con mayores concentraciones de metales a menor tiempo y con un volumen de exposición mayor.

Se recomienda para posteriores estudios, utilizar una bolsa de musgo con un tamaño de malla de 2 mm, para reducir la pérdida de material.

FUENTES DE CONSULTA

- Aarts, M. G. M. and Lin, Y. F. (2012) "The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 3187–3206. doi: 10.1007/s00018-012-1089-z.
- Aaseth, J. *et al.* (2015) "Chelation in metal intoxication-Principles and paradigms", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. Elsevier, 31, 260–266. doi: 10.1016/j.jtemb.2014.10.001.
- Abdi, H. and Williams, L. J. (2010) "Principal component analysis", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(4), 433–459. doi: 10.1002/wics.101.
- ABI, Analytical Testing Equipment. (2017) "Ágata lab porcelain". Available at: http://ab-instruments.com.ua/pdf/laboratornoe/AUXILAB/16/files/16.auxilab_lab_porcelain_agate_abi.pdf.-Working Paper
- Aboal, J. R. *et al.* (2010) "Is it possible to estimate atmospheric deposition of heavy metals by analysis of terrestrial mosses?", *Science of the Total Environment*, The. Elsevier B.V., 408(24), 6291–6297. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.09.013.
- Ali, H., Khan, E. and Anwar, M. A. (2013) "Phytoremediation of heavy metals", *Chemosphere*. Elsevier, 91(7), 869–881. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.075.
- Ambiental Del Ordenamiento Territorial. (2009) "Estudio sobre la superficie ocupada en áreas naturales protegidas del Distrito Federal", 2-78, EOT-03-2009. Informe Técnico.
- AMBIENTE, S. D. M. (2007) "Inventario de emisiones de la zona metropolitana del valle de toluca". Estado de México, 14-97- Informe Técnico.
- Andrzej, K. *et al.* (2012) "Mechanisms for translocation of heavy metals from soil to epigeal mosses", *Springer*, 223, 1829–1836. doi: 10.1007/s11270-011-0987-2.
- Aničić, M. *et al.* (2009) "Active biomonitoring with wet and dry moss: a case study in an urban area", *Environmental Chemistry Letters*, 7(1), 55–60. doi: 10.1007/s10311-008-0135-4.
- Anjali, S. A. and S. (2012) "Bioaccumulation and glutathione-mediated detoxification of copper and cadmium in *Sphagnum squarrosum*", *Environ Monit Assess*, 184, 4097–4103. doi: 10.1007/s10661-011-2246-9.
- Ardiles, V., Cuvertino, J. and Osorio, F. (2008) "Briófitas de los Bosques Templados de Chile Una introducción al mundo de los musgos, hepáticas y antocerotes". CORMA, 136-141.
- Ares, A. *et al.* (2012a) "Moss bag biomonitoring: a methodological review", *Science of the Total Environment*, 432, 143–158. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.05.087.

- Ares, A. *et al.* (2012b) "Moss bag biomonitoring: A methodological review", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 432, 143–158. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.05.087.
- Ares, A. *et al.* (2015) "Do moss bags containing devitalized *Sphagnum denticulatum* reflect heavy metal concentrations in bulk deposition?", *Ecological Indicators*. Elsevier, 50, 90–98. doi: 10.1016/j.ecolind.2014.10.030.
- Arshad, N. *et al.* (2016) "Assessment of radionuclides (uranium and thorium) atmospheric pollution around Manjung district, Perak using moss as bioindicator", *AIP Conference Proceedings*, 50009, 50009. doi: 10.1063/1.4940105.
- Badillo Corona, J. A. *et al.* (2009) *Manual de laboratorio de cultivo de tejidos*, Instituto politécnico nacional. México, 1-52.
- Basile, A. *et al.* (2012) "Bioaccumulation and ultrastructural effects of Cd, Cu, Pb and Zn in the moss *Scorpiurum circinatum*", *Environmental Pollution*. Elsevier, 166, 208–211. doi: 10.1016/j.envpol.2012.03.018.
- Bazilio, A. and Weinrich, J. (2012) "The Easy Guide to: Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry (ICP-MS)", December, 1–11. Available at: [http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/ICPMS/ICPMS quick guide.pdf](http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/ICPMS/ICPMS%20quick%20guide.pdf).
- Beike, A. K., Horst, N. A. and Rensing, S. A. (2010) "Axenic bryophyte in vitro cultivation", *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, 20, 102–108.
- Bekteshi, L., Lazo, P. and Qarri, F. (2014) "Monitoring heavy metal pollution in Elbasan using passive and active moss", *Agricultural University of Tirana*, 225–229.
- Boquete, M. T. *et al.* (2011) "¿Are terrestrial mosses good biomonitors of atmospheric deposition of Mn?", *Atmospheric Environment*. Elsevier, 45(16), 2704–2710. doi: 10.1016/j.atmosenv.2011.02.057.
- Caballero Segura, B. *et al.* (2013) "Estudio de la calidad analítica en las determinaciones de Cr, Fe, Mn, Cu, Zn, Pb y Hg a través de técnicas analíticas nucleares y convencionales en musgos de la ZMVT". Universidad Autónoma del Estado de México; Facultad de Química.
- Caballero Segura, B. *et al.* (2014) "Metal content in mosses from the Metropolitan Area of the Toluca Valley: a comparative study between inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and total reflection X-ray fluorescence spectrometry (TXRF)", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 94(13), 1288–1301. doi: 10.1080/03067319.2014.940343.
- Cabrera, G. P. (2015) "Estadística Aplicada a un problema de selección de grupos de trabajo para desarrollos de innovación tecnológica", 3-193, Tesis.
- Cajaraville, M. P. (2010) "Concepto de Biomarcador. Utilidad de los biomarcadores celulares en Programas de Seguimiento Ambiental", *Biomarkers*, Módulo 3A, 1-2.
- Callejas, F. R. (2012) "Tablas de Espectroscopía Infrarroja", 1-14.
- Capozzi, F. *et al.* (2016) "Best options for the exposure of traditional and innovative moss bags :

- A systematic evaluation in three European countries", *Environmental Pollution*, 214, 362–373. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.043.
- Capozzi, F. *et al.* (2016) "Biomonitoring of atmospheric pollution by moss bags: Discriminating urban-rural structure in a fragmented landscape", *Chemosphere*. Elsevier, 149, 211–218. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.065.
- Capozzi, F. *et al.* (2017) "*Sphagnum palustre* clone vs native *Pseudoscleropodium purum*: A first trial in the field to validate the future of the moss bag technique", *Environmental Pollution*. Elsevier, 225, 323–328. doi: 10.1016/j.envpol.2017.02.057.
- Coelho Gusmao, J. R. (2012) "Complejación de iones metálicos con mezclas de fitoquelatinas, sus fragmentos y selenocistina. Estudio mediante voltamperometría - resolución multivariante de curvas, en combinación con técnicas espectrométricas y calorimétricas" Universitat de Barcelona, 2-310. Memoria doctorado
- Colpas, F., Tarón A. y González R. (2017) "Área superficial de carbones activados y modificados obtenidos del recurso agrícola *Saccharum officinarum*", *Revista de ciencias agrícolas*, 34(2), 62–72.
- Conabio (2009) *Biodiversidad Mexicana, Ecosistemas*, 1-2. doi: 10.2307/3503924.
- Corella, D. and Ordovás, J. M. (2015) "Biomarcadores : antecedentes , clasificación y guía para su aplicación en epidemiología nutricional", 21, 176–187. doi: 10.14642/RENC.2015.21.sup1.5064.
- Cove, D. (2005) "The Moss *Physcomitrella patens*", *Annual Review of Genetics*, 39(1), 339–358. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.110214.
- Cove, D. *et al.* (2006) "Mosses as Model Systems for the Study of Metabolism and Development", *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 497–520. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105338.
- Cove, D. J. *et al.* (2015) "The moss *Physcomitrella patens*: a novel model system for plant development and genomic studies", *Cold Spring Harbor protocols*, 4(2), 1–7. doi: 10.1101/pdb.emo115.
- Dago, A. *et al.* (2014) "Analysis of phytochelatin and Hg-phytochelatin complexes in *Hordeum vulgare* plants stressed with Hg and Cd: HPLC study with amperometric detection", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 94(7), 668–678. doi: 10.1080/03067319.2013.864649.
- Dago, À. *et al.* (2009) "Liquid chromatographic analysis of Hg(II) binding by thiol-rich peptides using both UV-vis and electrochemical detection", *Journal of Chromatography A*, 1216(39), 6752–6757. doi: 10.1016/j.chroma.2009.07.071.
- Dago, À. *et al.* (2011) "Characterization of Hg(II) binding with different length phytochelatin using liquid chromatography and amperometric detection", *Analytica Chimica Acta*, 695(1–2), 51–57. doi: 10.1016/j.aca.2011.03.060.
- Dago, À. *et al.* (2014) "Evaluation of mercury stress in plants from the Almadén mining district

- by analysis of phytochelatin and their Hg complexes", *Environmental Science and Technology*, 48(11), 6256–6263. doi: 10.1021/es405619y.
- Demková, L. *et al.* (2016) "Biomonitoring of heavy metals contamination by mosses and lichens around Slovinky tailing pond", *Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 4529, 1532–4117. doi: 10.1080/10934529.2016.1221220.
- E. Ite, A., I. Udousoro, I. and J. Ibok, U. (2014) "Distribution of Some Atmospheric Heavy Metals in Lichen and Moss Samples Collected from Eket and Ibeno Local Government Areas of Akwa Ibom State, Nigeria", *American Journal of Environmental Protection*. Science and Education Publishing, 2(1), 22–31. doi: 10.12691/env-2-1-5.
- Esposito, S. *et al.* (2012) "Effects of heavy metals on ultrastructure and induction in the aquatic moss *Leptodictyum riparium*", *International Journal of Phytoremediation*, 14, 443–455. doi: 10.1080/15226514.2011.620904.
- Fernandez, J. A. *et al.* (2015) "A critical review of protocols for moss biomonitoring of atmospheric deposition: sampling and sample preparation", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 517, 132–150. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.02.050.
- Fernández, V. *et al.* (2013) "Obtención y caracterización de celulosa hidrofóbicamente modificada", *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(1), 51–56. Available at: https://www.researchgate.net/profile/Eduardo_Bordallo_Lopez/publication/268502927_Obtencion_y_caracterizacion_de_la_celulosa_hidrofobicamente_modificada/links/546c97c50cf21e510f63ea11.pdf.
- Fernandez, J. A. *et al.* (2002) "Biomonitoring of metal deposition in northern Spain by moss analysis", 300, 115–127.
- Flora, S. J. S. and Pachauri, V. (2010) "Chelation in metal intoxication", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(7), 2745–2788. doi: 10.3390/ijerph7072745.
- Flores J. A (2012) "Viento", 5-21.
- Frontasyeva, E. M. V. E. *et al.* (2009) "Active biomonitoring with wet and dry moss : a case study in an urban area", 55–60. doi: 10.1007/s10311-008-0135-4.
- Gerdol, R. *et al.* (2014a) "Chemosphere monitoring temporal trends of air pollution in an urban area using mosses and lichens as biomonitors", *Chemosphere*. Elsevier, 108, 388–395. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.035.
- Gerdol, R. *et al.* (2014b) "Monitoring temporal trends of air pollution in an urban area using mosses and lichens as biomonitors", *Chemosphere*, 108, 388–395. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.035.
- Gerhardt, A. (2002) "Bioindicator species and their use in biomonitoring", *Environmental Monitoring Vol. I- UNESCO Encyclopedia of Life Support Systems*, 1, 10(sample).

- Gribacheva, N., Yurukova, L. and Gecheva, G. (2016) "Atmospheric pollution trends in Bulgaria within the European moss surveys", *Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences: sciences mathématiques et naturelles*, 69, 151–154.
- Gross, S. E. (2009) *Evaluation of Moss As a Potential Restoration Tool*, 1-24. Preview
- Grupo de Quimiometría de (2002) *Quimiometria Una disciplina útil para el análisis químico*, 1-10.
- Harmens, H. *et al.* (2010) "Mosses as biomonitors of atmospheric heavy metal deposition: spatial patterns and temporal trends in Europe", *Environmental pollution*, 158(10), 3144–56. doi: 10.1016/j.envpol.2010.06.039.
- Hawksworth, D. L., Iturriaga, T. and Crespo, A. (2005) "Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos", *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(2), 71–82. doi: 10.1016/S1130-1406(05)70013-9.
- Hohe, A. and Reski, R. (2005) "From axenic spore germination to molecular farming One century of bryophyte in vitro culture", *Plant Cell Reports*, 23(8), 513–521. doi: 10.1007/s00299-004-0894-8.
- Horakova, E., Barek, J. and Vyskocil, V. (2016) "Determination of methyl violet 2B using polarographic and voltammetric methods at mercury electrodes", *Analytical Letters*, 49(1), 56–65. doi: 10.1080/00032719.2015.1004576.
- Iodice, P. *et al.* (2016) "Air pollution monitoring using emission inventories combined with the moss bag approach", *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 541, 1410–1419. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.034.
- Ite, A. E., Udousoro, I. I. and Ibok, U. J. (2014) "Distribution of some atmospheric heavy metals in lichen and moss samples collected from Eket and Ibeno local government areas of Akwa Ibom State, Nigeria", *American Journal of Environmental Protection*. Science and Education Publishing, 2(1), 22–31. doi: 10.12691/env-2-1-5.
- Jolliffe, I. T. (2002) "Principal Component Analysis", *Journal of the American Statistical Association*, 103(482), 881–882. doi: 10.1007/b98835.
- Kayee, P., Songphim, W. and Parkpein, A. (2015) "Using Thai native moss as bio-adsorbent for contaminated heavy metal in air", *Procedia - Social and Behavioral Sciences*. Elsevier B.V., 197, 1037–1042. doi: 10.1016/j.sbspro.2015.07.312.
- Koz, B. and Cevik, U. (2014) "Lead adsorption capacity of some moss species used for heavy metal analysis", *Ecological Indicators*. Elsevier Ltd, 36, 491–494. doi: 10.1016/j.ecolind.2013.08.018.
- LAFARGA (2015) *Ficha de Datos de Seguridad-Cobre, Toxicology*, 1-14.
- Lazo, P., Bekteshi, L. and Shehu, A. (2013) "Active moss biomonitoring technique for atmospheric deposition of heavy metals in Elbasan city, Albania", *Fresenius Environmental Bulletin*, 22(1 A), 213–219.
- López Vargas, E. and Galán Vidal, C. A. (2013) "Carbon paste electrodes application to anodic

- voltammetry", *Analytica Chimica Acta*, 91-96.
- Macedo-Miranda, G. *et al.* (2016) "Accumulation of heavy metals in mosses: a biomonitoring study", *SpringerPlus*. Springer International Publishing, 5(1), 715. doi: 10.1186/s40064-016-2524-7.
- Malviya R, Bansal V, P. O. P. and S. P. K. (2010) "High performance liquid chromatography : A short review", *Journal of Global Pharma Technology*, 2(January), 22–26.
- Martínez, C., Torres, L. M. and García, R. (2013) "Evaluación de la cinética de adsorción de Zn^{2+} y Cd^{2+} a partir de soluciones unitarias y binarias por raíces de *Eichhornia crassipes* Y *Typha latifolia*", *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(2), 1–14.
- Martínez Ortega, R. M. (2009) "El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización", *Rev. haban cienc méd La Habana*, VIII(2), 1–19. Available at: <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v8n2/rhcm17209.pdf>.
- Mejía Cuero, R. *et al.* (2015) "Application of neutron activation analysis for determination of As, Cr, Hg and Se in mosses in the Metropolitan Area of the Valley of Toluca, Mexico", *Journal of Chemistry*, 2015, 13. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/278326>.
- Molina, C. M. (2014) "Políticas públicas para el mejoramiento de la calidad del aire. Caso de estudio : Zona Metropolitana del Valle de Toluca", 1–5.
- Nava Ruíz, C. and Méndez Armenta, M. (2011) "Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio)", *Archivos de Neurociencias*, 16(3), 140–147.
- Nordberg, G. *et al.* (2001) "Metales: propiedades químicas y toxicidad", *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, 1–76.
- Olivieri, A. C. (2011) "Química Analítica", 51–56.
- Palma, A. Di (2016) "Mosses for monitoring air pollution : towards the standardization of moss-bag technique and the set-up of a new biomaterial Ph . D". *dissertation by*. University of Naples Federico II.
- Pelloux, J., Rustérucchi, C. and Mellerowicz, E. J. (2007) "New insights into pectin methylesterase structure and function", *Trends in Plant Science*, 12(6), 267–277. doi: 10.1016/j.tplants.2007.04.001.
- Popper, Z. A. (2008) "Evolution and diversity of green plant cell walls", *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 286–292. doi: 10.1016/j.pbi.2008.02.012.
- Pourrut, B. *et al.* (2011) "Lead uptake , toxicity , and detoxification in plants", *Environmental Contamination and Toxicology*, 213, 113–136. doi: 10.1007/978-1-4419-9860-6.
- Razmilic, B. (2016) "Espectroscopia de absorción atómica", *Depósito de documentos de la FAO, Depratamento de pesca.*, 1–6.
- Robinson, S. A. and Waterman, M. J. (2014) "Sunsafe Bryophytes: photoprotection from excess and damaging solar radiation", 113–130. doi: 10.1007/978-94-007-6988-5.

- Rocha Castro, E. (2000) "Espectrometría de absorción atómica", *Facultad de Ciencias Químicas*, 123–203.
- Roussel, S. *et al.* (2014) "Process analytical technology for the food industry", 7–17. doi: 10.1007/978-1-4939-0311-5.
- Rowntree, J. K. *et al.* (2011) "In vitro conservation of European bryophytes", *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47(1), 55–64. doi: 10.1007/s11627-010-9326-3.
- Rubio, C. *et al.* (2007) "El zinc: oligoelemento esencial", *Nutricion Hospitalaria*, 22(1), 101–107.
- Salazar Allen, N. (2011) "El mundo de las plantas pequeñas: las briofitas", *Editora Novo Art, S.A*, 24.
- Sandrine Millour, Y. N. (2015) "Determination of Ti from TiO₂ nanoparticles in biological materials by different ICP-MS instruments: method validation and applications", *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6(2). doi: 10.4172/2157-7439.1000269.
- Sardar, K. *et al.* (2013) "Heavy metals contamination and what are the impacts on living organisms", *Greener Journal of Environmental Management and Public Safety*, 2, pp. 172–179. Available at: <http://www.gjournals.org/GJEMPS/GJEMPS-PDF/2013/August/060413652-Kamran-et-al.pdf>.
- Sawidis, T. *et al.* (2011) "Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities", *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 159(12), 3560–3570. doi: 10.1016/j.envpol.2011.08.008.
- Sears, M. E. and Sears, M. E. (2013) "Chelation: harnessing and enhancing heavy metal", *The Scientific World Journal*, *The Scientific World Journal*, 2013, 2013, 219840. doi: 10.1155/2013/219840, 10.1155/2013/219840.
- Secretaría del Medio Ambiente del Estado de México (2012) "Programa para mejorar la calidad del aire en el Valle de Toluca (2012-2017)", 227. Available at: www.edomexico.gob.mx.
- Sliskovic, D., Grbic, R. and Hocenski, Z. (2012) "Multivariate Statistical Process Monitoring", *Tehnicki vjesnik*, 33–41. Available at: <http://hrcak.srce.hr/file/117623>.
- Smolyakov, B. S., Sagidullin, A. K. and Chikunov, A. S. (2017) "Removal of Cd(II), Zn(II), and Cu(II) from aqueous solutions using humic-modified moss (*Polytrichum*)", *Journal of Environmental Chemical Engineering*. Elsevier B.V., 5(1), 1015–1020. doi: 10.1016/j.jece.2017.01.022.
- Srivastava, N. (2016) "Role of Phytochelatin in Phytoremediation of Heavy Metals Contaminated Soils", *Springer International Publishing Switzerland*, 393–419. doi: 10.1007/978-3-319-40148-5.
- Srivastava, S. and Goyal, P. (2010) "Novel biomaterials: Decontamination of toxic metals from wastewater", *Environmental Science and Engineering (Subseries: Environmental Science)*, (9783642113284), 11–20. doi: 10.1007/978-3-642-11329-1.

- Tchounwou, P. B. *et al.* (2012) "Molecular, clinical and environmental toxicology", 101, 1–30. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4.
- VentDepot (2011) *Escala Beaufort, 1-4*.
- Vidal, R., Ma, Y. and Sastry, S. S. (2016) "Principal Component Analysis", *Generalized Principal Component Analysis*, 40, xxxii, 566. doi: 10.1007/978-0-387-87811-9.
- Viet, H. N. *et al.* (2010) "Atmospheric heavy metal deposition in Northern Vietnam: Hanoi and Thainguyen case study using the moss biomonitoring technique, INAA and AAS", *Environmental Science and Pollution Research*, 17(5), 1045–1052. doi: 10.1007/s11356-009-0258-6.
- Vuković, G. *et al.* (2015) "Residential heating contribution to level of air pollutants (PAHs, major, trace, and rare earth elements): a moss bag case study", *Environmental Science and Pollution Research*, 22(23), 18956–18966. doi: 10.1007/s11356-015-5096-0.
- Wang, J. (2004) *Controlled potential techniques, Analytical Electrochemistry*.
- Wolf, R. E. (2005) "What Is ICP-MS? ... And More Importantly, What Can It Do?", *U.S. Geological Survey, Crustal Geophysics and Geochemistry Science Center*, 7. Available at: url: <http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/intro.html>.
- Xu, H. *et al.* (2011) "Ecotoxicology and Environmental Safety Effects of heavy metals on production of thiol compounds and antioxidant enzymes in *Agaricus bisporus*", *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier, 74(6), 1685–1692. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.04.010.
- Zarazúa-Ortega, G. *et al.* (2013) "Assessment of spatial variability of heavy metals in Metropolitan Zone of Toluca Valley, Mexico, using the biomonitoring technique in mosses and TXRF analysis", *The Scientific World Journal*. Hindawi Publishing Corporation, 2013, 1–7. doi: 10.1155/2013/426492.
- Zepeda Gómez, C. *et al.* (2014) "México diversity of epiphytic mosses in the metropolitan area of the Toluca Valley, Mexico", *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 108–124. doi: 10.7550/rmb.31834.

ANEXOS

Formulación de medios de cultivo. Soluciones Stock Para preparar 1 L de solución stock

Tabla A1. Medio de Cultivo BCD

Solución	Sustancia	gr	Característica
Sol. B (100X)	MgSO ₄ • 7H ₂ O	25	Esterilizar en autoclave
Sol. C (100X)	KH ₂ PO ₄	25	Ajustar pH a 6.5 con KOH, esterilizar en autoclave
Sol. D (100X)	KNO ₃	101	
	FeSO ₄ 7H ₂ O	1.25	
Tartrato de amonio (100X)	(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	92.075	
CaCl ₂ (100X)	CaCl ₂	14.7	Se agrega al medio después del autoclave y justo antes de verter en cajas

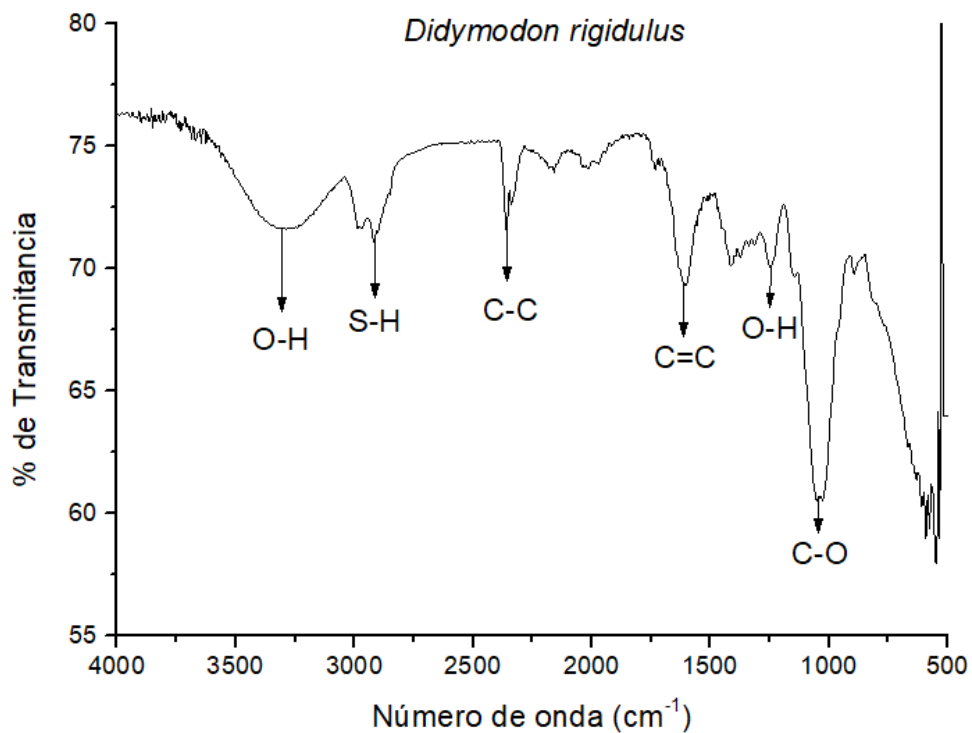
Tabla A2. Solución de elementos traza (1000X)

Micronutrientes	mg/L	Micronutrientes	mg/L
KI	28	KBr	28
H ₃ BO ₃	614	LiCl	28
AlK (SO ₄) ₂ • 12H ₂ O	110	MnCl ₂ 4H ₂ O	389
ZnSO ₄ • 4H ₂ O	55	SnCl ₂ 2H ₂ O	28
NaMoO ₅ • 2H ₂ O	25	NiCl ₂ 6H ₂ O	59
CuSO ₄ • 5H ₂ O	55	Agar Se utiliza al 0.8%	
CoCl ₂ • 6H ₂ O	55		

Tabla A3. Medio de Cultivo BCD-AT

Para preparar 1lt de medio:	
10mL	Sol. B (100X)
10mL	Sol. C (100X)
10mL	Sol. D (100X)
	Tartrato de Amonio
10mL	(100X)
	Sol. Elementos traza
1mL	(1000X)
8gr	Agar
Aforar a 1lt con agua	
Esterilizar en autoclave	
10mL	CaCl ₂ (100X)

Espectros de IR de musgos mezclados con *Leskea angustata*

**Figura A-1** Espectro de IR de musgo *Didymodon rigidulus*

En la Figura A-1 se observa el espectro de IR del musgo *Didymodon rigidulus*, en la Figura A-2 el espectro del musgo *Brachilecium ruderale*, que, en comparación con los musgos de estudio, presentan una banda aguda a 1400 cm^{-1} correspondiente a grupos metílenos que forman la estructura del gametofito. Lo mismo se observa en la Figura A-3 del musgo *Cryphaea patens*, teniendo la misma vibración.

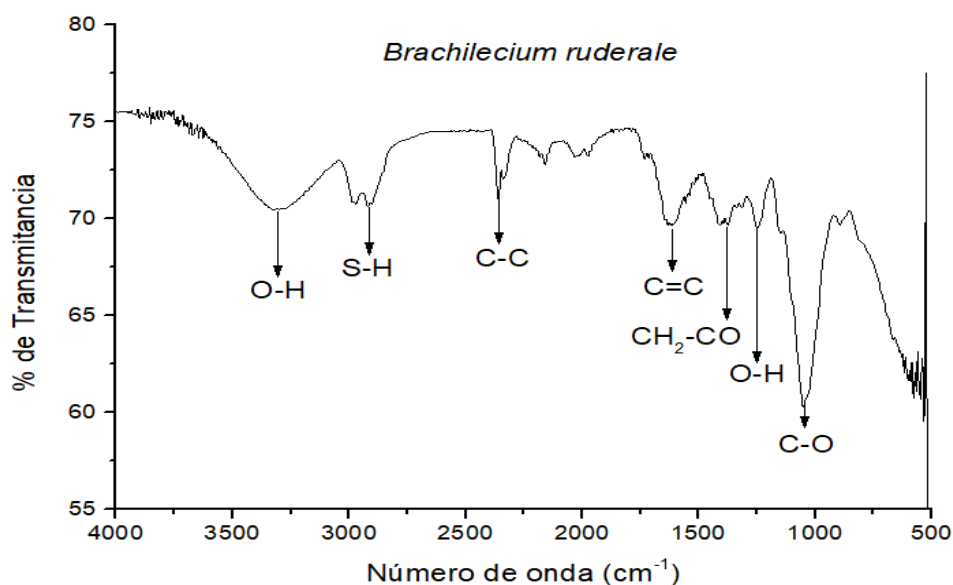


Figura A-2 Espectro de IR de musgo *Brachilecium ruderale*

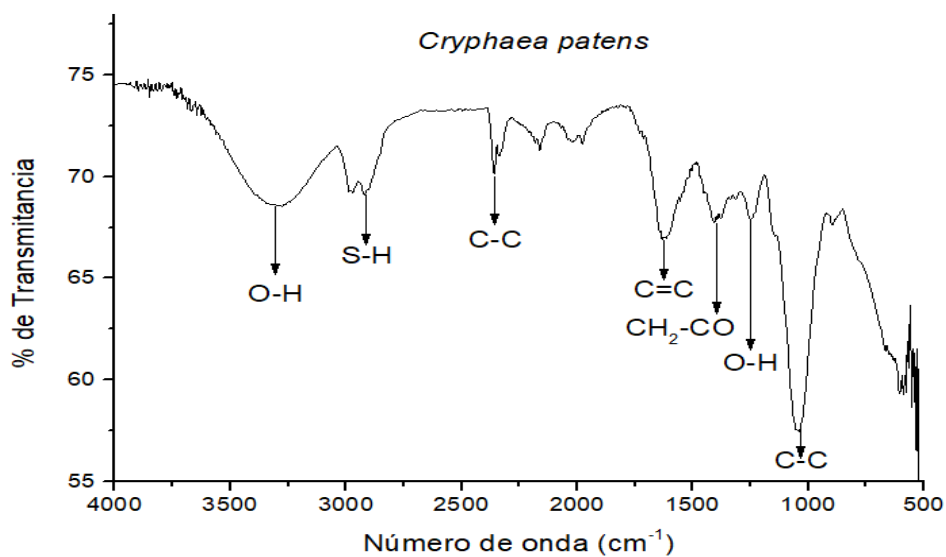


Figura A-3 Espectro de IR de musgo *Cryphaea patens*

Isoterma de Adsorción Musgo *Physcomitrella patens*

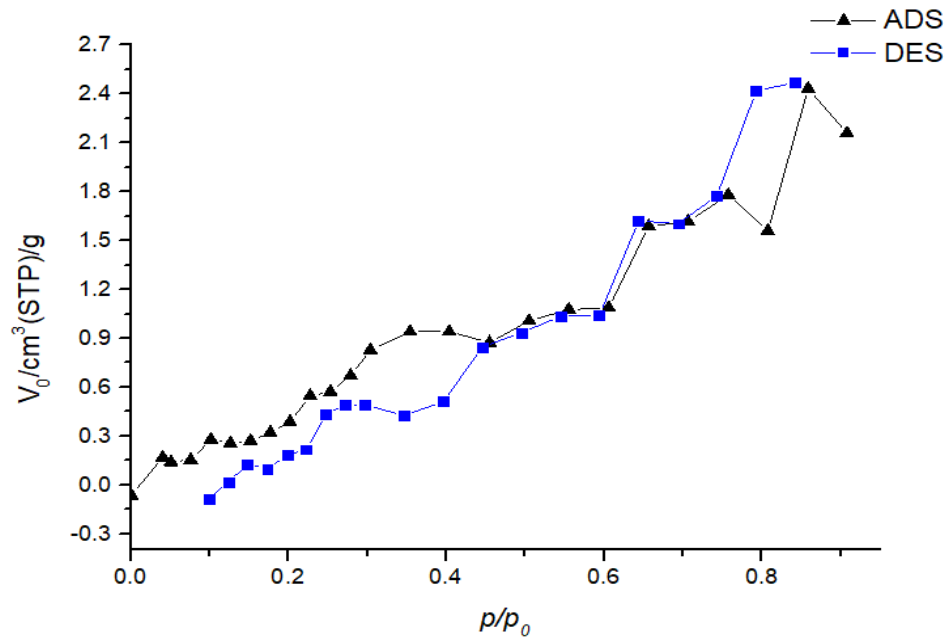


Figura A-4 Isoterma de adsorción-desorción de N₂ en el musgo *Physcomitrella patens*

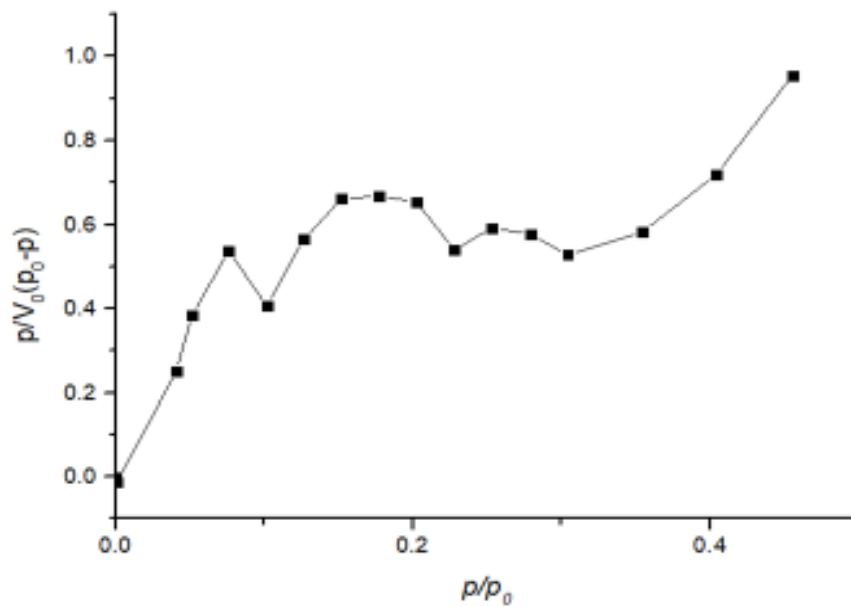
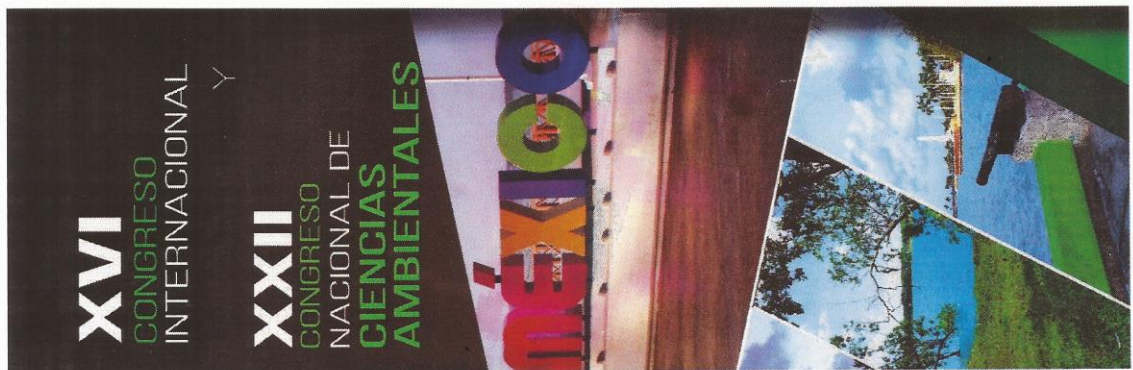




Figura A-5 Modelo BET aplicado a la isoterma de adsorción del musgo *Physcomitrella patens*





UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO




Congreso
XVI Internacional
XXII Nacional

Constancia

A:

LÓPEZ-SOLÓRZANO E., ÁVILA P. P., MACEDO M. G., AVONCE V. N.,
ZEPEDA-GÓMEZ C., ZARAZÚA O. G., Y GARCÍA-IBARRA C.

POR HABER IMPARTIDO LA PONECIA DENOMINADA
"CARACTERIZACIÓN DEL MUSGO LESKEA ANGUSTATA USADO COMO
BIOMONITOR DE LA CONTAMINACION ATMOSFÉRICA".
DEL 7 AL 9 DE JUNIO DE 2017 EN LA UNIDAD ACADÉMICA CHETUMAL DE LA
UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO.


 MTR. ÁNGEL E. RIVERO PALOMO
RECTOR



 DRA. GISELA V. CAMPOS ÁNGELES
PRESIDENTE ANCA

Figura A-6 Productividad-Constancia de participación en Congreso

U.S. Department of Commerce
Elliot L. Richardson,
Secretary
National Bureau of Standards
Ernest Ambler, Acting Director

National Bureau of Standards Certificate of Analysis

Standard Reference Material 1573

Tomato Leaves

This Standard Reference Material is intended primarily for calibrating instrumentation and evaluating the reliability of analytical methods for the determination of major, minor, and trace elements in botanical materials and other agricultural products.

Certified Values of Constituent Elements: The certified values for the constituent elements are shown in Table I. They are based on results obtained either by reference methods of known accuracy or by two or more independent, reliable analytical methods. Non-certified values, which are given for information only, appear in Table 2. All values are based on a minimum sample size of 500 mg of the material dried as indicated under "Instructions for Drying."

Notice and Warnings to Users:

Expiration of Certification: This certification will be invalid 5 years after the shipping date. Should it be invalidated before then, purchasers will be notified by NBS.

Stability: The material should be kept in its original bottle and stored at temperatures between 10-30 °C. It should not be exposed to intense sources of radiation, including ultraviolet lamps or sunlight. Ideally, the bottle should be kept in a desiccator in the dark at the temperature indicated.

Use: The bottle should be shaken well before each use. A minimum sample of 500 mg of the dried material (see Instructions for Drying) should be used for any analytical determination to be related to the certified values of this certificate.

The overall direction and coordination of the technical measurements leading to this certificate were performed under the chairmanship of H. L. Rook. The overall coordination of the cooperative work performed by the Commission of European Communities, Joint Research Center, Ispra Establishment, Italy, was by G. Rossi of the Chemistry Division.

The technical and support aspects involved in the preparation, certification, and issuance of this Standard Reference Material were coordinated through the Office of Standard Reference Materials by T. W. Mears and R. Alvarez

Washington, D.C. 20234
October 18, 1976

J. Paul Cali, Chief
Office of Standard Reference Materials

Figura A-7.1 Estándar de referencia: Hojas de tomate

Table I. Certified Values of Constituent Elements¹

Major and Minor Constituents

Element	Content Wt. Percent
Potassium	4.46 ± 0.03
Calcium	3.00 ± 0.03
Phosphorus	0.34 ± 0.02

Trace Constituents

Element	Content ug/g	Element	Content µg/g
Iron	690 ± 25	Lead	6.3 ± 0.3
Manganese	238 ± 7	Chromium	4.5 ± 0.5
Zinc	62 ± 6	Arsenic	0.27 ± 0.05
Strontium	44.9 ± 0.3	Thorium	0.17 ± 0.03
Rubidium Copper	16.5 ± 0.1	Uranium	0.061 ± 0.003

¹Analytical values are based on the "dry-weight" of material (See Instructions for Drying).

The uncertainties of the values shown in Table I include allowances for inhomogeneity, method imprecision, and an estimate of possible biases of the analytical methods used.

Table 2. Non-certified Values for Constituent Elements¹

NOTE: The following values are not certified because they are not based on the results of either a reference method of known accuracy or two or more independent methods. These values are included for information only.

Major and Minor Constituents

Element	Content Wt. Percent
Nitrogen	(5.0)
Magnesium	(0.7)
Aluminum	(0.12)

Trace Constituents

Element	Content gg/g	Element	Content µg/g
Boron	(30)	Cobalt	(0.6)
Bromine	(26)	Scandium	(0.13)
Cadmium	(3)	Mercury	(0.1)
Cerium	(1.6)	Thallium	(0.05)
Lanthanum	(0.9)	Europium	(0.04)

Figura A-7.2 Estándar de referencia: Hojas de tomate



International Atomic Energy Agency
Analytical Quality Control Services
 Wagramer Strasse 5, P.O.Box 100, A-1400 Vienna, Austria

REFERENCE SHEET

REFERENCE MATERIAL

IAEA--336

TRACE AND MINOR ELEMENTS IN LICHEN

Date of issue: June 1999^o

Recommended Values

(Based on dry weight)

Element	Recommended Value mg/kg	95% Confidence Interval* mg/kg	N**
As	0.63	0.55 - 0.71	17
Ba	6.4	5.3 - 7.5	11
Br	12.9	11.2 - 14.6	18
Ce	1.28	1.11 - 1.45	13
Co	0.29	0.24 - 0.34	19
Cs	0.110	0.097 - 0.123	13
Cu	3.6	3.1 - 4.1	21
Fe	430	380 - 480	35
Hg	0.20	0.16 - 0.24	15
K	1840	1640 - 2040	24
La	0.66	0.56 - 0.76	12
Mn	63	56 - 70	29
Na	320	280 - 360	20
Sb	0.073	0.063 - 0.083	12
Se	0.22	0.18 - 0.26	12
Sm	0.106	0.092 - 0.120	15
Sr	9.3	8.2 - 10.4	19
Th	0.14	0.12 - 0.16	16
Zn	30.4	27.0 - 33.8	38

* It should be noted that the confidence interval was calculated from the combination of the standard deviation of the mean value and an additional 5% to account for any variation due to sample inhomogeneity. ** Number of accepted laboratory means which were used to calculate the recommended values and confidence intervals.

^o Revision of the original reference sheet dated October 1994

Information Values*(Based on dry weight)*

Element	Information Value mg/kg	95% Confidence Interval* mg/kg	N**
Al	680	570 - 790	15
Cd	0.117	0.100 - 0.134	14
Cl	1900	1600 - 2200	13
Cr	1.06	0.89 - 1.23	22
Eu	0.023	0.019 - 0.027	9
Lu	0.0066	0.0042 - 0.0090	5
Nd	0.60	0.42 - 0.78	5
P	610	490 - 730	12
Pb	4.9	4.3 - 5.5	23
Rb	1.76	1.54 - 1.98	16
Sc	0.17	0.15 - 0.19	13
Tb	0.014	0.012 - 0.016	7
V	1.47	1.25 - 1.69	8
Yb	0.037	0.025 - 0.049	5

* It should be noted that the confidence interval was calculated from the combination of the standard deviation of the mean value and an additional 5% to account for any variation due to sample inhomogeneity.

** Number of accepted laboratory means which were used to calculate the information values and confidence intervals.

The values listed above were established on the basis of statistically valid results submitted by laboratories which had participated in an international intercomparison exercise organized during 1992/1994. The details concerning the criteria for qualification as a recommended or an information value can be found in the report NAHRES-33 (IAEA/AL/79) "Intercomparison run for the determination of trace and minor elements in lichen material IAEA-336" [1]. This report is available free of charge upon request.

Intended Use

This sample is intended to be used as a reference material for the measurement of trace and minor elements in lichens. It can also be used as a quality control material for the assessment of a laboratory's analytical work, for the validation of analytical methods and for quality assurance within a laboratory.

Origin and preparation of the material

The epiphytic lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. was selected and collected by hand. The lichen was collected from areas in Portugal remote from pollution sources. These areas included Gavião (center of Portugal), Ourique and Serra do Cladeirão (south of Portugal). The lichen was harvested from both the *Cistus ladanifer* and *Quercus* species of tree. About 25 kilograms were collected, separated from debris and other epiphytic lichen species by visual inspection, then washed in deionized water and oven-dried at 40 °C for 24 hours. The lichen was ground using a Teflon "Mikro-dismembrator" mill. The final material was passed through a 125 µm sieve and mixed in a rotating plastic drum. Sufficient material was obtained to produce 800 units of 20 g. The material was radiation-sterilized to a total dose of 12 kGy using a ⁶⁰Co source.