



SEP

TNM

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Toluca

“BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A METALES
PESADOS EN MUSGO DE LA ZMVT”

TESIS

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

PRESENTA:

PAULINA OBDULIA GIL VARGAS
No. CONTROL 0528M0106

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. GUADALUPE MACEDO MIRANDA

CODIRECTOR DE TESIS:
DR. PEDRO ÁVILA PÉREZ

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, ENERO 2015.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero del Tecnológico Nacional de México, proyecto 5167.13-p, “Evaluación de la contaminación por metales en la atmósfera de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT) mediante el uso de indicadores biológicos”,

El trabajo forma parte de la Línea de Investigación “Desarrollo de materiales y procesos fisicoquímicos y de oxidación, novedosos de aplicación ambiental”.

Se agradece a las autoridades del Instituto Tecnológico de Toluca y del Laboratorio de Investigación de Ingeniería Ambiental (LIIA), por las facilidades otorgadas para el desarrollo de las actividades de la presente investigación.

Agradeciendo al H. Ayuntamiento de Metepec y al H. Ayuntamiento de Toluca junto con el Ejido de Cacalomacán por los permisos otorgados para el muestreo de bioindicadores.

Así mismo, se agradece el apoyo del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable CCIQS (UAEMex-UNAM), por el apoyo y facilidades para el desarrollo de la técnica en este proyecto, en especial a la Dra. Gabriela Roa Morales por la dirección, orientación y entusiasmo en esta etapa del proyecto.

RESÚMEN

En la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT) existen diversos problemas ambientales, tales como: variaciones en los usos del suelo, invasión de áreas naturales protegidas, deforestación, procesos de erosión, incendios forestales, quemas de residuos a cielo abierto, así como las emisiones de contaminantes provenientes de industria que carecen de sistemas de control.

En el presente trabajo se aborda uno de los temas más importantes que aquejan a nuestra sociedad el problema de la contaminación atmosférica en la ZMVT. Se describen los principales contaminantes atmosféricos y sus efectos sobre el ambiente. Se presentan las observaciones y conclusiones sobre el muestreo de musgos en época de lluvias, así como los análisis de fitoquelatinas por la técnica de voltamperometría.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la concentración de Cd, Cu, Ni, Zn y Pb en los tejidos de musgo de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca. Se muestrearon 7 sitios clasificados como zonas urbanas y 1 área natural protegida. Las principales especies de musgos encontradas en los sitios fueron *Fabronia ciliaris*, *Syntrichia amphidiacea* y *Leskea angustata*. Se cuantificó la concentración de los metales Cd, Cu, Ni, Zn y Pb, mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica. El orden de concentración que se encontró en esta investigación fue el siguiente Zn>Pb>Ni>Cu>Cd.

En relación a las fitoquelatinas, se encontró que la especie *Fabronia ciliaris* es la que acumula más PC4 y los metales están estadísticamente relacionados con la concentración de fitoquelatinas.

ABSTRACT

In ZMVT there are several environmental problems such as: changes in land use, invasion of protected areas, deforestation, erosion, forest fires, burning waste in the open, as well as emissions of pollutants from industry lack of control systems.

In this paper addresses one of the most important issues facing our society the problem of air pollution in the ZMVT. Major air pollutants and their effects on the environment are described. The observations and conclusions on sampling of moss in the rainy season and the analysis phytochelatinas by voltammetry technique are presented.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the concentration of Cd, Cu, Ni, Zn and Pb in moss tissues of the Metropolitan Area of the Valley of Toluca. Seven sites are classified as urban areas and other one protected area was sampled. The main species of moss found in the sites were *Fabronia ciliaris*, *Syntrichia amphidiacea* and *Leskea angustata*. The concentration of Cd, Cu, Ni, Zn and Pb metals by Atomic Absorption Spectrophotometry was quantified. The order of concentration found in this investigation was the following Zn > Pb > Ni > Cu > Cd.

In relation to phytochelatinas found that the *Fabronia ciliaris* is the specie that more PC4 accumulations of metals are statistically related to the concentration of phytochelatinas

CONTENIDO

		Pág.
1	FUNDAMENTOS	1
1.1	Contaminación atmosférica por metales	1
1.1.1	Cadmio	3
1.1.2	Plomo	4
1.1.3	Zinc	5
1.1.4	Cobre	5
1.1.5	Níquel	6
1.2	Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT)	7
1.3	Biomonitoreo ambiental	9
1.4	Bioindicador	10
1.4.1	Musgo como bioindicador	12
1.5	Glutación y Fitoquelatinas (PCs) como biomarcadores	14
1.6	Cisteína	21
1.7	Voltamperometría	22
1.8	Voltamperometría de redisolución catódica (CSV)	25
1.9	Voltamperometría de barrido lineal (LSV)	26
1.10	Factor de enriquecimiento (FE)	26

1.11	Factor de bioacumulación	27
1.12	Determinación de Fitoquelatinas por el método adición de estandar	27
2	MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1	Visita preliminar y Muestreo de musgo	29
2.1.1	Muestreo de musgo	32
2.2	Tratamiento de muestras y clasificación de especies	35
2.3	Digestión acida de muestras	37
2.4	Extracción y purificación de tioles -PCs	39
2.5	Técnica voltamperométrica para cuantificación de Fitoquelatinas (PCs)	40
2.5.1	Deposición de amalgama Cu- Hg	42
2.5.2	Activación de amalgama Cu-Hg	43
2.6	Tratamiento estadístico de resultados	45
2.7	Factor de Bioacumulación (BAF)	45
2.8	Determinación de Fitoquelatinas por el método adición de estándar	46
3	RESULTADOS	47
3.1	Especies en la ZMVT	47
3.2	Metales pesados en broifitas y suelo de la ZMVT	50

3.3	Factor de enriquecimiento (FE)	60
3.4	Factor de Bioacumulación (BAF)	65
3.5	Estadístico	67
3.6	Implementación de la técnica por Voltamperometría	88
3.6.1	Deposición de la amalgama Cu-Hg	89
3.6.2	Caracterización de amalgama por voltamperometría cíclica (VC) y Microscopía electrónica de barrido (SEM)	90
3.6.3	Curva de calibración (Técnica de voltamperometría de barrido lineal)	93
3.7	Determinación de Fitoquelatinas (PCs) en muestras reales	95
3.8	Correlación entre fitoquelatinas PC4 y metales	100
3.9	Comparación de resultados	102
	CONCLUSIONES	103
	RECOMENDACIONES	104
	REFERENCIAS	105
	ANEXOS	114

ÍNDICE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1.1	Mapa de la ZMVT (SEMARNAT, 2007).	8
Figura 1.2	a) Estructura del musgo, b) Musgo real con esporofito y gametofito.	13
Figura 1.3	Mecanismos de tolerancia a metales pesados en plantas.	16
Figura 1.4	Iones metálicos (M) entrando en una célula vegetal.	17
Figura 1.5	Fórmula de Glutación.	18
Figura 1.6	Fórmula de Fitoquelatinas (PCs).	18
Figura 1.7	Estructura de la cisteína	22
Figura 2.1	Etapas desarrolladas.	28
Figura 2.2	Mapa sitios de muestreo (ININ, 2012).	30
Figura 2.3	Musgo en corteza.	32
Figura 2.4	Identificación de árbol.	33
Figura 2.5	a) Muestreo de musgos. Sitio Camellón Tollocan	34
Figura 2.5	b) Muestreo de musgos. Sitio Parque Hípico	34
Figura 2.6	Método de cuarteo.	35
Figura 2.7	a) Limpieza de musgo.	35
Figura 2.7	b) Muestra limpia.	35
Figura 2.8	Molienda de musgo.	36

Figura 2.9	Secado de muestras de suelo.	36
Figura 2.10	Molienda de musgos	39
Figura 2.11	Filtración con un filtro de 0.45 micras.	40
Figura 2.12	Muestras filtradas en filtro 0.24 micras.	40
Figura 2.13	a) electrodo de referencia, b) electrodo de trabajo, c) electrodo auxiliar	41
Figura 2.14	Electrodo de carbón vítreo con amalgama Cu-Hg.	42
Figura 3.1	Micrografías por Microscopio Óptico de <i>Fabronia ciliaris</i>	47
Figura 3.2	Micrografías por Microscopio Óptico de <i>Syntrichia amphidiacea</i> .	48
Figura 3.3	Micrografías por Microscopio Óptico de <i>Leskea angustata</i> .	50
Figura 3.4	Concentraciones de metales para la especie <i>Leskea angustata</i> .	52
Figura 3.5	Concentraciones de metales para la especie <i>Syntrichia amphidiacea</i> .	53
Figura 3.6	Concentraciones de metales para la especie <i>Fabronia ciliaris</i> .	55
Figura 3.7	Concentraciones de metales para suelos.	58
Figura 3.8	Coulometría, deposición de amalgama Cu-Hg durante 100s.	89
Figura 3.9	Voltamperograma cíclico, caracterización de amalgama.	90
Figura 3.10	a) Micrografía de amalgama inactiva.	91

Figura 3.10	b) Micrografía de amalgama activa con KCl 0.2M.	92
Figura 3.11	Voltamperograma de redisolución catódica (CSV) para Cys.	94
Figura 3.12	Curva de calibración de Cys.	95
Figura 3.13	Voltamperograma de redisolución catódica (CSV) para PC3.	95
Figura 3.14	Curva de calibración de PC3.	95
Figura 3.15	Voltamperograma de redisolución catódica (CSV) para PC4.	96
Figura 3.16	Curva de calibración de PC4.	97
Figura 3.17	CSV de muestra P. Reforma (<i>Fabronia ciliaris</i>) + PC3 y PC4.	98
Figura 3.18	CSV de muestra Santín (<i>Fabronia ciliaris</i>) + PC3 y PC4.	98
Figura 3.19	CSV de muestra P. La Pilita (<i>Fabronia ciliaris</i>) + PC3 y PC4.	99
Figura 3.20	CSV de muestra P. Hípico (<i>Syntrichia amphidiacea</i>) + PC3 y PC4.	99

ÍNDICE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1 Intervalo de Factor de enriquecimiento (FE)	27
Tabla 2.1 Ubicación de las zonas de muestreo (lluvias noviembre 2013)	31
Tabla 2.2 Longitudes de onda en el análisis	38
Tabla 2.3 Condiciones técnica de Coulometría	43
Tabla 2.4 Condiciones Voltamperometría cíclica	44
Tabla 2.5 Condiciones técnica lineal	44
Tabla 3.1 Especies encontradas en la ZMVT	47
Tabla 3.2 Concentraciones de referencia y analizadas para Std Lichen IAEA-336	50
Tabla 3.3 Concentraciones de referencia y analizadas para Std Soil-5	51
Tabla 3.4 Concentraciones de metales para la especie <i>Leskea angustata</i>	51
Tabla 3.5 Concentraciones de metales para la especie <i>Syntrichia amphidiacea</i>	53
Tabla 3.6 Concentraciones de metales para la especie <i>Fabronia ciliaris</i>	55
Tabla 3.7 Concentraciones de metales para Suelos	57
Tabla 3.8 FE para la especie <i>Fabronia ciliaris</i> .	60
Tabla 3.9 Evaluación del FE para la especie <i>Fabronia ciliaris</i> .	61
Tabla 3.10 FE para la especie <i>Syntrichia amphidiacea</i>	61
Tabla 3.11 Evaluación del FE para la especie <i>Syntrichia amphidiacea</i>	62
Tabla 3.12 FE para la especie <i>Leskea angustata</i>	63

Tabla 3.13 Evaluación del FE para la especie <i>Leskea angustata</i>	64
Tabla 3.14 Factor de bioacumulación para la especie <i>Fabronia ciliaris</i>	65
Tabla 3.15 Factor de bioacumulación para la especie <i>Syntrichia amphidiacea</i>	66
Tabla 3.16 Factor de bioacumulación para la especie <i>Leskea angustata</i>	67
Tabla 3.17 Prueba de Kruskal-Wallis para Cd por especie	67
Tabla 3.18 Contraste Múltiple de Rango para Cd	68
Tabla 3.19 Prueba de Kruskal-Wallis para Cu por especie	69
Tabla 3.20 Contraste Múltiple de Rango para Cu	69
Tabla 3.21 Prueba de Kruskal-Wallis para Ni por especie	70
Tabla 3.22 Contraste Múltiple de Rango para Ni	70
Tabla 3.23 Prueba de Kruskal-Wallis para Zn por especie.	71
Tabla 3.24 Contraste Múltiple de Rango para Zn	71
Tabla 3.25 Prueba de Kruskal-Wallis para Pb por especie	72
Tabla 3.26 Contraste Múltiple de Rango para Pb	72
Tabla 3.27 Prueba de Kruskal-Wallis para Cd por Sitio	73
Tabla 3.28 Grupos con diferencias significativa para Cd	73
Tabla 3.29 Prueba Contraste Múltiple de Rango para Cd	74
Tabla 3.30 Prueba de Kruskal-Wallis para Cu por Sitio	76
Tabla 3.31 Grupos con diferencia significativa para Cu.	76

Tabla 3.32 Contraste Múltiple de Rango para Cu	77
Tabla 3.33 Prueba de Kruskal-Wallis para Ni por Sitio	79
Tabla 3.34 Grupos con diferencia significativa para Ni.	80
Tabla 3.35 Contraste Múltiple de Rango para Ni	80
Tabla 3.36 Prueba de Kruskal-Wallis para Zn por Sitio	83
Tabla 3.37 Contraste Múltiple de Rango para Zn	83
Tabla 3.38 Prueba de Kruskal-Wallis para Pb por Sitio	86
Tabla 3.39 Grupos con diferencia significativa para Pb.	86
Tabla 3.40 Contraste Múltiple de Rango para Pb	87
Tabla 3.41 Análisis elemental (EDS)	93
Tabla 3.42 Concentraciones de PC4 en tejidos de musgo	97
Tabla 3.43 sitios y especies que no presentan PCs	100
Tabla 3.44 Análisis de varianza	101
Tabla 3.45 Concentraciones de PC2, PC3 y PC4 para líquen <i>Physcia adscendens</i>	102
Tabla 3.46 Concentraciones de PC4 para tejido de musgo	102

INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire es un problema prioritario a nivel mundial, particularmente en los países en desarrollo debido a la creciente urbanización e industrialización durante los últimos años. La evolución de la ZMVT es similar a la de otras ciudades del país por el continuo proceso de urbanización, con la consiguiente demanda de servicios y satisfactores a costa de los recursos naturales, provocando como consecuencia diversos problemas ambientales. Para el monitoreo ambiental se requiere de infraestructura y equipo especial, lo que origina una inversión en ello, por lo que el uso de los bioindicadores para medir los efectos de la contaminación atmosférica es un pilar en la gestión de la calidad del aire en todo el mundo, por la utilización de organismos vivos para estimar el riesgo de la contaminación ambiental para los ecosistemas y la salud humana (Anze *et al.*, 2007). En México, los musgos son una parte importante del paisaje urbano, sin embargo hay escasas publicaciones referentes al número de especies de las diferentes zonas.

Debido a la función vital que desempeñan las plantas en los ecosistemas, estos organismos han sido utilizados para el diagnóstico y predicción de las consecuencias negativas de actividades antropogénicas mediante el estudio de sus procesos fisiológicos, respuestas bioquímicas, mecanismos de adaptación y mortalidad. Las respuestas que tienen lugar en los organismos como consecuencia del efecto de un contaminante se han denominado biomarcadores.

Los biomarcadores son instrumentos de medición que ofrecen información completa y biológicamente relevante sobre el potencial impacto de los contaminantes tóxicos en la salud de los organismos. Tienen la ventaja de poner en evidencia síntomas tempranos del daño causado por el contaminante y, por tanto, pueden ser utilizados como señales de alarma ante la presencia de contaminantes químicos.

Por lo anterior, el objetivo del trabajo fue determinar la relación existente entre la concentración de metales pesados y la concentración de fitoquelatinas en los tejidos

de musgos de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca. Los objetivos específicos fueron:

- Seleccionar los sitios de muestreo de acuerdo a la presencia y abundancia de las especies de musgo *Fabronia ciliaris*, *Syntrichia amphidiacea* y *Leskea angustata*.
- Obtener las muestras de especies vegetales de las zonas de mayor abundancia.
- Cuantificar la concentración de Cu, Cd, Ni, Pb y Zn en muestras de musgo seleccionadas.
- Obtener los extractos conteniendo las fitoquelatinas
- Determinar la concentración las fitoquelatinas
- Evaluar la eficiencia del uso de fitoquelatinas como biomarcadores

La hipótesis planteada fue: Los musgos colectados en la ZMVT presentan concentraciones significativas de fitoquelatinas en sus tejidos, como resultado del estrés ambiental por metales pesados.

En el primer apartado del trabajo, se resumen los fundamentos en los que se basa la investigación sobre biomarcadores y fitoquelatinas así como el biomonitoreo ambiental. A continuación en la metodología se describen las actividades realizadas, como el muestreo y los análisis de laboratorio.

En el tercer apartado, se muestran y discuten los resultados obtenidos y finalmente se describen las conclusiones obtenidas en la investigación.

1. FUNDAMENTOS

1.1 Contaminación atmosférica por metales

La atmósfera es uno de los componentes del medio ambiente más sensible a la acción directa del hombre, lo que ha originado el incremento de las concentraciones de un grupo de elementos traza entre los que se encuentran los metales pesados. Algunas especies biológicas tienen la capacidad de acumular o tolerar en su estructura niveles elevados de metales pesados de la atmósfera, lo cual permite, mediante el análisis de estos elementos, conocer el estado de contaminación de esta (Estévez *et al.*, 2011).

La contaminación atmosférica se define como la presencia en el aire de toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, altere o modifique su composición y condición natural (INECC, SEMARNAT, 2014). De acuerdo con las leyes físicas, la contaminación se puede asimilar, transformar o eliminar, de tal modo que los sistemas permanecen en equilibrio. Sin embargo, en muchos casos las emisiones de grandes cantidades de sustancias a la atmósfera han rebasado la capacidad de equilibrio de este sistema, ocasionando con ello la alteración del ambiente natural (Kathryn *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que los procesos naturales (fuentes geotérmicas, como las erupciones volcánicas) y artificiales (industria) son causantes de las partículas metálicas que se encuentran en el aire. Dependiendo de las condiciones climáticas, estas partículas pueden llegar a ser arrastradas por el viento a grandes distancias.

Los problemas de contaminación de metal se están convirtiendo cada vez más común, con muchos casos documentados de toxicidad de metales en las industrias de minería, fundiciones, hornos de fundición, plantas de energía que queman carbón y la agricultura. Los metales pesados, como el Cd, Cu, Pb, Cr y Hg son los principales contaminantes ambientales, especialmente en las zonas con alta actividad antropogénica.

La contaminación atmosférica por metales tiene una gran influencia en las plantas y sus actividades metabólicas afecta a la geología y la redistribución biológica de los metales pesados a través de la contaminación del aire, agua y suelo. La toxicidad del metal tiene alto impacto y relevancia para las plantas y por consiguiente afecta el ecosistema, en donde las plantas son un componente integral. Cuando las plantas se desarrollan en sitios contaminados por metales su metabolismo es alterado, los procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas se ven afectados disminuyendo su crecimiento y la producción de biomasa es baja por la acumulación de las especies metálicas (Nagajyoti *et al.*, 2010). Ciertos metales son esenciales para la vida de los seres vivos y son absorbidos por las plantas, estos al acumularse y llegar a concentraciones elevadas se convierten en tóxicos.

La toxicidad de los metales depende de las concentraciones y tiempo de residencia. Los metales como el Pb, Ag, Cd, Ni, As, Cr, Cu, Al, y Hg son los principales contaminantes ambientales, especialmente en las zonas con alta actividad antropogénica y son clasificados como sustancias tóxicas. (Aksoy *et al.*, 2000).

La peligrosidad de los metales pesados reside en que no pueden ser degradados (ni química, ni biológicamente) y, además, tienden a bioacumularse y biomagnificarse (significa que se acumulan en los organismos vivos alcanzando concentraciones mayores que la que alcanzan en el medioambiente, y que estas concentraciones aumentan a medida que ascendemos en la cadena trófica), provocando efectos tóxicos. Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad relativamente 5 veces mayor a la densidad del agua. Determinados metales pesados presentan cierta toxicidad para el ser humano y algunos otros seres vivos. El cadmio, destaca aspectos que interfieren con el ciclo de vida de las plantas, estas han desarrollado una serie de mecanismos a nivel celular que le permiten establecerse en ambientes con altas concentraciones de metales (González y Zapata, 2008).

Algunos metales, incluyendo Cu, Mn, Co, Zn y Cr son esenciales para el metabolismo de la planta en cantidades traza (Domènech y Peral, 2006). Es sólo cuando los metales están presentes en formas biodisponibles y cuando los niveles

son excesivos tienen el potencial de llegar a ser tóxicos a plantas. Esta investigación se centró principalmente en Cd, Pb, Zn, y Ni.

1.1.1 Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial, se encuentra en el aire en forma de pequeñas partículas. La exposición al Cd en los humanos se produce generalmente a través de dos fuentes principales: la primera es la vía oral (por agua e ingestión de alimentos contaminados). La segunda vía es por inhalación, la población fumadora es la más expuesta al Cd, ya que está presente en los cigarrillos (Rodríguez *et al.*, 2008).

El empleo de fertilizantes a base de fosfatos que contienen Cd en forma iónica (como contaminante), o su presencia en el lecho de ríos y mares contaminados, por las descargas industriales, aumentan los niveles de este elemento en los suelos y por lo tanto las plantas absorben dicho metal (Souza *et al.*, 1997).

Borowiak *et al.* (2014), realizaron una evaluación de la contaminación atmosférica por Cd y otros metales, utilizando una planta "*Lolium multiflorum*". El experimento se llevó a cabo en la temporada de crecimiento de 2011 en la ciudad de Poznań, Polonia y alrededores. Las plantas estuvieron expuestas durante 28 ± 1 días en sitios con diferentes características ambientales. Las altas concentraciones de Cd en la planta *Lolium multiflorum* se encontraron dentro de la ciudad.

Hui-Ping *et al.* (2013), investigaron en el noroeste de China, las raíces, corteza, madera y hojas del árbol *Populus x canescens*. El estudio consistió en cuantificar Cd, fitoquelatinas (PCs) y/o glutatión (GSH) y observándose el cambio en la planta: Para ello realizaron un cultivo en una cámara climática en donde programaron las condiciones de humedad, temperatura y luz, óptimas para su crecimiento del árbol, ya teniendo las plántulas enraizadas fueron tratadas con CdSO₄ a diferentes concentraciones desde (control), 10, 30, 50, y 70 µM durante 28 días. Finalmente cuantificaron el Cd y se observó que el aumento de Cd induce la acumulación de los PCs las cuales fueron detectados en los últimos días de exposición, las

concentraciones crecientes de Cd causaron una disminución continua de contenido de GSH, mientras que los niveles de PC aumentaban.

1.1.2 Plomo

El plomo (Pb) suele estar en rocas, la mayor parte del plomo que forma parte en el ciclo biogeoquímico es de origen antropogénico. El plomo no tiene una función en el metabolismo normal en los organismos, aunque estos son afectados por su presencia debido a su facultad de unirse con la materia orgánica. La Norma Oficial Mexicana NOM-026-SSA1-1993, especifica que la concentración de plomo en aire no debe rebasar el valor máximo permisible de $1.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en un periodo de tres meses, como protección a la salud de la población susceptible (Castillo *et al.*, 2005; Secretaría de Salud, 2001).

Entre las principales fuentes de contaminación ambiental destacan la explotación minera, la metalurgia, las actividades de fabricación y reciclaje y, en algunos países, el uso persistente de pinturas con plomo. Más de tres cuartas partes del consumo mundial de plomo corresponden a la fabricación de baterías de plomo-ácido para vehículos de motor. Sin embargo, este metal también se utiliza en muchos otros productos, como pigmentos, pinturas, material de soldadura, vidrieras, vajillas de cristal, municiones, esmaltes cerámicos, artículos de joyería y juguetes (Casas y Sordo, 2006).

Para la su monitoreo se han utilizado plantas como bioindicadores. Naszradi *et al.*, (2004), utilizaron musgos para poder cuantificar metales pesados como Pb, Cd y Zn para supervisar el estado del medio ambiente en una zona con flujo vehicular siendo esta una autopista en Hungría, tomaron muestras a diferentes distancias. Reportaron que el contenido de metales pesados en muestras de musgo disminuye con la distancia. Los autores compararon los datos con los estándares húngaros, y encontraron que los valores medidos no superan los niveles máximos permitidos de concentración.

1.1.3 Zinc

El Zinc (Zn) es un oligoelemento esencial para las plantas y los animales, pero es tóxico cuando está presente en niveles elevados. Cd y Zn son elementos que tienen similares propiedades geoquímicas y ambientales; su similitud química puede llevar a la interacción entre Cd y Zn durante absorción de la planta, el transporte de las raíces a las partes aéreas, o acumulación en las partes comestibles (Šaćiragić, 2011).

El Zn se encuentra en la naturaleza como óxido de zinc (ZnO) es un metal brillante blanco azulado y en el momento que está en contacto con el aire húmedo se transforma en metal gris. Su aplicación fundamental es proteger de la corrosión al hierro y acero, fabricación de pilas secas, fabricación de latón. La contaminación ambiental por Zn ha aumentado como consecuencia del incremento de la actividad industrial del último siglo (Moustakas *et al.*, 2011).

(Aničić, *et al.*, 2009) realizaron un biomonitoreo de la calidad del aire en Belgrado, Serbia, mediante musgo *Sphagnum girgensohnii*. Colocaron bolsas con musgo en tres sitios diferentes una parte de las bolsas las mantuvieron con riego y otras las hidrataban durante 3 y 6 meses, respectivamente. Se determinaron elementos como el Zn, Al, Cr, Fe. La acumulación después de 6 meses superó la observada después de 3 meses.

1.1.4 Cobre

El cobre (Cu) es un metal rojizo que se encuentra de forma natural en aire, suelo, agua. Su concentración promedio en la corteza terrestre es de 50 mg de cobre por kilo de suelo, este metal provoca problemas de corrosión en el hierro y acero galvanizados, el cobre metálico es un excelente conductor por lo que es ampliamente utilizado en la industria eléctrica. El Cu es un elemento esencial para plantas y animales (incluso seres humanos), lo que significa que es necesario para la vida, en niveles altos, el cobre puede producir efectos nocivos como por ejemplo irritación de

la nariz, la boca y los ojos, vómitos, diarrea, calambres estomacales, náusea y aun la muerte (Cisneros, 2005).

El Cu es liberado por la industria minera, actividades agrícolas y de manufactura, y por la liberación de aguas residuales a ríos y lagos. También es liberado desde fuentes naturales como por ejemplo volcanes, polvo que sopla el viento, vegetación en descomposición e incendios forestales. El Cu liberado al ambiente generalmente se adhiere a partículas de materia orgánica, arcilla, tierra o arena y se libera al aire, el agua o los alimentos (De Garmo *et al.*, 2011).

López *et al.* (2012), utilizaron la técnica de biomonitoreo con musgo, para evaluar la contaminación del aire en el sur de Albania. Las características ambientales más importantes de los musgos como una herramienta adecuada de la vigilancia biológica son: Acumulan contaminantes del aire con facilidad, los niveles de contaminación en sus tejidos varía en función de su distancia desde la fuente, son sensibles en su morfología a los cambios importantes en la contaminación, tienen una amplia distribución. Utilizaron la especie *Pseudoscleropodium purum* analizando varios metales como Cu, Cd, Pb y Zn teniendo como resultado que las concentraciones encontradas fueron $Zn > Cu > Pb > Cd$.

1.1.5 Níquel

El Níquel (Ni) es considerado el quinto elemento más común refiriéndose al globo terráqueo en su totalidad, es decir, corteza, núcleo y manto y el número 22 entre los elementos de la corteza terrestre con el 0.008%. Es metálico magnético, de aspecto blanco plateado y usado principalmente para la producción de acero inoxidable y en aleaciones.

El Ni se encuentra en los suelos naturales en concentraciones traza. Sin embargo, la concentración de Ni^{2+} está aumentando en algunas zonas por las actividades humanas, tales como obras mineras, emisión de fundiciones, la quema de carbón y petróleo, aguas residuales, fertilizantes de fósforo y pesticidas. En el suelo contaminado, la concentración de Ni^{2+} puede variar de 20 a 30 veces (200-26,000

mg / kg) más alto que el rango general (10-1.000 mg / kg) que se encuentra en suelo natural (Izosimova, 2005).

El exceso de Ni²⁺ en el suelo provoca diversas alteraciones fisiológicas y diversos síntomas de toxicidad, tales como clorosis y necrosis en diferentes especies de plantas (Rahman *et al* 2005).

1.2 Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT)

La Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT) se localiza en la parte central del Estado de México, a una altitud promedio de 2,660 metros sobre el nivel del mar (msnm), 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, en la **figura 1.1** se muestra un mapa de la ZMVT (SEMARNAT, 2007).

Es la segunda conurbación en importancia del Estado de México y la quinta a nivel nacional, integrada por 22 municipios, donde viven 2 millones 166 mil 24 habitantes (Anexo, Tabla A1), presenta un aumento en la demanda de servicios públicos, transporte y viviendas, que requieren del suministro de agua y energía, propiciando diversos problemas ambientales. La ZMVT ha presentado un cambio en sus actividades económicas, pasando de ser una economía rural a una industrial y de servicios, contando con importantes parques industriales, y está considerada como una de las metrópolis más importantes en la Región Centro del país (INEGI 2010, SEMARNAT, 2012).

En las últimas décadas, se han realizado investigaciones las cuales han mostrado que la materia particulada (PM) es un importante contaminante ambiental involucrada en diferentes enfermedades cardiopulmonares y cáncer de pulmón. Enfermedades respiratorias, incluyendo tos y la bronquitis, se han asociado con PM₁₀. Se han reportado datos sobre la presencia de metales en partículas en suspensión en la atmósfera (Romero *et al.*, 2012).

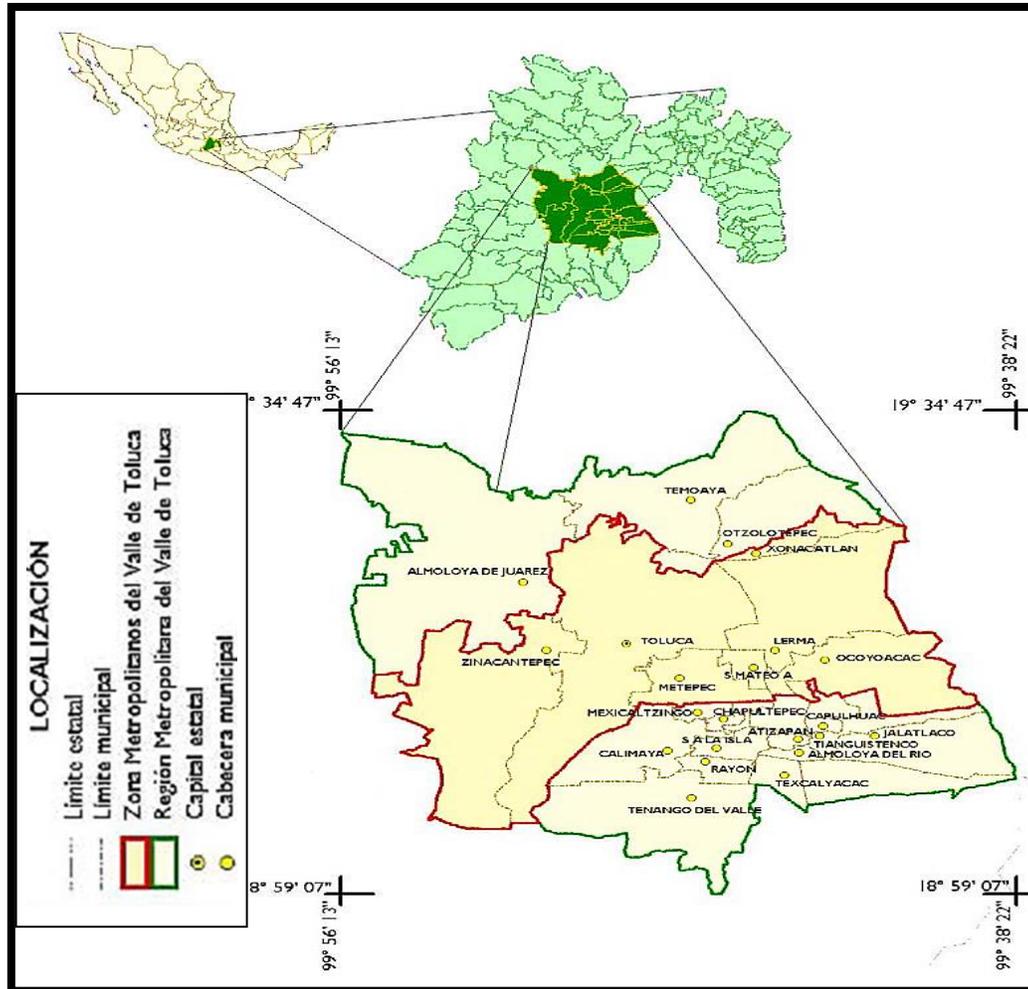


Figura 1.1 Mapa de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT) (SEMARNAT, 2007).

En la ZMVT se han incrementado año con año las emisiones provenientes de los sectores: transporte, industria, servicios y doméstico. Estas actividades han propiciado la contaminación atmosférica. Dentro de los contaminantes reportados en aire son los metales pesados, los cuales afectan la calidad de vida de las personas expuestas. Adicionalmente, se ha observado que las emisiones de metales al aire pueden provocar pérdida de biodiversidad, ocasionado por la presencia de metales tóxicos, lo cual generalmente tiene un impacto negativo en los procesos fisiológicos y bioquímicos de especies vegetales, afectando en su morfología, crecimiento y reproducción. Para poder conocer las condiciones en que se encuentra la ZMVT se ha utilizado el biomonitoreo ambiental.

1.3 Biomonitorio ambiental

El biomonitorio es un conjunto de técnicas para estimar los niveles de contaminación basadas en la reacción y sensibilidad de distintos organismos vivos a diversas sustancias contaminantes presentes en un ecosistema y se puede aplicar a grandes áreas, y obtener mapas de distribución, información sobre tipos de fuentes de emisión y su localización. Evalúa los efectos de una sustancia tóxica sobre distintos organismos vivos. El monitoreo atmosférico permite conocer la concentración de contaminantes en una zona determinada y compararla contra la norma respectiva. Dentro de la SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) y el INECC (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático) centraliza y procesa la información de la calidad del aire que proviene de las redes de monitoreo (INECC, 2005).

El biomonitorio sirve para manejar y conservar los ecosistemas y poblaciones, además aporta datos sobre las variaciones en las condiciones ambientales. El monitoreo ambiental establece las formas en las cuales los compuestos se liberan y determinan su destino en el ambiente. Es un procedimiento para detectar la presencia y cuantificar las concentraciones de los contaminantes en aire, agua, suelo y sedimentos (INECC, 2014).

Un buen monitoreo ambiental debe considerar un muestreo representativo, técnicas adecuadas para la colecta y preservación de las muestras, así como métodos apropiados de extracción y análisis, siguiendo prácticas estandarizadas en el laboratorio. El monitoreo biológico, desde el punto de vista de la ecotoxicología, consiste en evaluar los efectos adversos de los contaminantes sobre los individuos, poblaciones, comunidades y ecosistemas que han estado expuestos. En este sentido, se pueden aplicar pruebas en el laboratorio o realizar estudios en campo (Castillo, 2012, Capo Martí, 2007).

1.4 Bioindicador

Los bioindicadores son medios de los sistemas biológicos que se emplean para interpretar factores de su ambiente, lo que es útil en estudios de contaminación. Las especies indicadoras son aquellos organismos que ayudan a interpretar cualquier fenómeno o acontecimiento actual (o pasado) relacionado con el estudio de un ambiente.

Las especies tienen requerimientos físicos, químicos, de estructura del hábitat y de relaciones con otras especies. A cada especie o población le corresponden determinados límites de estas condiciones ambientales entre las cuales los organismos pueden sobrevivir (límites máximos), crecer (intermedios) y reproducirse (límites más estrechos). Cuando más estrechos sean sus límites de tolerancia, mayor será su utilidad como indicador ecológico. Las especies bioindicadoras deben ser, en general, abundantes, muy sensibles al medio de vida, fáciles y rápidas de identificar, bien estudiadas en su ecología y ciclo biológico, y con poca movilidad (Olivares et al., 2012). Las plantas son organismos sedentarios, son la base de la cadena alimenticia y son sensibles a las variaciones medioambientales. Reaccionan más rápido ante la presencia de contaminantes que otros organismos, por lo cual las convierte en elementos idóneos para el monitoreo de la contaminación (Ferrat et al., 2003).

Desde hace algunos años, las plantas están siendo utilizadas como bioindicadores de la contaminación como organismos cuya presencia y/o abundancia es representativa para una o más propiedades del ecosistema en donde se encuentran, por lo que permiten determinar con precisión el impacto de acciones antropogénicas.

Los bioindicadores son organismos o sistemas biológicos sensibles a las variaciones en la calidad ambiental, en este caso, de la calidad del aire. Al producirse una alteración en su entorno, algunos seres vivos desarrollan una determinada respuesta, cambiando sus funciones vitales, su composición química o genética y pueden almacenar el agente que ha causado ese cambio (Pinilla, 1998).

Una ventaja de los bioindicadores es que son organismos vivos. Eso quiere decir que sus respuestas indican directamente si se está produciendo algún daño sobre los seres vivos. Midiendo únicamente valores físico-químicos, estos efectos sólo pueden suponerse. Los bioindicadores permiten evaluar la calidad del suelo, el aire o el agua de manera muy útil, y fiable (Vázquez *et al.*, 2006).

Entre los bioindicadores se encuentran las briofitas, como los musgos, líquenes que son organismos que viven en ambientes muy diversos. El uso de briofitas es un método sumamente efectivo en el monitoreo de la contaminación del aire debido a las siguientes razones: (Mulgrew y Williams, 2000).

- a. Las especies tienen una amplia distribución geográfica y crecen en un amplio entorno.
- b. Son fáciles de manejar ya que su tamaño es pequeño.
- c. La mayoría de las especies son de hojas perennes y logran sobrevivir durante el año.
- d. Las briofitas carecen de una cutícula y de un sistema de raíces y obtienen sus nutrientes directamente de la deposición atmosférica. Tienen una buena capacidad de bioacumulación, particularmente para metales pesados, donde la concentración del metal refleja la deposición sin la complicación de la captación vía el sistema radicular.
- e. La capacidad de las briofitas para acumular elementos en muy altas concentraciones ayuda al análisis químico de los tejidos y puede facilitar la detección de elementos presentes en muy bajas concentraciones en el ambiente.

Se han utilizado para realizar comparaciones de los niveles de contaminación a nivel regional y en zonas industriales así como aquellas no sometidas a contaminación. Determinadas especies vegetales, experimentan un estado de estrés por la exposición a metales pesados, que conduce a daños de la célula vegetal; además de acumular iones metálicos, que afectan la homeostasis iónica celular. En las plantas,

sin embargo, los conjugados en general se supone que ser transportados en la vacuola donde se convierten a través de una acción concertada de diferentes enzimas para la respectiva conjugado de cisteína (Grzam *et al.*, 2006). Por lo tanto, es necesario evaluar la utilización de musgos colectados en determinadas zonas localizadas en la ZMVT para estudiar los biomarcadores de exposición a metales pesados, para establecer zonas de alerta de potencial contaminación.

1.4.1 Musgo como bioindicador

Los musgos son plantas relativamente pequeñas, generalmente miden desde unos milímetros hasta 20-30 cm de altura. Son abundantes en lugares húmedos donde se encuentran gran variedad de especies. Viven sobre el suelo, rocas o como epífitos, en sitios húmedo. La parte principal de cualquier musgo es el gametofito que consiste en un tallo con 3 a 5 hileras de hojas en un arreglo radial, el desarrollo del esporofito sigue un patrón preciso que incluye la formación de un pie absorbente anclado al gametofito, un eje y en la cima un esporangio o cápsula como se puede observar en la **figura 1.2** (Purves *et al.*, 2009 y Delgadillo y Cárdenas 2000).

Fajuke (2010), reporta que los musgos muestran un determinado grado de adaptaciones estructurales a diferentes condiciones ambientales y los mecanismos celulares de las plantas pueden estar participando en la tolerancia a elementos potencialmente tóxicos. Las plantas son un material adecuado para estudios de biomonitoreo, ya que forman el primer eslabón de las cadenas tróficas en los ecosistemas y, a diferencia de los animales, estas tienen un contacto más directo y abierto con su medio.

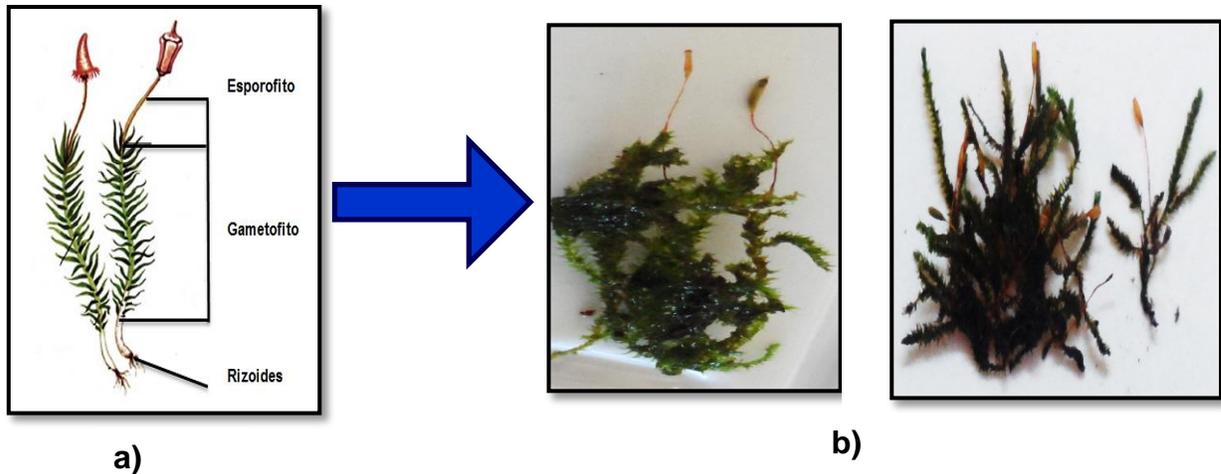


Figura 1.2 a) Estructura del musgo, b) Musgo real con esporofito y gametofito

Los musgos (briofita) están representados por alrededor de 12 800 especies en el mundo. En México se reconocen 984 especies y variedades por registros en la literatura y por ejemplares depositados en el Herbario Nacional (MEXU). En los estados del sur y en los situados a los largo del Eje Neovolcánico, la riqueza de especies de musgos es mayor, pero la exploración en los otros estados todavía puede ser fructífera. La proporción de endemismos es baja en todos los tipos de vegetación, excepto en la flora alpina donde alcanza el 17%, mientras que en el país apenas llega al 8% (Delgadillo, 2012).

Los musgos se han utilizado como bioindicadores de la contaminación del aire debido a que son altamente dependientes de las fuentes atmosféricas ya que se depositan elementos a través de toda su superficie. Estos organismos acumulan una variedad de contaminantes y por lo tanto son muy útiles para la determinación de patrones de deposición de contaminantes (Harmens *et al.*, 2008).

(Gil, 2012), cuantificó la presencia de metales pesados como Cr, Cd, Zn y Pb por la técnica de espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) utilizando musgo con especies *Fabronia ciliaris* y *Leskea angustata* como monitores biológicos (bioindicadores) para el análisis de la contaminación atmosférica en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT) en área natural protegida, en zonas de transición y área urbana, sugiriendo que el uso de musgos como bioindicadores es

útil para evaluar la presencia y concentración de metales pesados en el aire. El orden de acumulación encontrado fue Zn>Pb>Cr>Cd.

Zarazúa *et al.* (2013), determinó la presencia de especies metálicas (por la técnica de reflexión total de fluorescencia de rayos X) debido a la deposición atmosférica de los metales en musgo *Fabronia ciliaris* recogido de seis sitios urbanos de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT). Los resultados muestran la concentración en el siguiente orden: Fe>Ca>K>Ti>Mn>Zn>Sr>Pb>Cu>V>Cr> Rb>Ni y proporciona una evidencia del impacto antropogénico en los sectores industrial y áreas urbanas.

Es importante conocer los resultados de los últimos trabajos (Zarazúa *et al.*, 2013 y Gil, 2012) ya que es la base del presente trabajo y uno de los aspectos importantes es mencionar la especies de briofitas encontradas. La identificación de especies fue realizado por Zepeda *et al.* (2013), identificando los musgos epifitos de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT) a partir de una recolecta de todas las especies. Adicionalmente, las colonias de musgos se muestrearon por el método en parcela, para determinar las variaciones de su diversidad en 16 zonas verdes. Encontraron una riqueza de 39 especies (Anexo, Tabla A2).

El 65% de las especies tienen una distribución geográfica amplia. Las colonias de musgos epifitos tienden a ser diversas y están representadas en orden de importancia por *Syntrichia amphidiacea*, *Leskea angustata*, *Syntrichia fragilis*, *Syntrichia pagorum* y *Fabronia ciliaris*, que las especies con mayor peso ecológico.

1.5 Glutación y Fitoquelatinas (PCs) como biomarcadores

Los biomarcadores pueden definirse como “las variaciones bioquímicas, celulares, fisiológicas o comportamentales que pueden ser medidas en el tejido, en los fluidos corporales y/o a nivel de organismo completo; que brindan evidencia de la exposición a uno o más componentes químicos”(Depledge *et al.*, 1995). Tienen la ventaja de poner en evidencia síntomas tempranos del daño causado por el contaminante y, por tanto, pueden ser utilizados como señales de alarma ante la presencia de contaminantes (Pernía, De Sousa *et al.*, 2008).

Los biomarcadores se utilizan para la fitorremediación siendo el conjunto de métodos para degradar, asimilar, metabolizar metales pesados y compuestos orgánicos por medio de la utilización de plantas. Las plantas suelen activar como biomarcadores una serie de péptidos ricos en ácido glutámico y cisteína, denominados fitoquelatinas o péptidos γ -EC (γ -glutamilcisteína), para prevenir la absorción de iones metálicos tóxicos y esta sería una respuesta al estrés, cuyo nivel se incrementa cuando aquellos son expuestos a ciertos metales como, Cd, Pb, Zn, Ni, Hg, Ag, Cu, As, Cr (DalCorso *et al.*, 2008).

Las plantas responden a la toxicidad de metales pesados a través de un número de mecanismos. Uno de estos mecanismos implica la quelación de metales pesados por una familia de ligandos peptídicos, las fitoquelatinas (PCs). El papel de las PCs en la tolerancia de metal pesado ha sido caracterizado en *Arabidopsis*. En el citosol las PCs forman complejos estables con metales pesados, que posteriormente son secuestradas en la vacuola (**figura 1.3 y 1.4**) se presenta el posible mecanismo de tolerancia a metales pesados en plantas. (1) Ligamiento a la pared celular. (2) Limitado influjo a través de la membrana plasmática. (3) Eflujo activo. (4) (Lee y Kang, 2005).

No es posible eliminar o reducir los factores de estrés en el entorno urbano, que obstaculizan el crecimiento y desarrollo, cambiando la morfología y fisiología de las plantas. Para minimizar los efectos perjudiciales de la exposición a metales pesados, y su acumulación, las células vegetales producen tioles de bajo peso molecular, tales como glutatión (GSH) y pequeños péptidos ricos en cisteína como fitoquelatinas (PCs), con alta afinidad por los metales tóxicos (Coelho, 2012). Debido a lo anterior, en la presente propuesta se pretenden evaluar los niveles de fitoquelatinas utilizando a las briofitas como indicadores biológicos de calidad del aire.

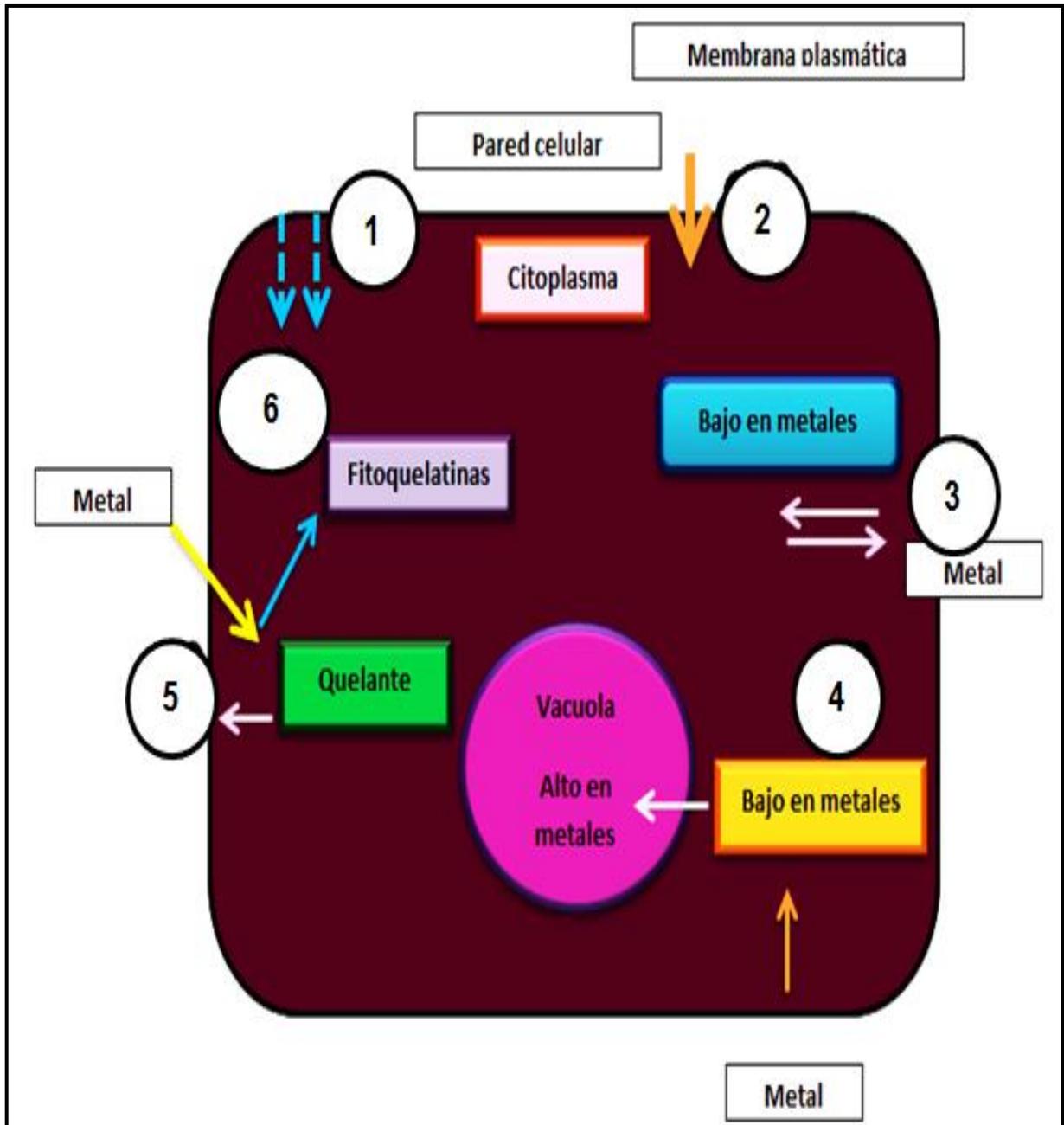


Figura 1.3 Mecanismos de tolerancia a metales pesados en plantas.

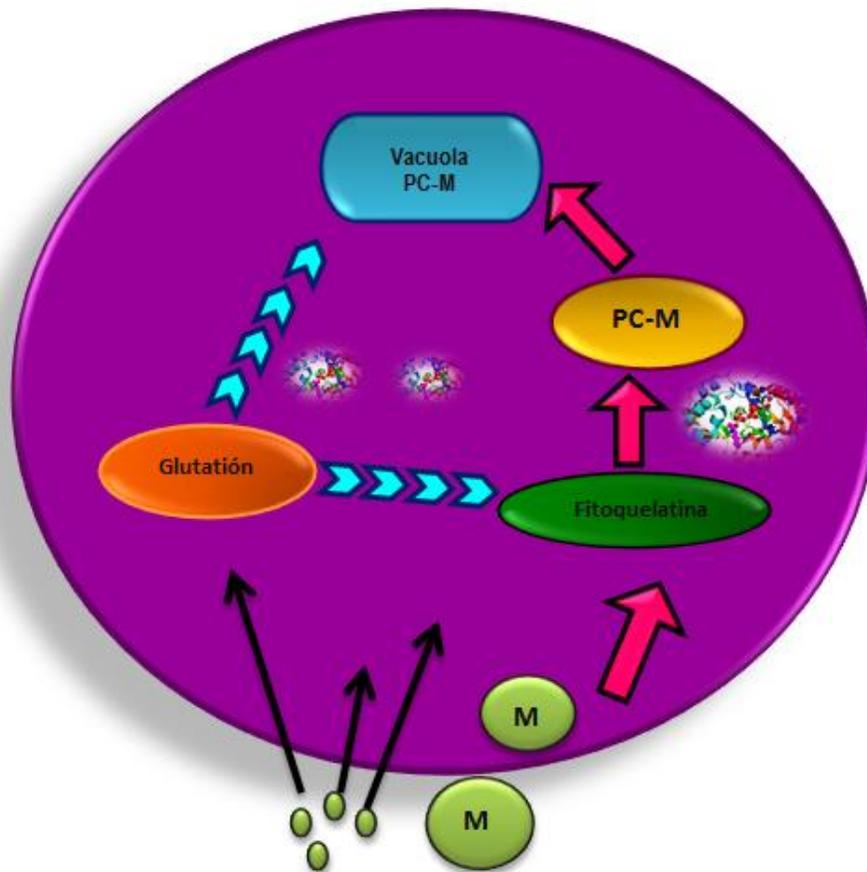


Figura 1.4 Los iones metálicos (M) entran en una célula vegetal, donde estos iones desencadenan mecanismos de protección incluyendo la síntesis de fitoquelatinas. El glutatión sirve como un precursor de estos péptidos, que se componen de dos o más unidades que se repiten (Zitka *et al.*, 2011).

Los biomarcadores como glutatión y fitoquelatinas ofrecen información completa y biológica que es relevante sobre el impacto de los contaminantes tóxicos en la salud de los organismos. El glutatión (**figura 1.5**) y las fitoquelatinas (**figura 1.6**) son generados por las plantas en respuesta a metales pesados. Estos péptidos formados por estrés participan en las plantas para la detoxificación de metales pesados (González *et al.*, 2008). Estos péptidos se han identificado en plantas y algunos microorganismos, se sintetizan a partir de glutatión, que es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina, por lo que juegan un papel importante en la respuesta de las plantas al estrés ambiental. El estrés oxidativo es producido por los compuestos xenobióticos tales como metales pesados (Pernía *et al.*, 2008).

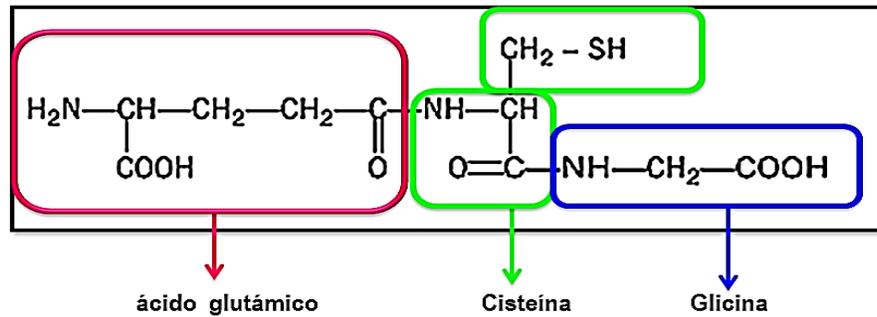


Figura 1.5 Fórmula de Glutación (Sarrasague *et al.*, 2006).



Figura 1.6 Fórmula de Fitoquelatinas (PCs)

Una de las estrategias de protección contra el exceso de metal es la expresión de sitios de unión de alta afinidad para suprimir la unión no controlada de iones metálicos a los grupos funcionales fisiológicamente importantes (Clemens, 2008).

Recientemente, los genes de la PC en las plantas superiores y la levadura se han identificado y caracterizado, lo que permite estudios de biología molecular para desentrañar los mecanismos que subyacen a la síntesis de PC. Las fitoquelatinas (PCs) forman complejos con metales pesados como el Cd, Cu, Zn, Hg, Ag (Hirata *et al.*, 2005).

Se llaman quelantes las sustancias que tienen la propiedad de fijar los iones metálicos de un determinado complejo molecular. El término quelar es originario del griego “*Khele*” que significa garra. La quelación es un fenómeno fisicoquímico por el cual ciertos iones metálicos son secuestrados de los complejos de que forman parte sin constituir una unión química con la sustancia quelante aunque sí una combinación (Morrison y Boyd, 1998).

La causa de toxicidad a nivel químico es que los metales pesados tienen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas. Estos ligandos están presentes en gran abundancia en la célula. Cabe mencionar la gran afinidad de los metales pesados, como principales ligandos, por grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo. El efecto de estas uniones ligando-metal puede ser muy nocivo para la célula, acentuando otros fenómenos como: (1) cambio en la estructura de las mismas, (2) el desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia, y (3) la catálisis de reacciones de generación de moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) o radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo (Navarro *et al.*, 2007).

La palabra estrés proviene del griego “*stringere*” que significa restricción o fuerza que empuja deformando un cuerpo. Son las restricciones externas que limitan las tasas de crecimiento o reproducción de los organismos. El estrés se puede distinguir como biótico (causado por otros organismos) y abiótico (causado por condiciones ambientales). Dentro del estrés abiótico se encuentran factores físicos (luz solar, vientos y agua) y factores químicos (metales pesados, salinidad y pH). El estado del estrés oxidativo es la razón por la cual los metales son tóxicos en plantas, causado por la exposición a elevadas concentraciones de metal (Peña *et al.*, 2005).

El estrés se identifica como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida. Dichas condiciones ocasionan cambios en todo los niveles funcionales de los organismos. Desde un punto de vista biológico, el estrés tiene una connotación más amplia, refiriéndose a los cambios ambientales que alteran al estado fisiológico de las plantas. Las especies vegetales acumulan iones metálicos que afectan la homeostasis iónica celular. Para minimizar los efectos perjudiciales de la exposición a metales pesados y su acumulación, las plantas han evolucionado mecanismos de desintoxicación, tales mecanismos se basan principalmente en la quelación.

El estrés oxidativo es un fenómeno que debe ser estudiado aisladamente, dada su complejidad e importancia en el desarrollo de los mecanismos básicos de la célula. Como resumen de dicho fenómeno baste decir que provoca daño a distintos niveles,

destacando los siguientes aspectos: Las plantas experimentan estrés oxidativo después de la exposición a los metales pesados que conduce a daño celular. Además, las plantas acumulan iones metálicos que perturban la homeostasis iónica celular. Para reducir al mínimo los efectos perjudiciales de la exposición a metales pesados y su acumulación. Uno de los aspectos más importantes de la acumulación de metales pesados es el que se refiere al proceso de complejación. Un complejo o compuesto de coordinación es el resultado de la interacción de un átomo central, esto es, un ion metálico con orbitales de valencia vacíos que puede actuar como ácido de Lewis (aceptor de electrones), y una o varias bases de Lewis (dador de electrones) con pares de electrones libres. Estas bases se conocen como agentes complejantes o ligandos (Navarro *et al.*, 2007).

La planta utiliza este mecanismo de complejación en el interior de la célula para detoxificar (amortiguar) los metales pesados, uniendo a ellos ligandos para formar complejos. De esta manera, el metal queda inmerso en una interacción química que le mantiene en equilibrio electrónico (acomplejado), pero que no lo deja fuera del metabolismo, no se ha eliminado del citoplasma de la célula y, por ello, sigue siendo potencialmente tóxico. Como se ha mencionado anteriormente, los metales pesados muestran gran afinidad por determinados grupos funcionales como principales ligandos (grupos sulfhidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo). Los ligandos que utiliza son básicamente aminoácidos y ácidos orgánicos, y más específicamente con péptidos como las fitoquelatinas (Yang *et al.*, 2005).

Una de las formas de poder identificar estos contaminantes presentes en el aire, es mediante el uso de las briofitas. Existe un número importante de especies de musgos que se han usado para determinar la presencia de partículas contaminantes incluyendo metales pesados y se ha concluido que son efectivos indicadores de la contaminación.

Leinenweber *et al.*, (2009) estudiaron biomarcadores de exposición a metales pesados en la especie de musgo *thuidium sp*, el musgo se rocío con $CdCl_2$ durante 12 días, cuantificaron Cd por EAA, haciendo una extracción de tioles y posteriormente evaluaron la presencia de glutatión y fitoquelatinas en la especie de

musgo por la técnica cromatografía de líquidos HPLC. Los análisis los realizaron 4, 7 y 12 días y las concentraciones de glutatión fueron aumentando con el tiempo (Anexo, Tabla A3).

Esta investigación contribuye para conocer cómo afecta la contaminación por metales en el ecosistema de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca (ZMVT) mediante el uso de indicadores biológicos (musgos). Sin embargo, los conjugados generalmente son transportados en las vacuolas como se mencionó anteriormente donde se convierten a través de una acción concertada de diferentes enzimas a la respectiva conjugado de cisteína.

1.6 Cisteína

Cisteína (Cys) es un aminoácido proteinogénico con un grupo tiol, que le confiere una gran reactividad. Por oxidación da lugar a un puente disulfuro, esencial para la estructura y función de las proteínas. La cisteína es molécula precursora de numerosos metabolitos azufrados necesarios para el desarrollo de la vida. La síntesis de cisteína por las plantas se considera un proceso biológico clave. Las investigaciones en plantas han demostrado que la cisteína ejerce un papel esencial en las respuestas de las plantas a situaciones de estrés, influye en la senescencia y en la función de los cloroplastos (Devlin, 2004).

La cisteína también forma parte del glutatión, un tripéptido que actúa como antioxidante, protegiendo frente al estrés oxidativo producido por especies reactivas de oxígeno, manteniendo un ambiente reductor dentro de la célula que impide la oxidación de proteínas. Esto ocurre gracias a la oxidación del grupo tiol de la cisteína del glutatión. Es un aminoácido no esencial, lo cual significa que puede ser sintetizado por el cuerpo humano; en este caso, siempre que haya metionina suficiente. En la **figura 1.7** se muestra la estructura de la cisteína.

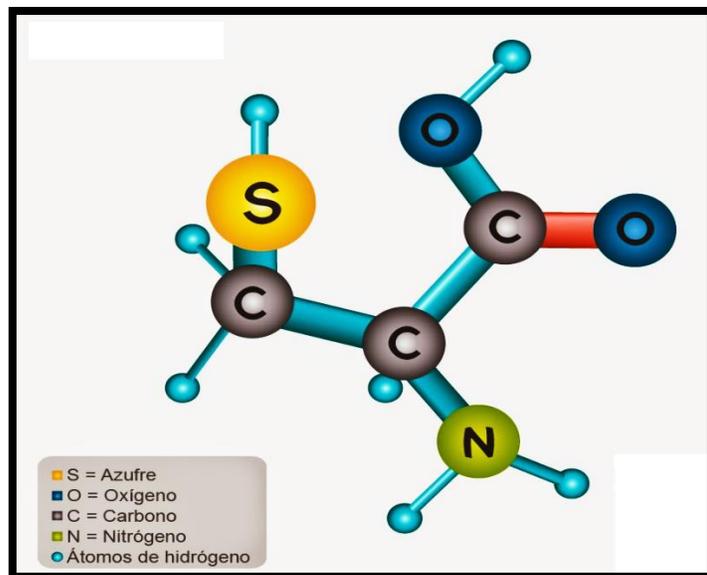


Figura 1.7 Estructura de la cisteína

La biosíntesis de Cys juega un papel clave en la fijación azufre inorgánico desde el medio ambiente y proporciona el único sulfuro para la generación de muchos compuestos. El GSH está implicado en la defensa contra las especies reactivas del oxígeno (ROS), la retención de metales pesados, la desintoxicación de xenobióticos, regulación de los procesos de desarrollo tales como la división celular y floración, además, un importante transporte y la forma de almacenamiento de azufre reducido. Por ello, es importante establecer métodos para determinar estos tioles y para evaluar su papel en plantas y otros organismos bajo estrés por metales (Xue Hai Ju *et al.*, 2011).

1.7 Voltamperometría

La electroanalítica es una rama de la química analítica que hace uso de la medición de magnitudes eléctricas para establecer la concentración de una determinada sustancia. Los métodos electroanalíticos se dividen en varias categorías dependiendo de qué aspectos de la célula son controlados y cuales se miden. Las tres principales categorías son:

- a) Potenciometría (se determina la concentración de una especie electroactiva en una disolución empleando un electrodo de referencia, un electrodo de trabajo y un potenciómetro).
- b) Coulombimetría (se determina la cantidad de materia transformada en una reacción de electrólisis midiendo la cantidad de electricidad consumida o producida).
- c) Voltamperometría (la información sobre un analito se obtiene midiendo la corriente cuando se modifica el potencial) (Villaseñor, 1995).

La Voltamperometría engloba un grupo de métodos electroanalíticos en los cuales la información sobre el analito se obtiene a partir de medidas de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, obtenidas en condiciones que favorecen la polarización de un electrodo indicador o de trabajo. Se basa en la medida de una intensidad de corriente que se desarrolla en una celda electroquímica en condiciones de polarización total de concentración; ocurre con un consumo mínimo del analito (Cases, 2001).

La Voltamperometría se desarrolló a partir de la Polarografía. La Polarografía, que todavía es una rama importante de la Voltamperometría, difiere de los otros tipos de ésta en que el electrodo de trabajo es un electrodo de gotas de mercurio. Es utilizada ampliamente para el estudio de procesos de oxidación y reducción en diversos medios, procesos de adsorción sobre superficies y mecanismos de transferencia de electrones en superficies de electrodos químicamente modificados. Las investigaciones sobre nuevos alcances, como métodos de incremento de potencial, voltamperometría de barrido de potencial, voltamperometría de corriente alterna con detección de fase (CA), métodos hidrodinámicos y voltamperometría de redisolución demuestran la utilidad de los nuevos métodos voltamperométricos (Pingarrón y Sánchez, 1999).

Las reacciones electroquímicas son las responsables de las transformaciones químicas que sufren las sustancias cuando se les somete a un proceso denominado

electrolisis, como consecuencia del paso de corriente eléctrica a través de electrodos, los conductores y los instrumentos, y del transporte de especies cargadas o no entre los electrodos a través de disoluciones electrolíticas en las que están sumergidos. Así pues, una reacción electroquímica es la transformación química que sufre una sustancia en la interfase electrodo/disolución al paso de la corriente eléctrica. Esta transformación consiste en una pérdida o ganancia de electrones, es decir en una oxidación o en una reducción (Pingarrón y Sánchez, 1999).

La voltamperometría se basa en la medición de una corriente de respuesta como una función del potencial aplicado a una celda voltamperométrica. La redisolución (SV) forma una subdivisión de la voltamperometría y constituye uno de los grupos más importantes de las técnicas de la química electroanalítica. La principal ventaja de SV son sus límites de detección bajos (10×10^{-10} a 10×10^{-12} mol/l), que son el resultado de una etapa de preconcentración en el que el analito se acumula sobre o en el electrodo de trabajo, por lo que la respuesta de corriente observada es proporcional a la concentración de analito en la muestra. Además de la excelente sensibilidad de SV, este grupo de técnicas también ofrece capacidades de multielementos y especiación, es adecuado para mediciones in situ, y utiliza la instrumentación de bajo costo (Achterberg *et al.*, 2005). Voltamperometría de redisolución anódica (ASV) y voltamperometría de redisolución catódica (CSV) son las dos versiones de SV.

En ASV, se lleva a cabo una etapa de preconcentración catódica que es seguida por una exploración de potencial hacia potenciales más positivos y la corriente anódica (oxidativo) es determinada. Mientras que en CSV, se lleva a cabo una etapa de preconcentración anódica, que es seguida por una exploración de potencial hacia potenciales más negativos y la corriente catódica (reductora) es determinada. En este trabajo se utiliza la técnica de la CSV en los análisis de Cys y PCs.

1.8 Voltamperometría de redisolución catódica (CSV)

La CSV es un grupo de técnicas electroquímicas para la cuantificación de trazas y ultratrazas en analitos de muestras complejas ambientales, clínicos e industriales. La excelente sensibilidad resultante de la etapa de preconcentración permite la determinación de analitos en muestras muy diluidas. El proceso de preconcentración electroquímica en CSV puede consistir de precipitación anódica de una sal insoluble (CSV convencional), o la adsorción de una superficie activa compleja por un metal (por adsorción CSV). La preconcentración requiere poco o ningún reactivo añadido, minimizando así el riesgo de contaminación de la muestra (Zoski, 2009).

La instrumentación básica para CSV consiste en un potenciostato, una celda de tres electrodos (electrodo de trabajo, electrodo de referencia, y contra-electrodo (o electrodo auxiliar)), y un ordenador para mediciones automatizadas y adquisición de datos. Los potenciostatos modernos son simples, capaces de realizar una amplia gama de formas de exploración. El electrodo de referencia Ag / AgCl / KCl se utiliza comúnmente y el contra-electrodo puede ser un alambre de platino o una varilla de carbono.

En CSV, es normal emplear un electrodo de trabajo estacionario y el electrodo más popular es el electrodo de gota suspendida de mercurio (HMDE). La ventaja de un HMDE es su fiabilidad. Con la formación de cada nueva caída, se produce una nueva superficie del electrodo. Las gotas generadas por HMDEs modernas son muy pequeñas (por ejemplo, soporte de 663 VA de Metrohm (Suiza) produce gotas con un área de 0.52mm^2), y el almacenamiento y reciclaje del mercurio utilizado segura asegurarán los riesgos ambientales y sanitarios mínimos Achterberg *et al.*, 2005). La solución (típicamente 5-10 ml) en la celda voltamperométrica se agita suavemente con una varilla de politetrafluoroetileno o de combustión durante la etapa de preconcentración. La agitación ayuda a la transferencia de analito a la superficie HMDE y disminuye la capa de difusión de la gota de mercurio. La velocidad de agitación debe ser reproducible y controlada. Diversas formas de onda voltamperométricas pueden ser empleadas durante la etapa de separación, incluyendo barrido lineal, pulso diferencial, onda cuadrada y escalera.

1.9 Voltamperometría de barrido lineal (LSV)

El término voltamperometría de barrido lineal (LSV) se utiliza para describir una técnica analítica que implica un electrodo sólido y una velocidad de exploración rápida. Es útil para la determinación de compuestos orgánicos oxidables con un electrodo de carbono vítreo. Un voltamperograma de barrido lineal es "la mitad" de un voltamperograma cíclico.

La voltamperometría cíclica (CV) es una técnica electroquímica que se utiliza para examinar la cinética de los procesos de electrodo. La CV no se utiliza para determinaciones analíticas. La altura del pico de un voltamperograma de barrido lineal es proporcional a la concentración. La sensibilidad analítica del barrido lineal es de aproximadamente 1 ppm. El pico de corriente es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Princeton, 2014).

En la técnica voltamperometría de barrido lineal (LSV), el potencial aplicado se varía linealmente con el tiempo desde un potencia inicial, E_i hasta un potencial final, E_f a una velocidad constante v ($V s^{-1}$). En esta técnica, generalmente se comienza el barrido de potencial a un valor de E_i al cual no hay electrólisis, es decir, donde sólo se detecta la corriente residual (realizándose el barrido en la dirección apropiada (barrido positivo o negativo) para obtener la respuesta electroanalítica (oxidación o reducción de la especie electroactiva) deseada (Pingarrón y Sánchez, 1999).

1.10 Factor de enriquecimiento (FE)

El factor de enriquecimiento (FE) ha sido utilizado en estudios de ecotoxicología y química ambiental como marco de referencia. Considera los elementos más abundantes de la corteza terrestre tales como Al, Si y Fe. El FE informa la dinámica de un contaminante inorgánico o elemento químico de la corteza terrestre que puede ser transportado por la lluvia, viento o por fuentes antropogénicas, el hierro (Fe) fue seleccionado como elemento conservador. Mulgrew y Williams (2000) establecen una escala para determinar cuál es el origen del elemento X en estudio; así, la **tabla 1.1** presenta las características de cada intervalo del FE.

Tabla 1.1 Intervalo de Factor de enriquecimiento (FE)

Factor de enriquecimiento	Nivel de enriquecimiento
≤ 2	Conservativo
3-5	Poco enriquecido
6-9	Moderadamente enriquecido
≥ 10	Alto enriquecimiento

1.11 Factor de Bioacumulación (BAF)

El BAF representa la concentración de contaminantes en las plantas en comparación con la concentración de medio ambiente (en el suelo) (Scragg, 2005).

Para una planta para ser herramienta eficaz, el BAF tiene que ser mayor que 1. El BAF para cada metal se calculó mediante la siguiente expresión:

1.12 Determinación de Fitoquelatinas por el método adición de estándar

El método de adición de estándar consiste en añadir cantidades conocidas de analito al problema, cuyo contenido de analito se quiere determinar. A partir del aumento de señal se deduce cuánto analito había en la muestra problema. La adición de patrón es especialmente apropiada cuando la composición de la muestra es desconocida o compleja.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En la **figura 2.1**, se muestra el diagrama general de las principales etapas desarrolladas en la presente investigación.

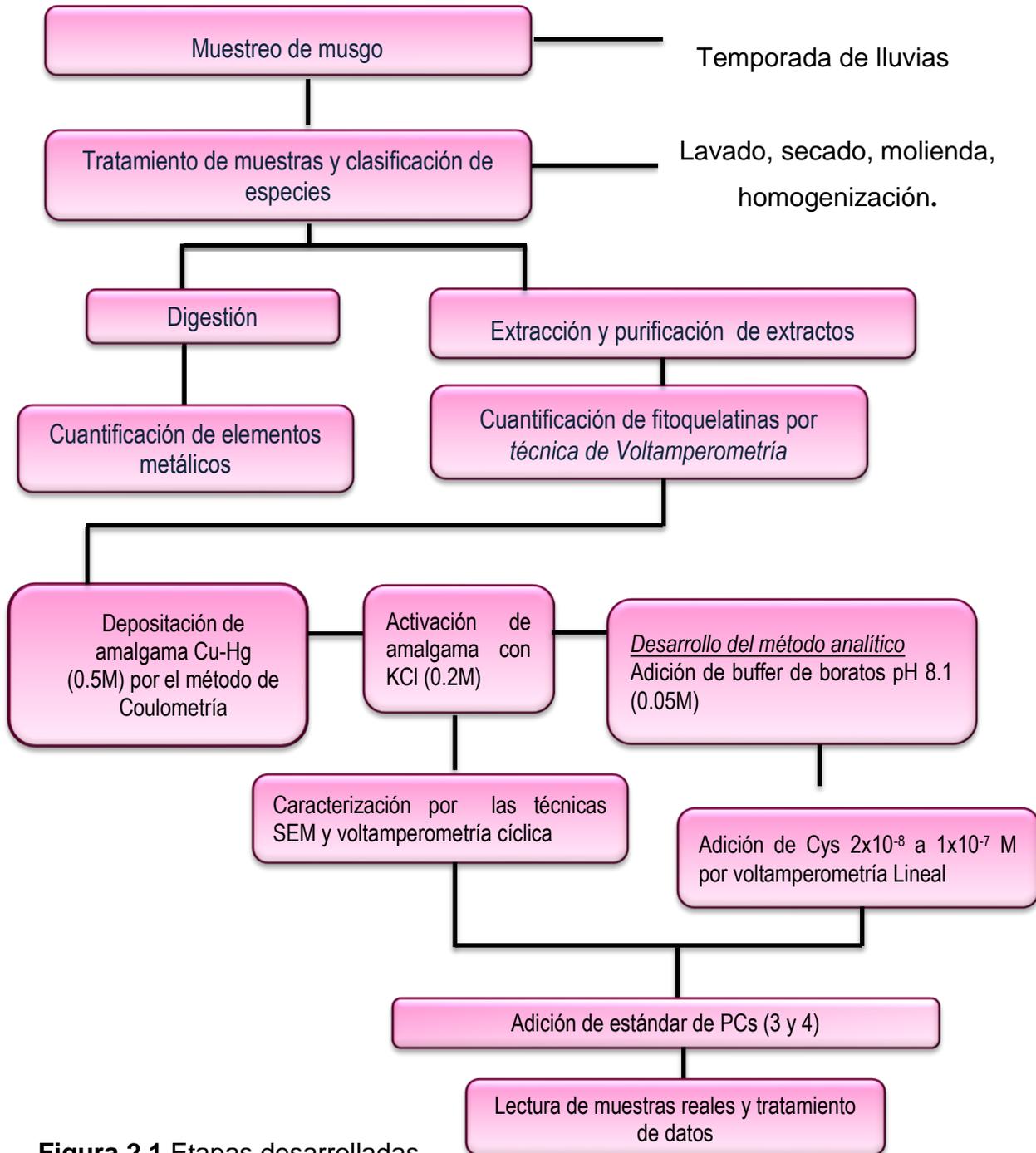


Figura 2.1 Etapas desarrolladas

2.1 Visita preliminar y Muestreo del musgo

Se realizó la visita preliminar, con el fin de localizar los sitios más adecuados en los cuales se realizará el muestreo en época de lluvias.

Los criterios que se consideraron para establecer el número y los sitios fueron:

- a) Existencia de musgo, principalmente las especies *Fabronia ciliaris*, *Leskea angustata* y *Syntrichia amphidiacea*. Este criterio fue con base a los resultados reportados por Gil (2012), Zarazúa *et al.*, (2013) y Zepeda *et al.*, (2013), ya que estas especies son las más representativas de la ZMVT.
- b) Sitios con mayor concentración de metales con base a los resultados previos reportados por Gil (2012).

Por lo anteriormente mencionado, los sitios seleccionados fueron áreas urbanas (localizadas en la Zona Metropolitana del Valle de Toluca): Parque Fidel Negrete, Toluca, Parque Alameda, Toluca, Parque Reforma, Toluca, Parque Hípico, Colonia Hípico, Metepec, Parque La Pilita, Metepec, Ex-Rancho Santín Toluca, Camellón Tollocan, y una Área Natural Protegida: Parque Ejidal Cacalomacán, Toluca. En la **figura 2.2** se muestra un mapa de los sitios de muestreo en la época de lluvias.

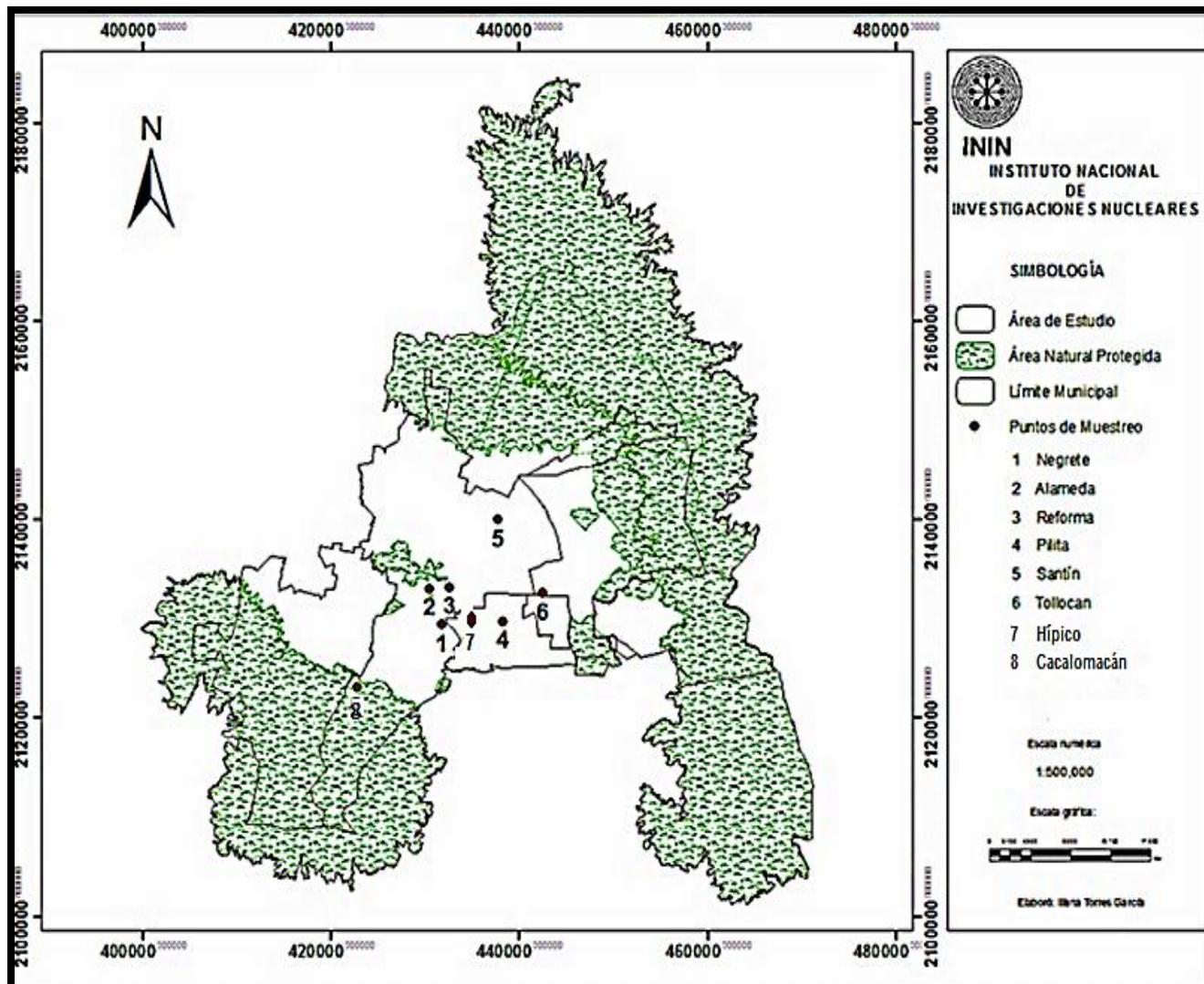


Figura 2.2. Mapa sitios de muestreo (ININ, 2012).

En la **tabla 2.1**, se muestra la localización de los sitios con sus coordenadas y tipo de área muestreada.

Tabla 2.1 Ubicación de las zonas de muestreo (noviembre 2013).

No.	Tipo	Sitios Muestreo	Identificación	Coordenadas UTM		Altitud
				Latitud Norte	Longitud Oeste	msnm
1	ZONAS URBANAS	P. Fidel Negrete, Colonia Azteca, Toluca	Fidel Negrete	2129427	431763	2685
2		P. Alameda, Colonia la Merced, Toluca	Alameda	2133062	430448	2662
3		P. Reforma, Colonia Ferrocarriles Nacionales, Toluca	Reforma	2133176	432588	2644
4		P. Hípico, Colonia Hípico, Metepec	Hípico	2130170	433610	2668
5		P. La Pilita, Colonia San José la Pila, Metepec	La Pilita	2129735	438249	2623
6		Ex-Rancho Santín Toluca	Santín	2139978	437812	2596
7		(Camellón Tollocan) Colonia Emiliano Zapata, Lerma	Tollocan	2132623	442543	2589
8	AREA NATURAL PROTEGIDA	P. Ejidal Cacalomacán, Toluca	Cacalomacán	2123038	422770	3100

2.1.1 Muestreo de musgo

Se realizó el muestreo de musgos de la especie *Leskea angustata*, *Fabronia ciliaris* y *Syntrichia amphidiacea*, así como de los suelos tomados a 1m de distancia de donde se tomaron las muestras de musgo. Para el muestreo de las especies de musgos en todos los sitios seleccionados se realizaron las siguientes actividades.

a) Identificación del árbol.- Se seleccionaron 10 árboles de las especies más abundantes en cada sitio **figura 2.3 y 2.4**.



Figura 2.3 Musgo en corteza



Figura 2.4 Identificación de árbol

b) Recolección y almacenamiento.- Ya seleccionados los árboles en cada sitio, la recolección de los musgos epifitos se realizó entre 1- 1.5 m de altura del árbol, tomándose la muestra manualmente con espátulas metálicas de acero inoxidable) para poder retirar el musgo del árbol sin dañarlos (**figura 2.5 a) y 2.5 b)**). Las muestras se depositaron en bolsas de polietileno y se etiquetaron con tipo de especie, fecha y sitio de recolección. El suelo recolectado se almacenó de igual manera.



Figura. 2.5 a) Muestreo de musgos. Sitio Camellón Tollocan

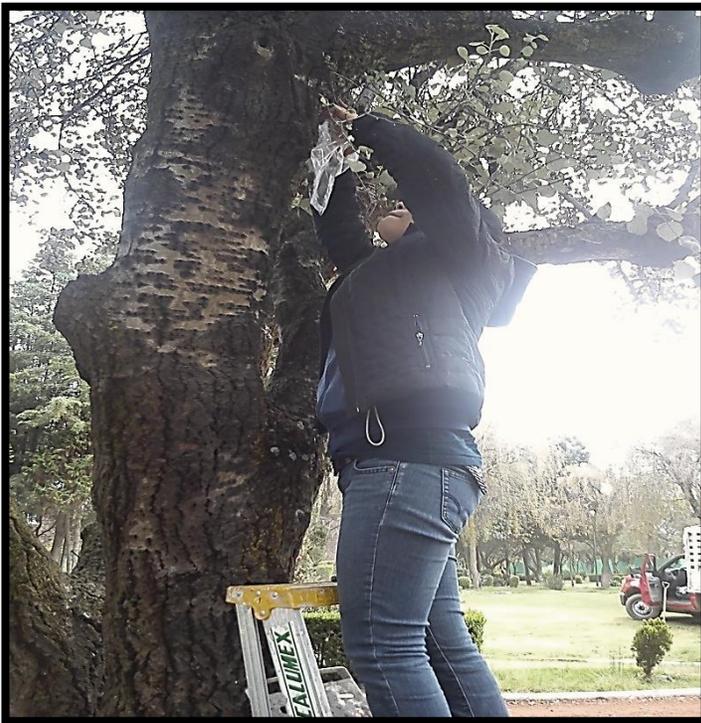


Figura. 2.5 b) Muestreo de musgos. Sitio Parque Hípico

2.2 Tratamiento de muestras y clasificación de especies

Las muestras se llevaron al Laboratorio de Investigación en Ingeniería Ambiental (LIIA) en el Instituto Tecnológico de Toluca, en donde se homogenizaron por el método el cuarteo como se presenta en la **figura 2.6**

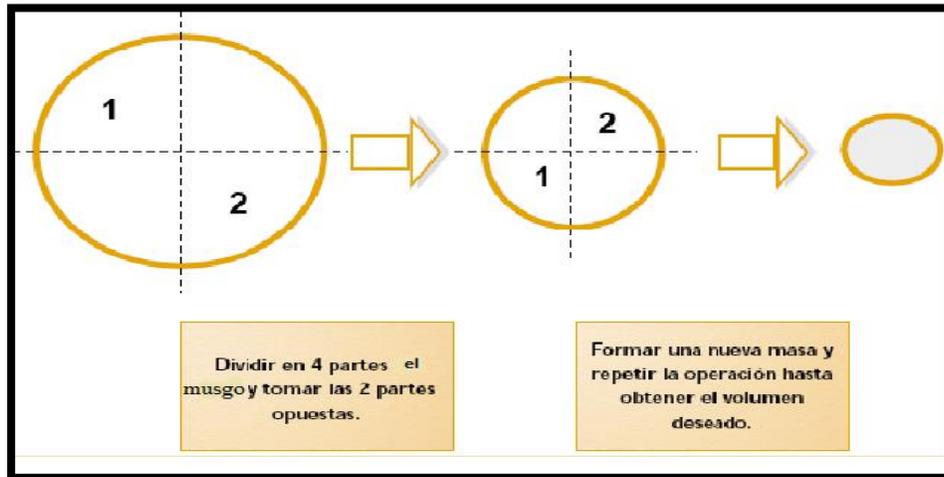


Figura 2.6 Método de cuarteo (Gil, 2012)

Posteriormente se realizó un lavado minucioso de musgo con agua desionizada (D.I) auxiliándose de pinzas, espátulas y navajas para retirar y separar la corteza y tierra sobrante **figura 2.7 a) y b)** Posteriormente, el musgo se extendió en charolas para eliminar la humedad (a temperatura ambiente, de uno a tres días). La limpieza se realizó de igual manera con todas las muestras de cada sitio de muestreo.



Figura. 2.7 a) Limpieza de musgo



Figura. 2.7 b) Muestra limpia

Después del secado se continuó con la molienda en un mortero de ágata. Finalmente, las muestras molidas se almacenaron en frascos de vidrio y se etiquetaron con tipo de especie, fecha y sitio de recolección para su análisis (**figura 2.8**).



Figura 2.8 Molienda de musgo.

Para el secado de las muestras de suelos, se extendieron en charolas de plástico y se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente, el suelo fue molido de la misma manera que el musgo, en mortero de ágata. Las muestras molidas se colocaron en bolsas con cierre hermético hasta su análisis (**figura 2.9**).



Figura 2.9 Secado de muestras de suelo.

La clasificación de las especies de las muestras de musgo, se realizó en la Facultad de Ciencias de la UAEMéx. Las muestras se analizaron en un microscopio *Leica* CMT con lente de 40x/0.65, realizándose cortes transversales a la planta para identificarlo por medio de claves taxonómicas, de acuerdo a la metodología reportada por Zepeda *et al.*, (2013).

2.3 Digestión acida de muestras

La digestión de musgos y suelos se realizaron por separado. Dada la importancia de la elección de los ácidos es importante mencionar que el HNO₃ (grado Instra) y el HCl, son de los más utilizados para digerir materia orgánica, y el HF para eliminar silicatos.

Para la digestión de musgos, se pesaron 0.3 g de cada una de las muestras molidas de musgos. Las muestras pesadas se depositaron en cada uno de los vasos, adicionándose 2mL de agua UP, 5mL HNO₃ y 1mL HF. El proceso de digestión se efectuó en dos etapas (usando el Método “Musgo OMNI – XP 1500”) y se realizó una digestión acelerada en un horno de microondas (*CEM*, modelo *Mars X 907600* serie XM3047) utilizando un set de vasos de teflón (*OMNI PLUS XP-1500*). En este equipo se procesaron 12 muestras simultáneamente. El método consta de dos etapas:

Etapa 1.- Se alcanzó una temperatura de 187°C y una presión de 240 psi, durante un tiempo total de 30min. 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 H₃BO₃ al 4%, la cual se adicionó a cada vaso.

El set de vasos se colocaron 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.

Para la digestión de suelos, se pesaron 0.3g de cada muestra y se adicionaron los siguientes reactivos HNO₃ (grado Instra), HF (Ultrex) y HCl. El proceso de digestión se efectuó en dos etapas (usando el Método “Suelo OMNI-XP 1500”), la digestión acelerada en un horno de microondas (CEM, modelo Mars X 907600 serie XM3047) utilizando un set de vasos de teflón (OMNI PLUS XP-1500) incluyendo las 2 etapas anteriores. Las muestras digeridas se decantaron a envases de polietileno y se mantuvieron en refrigeración 4°C hasta su análisis.

Como muestras control, se utilizaron los estándares certificados IAEA-336 Lichen (para los musgos) y Soil 5 (para suelos).

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 mostradas en el **tabla 2.2**.

Tabla 2.2 Longitudes de onda en el análisis

Elemento	Longitud de onda (nm)
Ni	232.0
Cd	228.7
Zn	213.9
Pb	216.9

2.4 Extracción y purificación de tioles

La extracción de tioles no proteicos se realizó siguiendo el procedimiento de (Leinenweber *et al.* 2009). Se pesaron 40 mg de musgo seco y se prepararon 25 mL de una solución la cual era formada por ácido dietilen triamino penta acético (DTPA) 6.3 mM y 0.1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA). Para 25ml de esta solución se pesaron 0.0123g de DPTA, y se agregaron 25 μ L de TFA. La solución se refrigeró a -4°C.

Posteriormente se realizó una molienda de musgos con la solución fría en un mortero de porcelana libre de metales **figura 2.10**. La suspensión homogeneizada se centrifugó (Centrifuga Universal 32R, HETTICH) a 10 000 rpm durante 15 min.



Figura 2.10 Molienda de musgos con la solución fría en un mortero de porcelana

El sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 micras **figura 2.11**, para finalmente volver a filtrar en la micro centrífuga Eppendorf 5415C Centrifuge a 10000rpm durante 10 min en tubos eppendorf Millipore Microconcon -yM-30 filtro 0.24 micras como se muestra en la **figura 2.12**. La filtración se realizó en laboratorio de la Facultad de Química (UAEMéx).

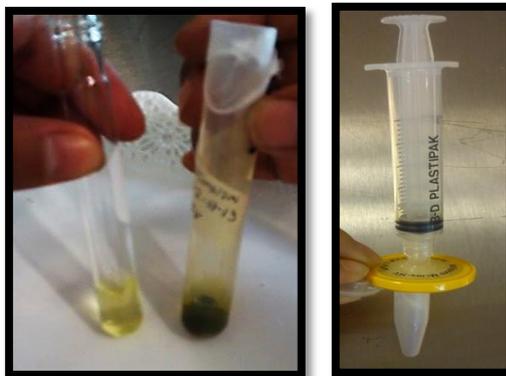


Figura 2.11 Filtración con un filtro de 0.45 micras



Figura 2.12 Muestras filtradas en filtro 0.24 micras

2.5 Técnica voltamperométrica para cuantificación de Fitoquelatinas (PCs)

Para la implementación de la técnica en este trabajo se manejaron técnicas voltamperométricas como: Coulometría, Voltamperometría cíclica y Redisolución catódica, utilizando el potencióstato Potenciostat Galvanostat AUTOLAB los análisis se realizaron en el laboratorio de Ambiental del Conjunto Centro de Investigación en Química Sustentable (CCIQS), Universidad Autónoma del Estado de México-Universidad Nacional Autónoma de México (UAEMéx – UNAM).

Es importante mencionar que para la implementación de la técnica se tomó la decisión de iniciar con cisteína y realizar pruebas ya que el grupo tiol tiene gran afinidad por los metales pesados y las fitoquelatinas son ricas en cisteína y es en donde se forma el complejo con los metales Cd, Zn, Pb y Ni.

Para el análisis de cisteína se realizó de acuerdo a los resultados reportados por (Yosypchuk *et al.*, 2002), quien utilizó un nuevo tipo de electrodo de amalgama sólida de cobre CuSAE sobre la base de la formación de complejo cuproso en un buffer de boratos pH8.1.

Se utilizó un electrodo de referencia de Ag/AgCl en una solución saturada de KCl, la solución sirve como contacto iónico, el cual fue usado en ambas técnicas voltamperométricas, como electrodo de trabajo se utilizó un electrodo de carbón vítreo, el contra-electrodo o electrodo auxiliar fue de grafito (**Figura. 2.13** electrodos).

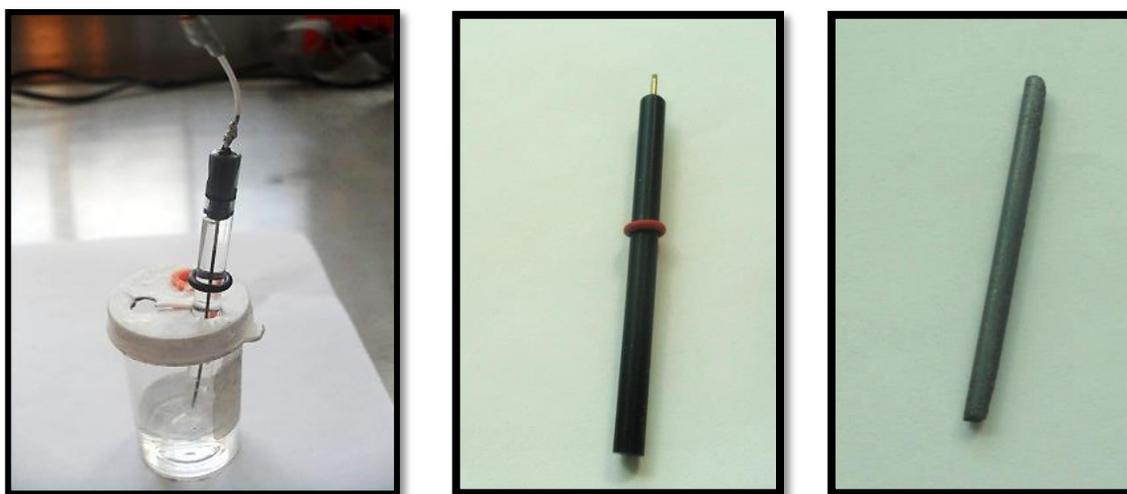


Figura 2.13 a) electrodo de referencia, b) electrodo de trabajo, c) electrodo auxiliar. A continuación se explicara la implementación de la técnica para la determinación de Cys por voltamperometría, como se mencionó se realizaron pruebas para poder conseguir las condiciones óptimas y así poder analizar el estándar de PCs con las muestras reales.

2.5.1 Deposición de amalgama Cu- Hg

Para la deposición de la amalgama se parte de una solución de sulfato de cobre (CuSO_4) 0.1M (98%, fermont) y cloruro de mercurio (HgCl_2) 0.1M (99,5%, fermont). Con la finalidad de formar otra solución de Cu-Hg 0.05M, y como electrolito soporte se utiliza ácido perclórico HClO_4 1M (70%, fermont), y empleando la técnica de Coulometría, En la **tabla 2.3** se muestran las condiciones para deposición de amalgama, donde se aplica un potencial durante un tiempo determinado. Se realizaron diferentes pruebas a diferentes tiempos de 300 s y 120s y potencial (E) de -0.8 Volts, se depositó la amalgama sobre la superficie del electrodo de trabajo de carbón vítreo (**figura 2.14**).

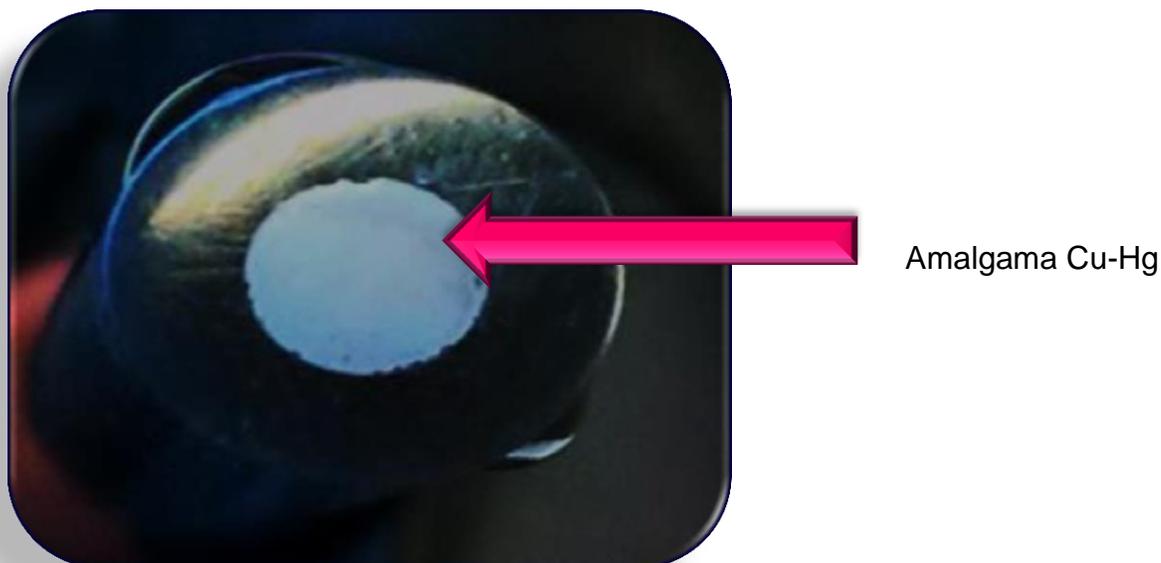


Figura 2.14 Electrodo de carbón vítreo con amalgama Cu-Hg.

Tabla 2.3 Condiciones de la técnica de Coulometría

Pretratamiento	
Primeras condiciones de potencial (V).....	0
Duración	0
Tiempo de equilibrio (s).....	0
Medición	
Intervalo de tiempo (>0.1s).....	10
Potencial inicial (V).....	0
Número de pasos (1-10).....	1

Nivel	Potencial/V	Duración /s
1	-0.8	300s

2.5.2 Activación de amalgama Cu-Hg

La superficie se activó electroquímicamente con una solución de cloruro de potasio (KCl) 0,02 M a un potencial de -1600mV y -800mV por 300s y 120s respectivamente, esto para poder tener fija la amalgama, posteriormente se caracterizó la amalgama utilizando la técnica de Voltamperometría Cíclica a una intensidad de 1mA, velocidad de barrido de 100mV/s, intervalo de trabajo, -1500 a 1500mV (**tabla 2.4**) y Espectroscopia Electrónica de Barrido (SEM) para obtener las características de la amalgama y asegurar la presencia de Cu y Hg.

Para realizar la curva de calibración de Cisteína (Cys) se utilizó (L-cisteína, Sigma Aldrich 98%) y se adicionaron diferentes concentraciones de cisteína por la técnica de voltamperometría lineal (lineal sweep) con las condiciones que se presentan en la **tabla 2.5** a una intensidad de 1mA, velocidad de barrido de 20mV/s, 1000mV, intervalo de trabajo: -280 a -2200mV. Se realizaron varias pruebas y las tres más representativas fueron a partir de concentraciones de 1×10^{-6} a 1×10^{-9} M, 2×10^{-9} a 1×10^{-7} y 2×10^{-8} tomando 10 puntos en cada prueba utilizando como electrolito soporte un buffer de boratos pH 8.1, 0.05M, el cual se preparó a partir de 10ml de ácido bórico H_3BO_3 ajustando el pH con NaOH 0.05M.

Tabla 2.4 Condiciones de la técnica Voltamperometría cíclica

Número de puntos de datos.....	6000
Potencial inicial (mV).....	0
Potencial 1 (mV).....	-1500
Potencial 2 (mV):.....	1500
Numero de segmentos :.....	3
Velocidad de barrido (mV/s).....	100
Corriente (mA).....	1

Tabla 2.5 Condiciones de la técnica lineal

Pretratamiento	
Primeras condiciones de potencial (V).....	-0.34
Duración.....	120s
Tiempo de equilibrio (s).....	5s
Medición	
Numera de corridas.....	1
Potencial (V).....	-1
Potencial	
Potencial inicial (V).....	-0.28
Potencial final (V).....	-2.0
Velocidad de barrido (V/s).....	0.100048

Al tener resultados favorables para la curva de Cys se probó corriendo 2 muestras reales para localizar el pico del complejo con Cu (I) RS-Cu, y así poder correr el estándar de PCs, por lo que se decidió correr los estándares PC2, PC3, PC4 y ver en las muestras cuál de ellas estaba presente en las briofitas. Las PCs se corrieron a las condiciones óptimas de la Cys.

2.6 Factor de enriquecimiento (FE)

Para la determinación del factor de enriquecimiento (FE) se utilizó la siguiente fórmula para su determinación (Mulgrew y Williams, 2000).

$$FE = \frac{(M/Fe) \text{ valor de musgo}}{(M/Fe) \text{ valores de suelo}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

FE: Factor de enriquecimiento

M: concentración del metal a analizar

Fe: Hierro (Fe) metal de referencia

2.7 Factor de Bioacumulación (BAF)

El BAF representa la concentración de contaminantes en las plantas en comparación con la concentración de medio ambiente (en el suelo) (Scragg, 2005).

Para una planta para ser herramienta eficaz, la condición (BAF > 1). Se calculó el factor de bioacumulación mediante la siguiente expresión:

$$BAF = \frac{C_{planta}}{C_{suelo}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

BAF: Factor de bioacumulación

C_{planta}: concentración de metales en la planta

C_{suelo}: concentración de metales en suelo

2.8 Determinación de Fitoquelatinas por el método adición de estándar

La adición de patrón o estándar se utilizó para la determinación de fitoquelatinas (PCs). Utilizando la siguiente expresión.

Ecuación de la adición de patrón:

$$\frac{X_i}{S_f + X_f} = \frac{I_x}{I_{S+X}} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 3}$$

[X]_i = Concentración del analito en la disolución inicial

[X]_f = Concentración del analito en la disolución final

[S]_f = Concentración de la solución estándar en la solución final

I_x = señal de la disolución inicial

I_{s+x} = señal de la disolución fin

2.9 Tratamiento estadístico de resultados

Las pruebas estadísticas se ejecutaron con el software Statgraphics plus 5. El método de contraste múltiplo de rango muestra las diferencias estadísticas significativas de cada grupo a analizar, a un nivel de confianza del 95%.

En el tratamiento estadístico los factores a considerar fueron: Especies predominantes de musgo y puntos de muestreo. Se realizó una correlación múltiple con los resultados obtenidos con metales y fitoquelatina PC4, para saber si estadísticamente se tenía una relación entre las 2 variables

3 RESULTADOS.

En esta sección se muestran los resultados obtenidos a partir de los análisis de EAA y voltamperometría, incluyendo las especies encontradas en las zonas urbanas de la ZMVT.

3.1 Especies en la ZMVT

Las muestras se clasificaron las especies de acuerdo a lo reportado por Zepeda *et., al* (2013), Se observaron por el microscopio. En la **tabla 3.1** se presentan los sitios con las especies predominantes y con las cuales se trabajaron en el presente proyecto.

Tabla 3.1 Especies encontradas en la ZMVT.

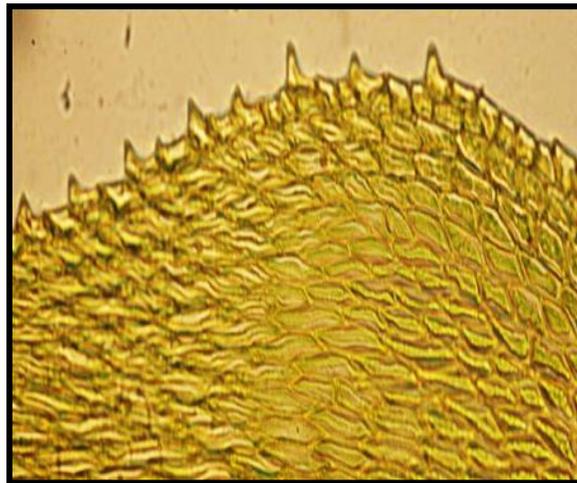
No. de muestra	Sitio	Especie de musgo
1	Cacalomacán	<i>Leskea angustata</i>
2	Tollocan a	<i>Fabronia ciliaris</i>
3	Tollocan b	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
4	Hípico a	<i>Fabronia ciliaris</i>
5	Hípico b	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
6	Santín a	<i>Fabronia ciliaris</i>
7	Santín b	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
8	Reforma a	<i>Fabronia ciliaris</i>
9	Reforma b	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
10	La Pilita	<i>Fabronia ciliaris</i>
11	Alameda	<i>Leskea angustata</i>
12	Fidel Negrete a	<i>Leskea angustata</i>
13	Fidel Negrete b	<i>Syntrichia amphidiacea</i>

* a y b----- diferentes especies

Las micrografías resultantes se compararon con las siguientes micrografías para asegurarnos que son las especies correctas. En la figura 3.1 a) y b) se presenta la especie *Fabronia ciliaris*, **figura 3.2 a) y b)** especie *Syntrichia amphidiacea*.

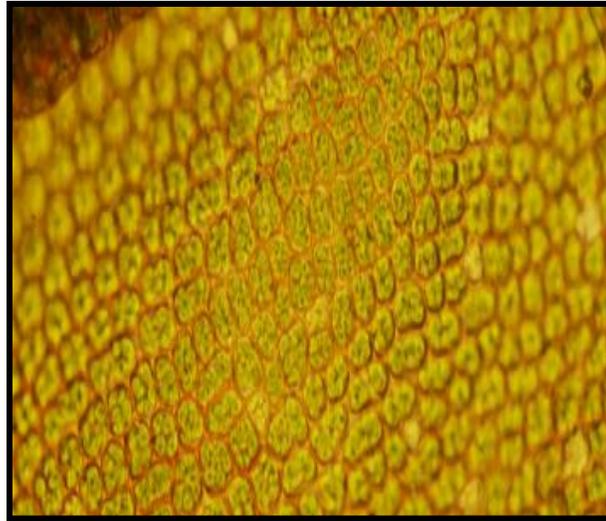


a)

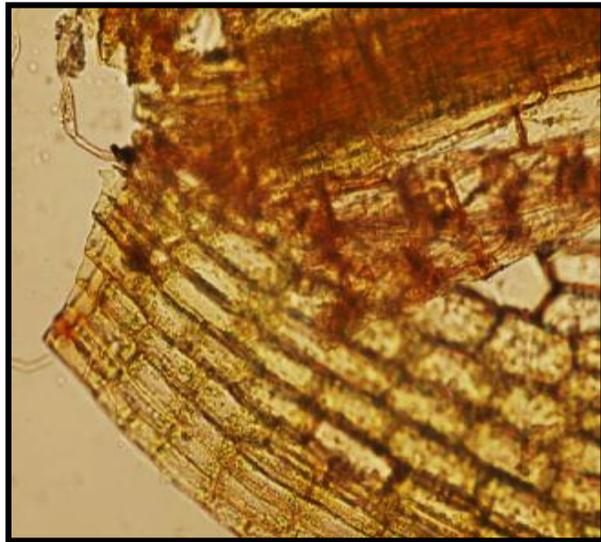


b)

Figura 3.1 Micrografías por Microscopio Óptico de *Fabronia ciliaris*, a) Micrografía de las células apicales a 40x, b) Micrografía de las células del borde a 40x. (Realizadas por Díaz García, 2012).



a)



b)

Figura 3.2 Micrografías por Microscopio Óptico de *Syntrichia amphidiacea*; a) Micrografía de células medias a 40x, b) Micrografía de las células alares de la base a 40x. (Realizadas por Díaz García, 2012).



Figura 3.3 Micrografías por Microscopio Óptico de *Leskea angustata*; a) Micrografía de células medias (Realizadas por Díaz García, 2012).

De acuerdo a las estas micrografías anteriores, se corroboró que las especies recolectadas fueron *Fabronia ciliaris*, *Leskea angustata* y *Syntrichia amphidiacea*.

3.2 Metales pesados en briofitas y suelo de la ZMVT

Los resultados del análisis mediante EAA se muestran en las **tablas 3.1 y 3.2**. Las tablas muestran las concentraciones de los estándares certificados utilizados: LICHEN IAEA-336 y Soil 5, así como de las muestras de musgo y suelo.

Tabla 3.2 Resultados del análisis del material de referencia Lichen IAEA-336

	Metal	Concentración de referencia (mg/kg)	Concentración leída (mg/kg)	% de recuperación
LICHEN IAEA-336	Ni	-	19.21	-
	Cu	3.6 ± 1.0	0.63	-
	Cd	0.117 ± 0.03	0.12	102.56
	Zn	30.4 ± 6.8	26.99	88.78
	Pb	4.9 ± 0.6	4.0	81.66

Tabla 3.3 Concentraciones de referencia y analizadas para Std Soil-5.

	Metal	Concentración de referencia (mg/kg)	Concentración leída (mg/kg)	% de recuperación
SOIL-5	Zn	368 ± 8.2	498.77 ± 0.10	135
	Pb	129 ± 2.6	158.82 ± 0.30	123
	Cd	1.5	0.77 ± 2.60	51.3
	Ni	1.3	6.32 ± 1.20	-
	Cu	77.1 ± 4.7	90.24 ± 0.30	-

A continuación en la **tabla 3.4** se presentan los análisis de Cd, Cu, Ni, Zn y Pb para la especie *Leskea angustata* con su respectiva gráfica, para los sitios en donde se encontró dicha especie Alameda, Cacalomacán y Parque Fidel Negrete.

Tabla 3.4 Concentraciones de metales para la especie *Leskea angustata*.

Sitio	Especie	Cd	Cu	Ni (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Pb (mg/kg)
Alameda	<i>Leskea angustata</i>	<L.D	<L.D	7.74 ± 2.50	202.42 ± 0.5	72.21 ± 1.30
Cacalomacán		<L.D	<L.D	1.85 ± 5.50	45.62 ± 0.10	<L.D
F. Negrete		<L.D	<L.D	6.29 ± 2.30	75.52 ± 0.10	35.30 ± 1.60

L.D = Límite de Detección.

Cd =0.10 mg/L Cu=0.15mg/L Ni=0.20mg/L Zn= 0.10 mg/L Pb=0.50mg/L

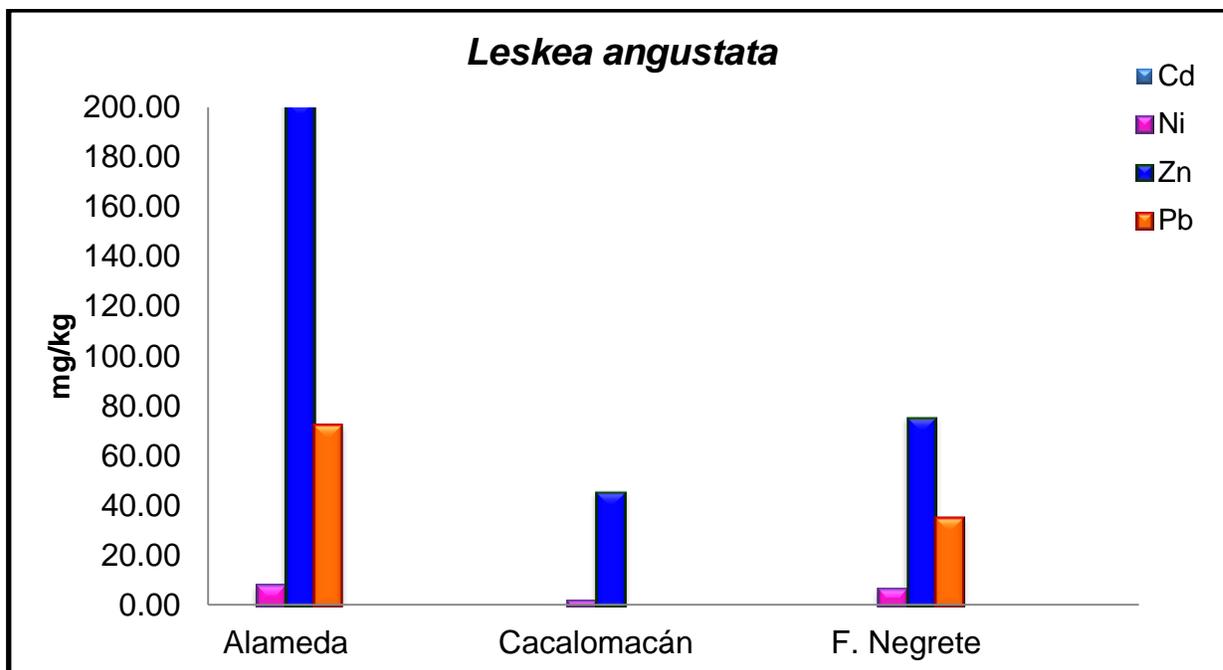


Figura 3.4 Concentración de metales para la especie *Leskea angustata*.

Las concentraciones de los metales analizados para la especie *Leskea angustata*, tuvo el siguiente orden:

$$\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Ni} > \text{Cd}$$

Y de acuerdo a los sitios, el orden fue:

$$\text{P. Alameda} > \text{P. Fidel Negrete} > \text{Cacalomacán}$$

La Alameda es considerada una zona de alto tráfico vehicular al igual que el sitio Fidel Negrete y Cacalomacán es un área natural protegida, lo que explica las diferencias encontradas en concentración de metales pesados en los sitios.

De acuerdo con Wannaz *et al.*, (2006) la presencia de algunos metales pesados tales como Ni, Cd, Fe, Zn, Pb, Hg y Cr son indicadores de contaminación antropogénica, característicamente con el tráfico de vehículos y de las emisiones. Por ello se considera que la presencia de Zn, Pb, Ni y Cd en altas concentraciones en los sitios P. Alameda, P. Fidel Negrete y Cacalomacán, están relacionados con la contaminación antropogénica.

A continuación se presentan los análisis de Cd, Cu, Ni, Zn y Pb para la especie *Syntrichia amphidiacea* con su respectiva gráfica, para los sitios Reforma, Hípico, F. Negrete, Tollocan, Santín (Tabla 3.5 y Figura 3.5).

Tabla 3.5 Concentraciones de metales para la especie *Syntrichia amphidiacea*.

Sitio	Especie	Cd mg/kg)	Cu mg/kg)	Ni (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Pb (mg/kg)
Reforma	<i>Syntrichia amphidiacea</i>	<L.D	40.48 ± 0.5	20.46 ± 1.90	480.60 ± 0.40	182.06 ± 0.60
Hípico		<L.D	<L.D	8.24 ± 1.60	269.05 ± 0.20	41.32 ± 1.40
Negrete		<L.D	22.22 ± 0.60	9.41 ± 0.70	115.70 ± 0.10	52.58 ± 0.80
Tollocan		1.13 ± 2.10	58.44 ± 0.50	16.48 ± 1.20	431.51 ± 0.40	105.55 ± 0.50
Santín		4.78 ± 0.60	<L.D	7.09 ± 2.30	232.21 ± 0.30	21.46 ± 2.10

L.D = Límite de Detección.

Cd=0.10 mg/L Cu=0.15mg/L Ni=0.20mg/L Zn= 0.10 mg/L Pb=0.50mg/L

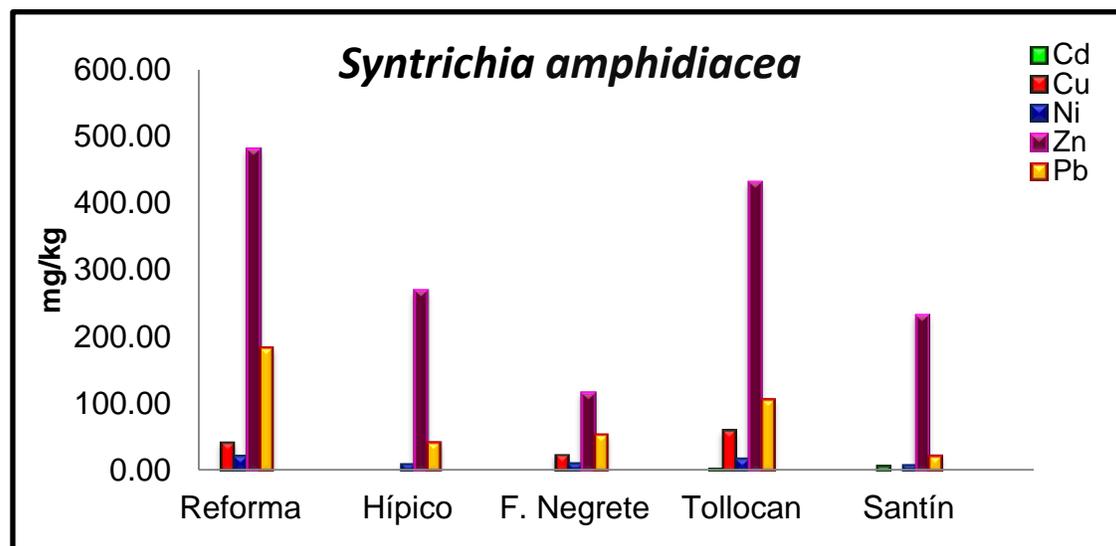


Figura 3.5 Concentración de metales para la especie *Syntrichia amphidiacea*.

La concentración de los metales analizados para la especie *Syntrichia amphidiacea*, tuvo el siguiente orden:

$$\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cd}$$

Y de acuerdo a los sitios, el orden fue:

$$\text{P. Reforma} > \text{Tollocan} > \text{Hípico} > \text{Santín} > \text{P. F. Negrete}$$

P. Reforma, Fidel Negrete, Hípico, Santín y Tollocan son considerados como sitios de alto tráfico vehicular lo que explica las concentraciones de metales pesados en los sitios. Momani *et al.*, (2000) menciona que las emisiones del tráfico en las carreteras son la principal causa de la acumulación de metales en el medio ambiente circundante. Señala que el medio ambiente se ve muy afectado por factores meteorológicos, sobre todo la dirección del viento y podría tener un efecto ecológico. Los niveles de metales pesados como Pb, Cu, y Cd se presentan comúnmente en zonas urbanas e industrializadas. Esto explica por qué los sitios de P. Reforma, Tollocan, Hípico, Santín y el P. Fidel Negrete están contaminados.

Los resultados de concentración de los metales Cd, Cu, Ni, Zn y Pb para la especie *Fabronia ciliaris* se muestran en la **tabla 3.6 y figura 3.6** , para los sitios Reforma, Hípico, La Pilita, Tollocan y Santín.

Tabla 3.6 Concentraciones de metales para la especie *Fabronia ciliaris*.

Sitio	Especie	Cd mg/kg)	Cu(mg/kg)	Ni (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Pb (mg/kg)
Reforma	<i>Fabronia ciliaris</i>	<L.D	<L.D	14.62 ± 0.6	231.99 ± 0.10	147.8 ± 0.30
Hípico		<L.D	<L.D	7.97 ± 1.60	302.65 ± 0.20	40.93 ± 1.90
La Pilita		<L.D	22.20 ± 0.4	7.22 ± 2.0	119.83 ± 0.30	30.87 ± 0.60
Tollocan		2.39 ± 1.90	61.65 ± 0.5	<L.D	391.46 ± 0.30	91.80 ± 0.60
Santín		3.78 ± 0.60	17.67 ± 1.0	8.58 ± 1.80	234.66 ± 0.30	25.22 ± 0.80

L.D = Límite de Detección.

Cd = 0.10 mg/L Cu = 0.15 mg/L Ni = 0.20 mg/L Zn = 0.10 mg/L Pb = 0.50 mg/L

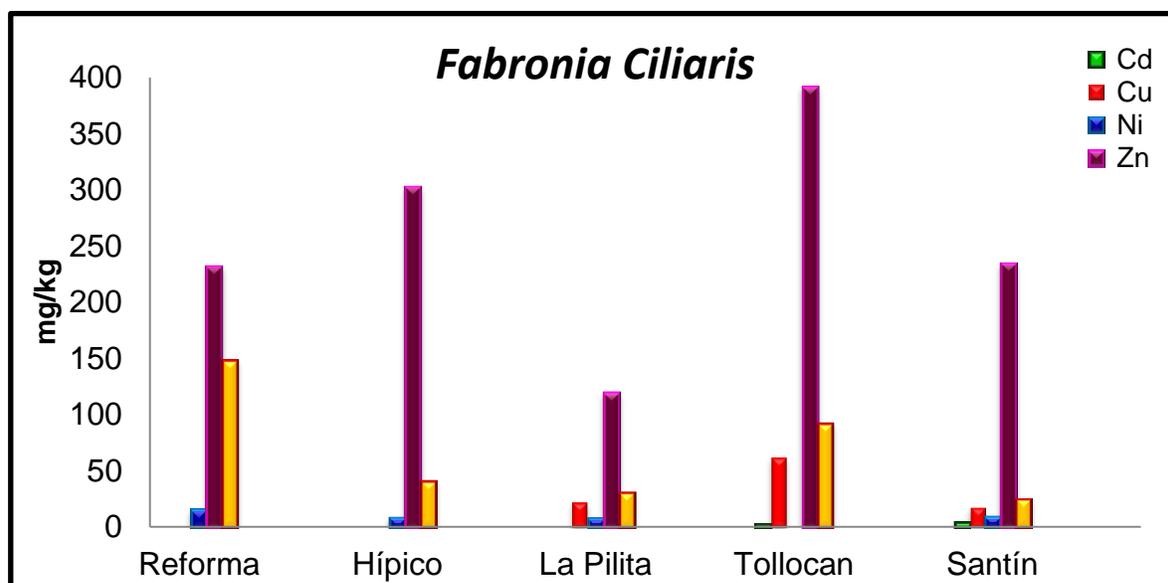


Figura 3.6 Concentraciones de metales para la especie *Fabronia ciliaris*.

Las concentraciones de los metales analizados para la especie *Fabronia ciliaris*, tuvo el siguiente orden:

$$\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cd}$$

Y de acuerdo a los sitios, el orden fue:

$$\text{Tollocan} > \text{P. Reforma} > \text{Hípico} > \text{Santín} > \text{P. La Pilita}$$

Tollocan, Reforma, Hípico y Santín son considerados como sitios de alto tráfico vehicular mientras que en el P. La Pilita disminuye el tráfico. Lo que explica las diferencias encontradas en concentración de metales pesados en los sitios.

Diferentes bioindicadores han sido utilizados en el seguimiento de la contaminación del aire, tales como musgos, líquenes y plantas vasculares. Los musgos toman sus nutrientes de las aguas pluviales. Por lo tanto son bioindicadores adecuados en las zonas urbanas e industriales ya que los metales se depositan en ellos (Samecka *et al.*, 2006). La contaminación por metales a la atmósfera será determinada por procesos de remoción atmosférica, que incluyen la disolución, deposición, precipitación y erosión de los suelos. Estos procesos de incorporación a la atmósfera causan acumulación excesiva de metales traza en otros medios (vegetación, suelos y lagos) incluso lejos del punto de emisión del contaminante, como consecuencia del arrastre atmosférico producido por el viento. La industrialización y la emigración de zonas rurales a centros urbanos, han dado lugar a un aumento en la contaminación atmosférica de los núcleos urbanos. 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.

Los resultados de las muestras en suelos son los siguientes, en **la tabla 3.7 y figura 3.7** se presentan las concentraciones de los metales en cada sitio.

Tabla 3.7 Concentraciones de metales para Suelos.

Sitio	Cd (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Pb (mg/kg)
Reforma	<L.D	36.34 ± 0.40	53.33 ± 0.60	265.72 ± 0.90	41.44 ± 1.20
Hípico	<L.D	7.70 ± 0.50	20.34 ± 2.0	103.27 ± 0.30	18.01 ± 2.00
Alameda	<L.D	<L.D	21.67 ± 0.60	<L.D	109.69±1.40
Cacalomacán	<L.D	<L.D	14.68 ± 0.70	81.98 ± 0.40	<L.D
La Pilita	<L.D	<L.D	12.17 ± 1.10	74.27 ± 0.10	19.83 ± 2.70
F. Negrete	<L.D	<L.D	17.77 ± 1.60	101.52 ± 0.40	44.76 ± 2.20
Tollocan	<L.D	11.19 ± 0.70	18.78 ± 1.30	<L.D	<L.D
Santín	3.32 ± 2.80	70.44 ± 0.30	17.35 ± 0.50	<L.D	<L.D

L.D = Límite de Detección.

Cd =0.10 mg/L Cu=0.15mg/L Ni=0.20mg/L Zn= 0.10 mg/L Pb=0.50mg/L

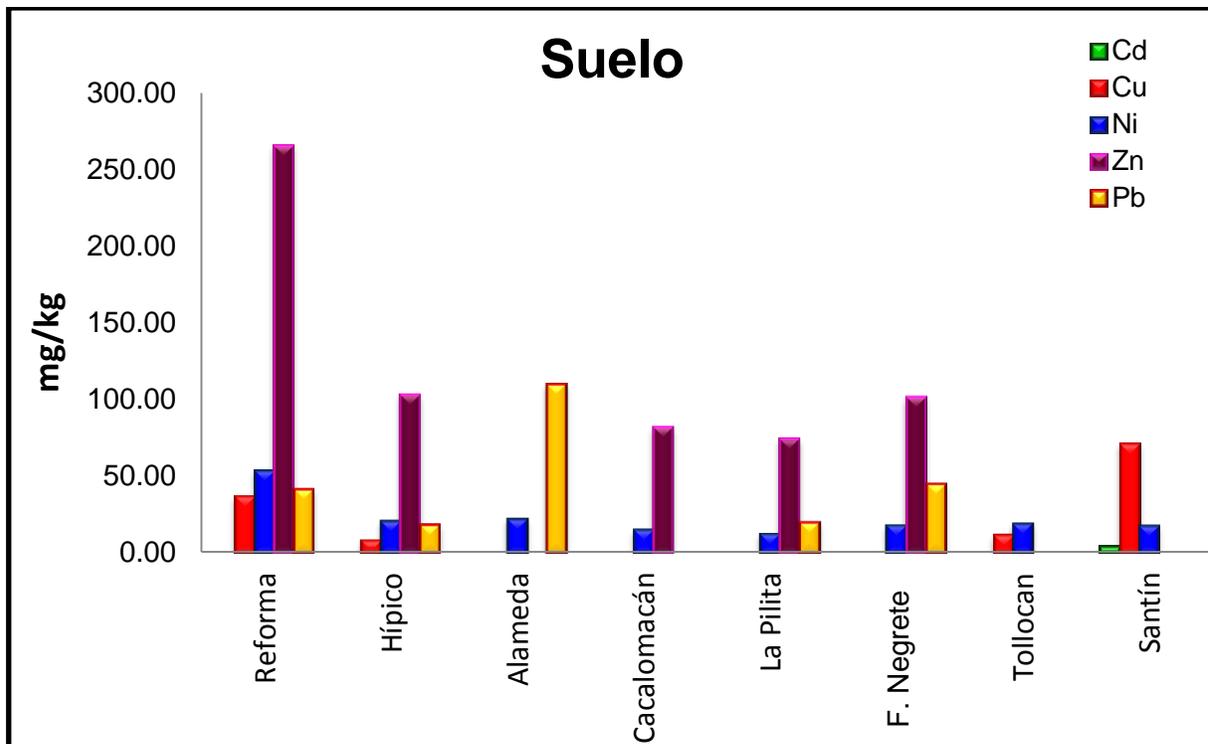


Figura 3.7 Resultado de los metales en suelos

Las concentraciones de los metales analizados para las muestras de suelo, presentó el siguiente orden:

$$\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Cd}$$

De acuerdo a los sitios, el orden fue:

Para Cd:

Santín

Para Cu:

Santín > P. Reforma > Tollocan > P. Hípico

Para Ni:

P. Reforma > P. Alameda > P. Hípico > Tollocan > P. Fidel Negrete > Santín >
>Cacalomacán > P. La Pilita

Para Zn:

P. Reforma > P. Hípico > P. Fidel Negrete > Cacalomacán > P. La Pilita

Para Pb:

P. Alameda > P. Fidel Negrete > P. Reforma > P.Hípico >La Pilita >Cacalomacán

Alameda, Reforma , Fidel Negrete, Hípico son considerados como sitios de alto tráfico vehicular y La Pilita disminuye tráfico vehicular así como Cacalomacán ya que este último es considerado área natural protegida lo que explica las diferencias encontradas en concentración de metales pesados en los sitios.

De acuerdo con Yadav, (2010) el suelo está contaminado con zinc (Zn), además de Cd por los lodos de aguas residuales urbanas o abonos compuestos, los fertilizantes, las emisiones de las incineradoras de residuos municipales, industria de la fundición de metales, y otras actividades humanas.

El Zn es un nutriente esencial para los organismos vivos, mientras que el Cd no es esencial y es tóxico para las plantas superiores, animales y seres humanos. Las concentraciones elevadas de Zn encontradas en suelos contaminados con frecuencia superar a los requeridos como nutrientes y puede causar fitotoxicidad.). Los altos niveles de Zn en el suelo inhiben muchas plantas funciones metabólicas, la toxicidad de Zn en las plantas limita el crecimiento tanto de raíces y brotes (De Vries *et al.*, 2002; Warne *et al.*, 2008).

3.3 Factor de enriquecimiento (FE)

Este factor se determinó para cada especie de musgo *Fabronia ciliaris*, *Syntrichia amphidiacea* y *Leskea angustata*. En la tabla 3.8, 3.9 y 3.10 se muestran los FE encontrados.

Tabla 3.8 FE para la especie *Fabronia ciliaris*.

Sitio de muestreo	Factor Cd	Factor Zn	Factor Pb	Factor Cu	Factor Ni	Promedio por zona
Reforma	ND	3.09	12.64	ND	0.97	3.34
Hípico	ND	9.25	7.17	ND	1.24	3.53
Pilita	ND	5.21	5.03	ND	1.92	2.43
Tollocan	ND	ND	ND	12.02	ND	2.40
Santín	2.66	ND	ND	0.59	1.15	0.88
Promedio por metal	0.53	3.51	4.96	2.52	1.05	

ND: No determinado

De acuerdo a los promedios obtenidos por metal, el orden de FE es el siguiente $Pb > Zn > Cu > Ni > Cd$, por lo tanto el Pb es el que contribuye de manera antropogénica al FE, para el sitio Reforma el Pb fue el metal que destacó para el FE. Para Hípico y La Pilita, están enriquecidos principalmente por Zn y en Santín por Ni. Los sitios llegan a estar enriquecidos en ciertas áreas por actividades humanas por ejemplo: minería, emisiones de las fundiciones, quema de carbón y petróleo, aguas residuales, fertilizantes fosfatados y pesticidas (Yadav, 2010).

De acuerdo al promedio por zona para la especie *Fabronia ciliaris* se presenta el siguiente orden: Hípico > Reforma > Tollocan > Santín. Por lo que el Hípico es el sitio con mayor FE.

Este cálculo permite determinar si un determinado elemento tiene fuentes adicionales o antropogénicas distintas de sus principales fuentes naturales (Izosimova, 2005). La ventaja de este método es la menor incertidumbre en la interpretación de las concentraciones absolutas (afectado por factores tales como la velocidad y dirección del viento, la lluvia, la distancia de la fuente).

De acuerdo a la **tabla 1.1** el FE es evaluado como se presenta en la **tabla 3.9** de manera puntual.

Tabla 3.9 Evaluación del FE para la especie *Fabronia ciliaris*.

Sitio de muestreo	Factor Cd	Factor Zn	Factor Pb	Factor Cu	Factor Ni
Reforma	-	Poco enriquecido	Alto enriquecimiento	-	Conservativo
Hípico	-	Moderadamente enriquecido	Moderadamente enriquecido	-	Conservativo
Pilita	-	Poco enriquecido	Poco enriquecido	-	Conservativo
Tollocan	-	-	-	Alto enriquecimiento	-
Santín	Conservativo	-	-	Conservativo	Conservativo

Para la especie *Syntrichia amphidiacea* se muestran los resultado a continuación (tabla 3.10 y 3.11).

Tabla 3.10 FE para la especie *Syntrichia amphidiacea*

Sitio de muestreo	Factor Cd	Factor Zn	Factor Pb	Factor Cu	Factor Ni	Promedio por zona
Reforma	ND	0.42	1.38	36.89	9.52	9.64
Hípico	ND	ND	1.5	114.88	6.68	24.61
F. Negrete	ND	0.55	0.53	0.15	7.43	1.73
Tollocan	ND	ND	ND	94.45	13.76	21.64
Santín	4.43	ND	ND	10.14	3.81	3.67
Promedio por metal	0.886	0.194	0.682	51.302	8.24	

ND: No determinado

Los promedios obtenidos por metal nos dan como resultado el orden de FE y para la especie *Syntrichia amphidiacea* se comportan en el siguiente orden Cu > Ni > Cd > Pb > Zn, por lo tanto el Cu es el que influye de modo antropogénico al FE, para los sitios, Reforma, Hípico, Tollocan y Santín el Cu fue el metal que destaco para el FE. Para F. Negrete, están enriquecidos principalmente por Ni.

De acuerdo al promedio por zona para la especie *Syntrichia amphidiacea* se presenta el siguiente orden: Hípico > Tollocan > Reforma > Santín > F. Negrete. Por lo que el Hípico es el sito más enriquecido.

De acuerdo a la **tabla 1.1** el FE es evaluado como se presenta en la **tabla 3.11** de manera puntual.

Tabla 3.11 Evaluación del FE para la especie *Syntrichia amphidiacea*

Sitio de muestreo	Factor Cd	Factor Zn	Factor Pb	Factor Cu	Factor Ni
Reforma	-	Conservativo	Conservativo	Alto enriquecimiento	Moderadamente enriquecido
Hípico	-	-	Conservativo	Alto enriquecimiento	Moderadamente enriquecido
F. Negrete	-	Conservativo	Conservativo	Conservativo	Moderadamente enriquecido
Tollocan	-	-	-	Alto enriquecimiento	Alto enriquecimiento
Santín	Poco enriquecido	-	-	Alto enriquecimiento	Conservativo

Para la especie *Leskea angustata* se muestran los resultados a continuación (tabla 3.12 y 3.13).

Tabla 3.12 FE para la especie *Leskea angustata*

Sitio de muestreo	Factor Cd	Factor Cu	Factor Ni	Factor Zn	Factor Pb	Promedio por zona
Alameda	ND	ND	1.18	ND	2.18	1.12
Cacalomacán	ND	ND	0.8	3.54	0.6	1.64
F. Negrete	ND	ND	1.32	2.78	2.94	2.34
Promedio por metal	ND	ND	1.10	2.10	1.90	

ND: No determinado

Los promedios obtenidos por metal nos dan como resultado el orden de FE y para la especie *Leskea angustata* se comportan en el siguiente orden $Zn > Pb > Ni$, por lo tanto el Zn es el que influye de modo antropogénico.

Para los sitios, Alameda y F. Negrete el Pb fue el que metal que destaco, para Cacalomacán está enriquecido principalmente por Zn.

De acuerdo al promedio por zona para la especie *Leskea angustata*, se presenta el siguiente orden: F. Negrete > Cacalomacán > Alameda. Por lo que F. Negrete es el sito más enriquecido.

De acuerdo a la **tabla 1.1** el FE es evaluado como se presenta en la **tabla 3.13** de manera puntual.

Tabla 3.13 Evaluación del FE para la especie *Leskea angustata*

Sitio de muestreo	Factor Cd	Factor Cu	Factor Ni	Factor Zn	Factor Pb
Alameda	-	-	Conservativo	-	Conservativo
Cacalomacán	-	-	Conservativo	Poco enriquecido	Conservativo
F. Negrete	-	-	Conservativo	Conservativo	Conservativo

3.4 Factor de Bioacumulación (BAF)

En la **tabla 3.14** se presentan los resultados del BAF para la especie *Fabronia ciliaris*, que para que se considere un buen bioacumulador debe ser mayor a 1.

Tabla 3.14 Factor de bioacumulación para la especie *Fabronia ciliaris*

Sitio	Cd	Cu	Ni	Zn	Pb
Reforma	ND	ND	0.27	0.87	3.57
Hípico	ND	ND	0.39	2.93	2.27
La Pilita	ND	ND	0.59	1.61	1.56
Tollocan	ND	5.51	ND	ND	ND
Santín	1.14	0.25	0.49	ND	ND

ND: No determinado

Los resultados muestran que la especie *Fabronia ciliaris* es buen acumulador para los metales Cd, Cu, Zn y Pb ya que el valor del factor de bioacumulación (BAF) >1, que es lo establecido para considerar un buen bioacumulador. Los sitios que indican ND, son sitios en donde los resultados del análisis de metales por la técnica EAA fueron menores al límite de detección (LD) y no pudieron ser determinados.

En la tabla 3.15 se presentan los resultados del BAF para la especie *Syntrichia amphidiacea*

Tabla 3.15 Factor de bioacumulación para la especie *Syntrichia amphidiacea*

Sitio	Cd	Cu	Ni	Zn	Pb
Reforma	ND	1.11	0.38	1.81	4.39
Hípico	ND	ND	ND	ND	ND
F. Negrete	ND	ND	0.53	1.14	1.17
Tollocan	ND	ND	0.88	ND	ND
Santín	1.44	ND	0.41	ND	ND

ND: No determinado

Los resultados muestran que la especie *Syntrichia amphidiacea* al igual que *Fabronia ciliaris*, es buen acumulador para los metales Cd, Cu, Zn y Pb ya que el valor del factor de bioacumulación (BAF) >1, que es lo establecido para considerar un buen bioacumulador, Los sitios que indican ND, son sitios en donde los resultados del análisis de metales por la técnica EAA fueron menores al límite de detección (LD).

En la tabla 3.16 se presentan los resultados del BAF para la especie *Leskea angustata*.

Tabla 3.16 Factor de bioacumulación para la especie *Leskea angustata*.

Sitio	Cd	Ni	Zn	Pb
Alameda	ND	0.36	ND	0.66
Cacalomacán	ND	0.13	0.56	ND
F. Negrete	ND	0.35	0.74	0.79

ND: No determinado

Los resultados muestran que la especie *Leskea angustata* no es buen acumulador para los metales Cd, Cu, Zn, Ni y Pb ya que el valor del factor de bioacumulación (BAF) < 1. Los sitios que indican ND, son sitios en donde los resultados del análisis de metales por la técnica EAA fueron menores al límite de detección (LD).

3.5 Estadístico

Las tablas siguientes aplican un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las que otros. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias. Un asterisco se ha colocado junto a los pares, lo que indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas en el nivel de confianza del 95%. El método que se utiliza actualmente para discriminar entre los medias es un procedimiento denominado diferencia significativa de Fisher (LSD). Con este método, existe un riesgo de 5% de llamar a cada par de medias significativamente diferentes. El método Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de que las medias de

cada metal dentro de cada uno de los niveles de sitio son los mismos. Los datos de todos los niveles se combinan y ordenan de menor a mayor primero. El rango medio se calcula entonces para los datos en cada nivel. Dado que el valor P es mayor que o igual a 0.05, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas al nivel de confianza del 95%.

A continuación se presenta tablas mostrando sí existe diferencias significativas entre las especies encontradas.

La **tabla 3.17** muestra el valor $P = 0.20289 > 0.05$ por lo que se concluye que no hay diferencia significativa entre medias para metal Cd.

Tabla 3.17 Prueba de Kruskal-Wallis para Cd por especie

Especie	Rango Promedio
<i>Fabronia ciliaris</i>	14.7
<i>Leskea angustata</i>	9.5
<i>Syntrichia amphidiacea</i>	14.7

Prueba estadística = 3.19018 P-Valor = 0.20289

Para Cd no existe diferencia significativa entre especies como se observa en la **tabla 3.18**.

Tabla 3.18 Contraste Múltiple de Rango para Cd

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Fabronia ciliaris- Leskea angustata</i>		1.194	1.67082
<i>Fabronia ciliaris - Syntrichia amphidiacea</i>		0.053	1.44697
<i>Leskea angustata - Syntrichia amphidiacea</i>		-1.141	1.67082

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para Cd no existe diferencia significativa entre las especies. Debido a que las concentraciones para este metal para la mayoría de los sitios fueron menores al límite de detección (LD).

La **tabla 3.19** muestra el valor $P = 0.098242 > 0.05$ por lo que se concluye que no hay diferencia significativa entre medias para metal Cu.

Tabla 3.19 Prueba de Kruskal-Wallis para Cu por especie

Espece	Rango Promedio
<i>Fabronia ciliaris</i>	0.15
<i>Leskea angustata</i>	20.36
<i>Syntrichia amphidiacea</i>	24.28

Prueba estadística = 4.64064 P-Valor = 0.098242

Para Cu existe diferencia significativa entre las especies (**tabla 3.20**):

- *Fabronia ciliaris* - *Leskea angustata*
- *Syntrichia amphidiacea* - *Leskea angustata*

Tabla 3.20 Contraste Múltiple de Rango para Cu

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Fabronia ciliaris</i> - <i>Leskea angustata</i>	*	20.21	24.2559
<i>Fabronia ciliaris</i> - <i>Syntrichia amphidiacea</i>		-3.925	19.6495
<i>Syntrichia amphidiacea</i> - <i>Leskea angustata</i>	*	-24.136	24.632

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para Cu existe diferencia entre las especies *Leskea angustata* con *Fabronia ciliaris* y *Syntrichia amphidiacea*, en los resultados de factor de bioacumulación (BAF) se encontró que *Leskea angustata* no es buen bioacumulador para Cu, mientras que *Fabronia ciliaris* y *Syntrichia amphidiacea* si son consideradas especies bioacumuladoras.

La **tabla 3.21** muestra el valor $P = 0.029763 < 0.05$ por lo que se concluye que hay diferencia significativa entre medias para metal Ni.

Tabla 3.21 Prueba de Kruskal-Wallis para Ni por especie

Especie	Rango Promedio
<i>Fabronia ciliaris</i>	13.3636
<i>Leskea angustata</i>	6.2
<i>Syntrichia amphidiacea</i>	17.3

Prueba estadística = 7.02898 P-Valor = 0.029763

Para Ni no existe diferencia significativa entre especies como se observa en la **tabla 3.22**.

Tabla 3.22 Contraste Múltiple de Rango para Ni

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Fabronia ciliaris</i> - <i>Leskea angustata</i>		3.98764	5.74591
<i>Fabronia ciliaris</i> - <i>Syntrichia amphidiacea</i>		-2.28836	4.65472
<i>Leskea angustata</i> - <i>Syntrichia amphidiacea</i>		-6.276	5.835

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

No existe diferencia entre especies (**tabla 3.22**) para Ni ya que el factor de bioacumulación para este metal fue menor a 1 en las tres especies, por lo tanto la

manera en que acumulan este metal las especies es muy parecido y no hay diferencia.

La **tabla 3.23** muestra el valor $P = 0.00687225 < 0.05$ por lo que se concluye que hay diferencia significativa entre medias para metal Zn.

Tabla 3.23 Prueba de Kruskal-Wallis para Zn por especie.

Especie	Rango Promedio
<i>Fabronia ciliaris</i>	15.9091
<i>Leskea angustata</i>	3.8
<i>Syntrichia amphidiacea</i>	15.7

Prueba estadística = 9.96053 P-Valor = 0.00687225

En la **tabla 3.24** se observa que para el Zn existe diferencia significativa en:

- *Fabronia ciliaris* - *Leskea angustata*
- *Leskea angustata* - *Syntrichia amphidiacea*

Tabla 3.24 Contraste Múltiple de Rango para Zn

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Fabronia ciliaris</i> - <i>Leskea angustata</i>	*	148.261	119.494
<i>Fabronia ciliaris</i> - <i>Syntrichia amphidiacea</i>		-49.698	103.485
<i>Leskea angustata</i> - <i>Syntrichia amphidiacea</i>	*	-197.959	119.494

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para Zn existe diferencia entre las especies *Leskea angustata* con *Fabronia ciliaris* y *Syntrichia amphidiacea*, en los resultados de factor de bioacumulación (BAF) se encontró que *Leskea angustata* no es buen bioacumulador para Zn, mientras que

Fabronia ciliaris y *Syntrichia amphidiacea* si son consideradas especies bioacumuladoras para este metal.

La **tabla 3.25** muestra el valor $P = 0.199675 > 0.05$ por lo que se concluye que no hay diferencia significativa entre medias para metal Pb.

Tabla 3.25 Prueba de Kruskal-Wallis para Pb por especie

Especie	Rango Promedio
<i>Fabronia ciliaris</i>	14.5909
<i>Leskea angustata</i>	8.0
<i>Syntrichia amphidiacea</i>	15.05

Prueba estadística = 3.22213 P-Valor = 0.199675

Para Pb no existe diferencia significativa entre especies como se observa en la **tabla 3.26**.

Tabla 3.26 Contraste Múltiple de Rango para Pb

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>Fabronia ciliaris</i> - <i>Leskea angustata</i>	*	48.8795	56.7467
<i>Fabronia ciliaris</i> - <i>Syntrichia amphidiacea</i>		7.68445	45.9701
<i>Leskea angustata</i> - <i>Syntrichia amphidiacea</i>	*	-41.195	57.6265

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para Pb existe diferencia entre las especies *Leskea angustata* con *Fabronia ciliaris* y *Syntrichia amphidiacea*, en los resultados de factor de bioacumulación (BAF) se encontró que *Leskea angustata* no es buen bioacumulador para Pb, mientras que *Fabronia ciliaris* y *Syntrichia amphidiacea* si son consideradas especies bioacumuladoras.

A continuación se presentan los resultados estadísticos por sitio. En la **tabla 3.27** muestra el valor $P = 0.000842163 < 0.05$ por lo que se concluye que hay diferencia significativa entre medias.

Tabla 3.27 Prueba de Kruskal-Wallis para Cd por Sitio

Sitio	Rango Promedio
Alameda	9.5
Cacalomacán	9.5
F. Negrete	9.5
Hípico	9.5
La Pilita	9.5
Reforma	9.5
Santín	24.5
Tollocan	20.5

Prueba estadística = 11.9016 P-Valor = 0.000842163

Tabla 3.28 Grupos con diferencias significativa para Cd

P. Alameda	Santín Tollocan
Cacalomacán	
P. F. Negrete	
P. Hípico	
P. La Pilita	
P. Reforma	
Santín	Tollocan

El contraste múltiple de rango muestra los grupos de sitios en donde existe una diferencia significativa entre sitios para Cd, los grupos son (**tabla 3.28 y 3.29**):

Tabla 3.29 Prueba Contraste Múltiple de Rango para Cd

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Alameda - Cacalomacán		0.0	0.807859
Alameda - F. Negrete		0.0	0.699627
Alameda - Hípico		0.0	0.699627
Alameda - La Pilita		0.0	0.807859
Alameda - Reforma		0.0	0.699627
Alameda - Santín	*	-4.28	0.699627
Alameda - Tollocan	*	-1.7575	0.699627
Cacalomacán - F. Negrete		0.0	0.699627
Cacalomacán - Hípico		0.0	0.699627
Cacalomacán - La Pilita		0.0	0.807859
Cacalomacán - Reforma		0.0	0.699627
Cacalomacán - Santín	*	-4.28	0.699627
Cacalomacán - Tollocan	*	-1.7575	0.699627
F. Negrete - Hípico		0.0	0.571243
F. Negrete - La Pilita		0.0	0.699627

F. Negrete - Reforma		0.0	0.571243
F. Negrete - Santín	*	-4.28	0.571243
F. Negrete - Tollocan	*	-1.7575	0.571243
Hípico - La Pilita		0.0	0.699627
Hípico - Reforma		0.0	0.571243
Hípico - Santín	*	-4.28	0.571243
Hípico - Tollocan	*	-1.7575	0.571243
La Pilita - Reforma		0.0	0.699627
La Pilita - Santín	*	-4.28	0.699627
La Pilita - Tollocan	*	-1.7575	0.699627
Reforma - Santín	*	-4.28	0.571243
Reforma - Tollocan	*	-1.7575	0.571243
Santín - Tollocan	*	2.5225	0.571243

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para poder explicar las diferencias entre este grupo, se basó en el análisis de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) que muestra, que en la mayoría de los sitios la concentración está por debajo del límite de detección (LD) y en Tollocan y Santín son los sitios en donde se encontró Cd por eso se consideran sitios con diferencias para este metal.

La tabla 3.30 muestra el valor $P = 0.0169833 < 0.05$ por lo que se concluye que hay diferencia significativa entre medias para Cu.

Tabla 3.30 Prueba de Kruskal-Wallis para Cu por Sitio

Sitio	Rango Promedio
Alameda	7.5
Cacalomacan	7.5
F. Negrete	13.0
Hípico	7.5
La Pilita	18.5
Reforma	14.5
Santín	11.5
Tollocan	24.5

Prueba estadística = 17.0648 P-Valor = 0.0169833

El contraste múltiple de rango muestra los grupos de sitios en donde existe una diferencia significativa entre sitios para Cu, los grupos son (**tabla 3.31 y 3.32**):

Tabla 3.31 Grupos con diferencia significativa para Cu.

P. Alameda	Tollocan
Cacalomacán	
P. Hípico	
Santín	

Tabla 3.32 Contraste Múltiple de Rango para Cu

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Alameda - Cacalomacán		0.0	61.5896
Alameda - F. Negrete		-23.65	61.5896
Alameda - F. Negrete		0.0	61.5896
Alameda - Hípico		0.0	53.3381
Alameda - La Pilita		-22.96	61.5896
Alameda - Reforma		-20.24	53.3381
Alameda - Santín		-8.245	53.3381
Alameda - Tollocan	*	-60.38	53.3381
Cacalomacán - F. Negrete		-23.65	61.5896
Cacalomacán - Hípico		0.0	53.3381
Cacalomacán - La Pilita		-22.96	61.5896
Cacalomacán - Reforma		-20.24	53.3381
Cacalomacán - Santín		-8.245	53.3381
Cacalomacán - Tollocan	*	-60.38	53.3381
F. Negrete - Hípico		23.65	53.3381
F. Negrete - La Pilita		0.69	61.5896
F. Negrete - Reforma		3.41	53.3381
F. Negrete - Santín		15.405	53.3381

F. Negrete - Tollocan		-36.73	53.3381
Hípico - La Pilita		-22.96	53.3381
Hípico - Reforma		-20.24	43.5504
Hípico - Santín		-8.245	43.5504
Hípico - Tollocan	*	-60.38	43.5504
La Pilita - Reforma		2.72	53.3381
La Pilita - Santín		14.715	53.3381
La Pilita - Tollocan		-37.42	53.3381
Reforma - Santín		11.995	43.5504
Reforma - Tollocan		-40.14	43.5504
Santín - Tollocan	*	-52.135	43.5504

***denota una diferencia estadísticamente significativa.**

Para el Cu, la diferencia que se encontró entre Tollocan y Alameda, Cacalomacán, Hípico y Santín, es que es el sitio con mayor concentración en comparación con los demás sitios.

La **tabla 3.33** muestra el valor $P = 0.121214 > 0.05$ por lo que se concluye que no hay diferencia significativa entre medias para metal Ni.

Tabla 3.33 Prueba de Kruskal-Wallis para Ni por Sitio

Sitio	Rango Promedio
Alameda	12.5
Cacalomacán	3.5
F. Negrete	12.5
Hípico	14.5
La Pilita	8.5
Reforma	23.5
Santín	12.5
Tollocan	12.5

Prueba estadística = 11.4227 P-Valor = 0.121214

El contraste múltiple de rango (**tabla 3.35**), muestra los grupos de sitios en donde existe una diferencia significativa entre sitios para Ni, para el caso del Ni existe diferencia significativa entre los sitios siguientes (**tabla 3.34**):

Tabla 3.34 Grupos con diferencia significativa para Ni.

Alameda	Cacalomacán Reforma Tollocan
Cacalomacán	Hípico Reforma Santín Tollocan
F. Negrete	Hípico Reforma
Hípico	Tollocan
La Pilita	Reforma Santín Tollocan
Reforma	Santín
Santín	Tollocan

Tabla 3.35 Contraste Múltiple de Rango para Ni

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Alameda - Cacalomacán	*	156.8	128.657
Alameda - F. Negrete		106.81	111.421
Alameda - Hípico		-83.4275	111.421
Alameda - La Pilita		82.595	128.657
Alameda - Reforma	*	-153.87	111.421

Alameda - Santín		-31.01	111.421
Alameda - Tollocan	*	-209.065	111.421
Cacalomacán - F. Negrete		-49.99	111.421
Cacalomacán - Hípico	*	-240.228	111.421
Cacalomacán - La Pilita		-74.205	128.657
Cacalomacán - Reforma	*	-310.67	111.421
Cacalomacán - Santín	*	-187.81	111.421
Cacalomacán - Tollocan	*	-365.865	111.421
F. Negrete - Hípico	*	-190.238	90.9746
F. Negrete - La Pilita		-24.215	111.421
F. Negrete - Reforma	*	-260.68	90.9746
F. Negrete - Santín	*	-137.82	90.9746
F. Negrete - Tollocan	*	-315.875	90.9746
Hípico - La Pilita	*	166.023	111.421
Hípico - Reforma		-70.4425	90.9746
Hípico - Santín		52.4175	90.9746
Hípico - Tollocan	*	-125.637	90.9746
La Pilita - Reforma	*	-236.465	111.421
La Pilita - Santín	*	-113.605	111.421

La Pilita - Tollocan	*	-291.66	111.421
Reforma - Santín	*	122.86	90.9746
Reforma - Tollocan		-55.195	90.9746
Santín - Tollocan	*	-178.055	90.9746

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para Ni en la mayoría de los sitios pudo detectarse y estuvo presente en las tres especies y su forma de acumulación de cada especie es diferente y por ello, los hubo diferencia en los sitios

Para el primer grupo existen diferencias en Alameda con Cacalomacán puesto que los resultados por EAA, Alameda > Cacalomacán, Reforma > Alameda, Tollocan > Alameda, en el segundo grupo Cacalomacán es una zona Natural Protegida mientras las restantes son zona urbanas con alto tráfico vehicular, en tercer lugar Tollocan > Hípico, en cuarto lugar la Pilita < Reforma, Santín y Tollocan en concentración, para Reforma > Santín, para Tollocan y Santín las especies encontradas son diferentes y su forma de acumular Ni es diferente.

La **tabla 3.36** muestra el valor $P = 0.245543 > 0.05$ por lo que se concluye que no hay diferencia significativa entre medias para el Zn.

Tabla 3.36 Prueba de Kruskal-Wallis para Zn por Sitio

Sitio	Rango Promedio
Alameda	5.0
Cacalomacán	1.0
F. Negrete	4.0
Hípico	9.5
La Pilita	3.0
Reforma	9.5
Santín	7.5
Tollocan	11.5

Prueba estadística = 10.2857 P-Valor = 0.245543

El contraste múltiple de rango, **tabla 3.37**, muestra los grupos de sitios en donde existe una diferencia significativa entre sitios para Zn, el grupo encontrado con diferencia es: **Cacalomacán – Tollocan**

Tabla 3.37 Contraste Múltiple de Rango para Zn

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Alameda - Cacalomacán		160.25	379.542
Alameda - F. Negrete		87.01	379.542
Alameda - Hípico		-74.82	328.693
Alameda - La Pilita		89.93	379.542
Alameda - Reforma		-141.005	328.693
Alameda - Santín		-32.95	328.693
Alameda - Tollocan		-203.135	328.693
Cacalomacacn - F. Negrete		-73.24	379.542
Cacalomacán - Hípico		-235.07	328.693
Cacalomacán - La Pilita		-70.32	379.542
Cacalomacán - Reforma		-301.255	328.693
Cacalomacán - Santín		-193.2	328.693
Cacalomacán - Tollocan	*	-363.385	328.693
F. Negrete - Hípico		-161.83	328.693
F. Negrete - La Pilita		2.92	379.542
F. Negrete - Reforma		-228.015	328.693
F. Negrete - Santín		-119.96	328.693

F. Negrete - Tollocan		-290.145	328.693
Hípico - La Pilita		164.75	328.693
Hípico - Reforma		-66.185	268.377
Hípico - Santín		41.87	268.377
Hípico - Tollocan		-128.315	268.377
La Pilita - Reforma		-230.935	328.693
La Pilita - Santín		-122.88	328.693
La Pilita - Tollocan		-293.065	328.693
Reforma - Santín		108.055	268.377
Reforma - Tollocan		-62.13	268.377
Santín - Tollocan		-170.185	268.377

*denota una diferencia estadísticamente significativa.

Para Zn hubo diferencia entre Cacalomacán y Tollocan. Cacalomacán es una zona natural protegida la cual es libre de una contaminación severa, su factor de enriquecimiento prueba que esta poco enriquecido de este metal.

Tollocan es una zona urbana, su ubicación es cercana a zona industrial y por lo tanto los resultados de factor de enriquecimiento mostraron que tiene un alto enriquecimiento de Zn en esta zona.

La **tabla 3.38** muestra el valor $P = 0.00113181 < 0.05$ por lo que se concluye que hay diferencia significativa entre medias para metal Pb.

Tabla 3.38 Prueba de Kruskal-Wallis para Pb por Sitio

Sitio	Rango Promedio
Alameda	17.5
Cacalomacán	1.5
F. Negrete	12.5
Hípico	12.5
La Pilita	7.5
Reforma	24.5
Santín	4.5
Tollocan	20.5

Prueba estadística = 24.0164 P-Valor = 0.00113181

El contraste múltiple de rango (**tabla 3.40**), muestra los sitios en donde existe diferencia significativa para Pb, para este caso los grupos son (**tabla 3.39**):

Tabla 3.39 Grupos con diferencia significativa para Pb.

P. Alameda	Cacalomacán P. Reforma Santín
Cacalomacán	F. Negrete P. Reforma Tollocan
P. F. Negrete	P. Reforma Tollocan
P. Hípico	P. Reforma Tollocan
P. La Pilita	P. Reforma Tollocan
P. Reforma	Santín Tollocan
Santín	Tollocan

Tabla 3.40 Contraste Múltiple de Rango para Pb

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Alameda - Cacalomacán	*	71.23	48.4384
Alameda - F. Negrete		20.45	48.4384
Alameda - Hípico		30.825	41.9489
Alameda - La Pilita		40.87	48.4384
Alameda - Reforma	*	-91.78	41.9489
Alameda - Santín	*	48.41	41.9489
Alameda - Tollocan		-28.02	41.9489
Cacalomacán - F. Negrete	*	-50.78	48.4384
Cacalomacán - Hípico		-40.405	41.9489
Cacalomacán - La Pilita		-30.36	48.4384
Cacalomacán - Reforma	*	-163.01	41.9489
Cacalomacán - Santín		-22.82	41.9489
Cacalomacacn - Tollocan	*	-99.25	41.9489
F. Negrete - Hípico		10.375	41.9489
F. Negrete - La Pilita		20.42	48.4384
F. Negrete - Reforma	*	-112.23	41.9489
F. Negrete - Santín		27.96	41.9489

F. Negrete - Tollocan	*	-48.47	41.9489
Hípico - La Pilita		10.045	41.9489
Hípico - Reforma	*	-122.605	34.2511
Hípico - Santín		17.585	34.2511
Hípico - Tollocan	*	-58.845	34.2511
La Pilita - Reforma	*	-132.65	41.9489
La Pilita - Santín		7.54	41.9489
La Pilita - Tollocan	*	-68.89	41.9489
Reforma - Santín	*	140.19	34.2511
Reforma - Tollocan	*	63.76	34.2511
Santín - Tollocan	*	-76.43	34.2511

***denota una diferencia estadísticamente significativa.**

La relación que existe entre especies es que *Syntrichia amphidiacea* y *Fabronia ciliaris* es que son buenos bioacumuladores de este metal, mientras que *Leskea angustata* no muestra un buen resultado para ser un buen bioacumulador. Entre estos sitios hay una combinación de estas tres especies y el factor de bioacumulación para las especies es diferente.

3.6 Implementación de la técnica por Voltamperometría

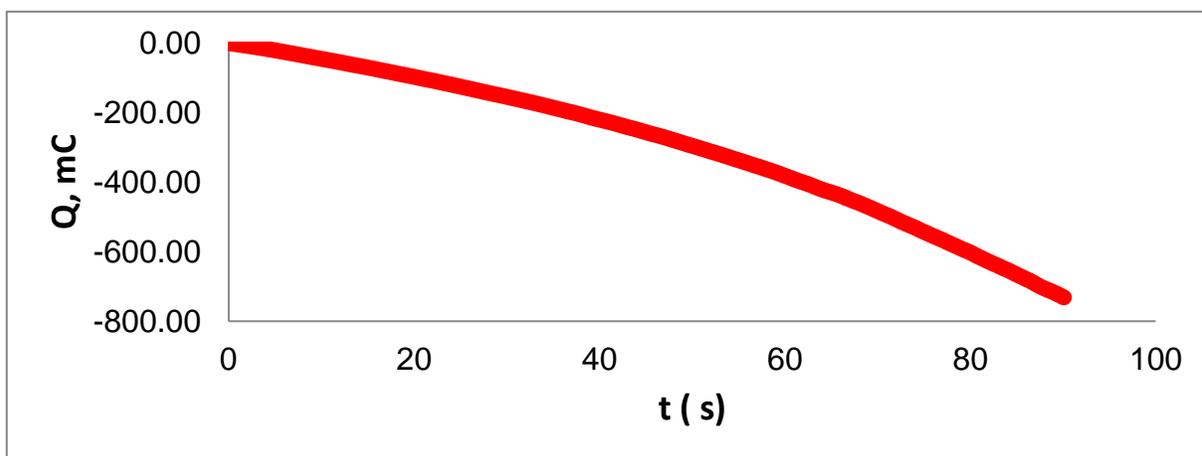
Para la implementación de la técnica por voltamperometría para fitoquelatinas (PCs), fue necesario iniciar con la determinación de Cisteína (Cys) ya que las fitoquelatinas son péptidos ricos en Cys.

Para esta técnica se utilizan 3 electrodos (como se mencionó anteriormente), electrodo de referencia (Ag/Ag Cl), contra electrodo (barra de grafito), electrodo de trabajo (carbón vítreo).

3.6.1 Deposición de la amalgama Cu-Hg

Inicialmente se realizó una deposición de una amalgama Cu-Hg, para lo cual se partió de una solución de Cu-Hg 0.05M y como electrolito soporte HClO_4 1M. Se empleó la técnica de Coulometría, en la cual se le aplicó un potencial en determinado tiempo. Cabe mencionar que se utilizó un buffer de boratos de pH 8.1, 0.05M como electrolito soporte, el cual se preparó a partir de 10mL de ácido bórico (H_3BO_3) ajustando el pH con NaOH 0.05M.

En la **figura 3.8** se muestra la deposición de la amalgama en el electrodo. Fue posible notar a simple vista una capa grisácea, lo que indicó los metales depositados en el electrodo.



Q, mC: carga eléctrica en mili Coulombs t (s): tiempo

Figura 3.8 Coulometría, deposición de amalgama Cu-Hg durante 100s, Tiempo de deposición= 100s, E= -0.8V, 0.05M Cu-Hg

3.6.2 Caracterización de amalgama por voltamperometría cíclica (VC) y Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En seguida se caracterizó la amalgama por medio de la técnica de voltamperometría cíclica VC. En la **figura 3.9** se muestra la caracterización del electrodo, en el voltamperograma cíclico se muestran dos picos, en la parte catódica, en la que se muestra que hay dos especies las cuales se pueden reducir, y por el contrario en la parte anódica se debe de presentar el proceso de oxidación de dichos metales. En uno de los picos se presenta un potencial de 158×10^{-1} V y una corriente de 7.96×10^{-5} A. el cual este pico es del cobre, por otra parte también se presenta otro pico característico que tiene un potencial de $4,72 \times 10^{-1}$ V y una intensidad de corriente de $5,76 \times 10^{-5}$ A.

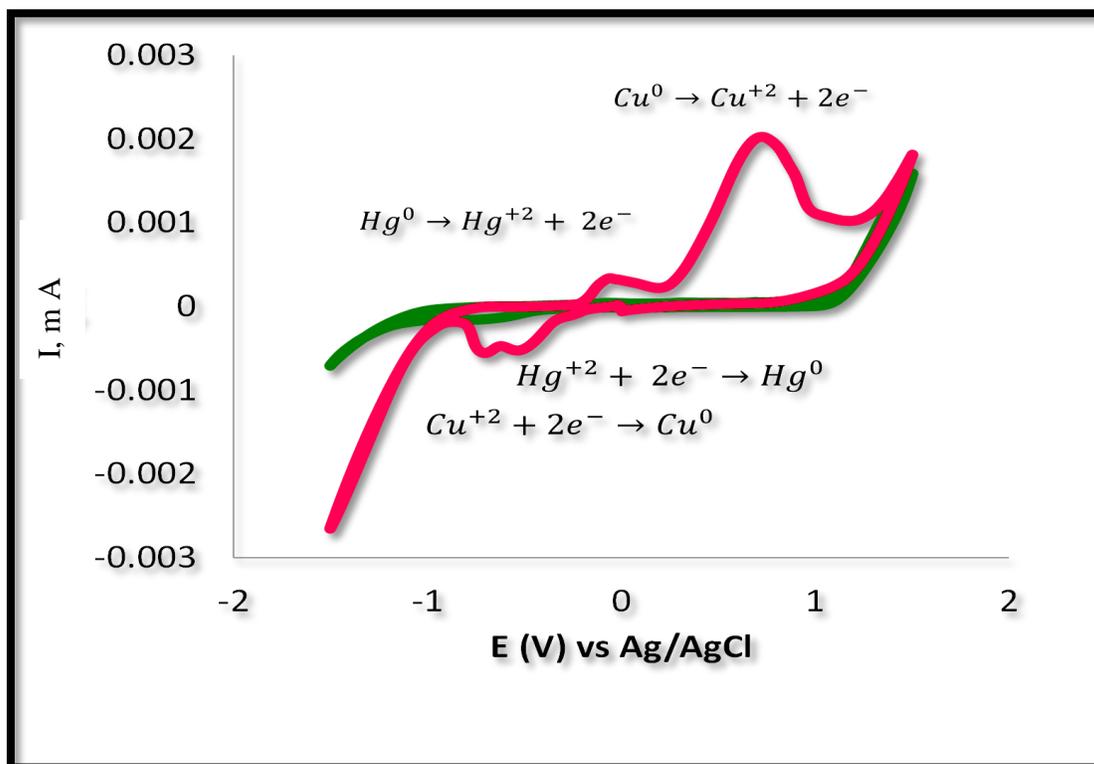
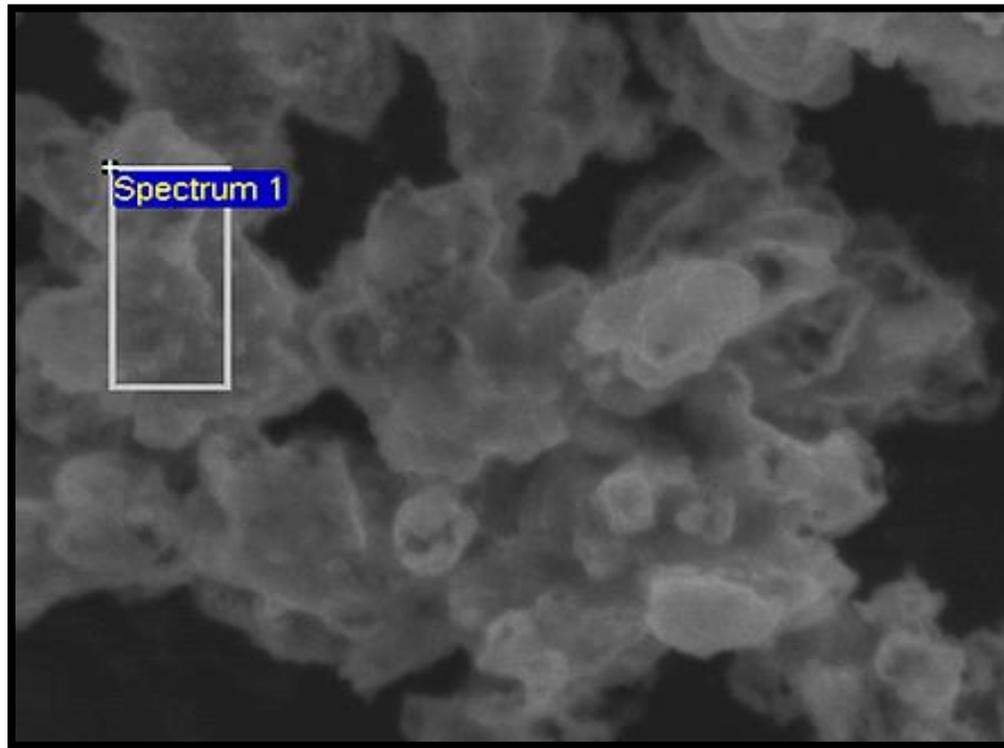


Figura 3.9 Voltamperograma cíclico, caracterización de amalgama

Dónde: E (V) vs Ag /Ag Cl: es el potencial que se necesita siendo el electrodo de referencia Ag/Ag Cl, I , mA: es la intensidad de corriente en mili Amperes (mA).

Por otra parte también se utilizó la técnica SEM para verificar la superficie del electrodo, antes de activarla y después de la activación como se muestra en la figura 3.10 a) y b) respectivamente.



10µm

Electron Image 1

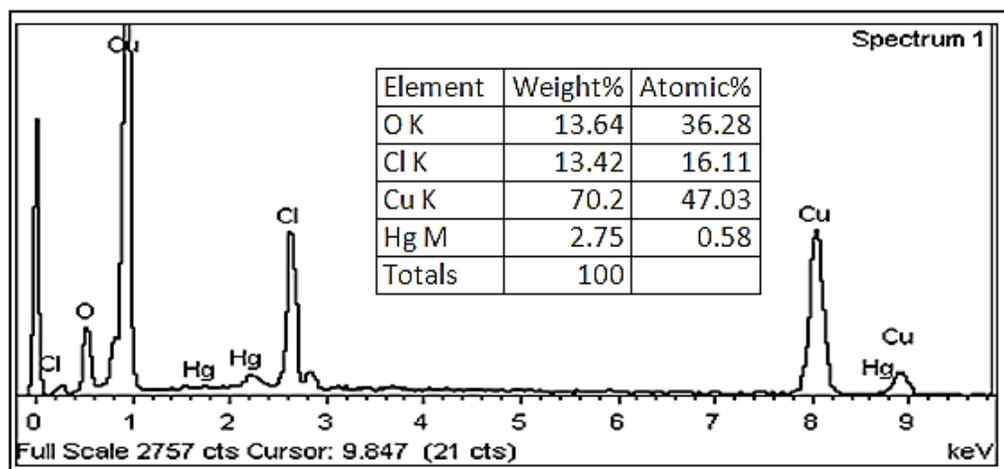


Figura 3.10 a) Micrografía de amalgama inactiva

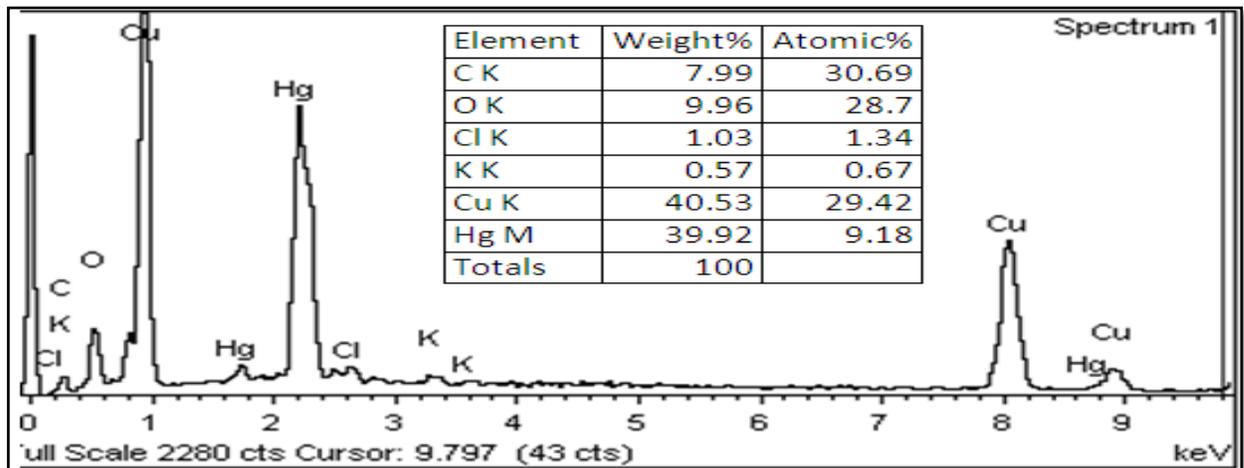
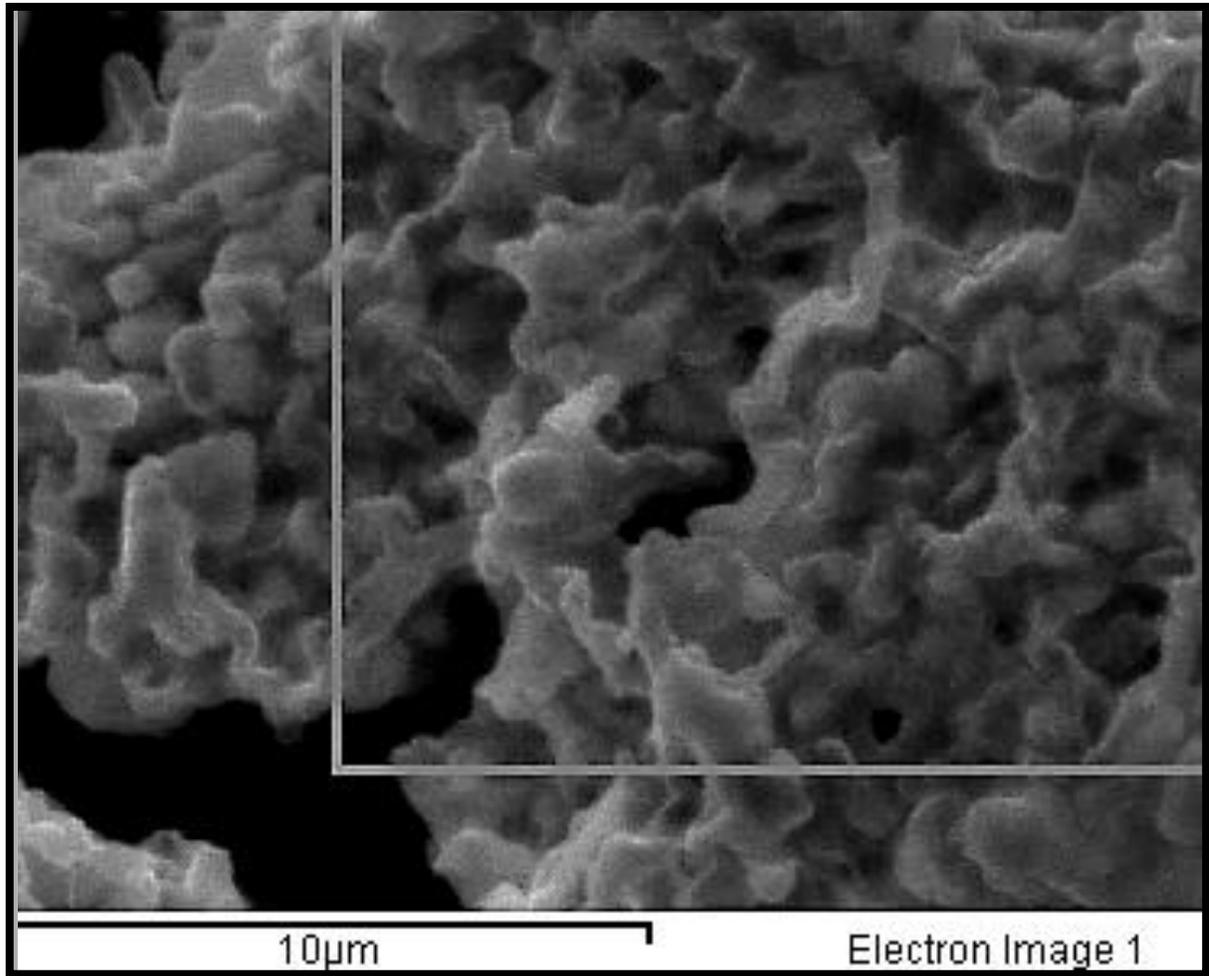


Figura 3.10 b) Micrografía de amalgama activa con KCl 0.2M

En la **tabla 3.41**, se muestra el análisis elemental (por EDS) correspondiente a la superficie sin activar y activada.

Tabla 3.41 Análisis elemental (EDS)

Elemento	Sin activar		Activada	
	% peso	% atómico	% peso	% atómico
C			7.99	30.69
O	13.64	36.28	9.96	28.7
Cl	13.42	16.11	1.03	1.34
Cu	70.2	47.03	40.53	29.42
Hg	2.75	0.58	39.92	9.18

El análisis químico elemental semicuantitativo puntual obtenido por EDS mostró que la amalgama está constituida principalmente por Cu y Hg, estos resultados son para comprobar que se depositó el Cu y Hg, esta técnica es de manera puntual. El KCl fija la amalgama y en las micrografías se puede observar que las partículas de la amalgama están más aglomeradas activándolas y así se podrá usar sin que se afecte la amalgama en todo el análisis de fitoquelatinas.

3.6.3 Curva de calibración (Técnica de voltamperometría de barrido lineal)

Se realizó la curva de calibración por la técnica de voltamperometría de barrido lineal, para lo cual se adicionaron diferentes concentraciones de cisteína, partiendo de una concentración de 2×10^{-8} a 1×10^{-7} M de Cys, en un buffer de

boratos pH 8.1, 0.05M como electrolito soporte. A continuación, se muestran los voltamperogramas más representativos de todas las determinaciones de cisteína que se realizaron.

En la **figura 3.11** se observa la presencia del complejo RS-Cu (I) El Cu (II) se reduce formándose el complejo con el enlace tiol de la Cys y es pico que se presenta es la señal indicando que se está formando. Las condiciones utilizadas fueron: Tiempo de deposición de 300 segundos, $E_{DEP} = -0.340V$, Tiempo de equilibrio de 5s. $E_{inicial} = -0.28 V$ $E_{final} = -2.0 V$, Velocidad de escaneo = $0.20 V /s$ El potencial de reducción de la Cys es $-0.34V$ de donde se partió para el análisis.

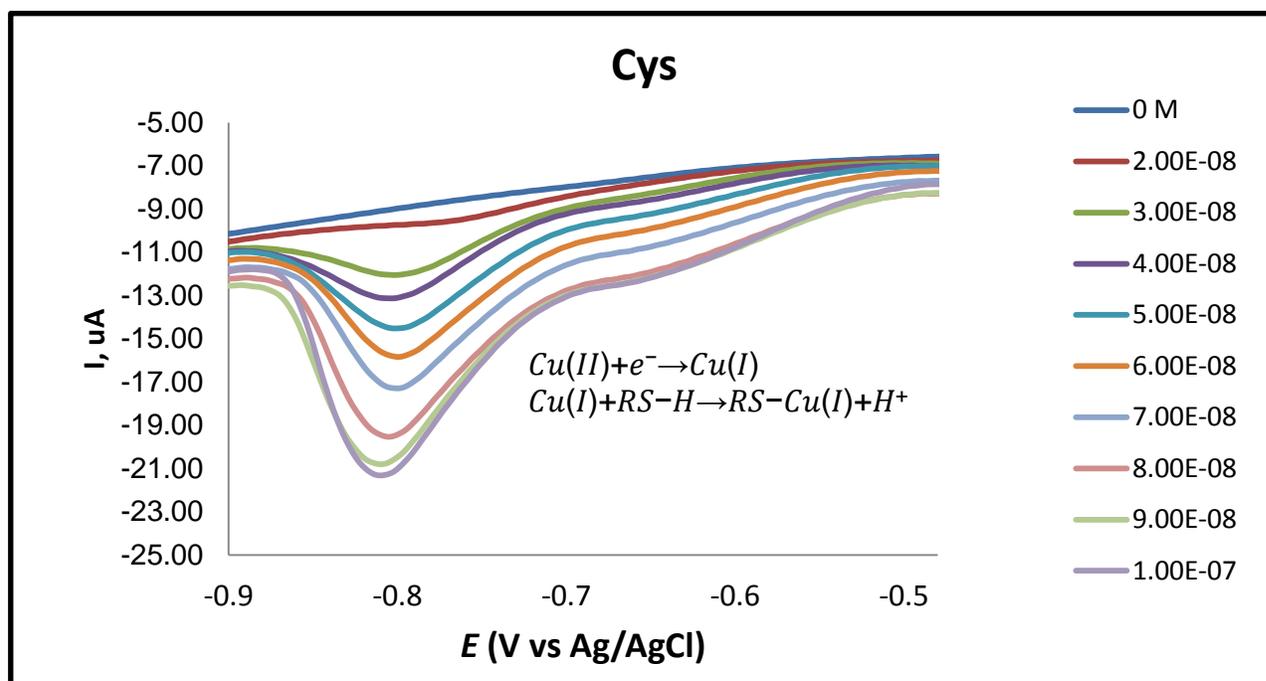


Figura 3.11 Voltamperograma de redisolución catódica (CSV) para Cys.

Finalmente, en la **figura 3.12** se muestra la curva de calibración.

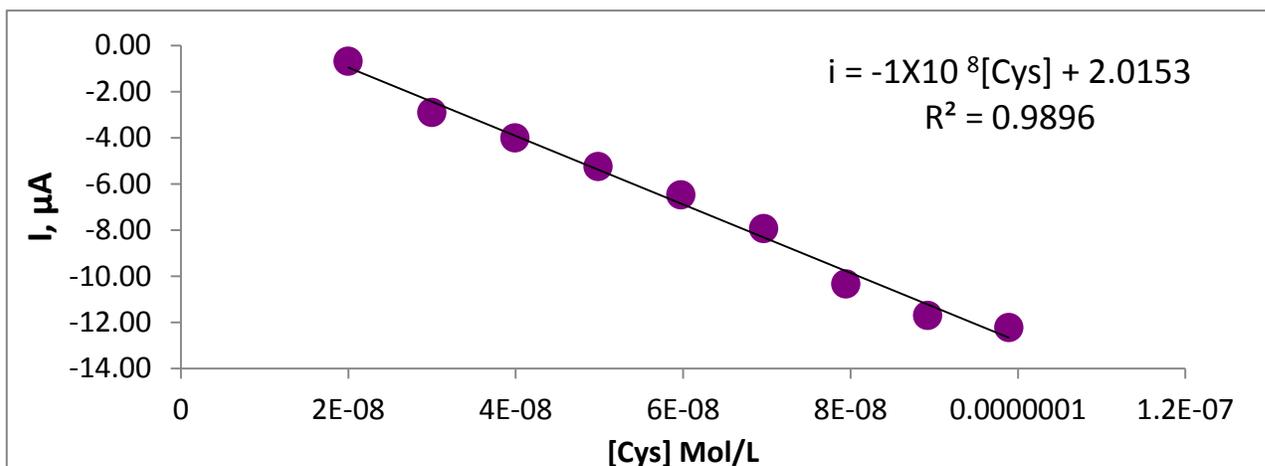


Figura 3.12 Curva de calibración de Cys.

3.7 Determinación de Fitoquelatinas (PCs) en muestras reales

Al finalizar y obtener la curva de la Cys el paso siguiente fue adicionar los estándares de fitoquelatinas 3 y 4 en la gráfica 3.9 se muestra la curva de los controles.

En la **figura 3.13** se muestra el voltamperograma de redisolución catódica (CSV) para PC3.

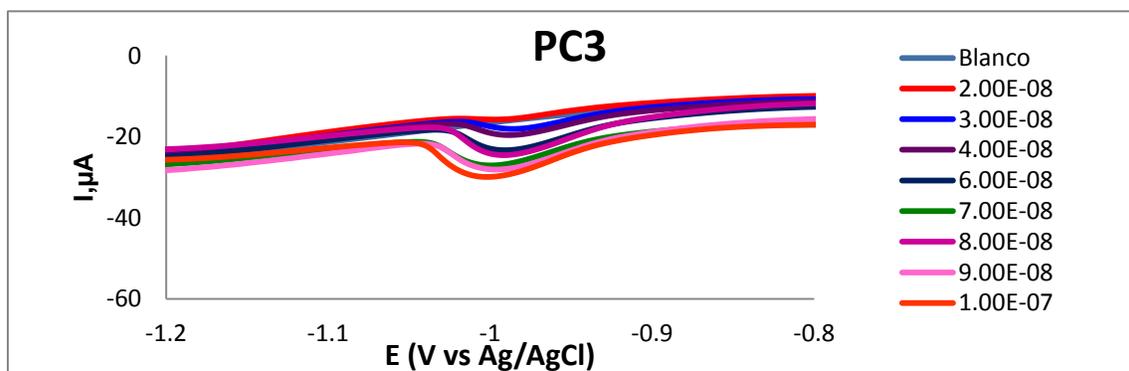


Figura 3.13 Voltamperograma de redisolución catódica (CSV) para PC3.

Posteriormente en la **figura 3.14** se presenta la curva de calibración de PC3.

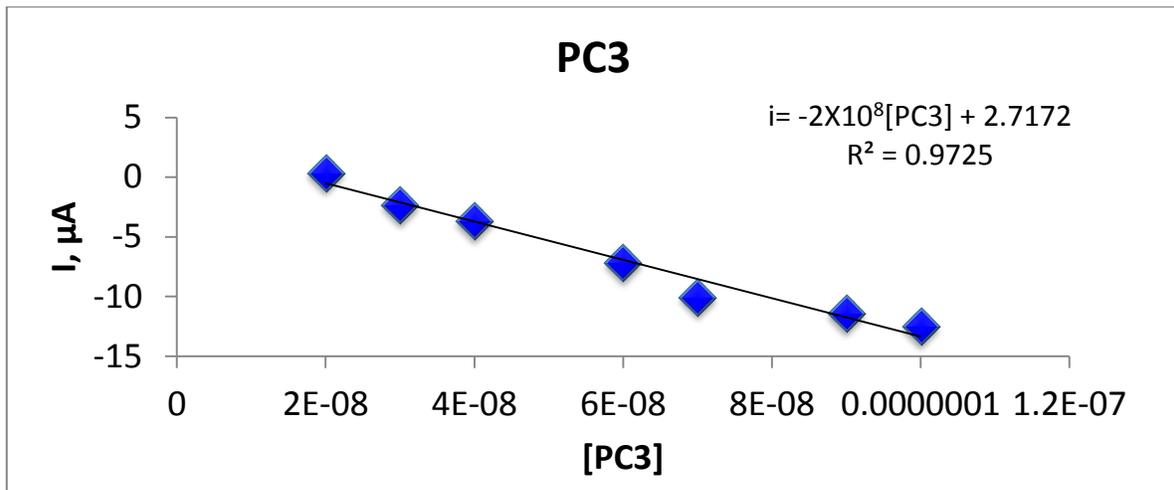


Figura 3.14 Curva de calibración de PC3.

En la **figura 3.15** y **3.16** se puede observar el voltamperograma de redisolución catódica (CSV) y la curva de calibración del estándar PC4.

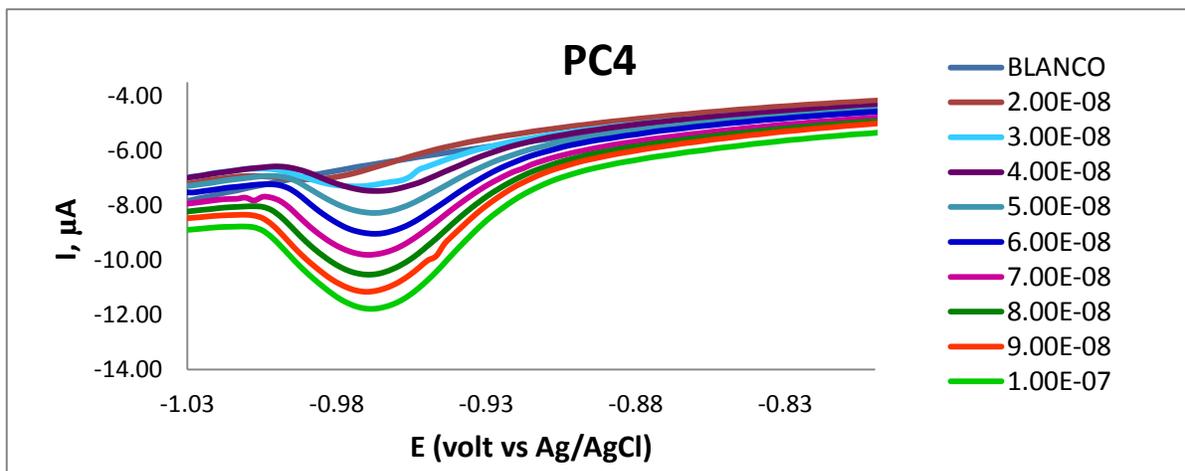


Figura 3.15 Voltamperograma de redisolución catódica (CSV) para PC4.

En la siguiente **figura 3.16** se presenta la curva de calibración de la PC4.

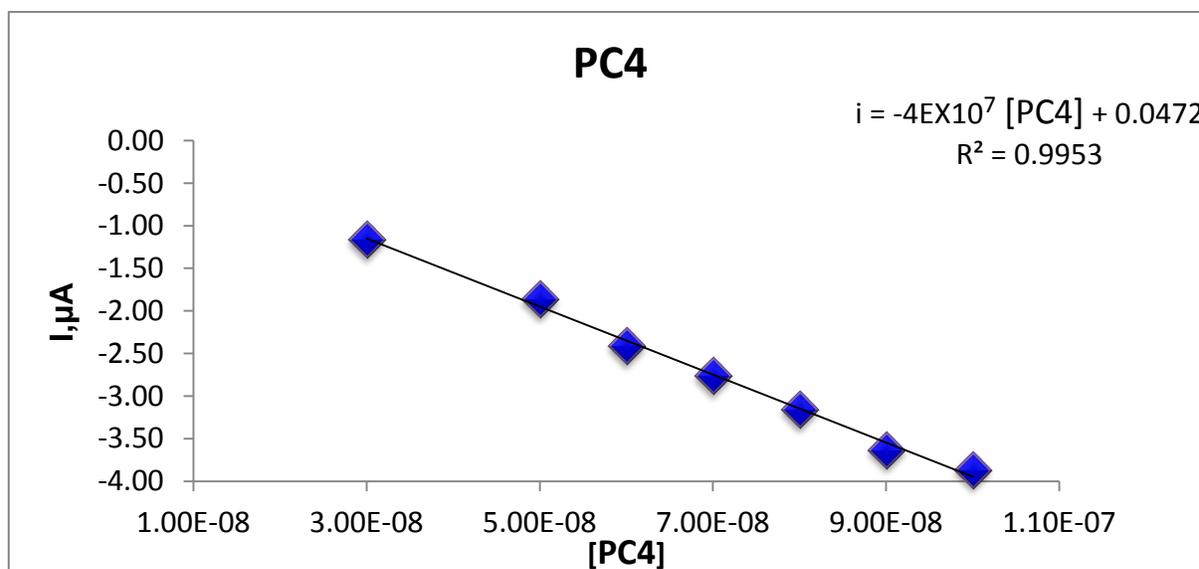


Figura 3.16 Curva de calibración de PC4.

Los resultados obtenidos en cada muestra se presentan a continuación, se corrieron las muestras con los estándares PC3 y PC4, y se encontró fitoquelatina 4 en cuatro muestras de las especie *Fabronia ciliaris* y *Syntrichia amphidiacea*.

Tabla 3.42 Concentraciones de PC4 en tejidos de musgo

Sitio	Especie	PC4 (g/kg)	PC4 (M)
Reforma	<i>Fabronia ciliaris</i>	0.02823	6.2336×10^{-7}
Santín	<i>Fabronia ciliaris</i>	0.02342	5.1725×10^{-7}
La Pilita	<i>Fabronia ciliaris</i>	0.03386	7.476×10^{-7}
Hípico	<i>Syntrichia amphidiacea</i>	0.03597	7.9413×10^{-7}

g/kg: gramos/ kilogramo M: molar (mol/L)

El orden encontrado es: P. Hípico > P. La Pilita > P. Reforma > Santín

Fabronia ciliaris > *Syntrichia amphidiacea*

En la **figura 3.17** se observa que la muestra P. Reforma presenta un potencial de -0.71V y la PC4 de -0.73V y hay un crecimiento de intensidad en este potencial lo que indica la presencia de PC4.

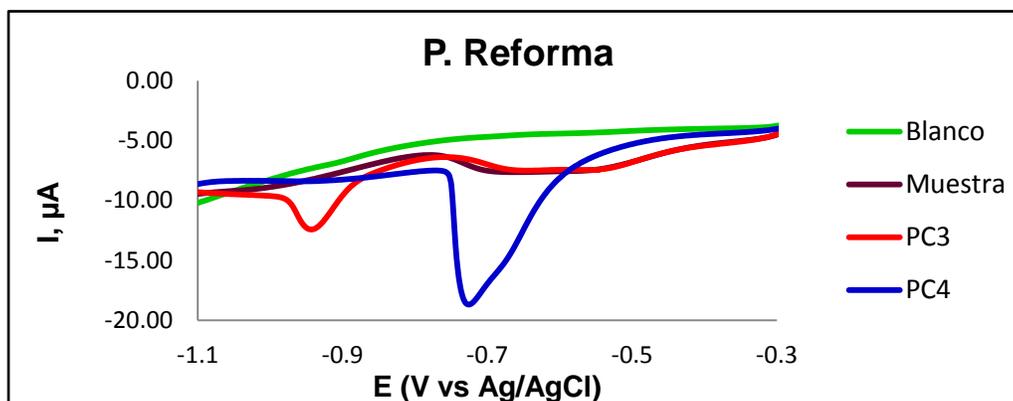


Figura 3.17 CSV de la muestra P. Reforma (*Fabronia ciliaris*) + PC3 y PC4.

En la **figura 3.18** la muestra Santín presenta un potencial de -0.69V y la PC4 de -0.73V y hay un crecimiento de intensidad en este potencial lo que indica la presencia de PC4.

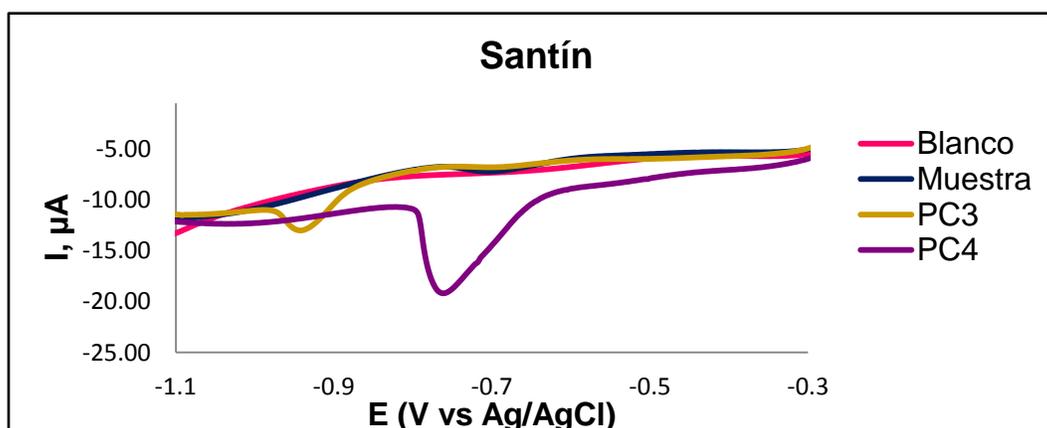


Figura 3.18 CSV de la muestra Santín (*Fabronia ciliaris*) + PC3 y PC4.

En la **figura 3.19** la muestra P. La Pilita presenta un potencial de -0.69V y la PC4 de -0.73V y hay un crecimiento de intensidad en este potencial lo que indica la presencia de PC4.

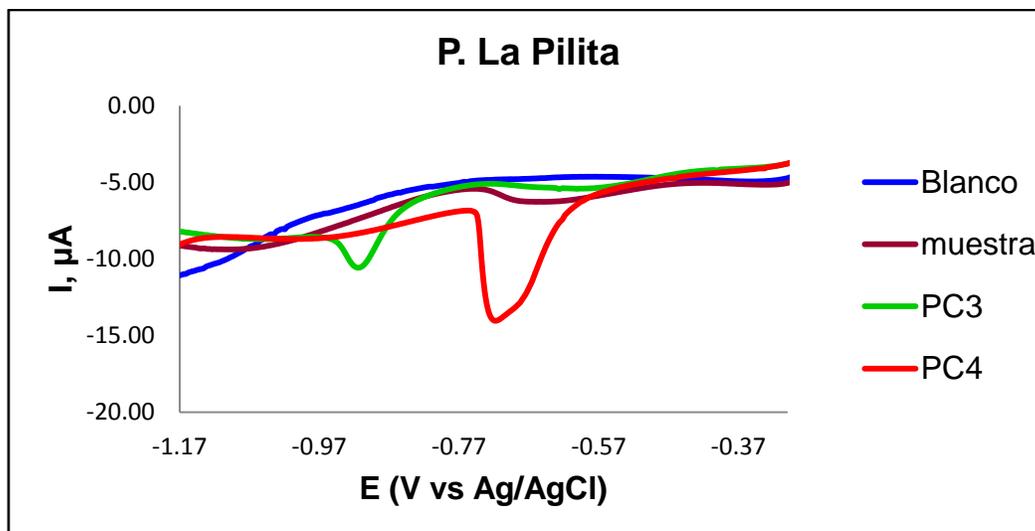


Figura 3.19 CSV de la muestra P. La Pilita (*Fabronia ciliaris*) + PC3 y PC4

En la **figura 3.20** la muestra P. Hípico presenta un potencial de -0.67V y la PC4 de -0.68V y hay un crecimiento de intensidad en este potencial lo que indica la presencia de PC4.

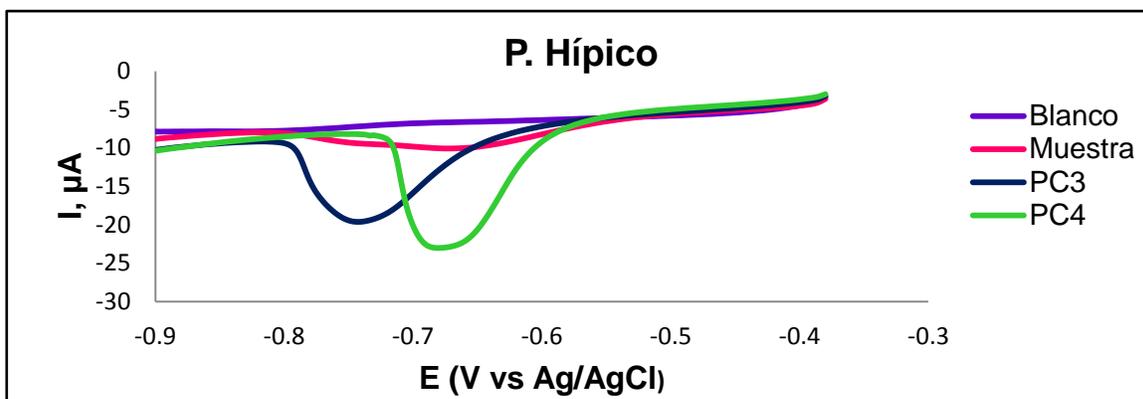


Figura 3.20 CSV de la muestra P. Hípico (*Syntrichia amphidiacea*) + PC3 y PC4.

La **tabla 3.43** muestra los sitios y especie que no presentaron PC3 y PC4.

Tabla 3.43 sitios y especies que no presentan PCs

Sitio	Especie
Tollocan	<i>Fabronia ciliaris</i>
P. Hípico	<i>Fabronia ciliaris</i>
Tollocan	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
P. Reforma	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
P. F. Negrete	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
Santín	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
P. Alameda	<i>Leskea angustata</i>
P. F. Negrete	<i>Leskea angustata</i>
P. Cacalomacán	<i>Leskea angustata</i>

El límite de detección de la técnica voltamperométrica es de 6.24×10^{-8} M. Para la fitoquelatina 3 (PC3) no hubo ninguna muestra que fuera detectada y por lo tanto fue menor al LD. Las gráficas se muestran en anexo B1.

3.8 Correlación entre fitoquelatinas PC4 y metales

A continuación se muestra un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre PC4 y los 5 metales analizados (Cd, Cu, Ni, y Pb). La ecuación del modelo ajustado es:

$$PC4 = 0.035515 - 0.00328238 \text{ Cd} - 0.0000919548 \text{ Cu} + 0.000384004 \text{ Ni} + 0.00000437441 \text{ Zn} - 0.0000940749 \text{ Pb}$$

Se muestra el análisis de varianza en la tabla **3.44** (ANOVA), donde indica que el valor P es inferior a 0,05 esto muestra que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables al nivel de confianza del 95%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo obtenido explica el 99.9735% de la variabilidad en PC4.

El valor de R^2 es de 99.9735% y el Error estándar de 0.000159735

Tabla 3.44 Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	P-Valor
Modelo	0.000192546	0.0007
Residuo	5.10304E-8	
Total (Corr.)	0.000192597	

3.9 Comparación de resultados

Pawlik *et al.*, (2002) realizó un estudio con lique de la especie *Physcia adscendens* la cual la expuso a diferentes concentraciones de Cd, Pb y Zn por 24 horas, teniendo como resultado la formación de PC2, PC3 y PC4:

Tabla 3.45 Concentraciones de PC2, PC3 y PC4 para liquen *Physcia adscendens*

<i>Physcia adscendens</i>	μM	PC2 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	PC3 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	PC4 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Cd	18	56	40	14
	36	103	75	38
Zn	18	12	4	5
	36	11	4	53
Pb	18	16	3	6
	36	18	2	4

Para el caso de la presente investigación, la relación que existe con el estudio de Pawlik *et al.*, (2002), es la formación de PC4 estando presentes estos 3 metales. Se encontró que las concentraciones de Zn y Pb fueron de las más altas en las especies *Syntrichia amphidiacea* y *Fabronia ciliaris* y basando los resultados en lo reportado se puede decir que los metales Pb, Zn y Cd inducen la formación de PC4.

Tabla 3.46 Concentraciones de PC4 para tejido de musgo

Hípico (<i>Syntrichia amphidiacea</i>)	Reforma (<i>Fabronia ciliaris</i>)	Santín (<i>Fabronia ciliaris</i>)	La Pilita (<i>Fabronia ciliaris</i>)
PC4($\mu\text{g}/\text{mg}$)	PC4($\mu\text{g}/\text{mg}$)	PC4($\mu\text{g}/\text{mg}$)	PC4($\mu\text{g}/\text{mg}$)
28.23	23.42	33.86	35.97

CONCLUSIONES

Se implementó la técnica de reducción asociada con la formación del complejo de Cu (I) -SR. La activación de la fusión era necesaria para el desarrollo electroquímico, mostrando buenos resultados en la formación de complejos de Cu-SR.

La concentración de metales para la especie *Leskea angustata* se comportó como: Zn > Pb > Ni > Cd, para la especie *Syntrichia amphidiacea*: Zn > Pb > Cu > Ni > Cd y finalmente para la especie: *Fabronia ciliaris* Zn > Pb > Cu > Ni.

Las especies especie *Syntrichia amphidiacea* y *Fabronia ciliaris* son las especies que se consideran como bioacumuladores eficientes en base al factor de bioacumulación.

Las diferencias significativas son debido al tipo de especie y a las concentraciones encontradas en cada sitio.

Los bioindicadores responden a la contaminación por alteración de su fisiología o su capacidad de acumular elementos. La respuesta de cada sistema es influenciada por las condiciones físicas de la atmósfera (temperatura, humedad, vientos y radiación).

La PC4 está estadísticamente asociada con la presencia de los metales Cu, Cd, Ni, Zn y Pb en los tejidos del musgo.

Los resultados indican que el uso de los musgos como bioindicadores de la contaminación atmosférica es un procedimiento viable para evaluar la contaminación atmosférica ya que los musgos se han utilizado como biomonitores de la contaminación del aire debido a que son altamente dependientes de las fuentes atmosféricas ya que acumulan elementos a través de toda su superficie.

RECOMENDACIONES

Analizar el glutatión para musgos, puesto que en la literatura mencionan que en algunas especies de briofitas el glutatión va disminuyendo conforme aumenta la concentración de metales y en otras briofitas aumenta la concentración. Evaluar a que se debe estos cambios ya que el glutatión es el antecesor de las fitoquelatinas.

Implementar un cultivo de *Fabronia ciliaris* y *Syntrichia amphidiacea* exponiéndolas al ambiente y así controlar el tiempo y saber a qué tiempo empezamos a observar la presencia de fitoquelatinas

REFERENCIAS

- Achterberg, E. P., Barriada, J. L. and Braungardt, C. B. (2005) Cathodic Stripping Voltammetry In: Encyclopedia of Analytical Science. , ed. by Worsfold, P. J., Townsend, A. and Poole, C. F. Elsevier, pp. 203-212. 2. ISBN 978-0-12-369397-6
- Aničić, M., Tasić, M., Frontasyeva, M., Tomašević, M., Rajšić, S., Strelkova, L. P., Steinnes, E. (2009). Active biomonitoring with wet and dry moss:a case study in an urban area. *Environ Chem Lett*(7), 55-60.
- Aksoy, A., Sahin, U., and Duman, F. (2000). "Robinia pseudo-acacia L. as a possible biomonitor of heavy metal pollution in Kayseri,"*Turkish Journal of Botany* 24(5), 279-284.
- Borowiak, K., Zbierska, J., Barańkiewicz, D., Hanć, A., Budka, A., Kayzer, D., y Kawala, A. (2014). Biomonitoring of Air Pollution by Trace Elements Using Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* L. 'Lema'). *Polish Journal Of Environmental Studies*, 23(3), 681-688.
- Capo Martí, Miguel Andrés. (2007). *Principios de Ecotoxicología*. España: Tébar, (2) ,141-145.
- Casas, J., y Sordo, J. (2006). *Lead: Chemistry, analytical aspects, environmental impact and health effects* Vol. 1. Amsterdam: Elsevier. 159-164.
- Cases A. M. Valcárcel Gómez Hens *Técnicas analíticas de separación* España: Reverté, (2001). (6) 99-107.

- Castillo, Morales Gabriela. (2012). Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (1), 23-24.
- Castillo Rodríguez, F., Roldan Ruíz, M. D., Blasco Plá, R., Huertas Romero, M. J., Caballero Domínguez, F. J., Moreno, C., y Martínez Luque, M. (2005). Biotecnología Ambiental. Madrid Ed. TÉBAR.
- Cisneros Jiménez, Blanca. (2005). Contaminación ambiental en México. México: LIMUSA, 2005. 56.
- Clemens, S. (2008). Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology*(163), 319- 332.
- Coelho, Rui Jorge. 2012. Complicación de iones metálicos con mezclas de fitoquelatinas sus fragmentos y selenio-cistina. Barcelona: UB, 2012. 20-23.
- Dal Corso, G., Farinati, S., Maistri, S., Maistri , S., y Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *J. Integer. Plant*, 50(10), 1268-1280.
- De Garmo, P., Temple Black, J., y Kohser, R. (2011). Materiales y procesos de fabricación 2(1). España: Reverté.121-123.
- De Vries, W., Lofts, S., Tipping, E., Meili, M., Groenenberg, J.E., Schütze, G., 2002. Impact of soil properties on critical concentrations of cadmium, lead, copper, zinc, and mercury in soil and soil solution in view of ecotoxicological effects. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 191, 47–89.
- Depledge M, Aagard A, Gyorkos P (1995) Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological biomarkers. *Mar.Pollut. Bull.* 21: 19-27.

- Delgadillo Moya, C. (2012). Biodiversidad de Bryophyta (musgos) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* (85): 100-105.
- Delgadillo Moya, C. y A. Cárdenas S. (2000). Urban mosses in Mexico City. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica 71: 63-72.
- Devlin, Thomas M. 2004. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4°. Buenos Aires. 803-807.
- Domènech, X., y Peral, J. (2006). *Química ambiental de sistemas terrestres* (2). España: Reverté.
- Durán D. A. 1993. *Evaluación biológica de los efectos de la contaminación atmosférica en la Ciudad de México*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 54.
- Estévez Álvarez, J., Montero Álvarez, A., López Sánchez, D., Pupo González, I., Hernández Torres, D., Pérez Arriba, O., Wolterbeek, B. (2011). Biomonitorio de la contaminación atmosférica en La Habana durante la campaña 2004-2005. (Spanish). *Nucleus*, (50), 18-23
- Fajuke , A. A. (2010). Desiccation stress in mosses. *Not Sci Biol*, 2(1), 40-42.
- Ferrat L, Pergent-Martini C, Romeo M (2003) Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to sea grasses. *Aq. Tox.* 65: 187-204.
- Gil Vargas, P., 2012. Análisis de Cr, Cd, Zn y Pb en tejidos de musgos de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca a través de espectrofotometría de absorción atómica. Toluca: ITT.35 – 58.
- Grzam, A., Tennsted, P., Clemens, S., Hell, R., y Meyer, A. J. (2006). Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible

degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase. Federation of European Biochemical Societies., 580, 6384–6390.

- González Mendoza, D., Zapata Pérez, O. (2008). Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Redalyc* (82), 53-61.
- Harmens, H., Norris, D.A., Koerbe, G.R., Buse, A., Steinnes, E., Rühling, A., 2008. Temporal trends (1990-2000) in the concentration of cadmium, lead and mercury in mosses across Europe. *Environmental Pollution* 151, 368-376.
- Hirata, K., Tsuji, N., y Miyamoto, K. (2005). Biosynthetic Regulation of Phytochelatins, Heavy Metal-Binding Peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(6), 593–599.
- Hui-Ping, D., Chan-Juan, S., Genliang, J., Chao, L., Tu-Xi, Y., & An-Zhi, W. (2013). Cadmium detoxification in *Populus x canescens*. *Turkish Journal Of Botany*, 37(5), 950-955.
- Inohue, M. (2005). Phytochelatins. *Toxic metals in plants*, 17(1), 65-78.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). 2005. Guía de elaboración y usos de inventarios de emisiones. 3. México;SEMARNAT, 2005. págs. 45-46.
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), 2014. Gestión de Calidad del Aire en México. SEMARNAT, México.
- INEGI. (2010). Información nacional por entidad federativa y municipios. Recuperado el 10 de Septiembre de 2014, de <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/>

- Izosimova, A., (2005). Modelling the interaction between calcium and nickel in the soil–plant system. *FAL Agricultural Research* 288, 99.
- Kathryn M. Conko, Kare C. Rice, Margaret M. Kennedy. 2004. Atmospheric wet deposition of trace elements to a suburban environment, Reston, Virginia, USA. 38:4025-4033.
- Lee, S., y Kang, S. B. (2005). Phytochelatin Is Not a Primary Factor in Determining Copper Tolerance. *Journal of Plant Biology*, 48(1), 32-38.
- Leinenweber, G., Stegen, S., y Díaz Palma, P. (2009). Increase of total glutathione as a response to Cd induced stress in Chilean endemic bryophytes (*Thuidium* sp). *J. Chil. Chem. Soc.*, 54(4), 401-404.
- López, Y., Sobrinho, N., Arias, M., Carmenate, R., y Magalhães, M. (2012). Contenido de elementos metálicos en suelos característicos del municipio San José de las Lajas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 21(1), 43-46.
- Miller, James M. 2005. *Chromatography; Concepts and Contrasts*. New Jersey: Wiley Interscience. 412-414. Vol. 2.
- Momani, K., Jiries, A., Jaradat, Q. (2000). Atmospheric deposition of Pb, Zn, Cu and Cd in Amman, Jordan. *Turk. J.chem.* 24, 231.
- Moustakas, N. K., Akoumianaki, A., y Barouchas, P. E. (2011). The effects of cadmium and zinc interactions on the concentration of cadmium and zinc in pot marigold. *Australian Journal of Crop Science*, 5(3), 277-282.
- Mulgrew A. and Williams P. (2000). *Biomonitoring of Air Quality Using Plants*. WHO Collaborating Centre for Air Quality Management and Air Pollution Control. Berlin, Alemania. 165.

- Navarro-Aviño, J., Aguilar Alonso, I., y López Moya, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2), 10-25.
- Naszradi, T. T., Badacsonyi, A. A., Németh, N. N., Tuba, Z. Z., y Batič, F. F. (2004). Zinc, Lead and Cadmium Content in Meadow Plants and Mosses Along the M3 Motorway (Hungary). *Journal Of Atmospheric Chemistry*, 49(1-3), 593-603.
- Nikolai, S. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Bogotá: CYTED.159-179.
- Pawlik-Skowrońska, B., di Toppi, L. S., Favali, M. A., Fossati, F., Pirszel, J., & Skowroński, T. (2002). Lichens respond to heavy metals by phytochelatin synthesis. *New Phytologist*, 156(1), 95-102
- Peña Salamanca, E. J., Ospina Álvarez, N., y Palacios Peñaranda, M. L. (2005). Algas com oindicadoras de contaminación. Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- Pernía, B., De Sousa, A., Reyes, R., y Castrillo, M. (2008). Biomarcadores de contaminación en las plantas. *INTERCIENCIA*, 33(2), 112-116.
- Pingarrón Carrazón José M y Sánchez Batanero Pedro (1999) Química electroanalítico. (2): págs. 260, 261, 285,291.
- Pinilla A., G. A. (1998). Indicadores Biológicos en ecosistemas acuáticos continentales de Colombia. Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá.
- Porta, A. A., Caffini, N., y Ramírez, S. (2009). Fitoquelatinas y péptidos relacionados. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 18(1).
- Princeton Applied Research. (2014). *Basics of Voltammetry and Polarography*. noteP-2, Illinois.1-9.

- Purves, William H, David Sadava, H. Craig Heller , Gordon Orians, y David Hillis: *Life:The Science of Biology* (2009). Buenos Aires: Médica Panamericana S.A., 8 (3). págs. 623-625.
- Romero Guzmán, E. T., Reyes Gutiérrez, L. R., y Sandoval Pérez, A. (2012). Morphological and chemical characteristics of atmospheric particles in the Metropolitan Zone of Toluca. *Chemistry and Ecology*, 28(6), 574-588.
- Rodríguez Serrano, M., Martínez de la Casa, N., Romero Puertas, M. C., del Río, L. A., y Sandalio, L. M. (2008). Toxicidad del Cadmio en Plantas.136-146.
- Samecka-Cymerman, A., Kosior, G., and Kempers, A.J. (2006).Comparison of the moss *Pleuroziumschreberi* with needles and bark of *Pinussylvestris*,"*Ecotoxicol.Environ.* (65), 108-117.
- Sarrasague, M., Barrado , D., Zubillaga, M., Hager, A., De Paoli, T., y Boccio, J. (2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Bioquímica*, 45-51.
- Scragg. A (2005).*Environmental Biotechnology*. Oxford University Press, New York
- Secretaria de Salud (2001). NOM-026-SSA1-1993. Que establece el criterio para evaluar la calidad del aire con respecto al plomo (Pb). D.O.F Fecha de publicación 17 de Junio de 1994.
- Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2007). *Inventario de Emisiones de la Zona Metropolitana*. Gobierno del Estado de México , Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación Atmosférica , Toluca. 11-12.

- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (2012). Programa para Mejorar la Calidad del Aire del Valle de Toluca. Gobierno del Estado de México, Metepec, 23-34.
- Šaćiragić, S. (2011). *Taraxacum officinale* weber as heavy metal absorber in phytoremediation of agricultural land. *Herbologia*, 12(2), 89-98.
- Souza V, Bucio, Sánchez Y, López Y, Antuna BS, Rondán ZA, Gutiérrez MC (1996). Mecanismos básicos de toxicidad. Ed. Ciencia y Desarrollo, México 126 (1) 39-45.
- Olivares, B., Guevara, E., y Demey, R. (2012). Utilización de bioindicadores climáticos en sistemas de producción agrícola del estado de Anzoátegui Venezuela. *Ciencias del Agro y Mar*, 12(2), 136-145.
- Vázquez Silva, G., Castro Mejía, G., González Mora, I., Pérez Rodríguez, R., y Castro Barrera, T. (2006). Bioindicadores como herramientas para determinar 41-48.
- Villaseñor Llerena, María Jesús (1995). Métodos fotométricos y electroquímicos: Universidad de Castilla (40) 58-62.
- Wannaz E., Carreras H., Pérez C. A. and Pignata M. (2006). Assessment of heavy metal accumulation in two species of *Tillandsia* in relation to atmospheric emission sources in Argentina. *Science of the Total Environment* 361:267–278.
- Warne, M.S., Heemsbergen, D., Stevens, D., McLaughlin, M., Cozens, G., Whatmuff, M., Broos, K., Barry, G., Bell, M., Nash, D., Pritchard, D., Penney, N., (2008). Modeling the toxicity of copper and zinc salts to wheat in 14 soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 786–792.
- Xue Hai Ju, Shirong Tang, Yan Jia, Junkang Guo, Yongzhen Ding, y Zhengguo Song (2011). Determination and characterization of cysteine,

- glutathione and phytochelatins (PC2–6) in *Lolium perenne* L. exposed to Cd stress under ambient and elevated carbon dioxide using HPLC with fluorescence detection (879) 1717– 1724.
- Yadav, S. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* (76), 167-179.
 - Yang, X., He, Z., Peter J., S., y Ying, F. (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (18) 339-353.
 - Yosypchuk B, Sestakova. I y Novotny L. Voltammetric determination of phytochelatins using copper solid amalgam electrode [Publicación periódica] // *Talanta* (2002). (3)59, 1253-1258.
 - Zarazúa Ortega, G., Poblano Bata, J., Tejeda Vega, S., Ávila Pérez, P., Zepeda Gómez, C., Ortíz Oliveros, H., y Macedo Miranda G. (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*, 1-7.
 - Zepeda Gómez, C., Ávila Pérez , P., Díaz García, U. S., Alanís Martínez, Y., Zarazúa Ortega, G., y Amaya Chávez, A. (2013). Diversidad de musgos epifitos de la zona metropolitana del valle de Toluca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* (85), 108-124.
 - Zitka, O., Krystofova, O., Sobrova, P., Adam, V., Zehnalek, J., Beklova, M., (2011). Phytochelatin synthase activity as a marker of metal pollution. *Journal of Hazardous Materials* (192), 794-800.
 - Zoski, C. (2009). *Handbook of Electrochemistry*. Amsterdam: Elsevier (1)447

ANEXOS

ANEXOS

Tabla A1. Densidad de población en la ZMVT.

Municipios	Población	Superficie territorial (Km ²)	Densidad (Habitante/Km ²)
Almoloya de Juárez	147,653	483.8	305.2
Almoloya del Río	10,886	6.5	1,687.7
Atizapán	10,299	8.4	1,223.1
Calimaya	47,033	103.1	456.0
Capulhuac	34,101	21.5	1,586.0
Chapultepec	9,676	11.9	818.6
Lerma	134,799	228.6	589.5
Metepec	214,162	70.5	3,040.7
Mexicaltzingo	11,712	12.2	960
Ocoyoacac	61,805	134.8	458.8
Otzolotepec	78,146	128	610.7
Rayón	12,748	20.6	618.8
San Antonio la Isla	22,152	24.1	917.2
San Mateo Atenco	66,568	12.6	5,291.5
Temoaya	90,010	199.7	450.8
Tenango del Valle	77,965	208.9	373.2
Texcalyacac	5,111	17.9	284.1
Tianguistenco	70,682	121.6	581.6
Toluca	819,561	420.1	1,950.6
Xalatlaco	26,865	93.2	288.1
Xonacatlán	46,331	32.9	1,409.5
Zinacantepec	167,759	308.7	542.5
Total	2'166,024	2,669.6	811.3

Fuente: Instituto Nacional De Geografía, Estadística E Informática INEGI (2010).

Inventario De Emisiones De La Zona Metropolitana Del Valle De Toluca (2004).

Tabla A2. Lista de especies de musgos epifitos y su área de distribución geográfica. AD: amplia distribución, CAR: Caribe, END: endémico, MES: mesoamericano, NOR: norteamericano

Familia y especies	Distribución	Familia y especies	Distribución
Brachytheciaceae		<i>Leucodon</i> sp.	
<i>Brachythecium ruderale</i> (Brid.) W. R. Buck	AD	Neckeraceae	
Bryaceae		<i>Neckera</i> sp.	
<i>Brachymenium</i> sp.		Orthotrichaceae	
<i>Brachymenium systylium</i> (Müll. Hal.) A. Jaeger	AD	<i>*Orthotrichum aequatoreum</i> Mitt.	AD
<i>Bryum argenteum</i> Hedw.	AD	<i>*Orthotrichum diaphanum</i> Schrad. ex Brid.	AD
<i>Bryum billarderi</i> Schwägr.	AD	<i>Orthotrichum pycnophyllum</i> Schimp. ex Müll. Hal.	MES
<i>*Bryum procerum</i> Schimp.	MES	<i>Orthotrichum</i> sp.	
Cryphaeaceae		<i>*Zygodon obtusifolius</i> Hook.	AD
<i>Cryphaea patens</i> Hornsch.	CAR	Pottiaceae	
Dicranaceae		<i>Bryoerythrophyllum jamesonii</i> (Taylor) H. A. Crum	AD
<i>Campylopus pilifer</i> Brid.	AD	<i>Didymodon australasiae</i> (Hook. & Grev.) R. H. Zander	AD
<i>Symblepharis vaginata</i> (Hook.) Wijk & Margad.	AD	<i>Didymodon rigidulus</i> Hedw. var. <i>gracilis</i> (Schleich. ex Hook. Grev.) R.H. Zander	AD
Entodontaceae		<i>Didymodon rigidulus</i> Hedw. var. <i>icmadophilus</i> (Schimp. ex Müll. Hal.) R. H. Zander	AD
<i>Entodon abbreviatus</i> (Schimp.) A. Jaeger	END	<i>Didymodon rigidulus</i> var. <i>rigidulus</i> Hedw.	AD
Fabroniaceae		<i>Leptodontium flexifolium</i> (Dicks. ex With.) Hampe	AD
<i>Fabronia ciliaris</i> (Brid.) Brid.	AD	<i>Leptodontium viticulosoides</i> (P. Beauv.) Wijk & Margad.	AD
Fissidentaceae		<i>Rhexophyllum subnigrum</i> (Mitt.) Hilp.	MES
<i>*Fissidens angustelimbatus</i> Mitt.	AD	<i>Syntrichia amphidiacea</i> (Müll. Hal.) R. H. Zander	MES
Grimmiaceae		<i>Syntrichia fragilis</i> (Taylor) Ochyra	AD
<i>Grimmia trichophylla</i> Grev.	AD	<i>*Syntrichia pagorum</i> (Milde) Amann	AD
Hedwigiaceae		Sematophyllaceae	
<i>Hedwigidium integrifolium</i> (P. Beauv.) Dixon	AD	<i>Sematophyllum subpinnatum</i> (Brid.) E. Britton	AD
Hypnaceae		<i>*Sematophyllum subsimplex</i> (Hedw.) Mitt.	AD
<i>*Homomallium mexicanum</i> Cardot	NOR	Thuidiaceae	
<i>*Hypnum cupressiforme</i> Hedw. var. <i>cupressiforme</i>	AD	<i>Thuidium delicatulum</i> (Hedw.) Schimp.	AD
<i>Platygyriella pringlei</i> (Cardot) W. R. Buck	MES		
<i>Pylaisia falcata</i> Schimp.	AD		
Leskeaceae			
<i>Leskea angustata</i> Taylor	MES		
<i>*Rozea andrieuxii</i> (Müll. Hal.) Besch.	MES		
Leucodontaceae			

Fuente: (Zepeda *et al.*, 2013).

Tabla A 3. GSH contenido musgos después de 4, 7 y 12 días de exposición a 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ Cd (II) [$\mu\text{g} / \text{g}$]. Los valores son medias de tres repeticiones.

Days of exposure to Cd	4 days	7 days	12 days
$\mu\text{g GSH/g}$ of moss	0.16	6.25	11.25

Fuente: (Leinenweber *et al.*, 2009).

Tabla A4 Concentración de Cd para *Fabronia ciliaris*.

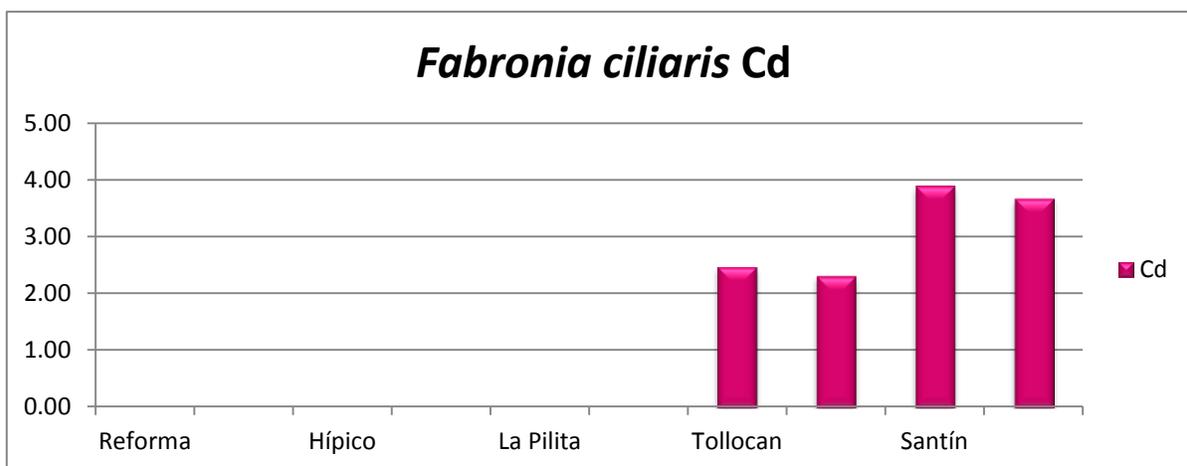


Tabla A5 Concentración de Cu en especie *Fabronia ciliaris*

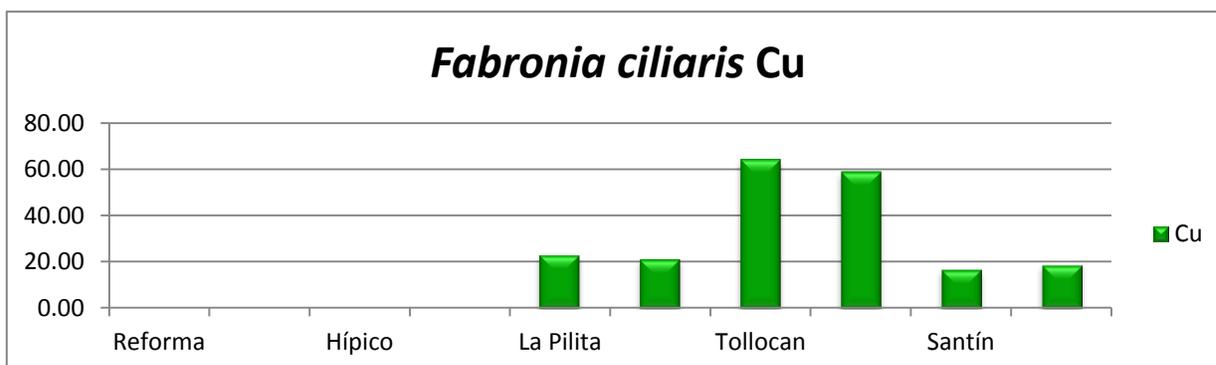


Tabla A6 Concentración de Ni en especie *Fabronia ciliaris*

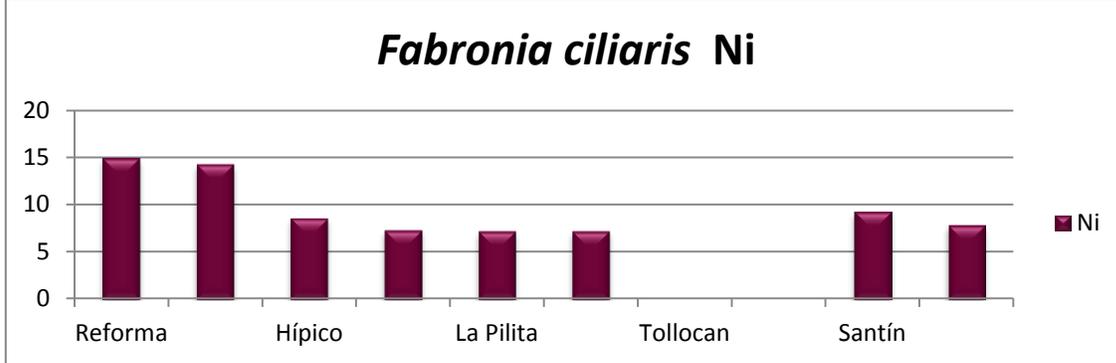


Tabla A7 Concentración de Ni en especie *Fabronia ciliaris*

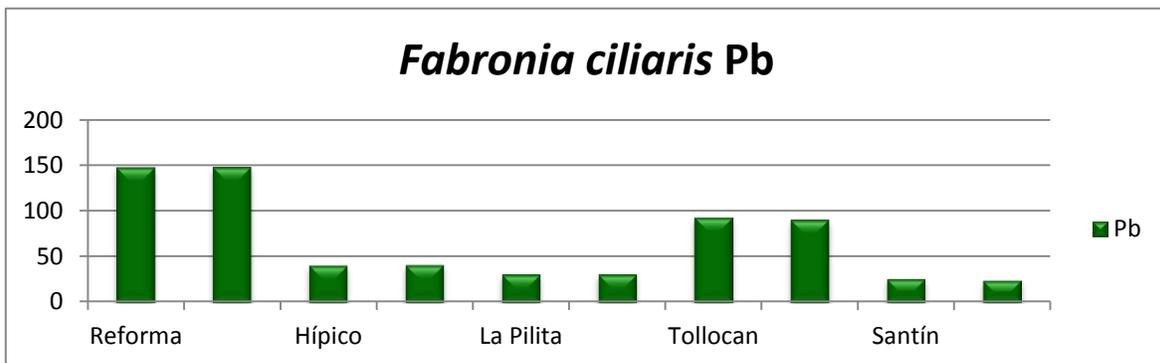


Tabla A8 Concentración de Zn en especie *Fabronia ciliaris*

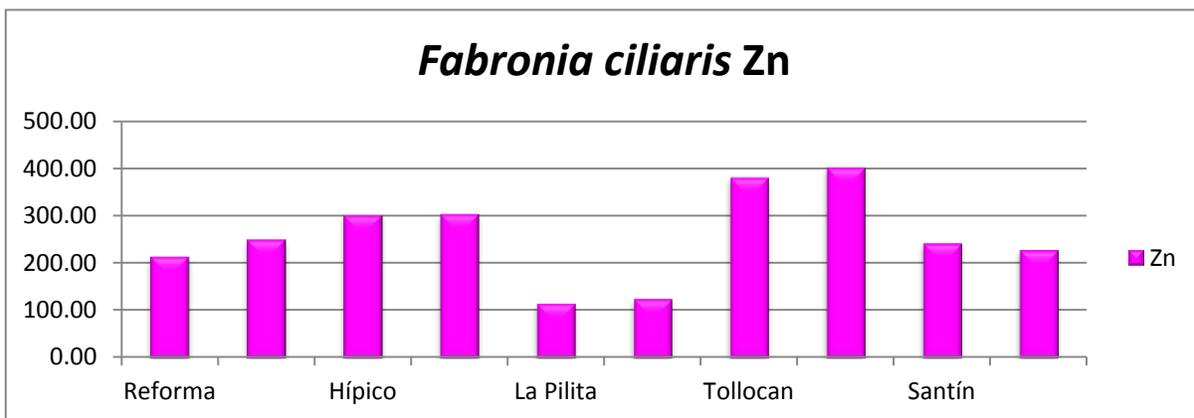


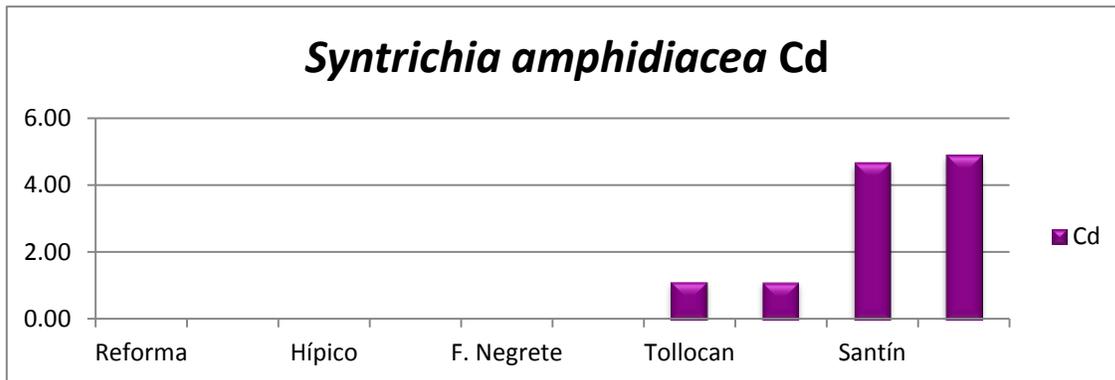
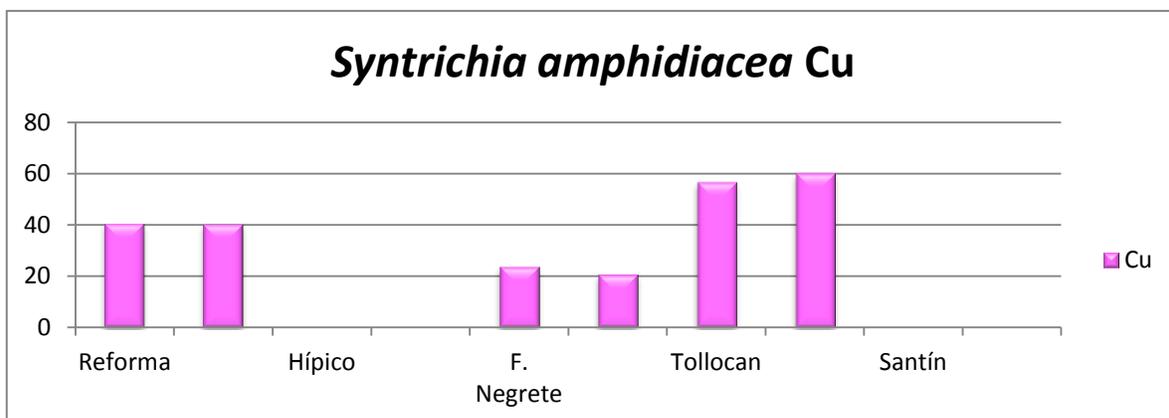
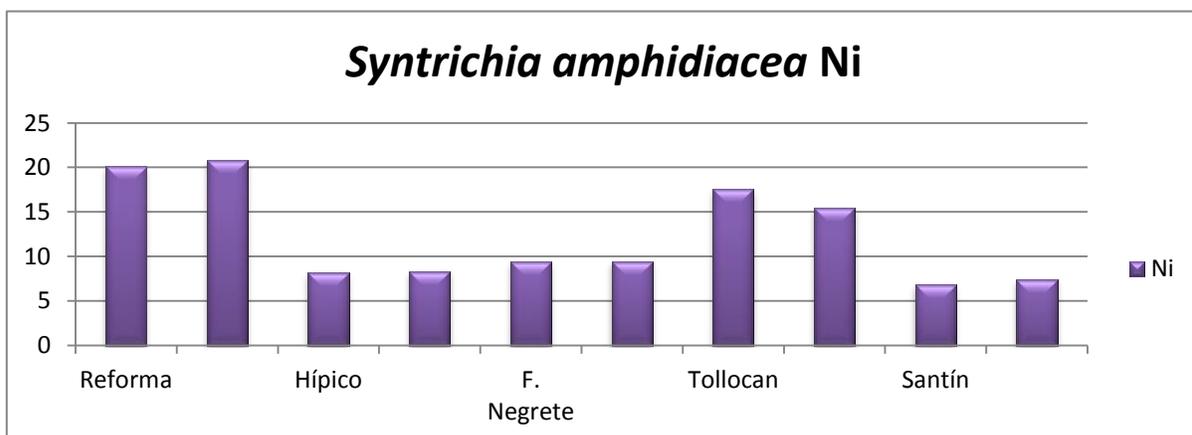
Tabla A9 Concentración de Cd en especie *Syntrichia amphidiacea*Tabla A10 Concentración de Cu en especie *Syntrichia amphidiacea*Tabla A11 Concentración de Ni en especie *Syntrichia amphidiacea*

Tabla A12 Concentración de Pb en especie *Syntrichia amphidiacea*

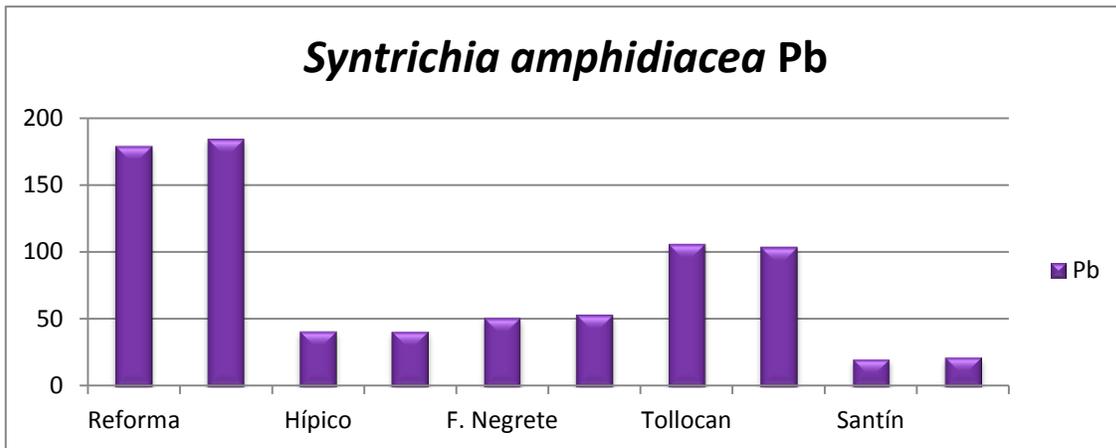


Tabla A13 Concentración de Zn en especie *Syntrichia amphidiacea*

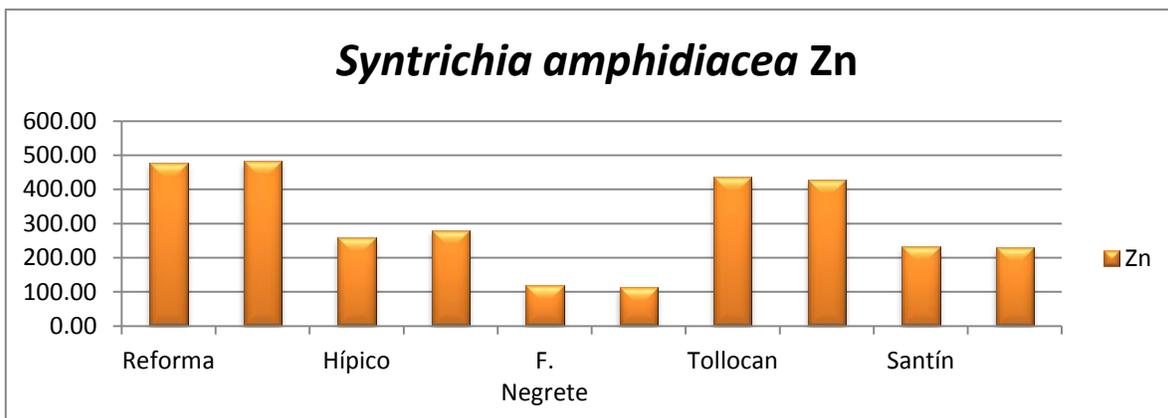


Tabla A14 Concentración de Ni en especie *Leskea angustata*

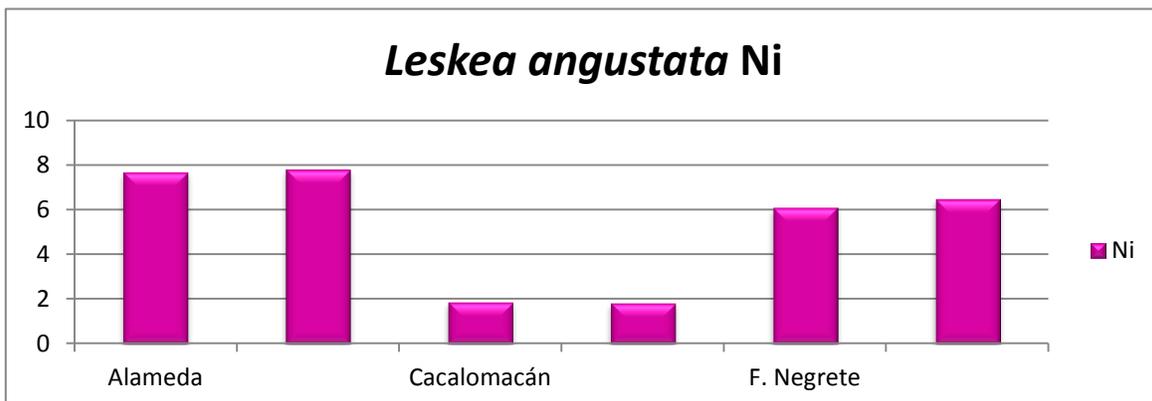


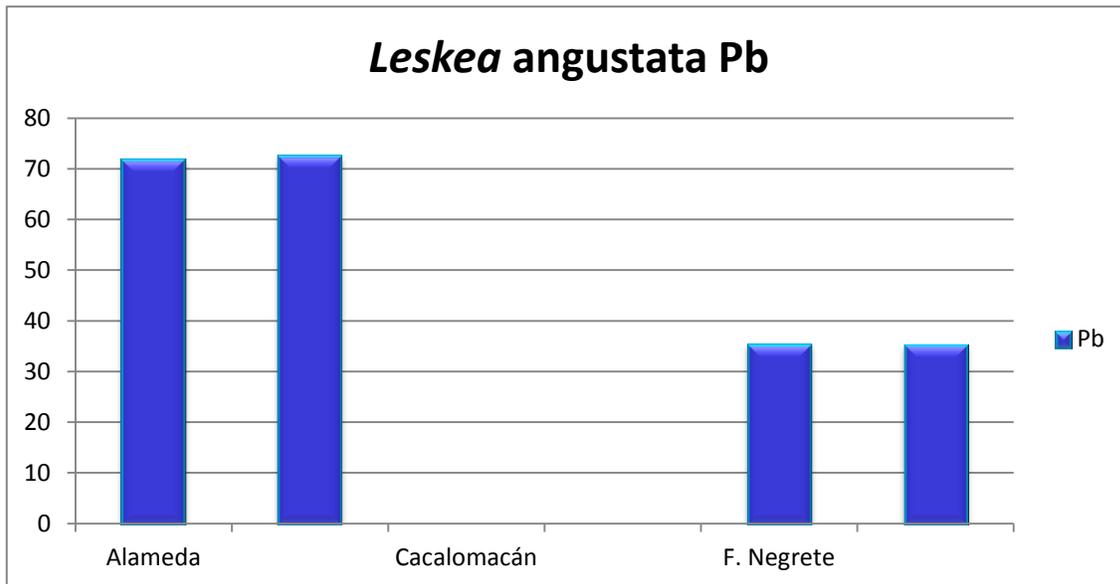
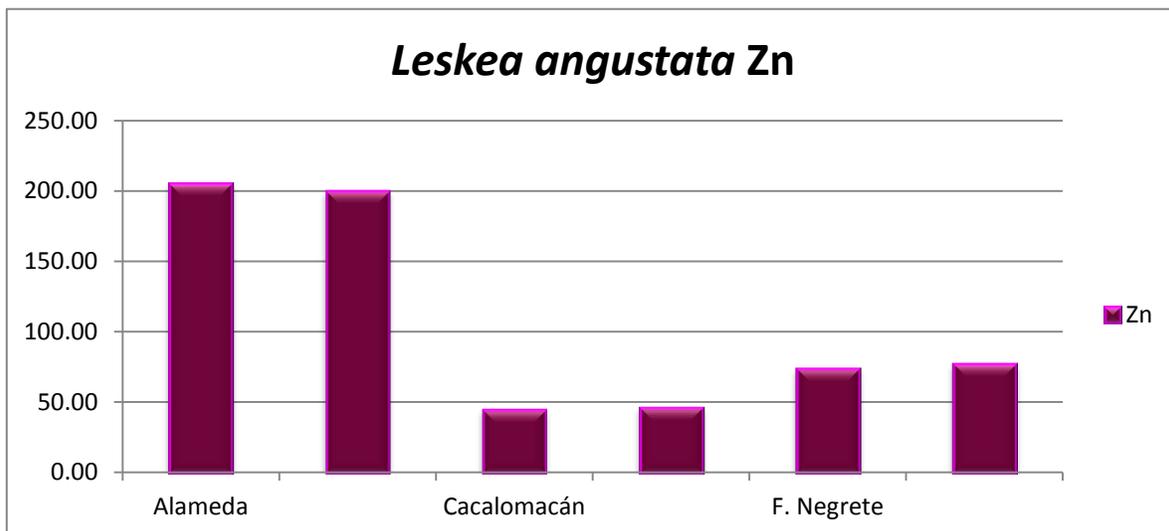
Tabla A15 Concentración de Pb en especie *Leskea angustata*Tabla A16 Concentración de Zn en especie *Leskea angustata*

Tabla B1 sitios y especies que no presentan PCs

Sitio	Especie
Tollocan	<i>Fabronia ciliaris</i>
P. Hípico	<i>Fabronia ciliaris</i>
Tollocan	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
P. Reforma	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
P. F. Negrete	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
Santín	<i>Syntrichia amphidiacea</i>
P. Alameda	<i>Leskea angustata</i>
P. F. Negrete	<i>Leskea angustata</i>
P. Cacalomacán	<i>Leskea angustata</i>

El voltamperograma del sitio Tollocan especie *Fabronia ciliaris*, el cual presenta una señal en el potencial $-0.613V$ esta señal se presume que es por la presencia de aminoácidos propios de la planta y las PC3 y PC4 presentan un potencial en $-0.943V$.

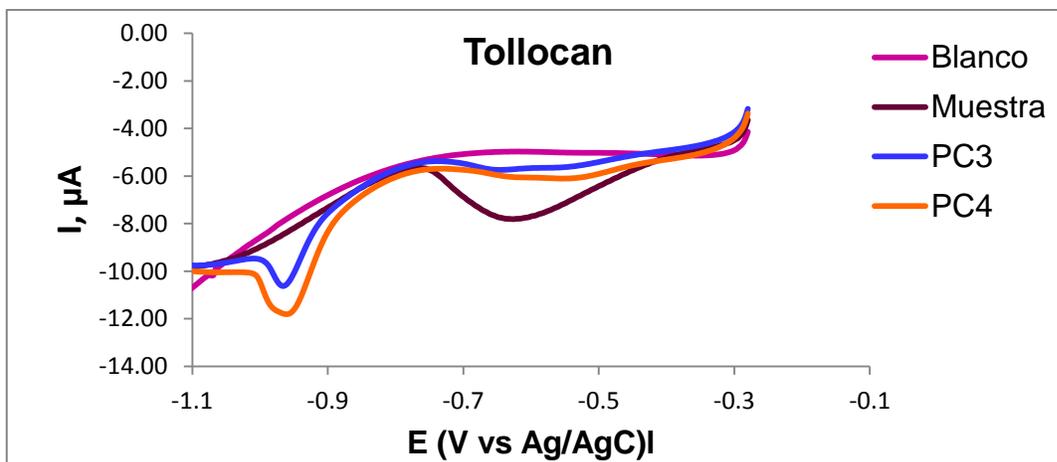


Figura B2 CSV de muestra Tollocan (*Fabronia ciliaris*) + PC3 y PC4.

El voltamperograma de la figura B3 es el sitio P. Hípico especie *Fabronia ciliaris*, el cual presenta una señal en el potencial -0.69V esta señal se presume que es por la presencia de aminoácidos propios de la planta y la PC3 tiene un potencial -0.99V de y PC4 de -0.98V .

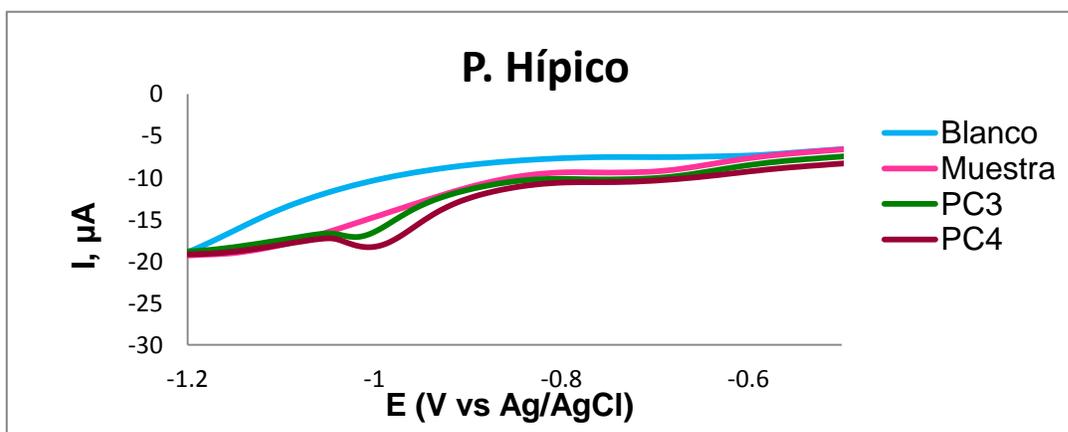


Figura B3 CSV de muestra P. Hípico (*Fabronia ciliaris*) + PC3 y PC4.

El voltamperograma de la figura B4 es el sitio Tollocan, especie *Syntrichia amphidiacea*, el cual no presenta señal y la PC3 en -0.726V y PC4 presenta un

potencial en -0.70V , lo cual indica que no existe la presencia de PCs en este sitio y especie.

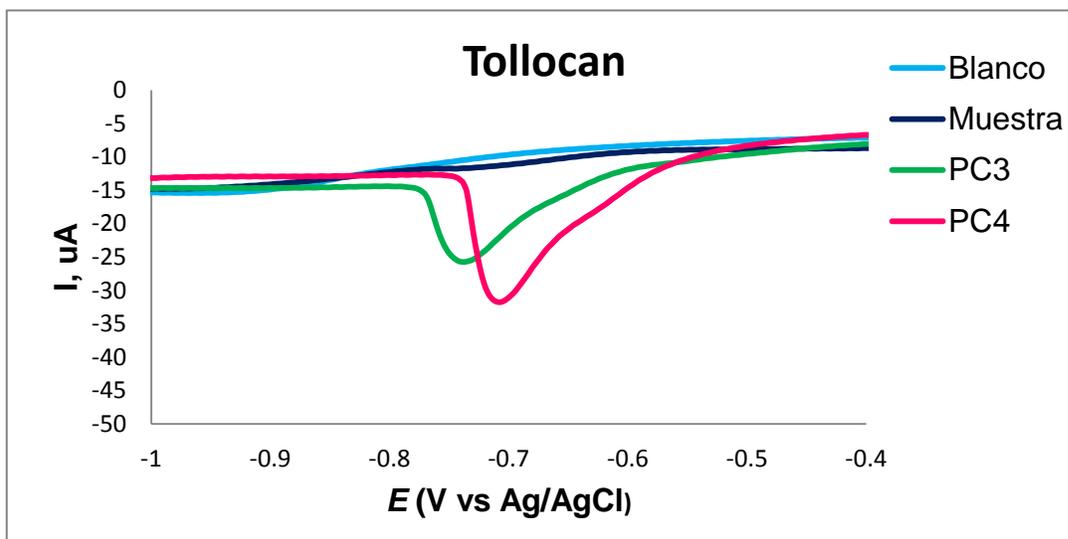


Figura B4 CSV de muestra Tollocan (*Syntrichia amphidiacea*) + PC3 y PC4.

El voltamperograma de la figura B5 es el sitio P. Reforma, especie *Syntrichia amphidiacea*, el cual no presenta señal, y las PC3 y PC4 presentan un potencial en -0.999V , lo cual indica que no existe la presencia de PCs en este sitio y especie.

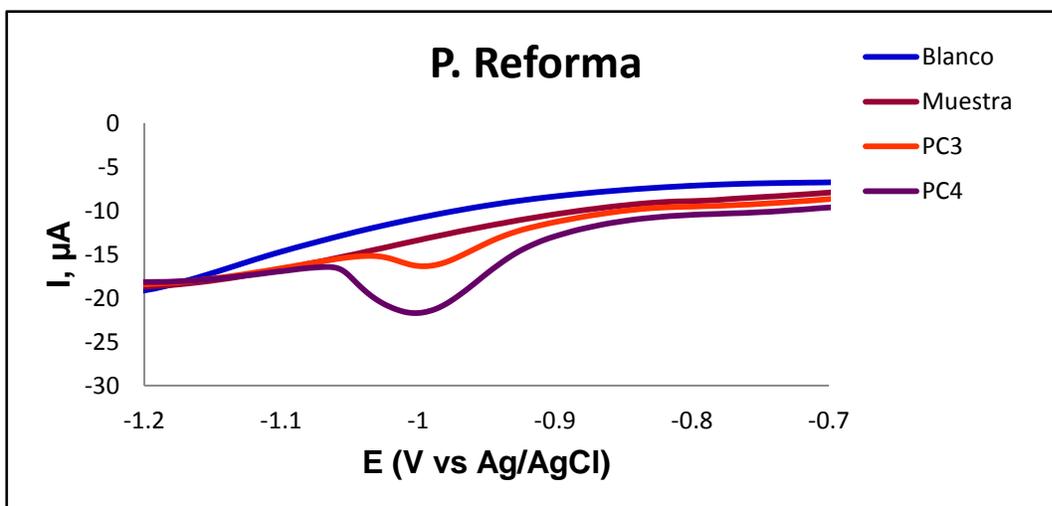


Figura B5 CSV de muestra P. Reforma (*Syntrichia amphidiacea*) + PC3 y PC4.

El voltamperograma de la figura B6 es el sitio P.F. Negrete especie *Syntrichia amphidiacea*, el cual presenta una señal en el potencial -0.749V esta señal se presume que es por la presencia de aminoácidos propios de la planta y la PC3 tiene un potencial -0.99V de y PC4 de -1.01V .

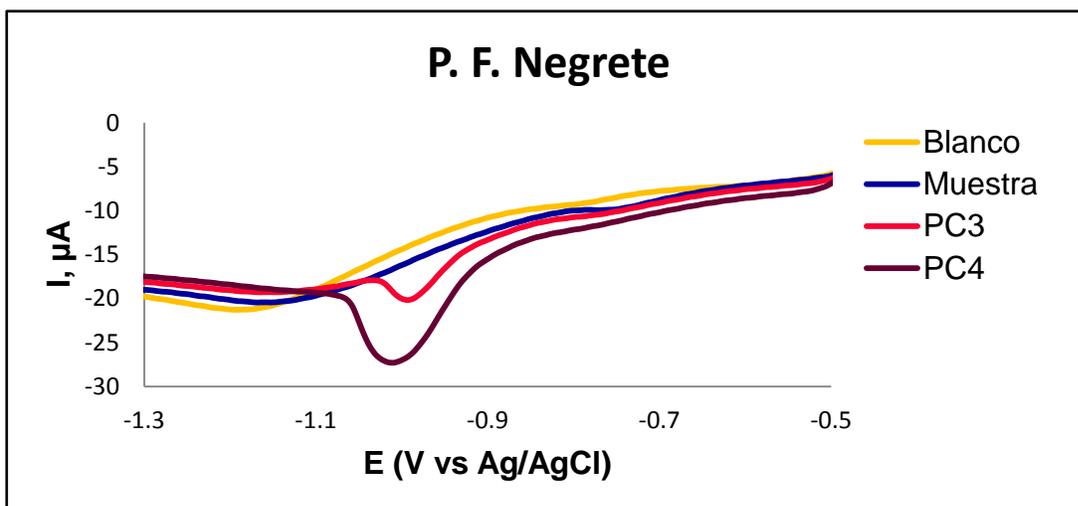


Figura B6 CSV de muestra P. F. Negrete (*Syntrichia amphidiacea*) + PC3 y PC4.

El voltamperograma de la figura B7 es el sitio Santín, especie *Syntrichia amphidiacea*, el cual no presenta señal, y las PC3 y PC4 presentan un potencial en -0.999V , lo cual indica que no existe la presencia de PCs en este sitio y especie

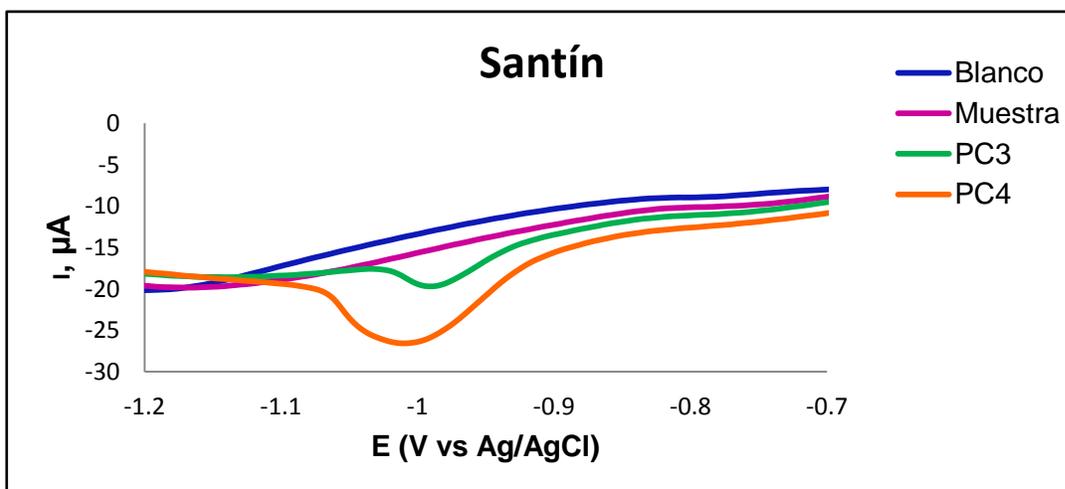


Figura B7 CSV de muestra Santín (*Syntrichia amphidiacea*) + PC3 y PC4.

El voltamperograma de la figura B8 es el sitio P. Alameda, especie *Leskea angustata*, el cual no presenta señal, y las PC3 y PC4 presentan un potencial en -0.929V , lo cual indica que no existe la presencia de PCs en este sitio y especie

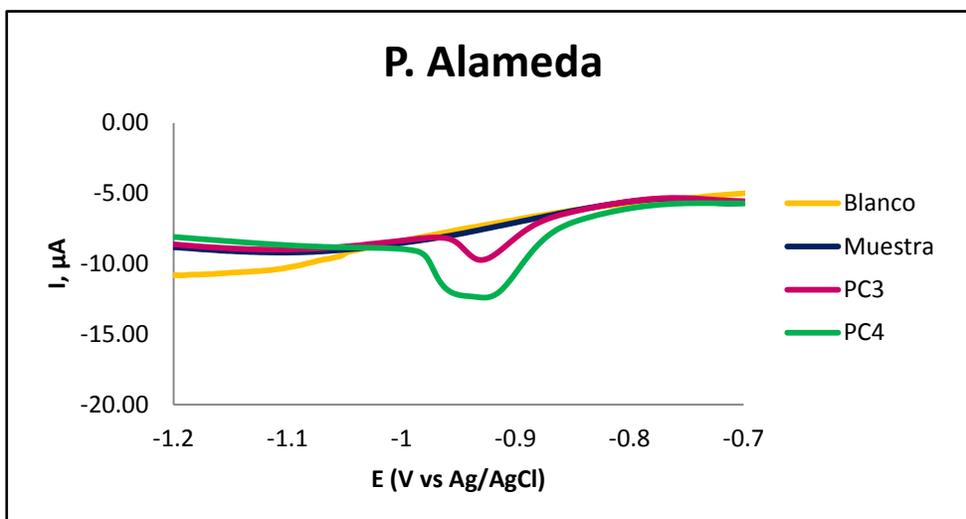


Figura B8 CSV de muestra P. Alameda (*Leskea angustata*) + PC3 y PC4

El voltamperograma de la figura B9 el sitio P.F. Negrete especie *Leskea angustata*, el cual presenta una señal en el potencial -0.789V esta señal se presume que es por la presencia de aminoácidos propios de la planta y la PC3 tiene un potencial -0.964V de y PC4 de -0.943V . lo que indica que no hay presencia de PCs.

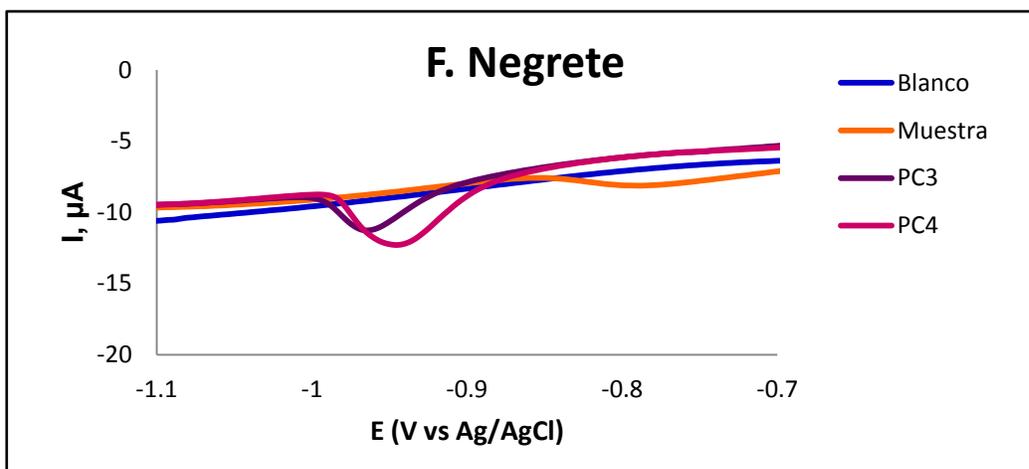


Figura B9 CSV de muestra P. F. Negrete (*Leskea angustata*) + PC3 y PC4.

El voltamperograma de la figura B10 es el sitio Cacalomacán especie *Leskea angustata*, el cual presenta una señal en el potencial -0.782V esta señal se presume que es por la presencia de aminoácidos propios de la planta y la PC3 tiene un potencial -0.980V de y PC4 de -1.00V , lo que indica que no hay presencia de PCs en Cacalomacán y en la especie *Leskea angustata*.

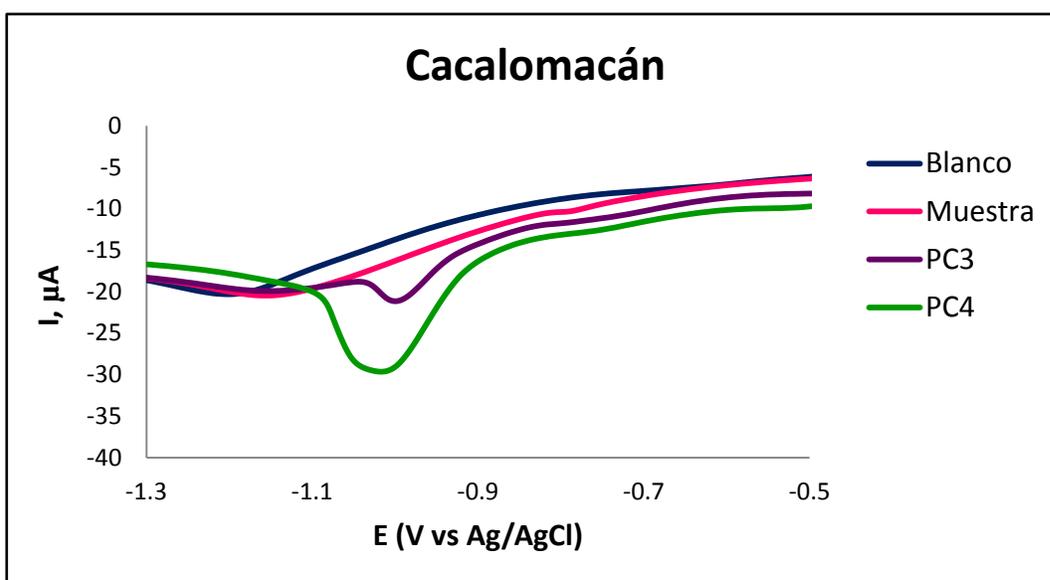


Figura B10 CSV de muestra Cacalomacán (*Leskea angustata*) + PC3 y PC4.