

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE GEOQUÍMICA



**Evaluación de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos, empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* y aplicando un muestreo de tipo activo en la ciudad de Caracas**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Universidad Central de Venezuela por el Br. Henry David Gómez Caicedo para aprobar la asignatura Proyecto geoquímico II y optar al Título de Licenciado en Geoquímica

Caracas, Octubre 2010

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE GEOQUÍMICA



**Evaluación de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos, empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* y aplicando un muestreo de tipo activo en la ciudad de Caracas**

Tutores: Profesora Raiza Fernández  
Licenciado Jesús Hernández

Realizado por Henry Gómez

Caracas, Octubre 2010



Evaluación de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos,  
empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* y aplicando un muestreo de tipo activo  
en la ciudad de Caracas



---

## ACTA

APROBADO EN NOMBRE DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA por los  
Miembros del Jurado Examinador.

---

Profesora Raiza Fernández  
Directora

---

Licenciado Jesús Hernández  
Director

---

Profesor Federico Galarraga  
Jurado

---

Profesor Armando Ramírez  
Jurado



Evaluación de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos, empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* y aplicando un muestreo de tipo activo en la ciudad de Caracas



## DEDICATORIA

**Al Bravo Pueblo que me vio nacer.**





## AGRADECIMIENTOS

A nuestra Universidad Central de Venezuela por haberme suministrado las luces necesarias, al igual que la experiencia de vida suficiente para culminar satisfactoriamente mi profesión universitaria, especialmente a la Facultad de Ciencias.

A mis padres, Esperanza y Henry, ya que sin ellos no habría tenido el empuje, soporte, firmeza y constancia suficiente para llevar a cabo este trabajo. Esta victoria es suya. De igual forma agradezco al resto de mis familiares, hermana, abuelos, tíos y primos; y a mis amigos por permitirme siempre recordar mi esencia y ser oasis en el camino.

A mi tutora la profesora Raiza Fernández por todo el apoyo material y el ánimo dado a lo largo del proyecto y de toda la carrera. A mi tutor el licenciado Jesús Hernández por colocar su apoyo logístico, experiencia y conocimientos en el área de la líquenología para la realización de esta investigación. A los profesores Federico Galarraga y Roschman González, por el empeño y soporte brindado en las áreas de Geoquímica Orgánica y Estadística, además de sus buenos consejos.

Al personal del Minamb, ingenieros Carlos García y Jennifer Parra por facilitar la colocación de los biomonitores en las estaciones de monitoreo de dicha institución.

Al profesor Andrés Escalona por abrirme las puertas del Centro de Química Analítica para la realización de los análisis, al igual que a las personas que allí laboran: profesor Gustavo, Daniel, Alejandro, y mis panas químicos Luz y Manuel. A mi pana Wilbert Hurtado por su apoyo incondicional en la etapa de muestreo y muchos otros momentos, gracias compañero.

A todos los que de alguna u otra manera han estado brindándome su apoyo en el camino pero por cuestiones de espacio no aparecen sus nombres.



## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* y un muestreo de tipo activo, en la ciudad de Caracas. Para ello fueron transplantados líquenes de una zona suburbana a seis localidades de la ciudad de Caracas, en las cuales estuvieron expuestos a la atmósfera urbana por un periodo de cuatro meses.

El método de extracción empleado fue un baño de ultrasonido, usando como solvente una mezcla hexano:diclorometano (3:2, v/v). La separación de la fracción de compuestos aromáticos fue lograda mediante el uso de una columna cromatográfica con sílica gel y la elución con una mezcla hexano-diclorometano (3:2, v/v). Los análisis fueron realizados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC/UV/FL). Fueron identificados 16 HAP: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno.

La concentración de HAP totales obtenida en esta investigación estuvo en el rango de  $6,47 \pm 3,80 \mu\text{g/g}$  a  $2,30 \pm 0,49 \mu\text{g/g}$ . Los líquenes mostraron un enriquecimiento en compuestos de 6 y 5 anillos ( $6 > 5 > 3 > 4$  para LCM;  $6 > 3 > 5 > 4$  para LCF, LBC, LSC y LC5;  $6 > 3 > 4 > 5$  para LRC) asociados a las partículas atmosféricas comúnmente generadas en procesos de combustión.

La relación  $\text{Ind}/(\text{Ind} + \text{B}[\text{g,h,i}]\text{P})$  señala la presencia de HAP provenientes de la quema de vegetación en todas las localidades, y la relación  $\text{B}[\text{g,h,i}]\text{P}/\text{B}[\text{a}]\text{P}$  un fuerte aporte de las emisiones provenientes específicamente de la quema de gasolina en El Cafetal, lo cual indica una fuerte incidencia del tráfico vehicular.



## ÍNDICE

	<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
	<b>Objetivo general.....</b>	<b>5</b>
2.1		
2.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
3.1	<b>Fundamentos teóricos.....</b>	<b>6</b>
3.1.2	Contaminación.....	9
3.1.2.1.	Contaminantes atmosféricos.....	9
3.1.2.2	Fuentes de contaminación.....	10
3.1.3	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). . . . .	12
3.1.3.1	Propiedades fisicoquímicas de los HAP.....	13
3.1.3.2	Origen de los HAP.....	15
3.1.3.3.	Identificación de las fuentes de procedencia (Relaciones diagnósticas)	19
3.1.3.4.	Distribución de los HAP en el ambiente.....	20
3.1.3.5	Efectos en la salud de los HAP.....	22
3.1.4.	Control de la calidad del aire.....	25
3.1.5.	Líquenes.....	26



---

3.1.5.1	Género <i>Parmotrema</i> .....	28
3.1.5.2.	Género <i>Usnea</i> .....	29
3.1.5.3.	Química de los líquenes.....	29
3.1.5.4.	Líquenes como bioindicadores/biomonitores de la contaminación atmosférica.....	32
3.1.6	Técnica de extracción estática asistida por ultrasonidos.....	33
3.1.7.	Instrumental Analítico.....	35
3.2.	<b>Antecedentes</b> .....	37
3.2.1	Internacionales.....	37
3.2.2.	Nacionales.....	45
3.3.	<b>Área de estudio</b> .....	47
3.3.1.	Ubicación geográfica y datos demográficos. ....	47
3.3.1.1.	Fuentes Móviles de contaminación.....	47
3.3.1.2	Fuentes Fijas de contaminación.....	47
3.3.2.	Condiciones climáticas.....	48
3.3.3.	Fisiografía.....	48
4.	<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	49
4.1.	<b>Etapa de campo (muestreo activo)</b> .....	51
4.1.1.	Colección de los líquenes en la zona suburbana.....	51
4.1.1.1	Identificación de la especie de líquen.....	53



4.1.2.	Preparación de los líquenes.....	54
4.1.3.	Colocación de los líquenes en las localidades a evaluar.....	55
4.1.4.	Recolección de la muestra.....	59
4.2.	<b>Etapas de laboratorio.....</b>	<b>62</b>
4.2.1.	Optimización de la metodología de extracción y separación de la fracción aromática.....	62
4.2.1.1.	Lavado del material de vidrio.....	63
4.2.1.2.	Preparación de las muestras.....	64
4.2.1.3.	Extracción.....	66
4.2.1.4.	Separación de la fracción aromática.....	66
4.2.1.5.	Condiciones del análisis instrumental.....	70
4.2.2.	Estudio del lavado del líquen.....	70
4.2.3.	Tratamiento de las muestras recolectadas.....	71
4.2.4.	Mezcla estándar y tratamiento.....	73
4.2.5.	Análisis de recuperación.....	73
4.3.	<b>Tratamiento estadístico de los datos.....</b>	<b>74</b>
5.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>77</b>
5.1.	<b>Diseño del muestreo activo en la ciudad de Caracas empleando el líquen <i>Parmotrema sancti-angelii</i> (Lyngby) Hale como</b>	



	<b>bioacumulador de HAP</b> .....	77
5.2.	<b>Evaluación del efecto que tiene el lavado de los líquenes con agua deionizada en la determinación de los HAP</b> .....	78
5.3.	<b>Optimización de la extracción y separación de la fracción aromática</b> .....	80
5.4.	<b>Recuperación de los HAP en las alícuotas de líquen enriquecidas con el <i>Standard Mix</i></b> .....	84
5.5.	<b>Identificación de HAP bioacumulados por la especie <i>Parmotrema sancti-angelii</i> (Lyngé) Hale en la ciudad de Caracas mediante CG/EM</b> .....	86
5.6.	<b>Cuantificación de HAP en los líquenes mediante HPLC</b> .....	87
5.7.	<b>Distribución espacial de HAP bioacumulados por la especie <i>Parmotrema sancti-angelii</i> (Lyngé) Hale en la ciudad de Caracas</b> .....	89
5.7.1.	Concentraciones y perfil de HAP biomonitoreados en las localidades de estudio.....	91
5.7.2.	Análisis de <i>Cluster</i> y Análisis de Componentes Principales (ACP).....	98
5.7.3.	Variabilidad intralocal de los HAP bioacumulados por los líquenes transplantados.....	101
5.7.4.	Relaciones diagnósticas en las localidades de estudio.....	103
5.8.	<b>Caracterización de los HAP bioacumulados por <i>Parmotrema sancti-angelii</i> (Lyngé) Hale y <i>Usnea sp.</i></b> .....	105



5.8.1.	Capacidad y perfil de bioacumulación de HAP en las dos variedades de líquenes.....	106
5.8.2.	Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de <i>Cluster</i> .....	109
6.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	114
7.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	116
8.	<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	118
9.	<b>APÉNDICE</b> .....	128

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Pág.
1.	Composición del aire seco a nivel del mar.....	7
2.	Emisiones anuales en porcentaje de los cinco principales contaminantes, divididos por fuente.....	10
3.	Propiedades fisicoquímicas para 16 HAP.....	15
4.	Relaciones diagnósticas utilizadas para la determinación de las fuentes de origen más relevantes de HAP en la zona de estudio.....	19
5.	Toxicidad de cada HAP relativa al benzo[a]pireno (TEF) establecida por Nisbet y Lagoy (1992).....	24
6.	Cuadro comparativo de los instrumentales HPLC y CG, relativo a HAP	36
7.	Cuadro comparativo de líquenes, metodologías de preparación, extracción y purificación empleadas por distintos autores.....	42



8.	Ubicación de las localidades de muestreo.....	56
9.	VARIABLES a considerar durante la etapa de campo.....	61
10.	Diseño experimental para la optimización de la extracción y separación de la fracción aromática.....	68
11.	Concentración en $\mu\text{g/g}$ para cada HAP en la evaluación del efecto del lavado del líquen con agua deionizada para la determinación de los HAP.....	79
12.	Porcentajes de extractos orgánicos obtenidos para la muestra lavada y no lavada.....	80
13.	HAP obtenidos en la fase de optimización de la extracción y separación de la fracción aromática.....	81
14.	Comparación del trabajo actual con otras investigaciones en términos de HAP identificados en matrices líquénicas por CG/EM.....	87
15.	Relaciones diagnósticas promedio calculadas para cada una de las localidades.....	104
16.	Pesos de las variables correspondientes a los dos primeros componentes obtenidos con el ACP. Entre paréntesis, el poder de discriminación de cada uno en porcentaje.....	111



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
1.	Estructura de la Atmósfera.....	8
2.	Hidrocarburos aromáticos policíclicos listados por la Agencia de Protección Ambiental de EE UU.....	13
3.	Posible mecanismo de formación de HAP.....	16
4.	Esquema general del ciclo que siguen los HAP desde que son emitidos a la atmósfera.....	21
5.	Clasificación básica de los líquenes.....	27
6.	Generalidades anatómicas de los líquenes.....	28
7.	Líquenes de los géneros <i>Parmotrema sp.</i> (A) y <i>Usnea sp.</i> (B).....	29
8.	Estructura química de algunos ejemplos de sustancias liquénicas.....	31
9.	Esquema de la incorporación de contaminantes al tejido biológico del líquen debido a las deposiciones húmedas y secas sobre la superficie del líquen y la absorción de compuestos en fase gas.....	33
10.	Baño de ultrasonido Cole-Parmer modelo 8894.....	35
11.	Gráfico que relaciona las diferencias entre los grupos poblacionales y la varianza de los HAP, con el N de muestreo.....	50
12.	Fotografía del jardín de la USB en el que fueron colectados los líquenes.....	51
13.	Imagen de la especie <i>Parmotrema sancti angelii</i> (Lynge) Hale.....	54
14.	Ramas con líquenes sujetas entre si.....	54
15.	Mapa de la ciudad de Caracas, señalando las estaciones de muestreo	



y las principales vías de tránsito vehicular.....	57
16. Dos especímenes de líquenes de la especie <i>Parmotrema sancti-angelii</i> (Lyngé) Hale, posicionados en la estación del Minamb de Los Ruices (A). Dos especímenes de líquenes del género <i>Usnea sp.</i> , posicionados en la estación del Minamb de El Silencio (B).....	58
17. Fotografía de las muestras al ser recolectadas (A) y preservación de las mismas bajo 0 °C (B).....	60
18. Esquema de recolección de muestras.....	61
19. Lupa binocular con aumento de hasta 4,5 X.....	64
20. Pulverización de los líquenes empleando nitrógeno líquido.....	65
21. Alícuotas de líquen en contacto con el solvente (A); muestras en el baño de ultrasonidos (B); filtrado de los extractos (D) y extracto reconstituido en un vial de 5 mL.....	67
22. Fotografía de las columnas cromatográficas en las que puede observarse la longitud de las mismas (A), la elución de la fracción aromática (B) y un montaje simultáneo de 4 columnas (C).....	69
23. Residuos producto del lavado de la muestra de El Cementerio.....	71
24. Esquema experimental .....	73
25. Cromatograma de gases obtenido para la muestra de El Cafetal.....	86
26. Concentración de HAP ( $\mu\text{g/g}$ ) en las muestras de líquenes recolectadas en las localidades a las que fueron transplantadas en la ciudad de Caracas.....	91
27. Comparación de concentración de HAP totales y el contenido de HAP <sup>comb</sup> bioacumulados por los líquenes en cada localidad de	



Caracas.....	92
28. Perfil de bioacumulación de HAP según el contenido (%) de compuestos constituidos por 3, 4, 5 y 6 anillos en las localidades estudiadas.....	93
29. Líquenes ubicados en la Avenida Principal de El Cafetal.....	97
30. Análisis de Componentes Principales de las 7 muestras analizadas. Representación de CP1 y CP2.....	100
31. Análisis de Componentes Principales de las 7 muestras analizadas. Representación de CP2 y CP3.....	101
32. Concentración de compuestos constituidos por 3, 4, 5 y 6 anillos en los especímenes ubicados en El Cafetal.....	102
33. Comparación de la concentración de HAP totales y HAP <sup>comb</sup> de cada muestra de líquenes de las dos variedades estudiadas.....	107
34. Perfil de bioacumulación de HAP según el contenido (%) de compuestos constituidos por 3, 4, 5 y 6 anillos en las cuatro muestras estudiadas.....	108
35. Resultados del análisis de componentes principales. Representación de los dos primeros CP.....	112



## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental constituye uno de los principales problemas que la humanidad enfrenta en la actualidad. Dicho fenómeno afecta diversos ámbitos de vital importancia para los individuos y las sociedades, como la salud y la economía; y por lo tanto atenta contra la calidad de vida del ser humano.

Tomando en cuenta lo antes expuesto, es importante señalar que el ambiente está conformado por cuatro compartimientos principales: aire, agua, suelo y biota (Blasco, 2008). Entre dichos compartimientos, el aire constituye uno de los más dinámicos, debido a que el mismo está compuesto por una mezcla de gases y partículas suspendidas, que poseen una capacidad de dispersión y expansión bastante elevada, en comparación con los otros compartimientos, la cual depende en la mayoría de los casos de distintos parámetros como la dirección de los vientos, el clima, la altura, y las condiciones meteorológicas.

En este orden de ideas, la Ley de calidad del aire y protección de la atmósfera de España (2007), define la contaminación atmosférica como “la presencia en la atmósfera de materias, sustancias o formas de energía que impliquen molestia grave, riesgo o daño para la seguridad o la salud de las personas, el medio ambiente y demás bienes de cualquier naturaleza.”

El crecimiento descontrolado y desequilibrado de la población en las últimas décadas ha generado un aumento considerable en la contaminación del aire en ciudades como: Nueva York, Atenas, París, Londres, Madrid, Pekín, Tokio, Yakarta, Johannesburgo, El Cairo, Ciudad de México, Sao Paulo, Buenos Aires, Santiago de Chile, entre otras; lo cual tiene una relación directa con el aumento en la cantidad de combustible fósil que es quemado para la generación de energía, a nivel industrial, urbana y doméstica; siendo importante destacar que dichos efectos son producto del modelo de desarrollo no sustentable que impera en la mayoría de las sociedades del



mundo, el cual no toma en cuenta, a largo plazo, el destino que tendrán todas las sustancias que son transformadas luego de ser extraídas de la naturaleza.

De esta forma, los vehículos automotores constituyen una fuente importante de contaminación atmosférica en las grandes ciudades; ellos descargan diversos gases tóxicos, entre los cuales pueden citarse: monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, hidrocarburos y otros residuos originados en los motores. Dichos gases son reactivos ante la radiación solar, con lo cual originan una gran cantidad adicional de gases nocivos para el sistema respiratorio conocidos como *smog* fotoquímico (Blasco, 2008).

En el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), diversos estudios han demostrado la capacidad que tienen de generar cáncer en los seres humanos (Lawerys, 1994 y Vives *et al.*, 2001). Dicha capacidad es debida principalmente a las especies químicas intermedias generadas por la combustión incompleta y/o biotransformación de los HAP, como dioles, epóxidos y nitroderivados, que son capaces de enlazarse covalentemente con el ADN de las células e inducirlo a romper sus cadenas, mutándolo y provocando la iniciación de tumores. Los HAP son formados por pirólisis o combustión incompleta de material orgánico que contiene carbono e hidrógeno, estos pueden hallarse casi en todas partes, procedentes de fuentes naturales o antropogénicas. La contribución de las fuentes naturales, como los incendios forestales y los volcanes, es mínima comparada con las emisiones causadas por el ser humano. La quema de combustibles fósiles, así como la combustión de residuos y madera constituyen la principal fuente de emisión de HAP (origen pirogénico). Otra fuente de emisión de dichas sustancias son los vertidos de petróleo y derivados que en sí mismos contienen HAP (origen petrogénico) (Blasco, 2008).

Por los motivos antes expuestos, han sido generadas diferentes técnicas o herramientas para el seguimiento de la calidad del aire en distintas zonas geográficas y a lo largo del tiempo, entre las que están el seguimiento convencional (sensores de gases, aparatos captadores de PTS, PM<sub>10</sub> y PM<sub>2,5</sub>, principalmente), y el uso de



bioindicadores/biomonitores (como plantas, musgos, algas y líquenes). Los bioindicadores/biomonitores son organismos ampliamente utilizados para la determinación cuantitativa o cualitativa de contaminantes, tales como: metales pesados, dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), hidrocarburos aromáticos policíclicos, hidrocarburos clorinados, óxidos de nitrógeno, amoníaco (NH<sub>3</sub>), ozono (O<sub>3</sub>), fluoruros y cloruros, esencialmente.

Debido a que los organismos epifitos reciben la mayor parte de sus nutrientes a partir de la atmósfera, son más susceptibles a los factores atmosféricos y, por lo tanto, constituyen sustratos ideales para ser utilizados como bioindicadores/biomonitores. En esta clasificación están enmarcados los líquenes, los cuales presentan las siguientes ventajas: no poseen una cutícula protectora y absorben nutrientes y contaminantes a través de gran parte de su superficie; son relativamente longevos, permaneciendo expuestos al efecto nocivo por largos períodos, por lo que proporcionan una imagen de estados crónicos y no de variaciones puntuales del medio ambiente; son organismos perennes que pueden ser muestreados durante todo el año. El empleo de este tipo de organismos permite abaratar costos y cubrir mayores áreas que los aparatos de seguimiento convencionales. Otra de las ventajas que presentan los líquenes, es que biomonitorizan tanto HAP presentes en la fase gas de la atmósfera que son acumulados en su tejido biológico, como los adsorbidos en las partículas que sobre ellos son depositadas; de modo que el espectro de biomonitorización de HAP en líquenes resulta más amplio que en las partículas atmosféricas, que frecuentemente se relacionan con los HAP de mayor peso molecular (Migaszewski *et al.*, 2002; Guidotti *et al.*, 2003 y 2009; Shukla y Upreti, 2008; Blasco, 2008 y Augusto *et al.*, 2009).

A nivel internacional han sido publicados pocos estudios acerca del seguimiento de HAP empleando líquenes como bioindicadores/biomonitores, en contraposición a las numerosas investigaciones que los emplean como bioindicadores/biomonitores de contaminación por metales. Venezuela no escapa de esta situación, sólo cuenta con el trabajo de Réquiz (2006), en el cual fue aplicado un muestreo de tipo pasivo como estudio piloto, a fin de identificar los HAP presentes en distintas localidades de la ciudad



de Caracas. Dichas localidades fueron seleccionadas de acuerdo a la presencia del género *Pyxine sp.* y los diferentes niveles de tráfico vehicular. En aquella investigación fueron determinados 14 de los 16 HAP contaminantes principales según la US-EPA (no fueron identificados benzo[g,h,i]perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno).

La capital venezolana está enmarcada en un valle tectónico de escasa pendiente, ubicado en el tramo central de la Cordillera Caribe de Venezuela. De acuerdo a proyecciones hechas por el Instituto Nacional de Estadística (INE), para el año 2010 la ciudad de Caracas (incluye Distrito Capital y municipios Baruta, Chacao, El Hatillo y Sucre del estado Miranda) cuenta con una población de aproximadamente 3.220.540 habitantes, y en ella está concentrado el 24 % (1.246.910 vehículos) del parque automotor de Venezuela; siendo estos los principales motivos por los cuales fue seleccionada dicha ciudad para llevar a cabo la presente investigación.

Es importante señalar que Venezuela no cuenta con estudios en los cuales el muestreo de líquenes sea de tipo activo (transplante del líquen de una zona poco intervenida por el hombre a la zona de estudio) para la determinación y cuantificación de los HAP, ni con investigaciones en las que sean empleados líquenes de morfología fruticulosa, por lo que el presente trabajo fue realizado para aportar información en estos aspectos, y pueda servir de apoyo a futuras investigaciones similares.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Determinar la concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), empleando *Parmotrema sancti-angelii* y un muestreo de tipo activo, en la ciudad de Caracas.

### 2.2. Objetivos específicos

Diseñar un plan de muestreo de tipo activo en la ciudad de Caracas, empleando *Parmotrema sancti-angelii* como biomonitor de HAP.

Evaluar el efecto que tiene el lavado de los líquenes con agua deionizada en la determinación de los HAP.

Optimizar la metodología de extracción de los HAP en las muestras de líquenes mediante la técnica de extracción estática con ultrasonidos.

Identificar los HAP presentes en las muestras de líquenes, aplicando la técnica cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Determinar la concentración de los HAP en las muestras de líquenes, empleando la técnica cromatografía líquida de alto rendimiento.

Comparar las concentraciones de HAP obtenidas, usando *Parmotrema sancti-angelii* y *Usnea sp.* a fin de establecer semejanzas y/o diferencias en cuanto a la capacidad que tienen estos líquenes de acumular dichos compuestos.



### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Fundamentos teóricos

**3.1.1. *Atmósfera.*** Es una de las geosferas externas de la Tierra (junto con la hidrosfera, pedosfera y biosfera, con las cuales está estrechamente relacionada), y es comúnmente definida como la capa de aire que rodea al planeta. Dicha capa o envoltura de aire es de vital importancia para los organismos vivos, debido a que es la fuente de dióxido de carbono para la fotosíntesis de las plantas y de oxígeno para la respiración; proporciona el nitrógeno que las bacterias fijadoras de nitrógeno y las plantas productoras de amoníaco emplean para producir las especies de nitrógeno biodisponibles; como parte básica del ciclo hidrológico, la atmósfera transporta el agua de los océanos a la tierra. Adicionalmente, actúa como escudo protector contra los meteoritos, absorbe en la capa de ozono gran parte de la radiación solar ultravioleta y debido a que reabsorbe mucha de la radiación infrarroja que es reemitida al espacio, la atmósfera estabiliza la temperatura de la Tierra (Manahan, 2007).

La tabla 1 indica la composición media del aire seco a nivel del mar, variando un poco la proporción de los distintos componentes hasta alturas de unos 80 Km.

La atmósfera suele ser dividida de acuerdo a la variación de la temperatura con la altura en las siguientes capas: Troposfera, Estratosfera, Mesosfera y Termosfera (Martínez y Díaz, 2004). En el caso de esta investigación solo será definida la primera, debido a que es en ella en la cual ocurre la problemática de estudio. La figura 1 muestra una ilustración de las distintas capas de la atmósfera, los cambios de temperatura, así como de las distintas actividades que son desarrolladas en cada una de ellas.



**Tabla 1.** Composición del aire seco a nivel del mar (Tomado de Figueredo y Dávila, 2004).

Componente	% Volumen	Componente	% Volumen
N <sub>2</sub>	78,085	Kr	0,00011
O <sub>2</sub>	20,946	H <sub>2</sub>	0,000058
Ar	0,934	N <sub>2</sub> O	0,000031
CO <sub>2</sub>	0,0314	CO	0,00001
Ne	0,00182	Xe	8,7 x 10 <sup>-6</sup>
He	0,000524	O <sub>3</sub>	(1-50) x 10 <sup>-6</sup>
CH <sub>4</sub>	0,00015	NH <sub>3</sub>	(0,01-1) x 10 <sup>-7</sup>

3.1.1.1. Troposfera: Es la capa más próxima a la superficie de la Tierra (los primeros 9 a 15 Km) y posee el 85 % de la masa total atmosférica. En ella acontece la actividad humana y son producidos los fenómenos meteorológicos que determinan el clima. Es la capa más dinámica, siempre en movimiento (lluvias, vientos, nubes, entre otros). Asimismo, es allí donde son generados la mayoría de los casos de contaminación atmosférica (a excepción de las aeronaves supersónicas que llegan a volar a niveles estratosféricos), teniendo en cuenta que por sobre los 12 Km de altura la atmósfera ya no es habitable (Martínez y Díaz, 2004).

Su característica física más importante es que la temperatura disminuye con la altura a razón de 0,6 °C cada 100 m, hasta unos 12 Km de altitud, donde la estabilización de la temperatura marca el final de la Troposfera, altura a la cual es alcanzada la Tropopausa. Dependiendo del lugar del planeta, la Tropopausa es encontrada a una altura diferente (15 Km en el Ecuador, 6 Km en los polos) (Martínez y Díaz, 2004).

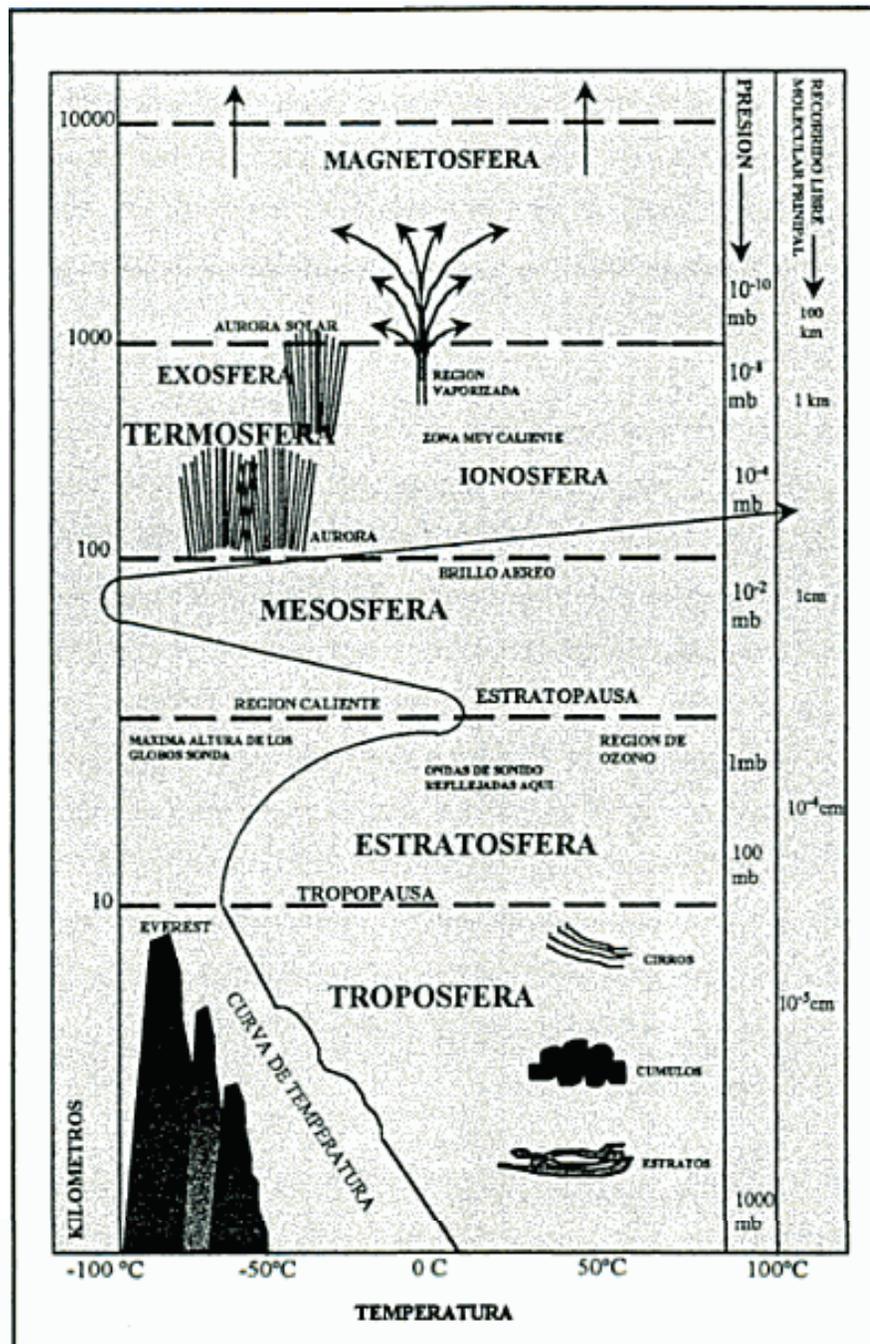


Fig. 1. Estructura de la Atmósfera (Tomado de Martín, 2000).



**3.1.2. Contaminación.** La ley Orgánica del Ambiente (2007) (LOA), define contaminación como la “liberación o introducción al ambiente de materia, en cualquiera de sus estados, que ocasione modificación al ambiente en su composición natural o la degrade”.

Existen tres tipos principales de contaminación: del aire, del agua y de los suelos; de acuerdo al compartimiento ambiental que esté siendo afectado. La LOA no presenta una definición específica para la contaminación del aire o de la atmósfera, sin embargo, al revisar la legislación extranjera, es apreciable la ley de calidad del aire y protección de la atmósfera de España (2007), la cual define dicho término como “la presencia en la atmósfera de materias, sustancias o formas de energía que impliquen molestia grave, riesgo o daño para la seguridad o la salud de las personas, el medio ambiente y demás bienes de cualquier naturaleza”.

La concentración a la cual una sustancia provoca contaminación varía mucho, según la sustancia a la cual esté referida. Por ejemplo, unos pocos nanogramos de benzo[a]pireno por metro cúbico de aire, originan mayores daños que unos diez miligramos de dióxido de carbono, también por metro cúbico (Caselli, 2000).

**3.1.2.1. Contaminantes atmosféricos:** Los contaminantes atmosféricos pueden ser divididos en orgánicos e inorgánicos, de acuerdo a su naturaleza. Entre los orgánicos pueden contarse dibenzodioxinas policloradas, dibenzofuranos policlorados, ácidos grasos, tiofenos e hidrocarburos. Algunos contaminantes inorgánicos importantes son: ozono ( $O_3$ ), amoníaco ( $NH_3$ ), sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), el monóxido de carbono (CO), el dióxido de azufre ( $SO_2$ ), los óxidos de nitrógeno ( $NO_x$ ), polvo (en algunos casos con altas concentraciones de metales pesados), COS, HCl y HF.

Al observar el total de contaminantes atmosféricos, puede notarse que sólo cinco de ellos constituyen más del 95 % del total. Estos contaminantes son: el monóxido de carbono (CO), el dióxido de azufre ( $SO_2$ ), los óxidos de nitrógeno ( $NO_x$ ), los hidrocarburos y el polvo o partículas suspendidas. La concentración de dichos



contaminantes, junto con la del ozono ( $O_3$ ), estrechamente vinculado a ellos, es la utilizada como índice de calidad del aire (Caselli, 2000).

La tabla 2 muestra los porcentajes de emisiones anuales de los cinco contaminantes atmosféricos predominantes, divididos por fuente.

**Tabla 2.** Emisiones anuales en porcentaje de los cinco principales contaminantes, divididos por fuente (Tomado de Caselli, 2000).

Contaminante	Combustiones (%)	Transporte (%)	Industria (%)	Tratamiento de desechos (%)	Otras fuentes (%)	Contaminantes totales (%)
CO	0,30	41,62	4,27	2,69	6,89	55,76
SO <sub>2</sub>	9,88	0,37	2,40	0,04	0,07	12,76
NO <sub>x</sub>	3,73	4,34	0,07	0,15	0,22	8,53
Hidrocarburos	0,22	7,34	2,10	0,75	2,77	13,17
Partículas	2,54	0,30	4,94	0,52	1,50	9,81
<b>Total de las fuentes (%)</b>	16,69	53,97	13,77	4,15	11,45	100,00

A continuación son mostradas algunas fuentes de emisión de contaminantes a la atmósfera, así como su clasificación, haciendo especial énfasis en las especies orgánicas.

3.1.2.2. Fuentes de contaminación: Pueden ser clasificadas en fuentes naturales y fuentes antrópicas.

La gran mayoría de las especies consideradas como contaminantes de la atmósfera, tienen en buena parte un origen natural, siendo estas fuentes las responsables de las cantidades de sustancias existentes en una atmósfera no contaminada. La vegetación constituye una fuente importante de emisión de hidrocarburos a la atmósfera; por ejemplo, muchas plantas liberan etileno ( $C_2H_4$ ), y son



origen también, especialmente algunos tipos de árboles, de diferentes terpenos (como  $\alpha$ -pineno, isopreno y limoneno) los cuales, a causa de que tienen doble enlaces en sus moléculas reaccionan con agentes oxidantes atmosféricos como el radical  $\bullet\text{OH}$ , formando aerosoles responsables en gran parte de las neblinas azuladas naturales observadas en zonas con grandes masas de vegetación. Algunos mercaptanos y otros organosulfurados son formados a partir de la materia orgánica. Las plantas también emiten gran variedad de ésteres orgánicos; y las algas, constituyen una fuente de los organohalogenados de cloruro, fluoruro y yoduro de metileno a la atmósfera. Otra importante fuente de emisión de contaminantes a la atmósfera, la constituyen los incendios forestales (procesos de combustión) y las erupciones volcánicas (Orozco *et al.*, 2004).

Las fuentes de emisión antropogénicas de agentes contaminantes en la troposfera han sido clasificadas considerando su localización fija o móvil. Así puede hablarse de:

- Fuentes móviles: incluyen los diversos tipos de vehículos de motor utilizados en el transporte.
- Fuentes fijas: localizadas en un punto determinado. Entre ellas están los focos de contaminación industriales, domésticos y vertederos (Orozco *et al.*, 2004).

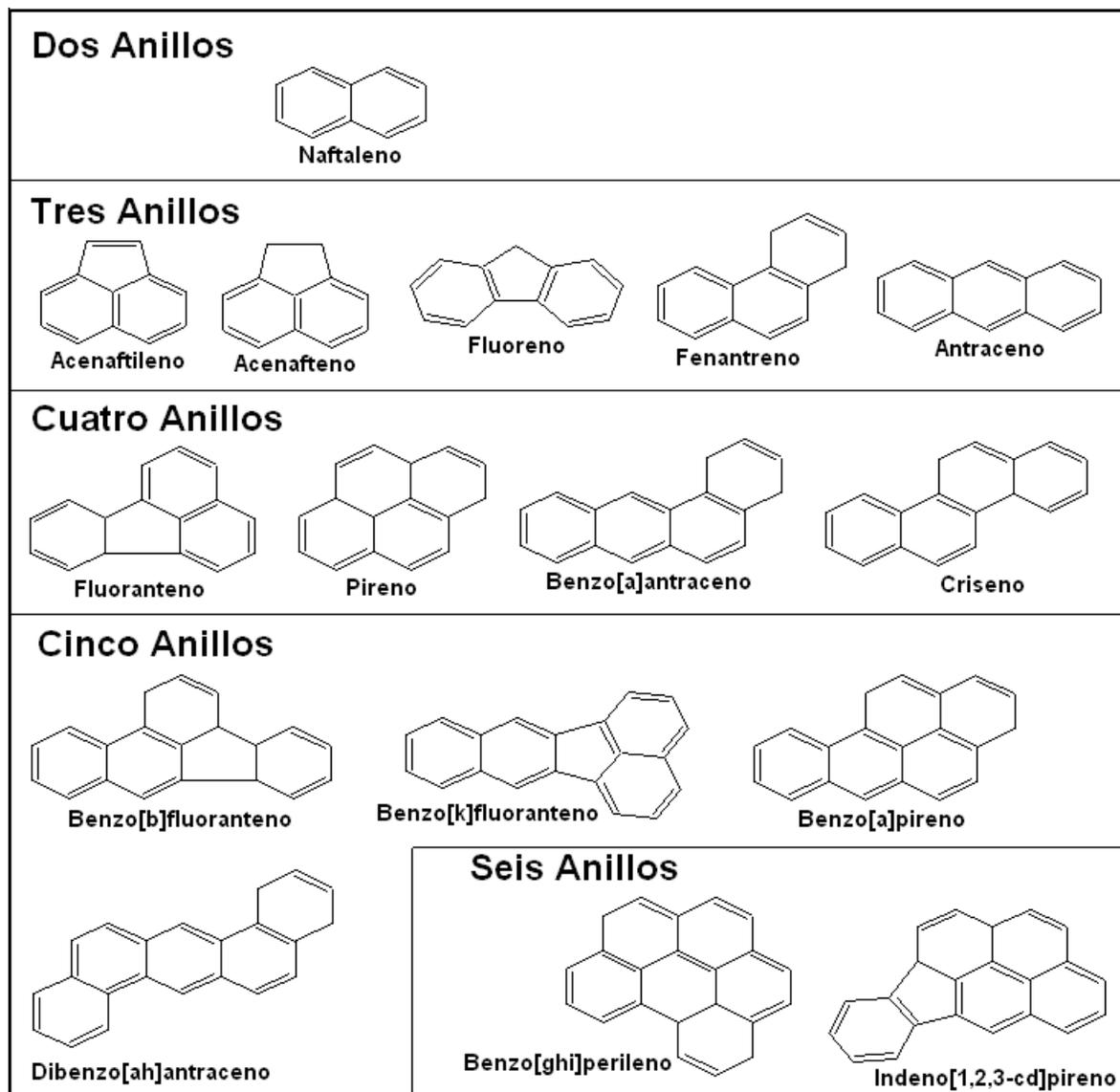


**3.1.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).** Constituyen una familia particular de hidrocarburos correspondiente a compuestos que contienen un cierto número de anillos bencénicos condensados a través de dos o más átomos de carbono (Orozco *et al.*, 2004). También reciben el nombre de hidrocarburos aromáticos polinucleares o poliarenos. Estos compuestos, junto con los HAP con derivados alquílicos, los HAP con grupos  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $\text{NH}_2$  y  $-\text{Cl}$  como sustituyentes y los HAP con heterociclos nitrogenados, sulfurados y oxigenados, constituyen la familia conocida como compuestos aromáticos policíclicos (PACs, por sus siglas en inglés) (Blasco, 2008).

Una primera clasificación de los HAP puede ser entre alternantes, los que contienen solamente anillos bencénicos, y no alternantes, los que presentan también anillos aromáticos distintos del benceno, como por ejemplo el acenaftileno (Blasco, 2008) (ver figura 2).

La importancia de los HAP como contaminantes ambientales radica en que han sido clasificados como cancerígenos por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés). Recientemente se han incluido dentro de los contaminantes orgánicos persistentes (POPs, por sus siglas en inglés) por el *United Nations-European Committee*, en el tratado global firmado en mayo de 2001 en la “*Convention of Lon-range Transboundary Air Pollution*” (Blasco, 2008).

Aunque el número posible de HAP es enorme, hay una serie de miembros de la familia que aparecen en el ambiente de forma más generalizada. En 1980, la Agencia de Protección Ambiental de los EE UU (US-EPA), reporta un grupo de dieciséis HAP contaminantes principales, de acuerdo a su importancia medioambiental, y posibles efectos en la salud. Dicho grupo está conformado por: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-cd] pireno y benzo[g,h,i]perileno. La figura 2 muestra las estructuras de los 16 HAP mencionados anteriormente.



**Fig. 2.** Hidrocarburos aromáticos policíclicos listados por la Agencia de Protección Ambiental de EE UU. .

3.1.3.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAP: Los HAP son una familia de compuestos muy heterogénea en cuanto a propiedades fisicoquímicas ya que presentan un rango muy amplio (Blasco, 2008). Algunas características generales de dichos compuestos es que en su mayoría (salvo los menores de la serie naftaleno y



antraceno), son compuestos sólidos en condiciones ambientales (puntos de fusión y ebullición elevados, ver apéndice C). Dichos compuestos poseen muy baja solubilidad en agua, a la vez que elevada en solventes orgánicos no polares, lo que les configura como compuestos típicamente microcontaminantes orgánicos y con capacidad bioacumulativa. Por lo general, un incremento en el peso molecular y en el número de anillos en su estructura disminuye la solubilidad en agua y su volatilidad. La toxicidad más elevada y ampliamente estudiada de los compuestos de la serie es la del benzopireno (Orozco *et al.*, 2004). Asimismo, dependiendo de su carácter aromático los HAP absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico.

Generalmente, los hidrocarburos más persistentes en el ambiente son los que tienen mayor peso molecular. También son más persistentes aquellos que poseen una mayor capacidad de bioacumulación. La capacidad de disolución en grasas de algunos contaminantes, frente al carácter hidrofílico, y por lo tanto su carácter bioacumulativo, puede medirse mediante el coeficiente de reparto octanol/agua ( $K_{ow}$ ), definido como:

$$K_{ow} = \frac{\text{Concentración del hidrocarburo en octanol}}{\text{Concentración del hidrocarburo en agua}}$$

El valor de  $K_{ow}$  está relacionado directamente con el factor de bioconcentración ( $K_B$ ), a través de la expresión:

$$K_B = f_{lip} \times K_{ow}$$

Donde  $f_{lip}$  es la fracción de grasa (lípidos) presente en el ser vivo (Orozco *et al.*, 2004).

La tabla 3 presenta algunas propiedades fisicoquímicas para 16 HAP, entre las que son incluidas: presión de vapor, solubilidad en agua y logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua, así como el peso molecular y el número de anillos para cada compuesto. Las temperaturas de fusión y de ebullición pueden localizarse en el apéndice C.



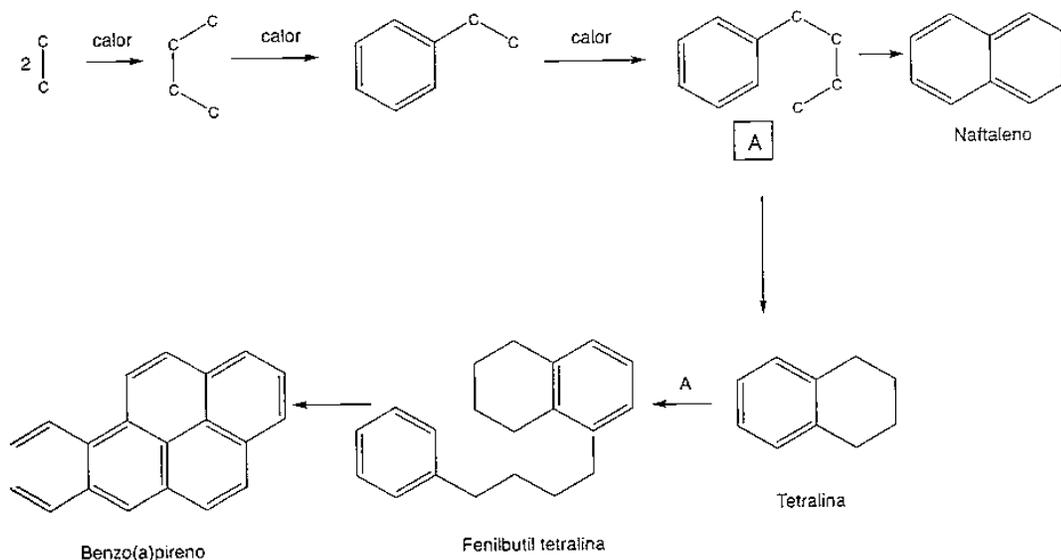
**Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas para 16 HAP (Datos tomados de la ATSDR [Agency for Toxic Substances and Disease Registry, de acuerdo a sus siglas en inglés], 1995).

HAP	Fórmula Química	Número de anillos	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Presión de vapor (mmHg)	Solubilidad en agua (mg L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub>
<b>Bajo peso molecular</b>						
Naftaleno	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	2	128,17	7,5x10 <sup>-1</sup>	31	3,36
Acenaftileno	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	3	152,20	2,9x10 <sup>-2</sup>	16	4,03
Acenafteno	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	3	154,21	4,5x10 <sup>-3</sup>	3,8	3,55
Fluoreno	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	3	166,20	3,2x10 <sup>-4</sup>	1,98	4,18
Fenantreno	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	3	178,20	6,8x10 <sup>-4</sup>	1,20	4,57
Antraceno	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	3	178,20	1,7x10 <sup>-5</sup>	7,6x10 <sup>-2</sup>	4,54
<b>Mediano peso molecular</b>						
Fluoranteno	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	4	202,26	5,0x10 <sup>-6</sup>	0,26	5,22
Pireno	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	4	202,30	2,5x10 <sup>-6</sup>	7,7x10 <sup>-2</sup>	5,18
Benzo[a]antraceno	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	4	228,29	2,2x10 <sup>-8</sup>	1,0x10 <sup>-2</sup>	5,91
Criseno	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	4	228,30	6,3x10 <sup>-7</sup>	2,8x10 <sup>-3</sup>	5,91
<b>Alto peso molecular</b>						
Benzo[b]fluoranteno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	252,30	5,0x10 <sup>-7</sup>	1,2x10 <sup>-3</sup>	6,50
Benzo[k]fluoranteno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	252,30	9,6x10 <sup>-11</sup>	7,6x10 <sup>-4</sup>	6,20
Benzo[a]pireno	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	252,30	5,6x10 <sup>-9</sup>	2,3x10 <sup>-3</sup>	6,50
Dibenzo[a,h]antraceno	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	5	278,35	1,0x10 <sup>-10</sup>	5,0x10 <sup>-4</sup>	6,20
Benzo[g,h,i]perileno	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	6	276,34	1,0x10 <sup>-10</sup>	2,6x10 <sup>-4</sup>	7,10
Indeno[1,2,3-cd]pireno	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	6	276,30	1,0x10 <sup>-11</sup>	6,2x10 <sup>-2</sup>	6,50

3.1.3.2. Origen de los HAP: Dichos compuestos son formados por la combustión incompleta de todo tipo de materiales orgánicos como petróleo y sus derivados, carbón, madera, tabaco o vegetación en general. El proceso transcurre a través de la formación



de radicales libres, producidos por ruptura de enlaces C-C y C-H, que reaccionan entre sí. En la figura 3 puede observarse un posible mecanismo de formación de HAP en la combustión de ciertos materiales orgánicos. Las cantidades de HAP formadas dependen de la temperatura de combustión y de la naturaleza de los compuestos orgánicos implicados en el proceso. Varios de los compuestos formados en estas reacciones son alquil sustituidos, y como regla general, a temperaturas de combustión más elevadas son generados HAP con menos sustituciones alquílicas (Orozco *et al.*, 2004).



**Fig. 3.** Posible mecanismo de formación de HAP (Tomado de Orozco *et al.*, 2004).

También en la formación geológica de combustibles fósiles pueden generarse HAP. El material biológico que da origen al carbón y el petróleo evoluciona, en este caso bajo presión y temperaturas relativamente bajas (menos de 200 °C), condiciones a las que pueden formarse ciertas cantidades de HAP (alrededor del 1% del crudo) (Vives *et al.*, 2001 y Orozco *et al.*, 2004).



Las fuentes principales de HAP son los automóviles, los aviones, los barcos, las plantas de generación de energía eléctrica, las incineradoras de residuos, las calefacciones de los edificios, los incendios forestales y el humo del tabaco, así como, los alimentos a la parrilla o a la barbacoa. En general la tasa de formación de estos compuestos depende de las condiciones de combustión. Una combustión que genere mucho humo negro dará lugar a una mayor cantidad de estos hidrocarburos por masa de compuesto quemado (Vives *et al.*, 2001).

El tráfico rodado es una fuente de emisión de HAP muy importante en áreas urbanas, donde se han hallado las concentraciones más elevadas de estos compuestos (Blasco, 2008). La cantidad emitida por los vehículos depende del tipo de motor, el tipo de combustible y el tratamiento de los gases de escape previo a la salida a la atmósfera, además de factores como la edad del vehículo/motor o los hábitos de conducción ocasionados por la topografía y la calidad de las vías. Por lo general, los nuevos motores que incorporan catalizador emiten entre 5 y 10 veces menos HAP que los motores antiguos (Boström *et al.*, 2002). Sin embargo, ha sido comprobado que la nueva tecnología diesel de los motores emite un perfil de HAP más rico en compuestos de menor peso molecular (3-4 anillos), reduciendo así el aporte de benzo[a]pireno (compuesto de referencia por su evidente efecto carcinogénico) a la atmósfera (Blasco, 2008).

Además de las emisiones procedentes de los vehículos a motor, a causa del tráfico rodado, también pueden incorporarse HAP a la atmósfera mediante el desgaste de los neumáticos, las partículas de asfalto que se desprenden de la carretera y los residuos de aceites lubricantes (Blasco, 2008).

Origen pirogénico y petrogénico: En la práctica la identificación de las fuentes de emisión de HAP es realizada según su origen sea pirogénico: procedentes de la combustión de materiales orgánicos a altas temperaturas, o petrogénico: procedentes del petróleo y derivados (generalmente en menor proporción) (Blasco, 2008).



Los HAP de origen pirogénico son formados por la ruptura o “craqueo” a altas temperatura de materiales orgánicos en compuestos de bajo peso molecular que son rápidamente recombinados en estructuras de HAP no alquilados. Otro producto muy importante de la pirólisis es la formación de un tipo de hollín, constituido por una aglomeración de HAP condensados. Generalmente, entre los HAP de origen pirogénico predominan los compuestos de alto peso molecular (Blasco, 2008).

Los HAP de origen petrogénico son creados durante los procesos diagenéticos, en los que la materia orgánica sedimentada sufre una serie de procesos geoquímicos naturales dando lugar a la formación de estos compuestos. En este tipo de procesos es frecuente la formación de HAP alquilados. Habitualmente, dichos HAP son de bajo peso molecular que en el ambiente se encuentran en combinación con los HAP pirogénicos (Blasco, 2008).

Normalmente la presencia de HAP petrogénicos es asociada a fuentes locales o puntuales, como refinerías o industrias del petróleo, rutas de navegación o adyacentes a carreteras y autopistas, en contraste con los HAP de origen pirogénico que tienen lugar en una escala geográfica mayor. Otra diferencia importante entre los HAP de origen pirogénico y petrogénico es la persistencia en el ambiente. Los HAP de origen pirogénico son más persistentes y están más protegidos frente a reacciones de degradación por la asociación en forma de aglomerado antes mencionada en la que pueden presentarse. Por su parte, los HAP de origen petrogénico son más fácilmente degradados por reacciones de fotooxidación o por la acción de los microorganismos (Mochida *et al.*, 2000 y Douben, 2003).

La distribución de HAP en las diferentes matrices donde son determinados constituye una herramienta para elucidar las fuentes de procedencia, ya que cada fuente de origen produce un patrón de HAP particular. Por eso, a través de las concentraciones relativas de determinados HAP, denominadas relaciones diagnósticas, es posible identificar las fuentes de procedencia más significativas (Blasco, 2008).



### 3.1.3.3. Identificación de las fuentes de procedencia (Relaciones diagnósticas):

La identificación de las fuentes de procedencia de los contaminantes es una cuestión crítica dentro de la valoración del riesgo que implican. En el caso de los HAP, comúnmente es utilizada la comparación entre el patrón de HAP emitido y el obtenido en las muestras estudiadas, para evaluar la contribución de las distintas fuentes posibles. Generalmente, esta comparación es realizada a través de la relación entre pares de HAP con igual masa molecular, con el fin de minimizar las diferencias de volatilidad, solubilidad en agua, y otras propiedades fisicoquímicas, entre los compuestos. La relación entre HAP específicos se denominan relaciones diagnósticas y van a permitir diferenciar entre el origen pirogénico y/o petrogénico de los HAP encontrados en una muestra determinada (Blasco, 2008).

Las relaciones diagnósticas más aplicadas para la diferenciación entre origen pirogénico o petrogénicos de los HAP son mostradas en la tabla 4.

**Tabla 4.** Relaciones diagnósticas utilizadas para la determinación de las fuentes de origen más relevantes de HAP en la zona de estudio (<sup>a</sup>Baumard et al., 1998; <sup>b</sup>Yunker et al., 2002; <sup>c</sup>Budzinski et al., 1997 y <sup>d</sup>Ortiz et al., 2007).

Relación diagnóstica	Origen pirogénico	Origen petrogénico
Fenantreno/Antraceno <sup>a</sup>	<10	>10
Fluoranteno/Pireno <sup>a</sup>	>1	<1
Benzo[a]antraceno/(Benzo[a]antraceno+Criseno) <sup>b</sup>	>0,35	<0,2
Antraceno/(Antraceno+Fenantreno) <sup>c</sup>	>0,1	<0,1
Fluoranteno/(Fluoranteno+Pireno) <sup>d</sup>	>0,5	<0,5

De igual forma, el empleo de la relación Flu/(Flu+Pi) superior a 0,5 es indicativo de que también contribuye la combustión de carbón o madera al origen de esa mezcla de HAP (Yunker et al., 2002), y valores superiores a 0,6 de la relación benzo[g,h,i]perileno/benzo[a]pireno indican la influencia del tráfico, debido a que el



benzo[g,h,i]perileno es considerado un compuesto específico de las emisiones de gasolina (Brandli *et al.*, 2007). La relación  $I[1,2,3\text{-cd}]P / (I[1,2,3\text{-cd}]P + B[g,h,i]P) > 0,5$  es empleada por algunos autores como característica de la combustión de pasto y madera (Ortiz *et al.*, 2007)

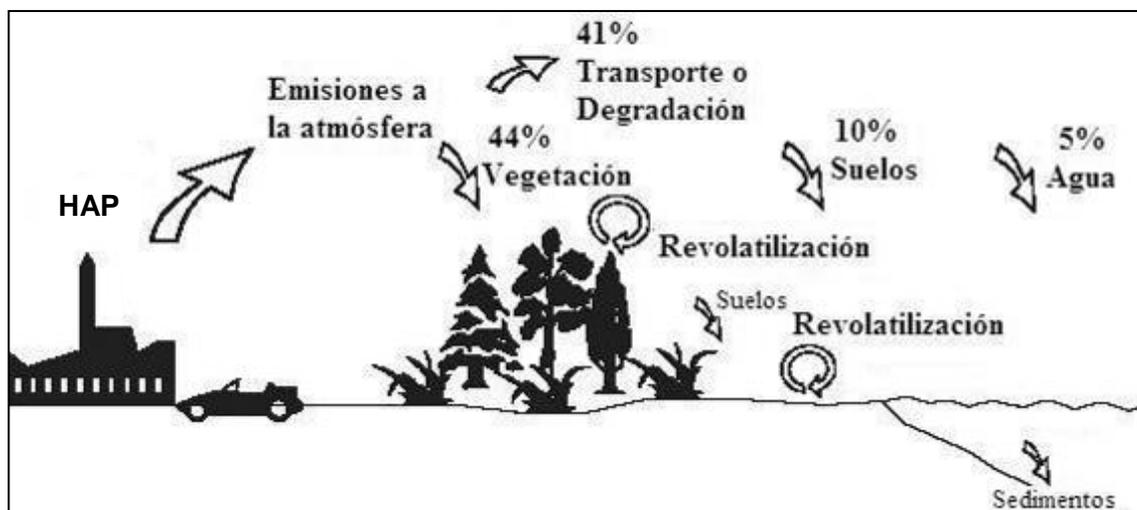
Cabe destacar que las relaciones diagnósticas deben ser utilizadas con cuidado como método para identificar la fuente de procedencia de los HAP, ya que este procedimiento asume que los pares de HAP estudiados se transportan y transforman de igual modo en el camino desde la fuente de emisión hasta la muestra receptora. Pero esta hipótesis no siempre es cierta, ya que los pares de HAP empleados en las relaciones tienen propiedades muy similares pero no idénticas (Bucheli *et al.*, 2004 y Zhang *et al.*, 2005). Sin embargo, es factible emplearlos, estudiando la problemática desde una perspectiva global.

3.1.3.4. Distribución de los HAP en el ambiente: Estas sustancias están presentes en todas las parcelas o compartimientos ambientales. Nunca como compuestos aislados, sino formando mezclas de HAP. Además, presentan amplios rangos de concentración, de acuerdo a la matriz en la que sean analizados.

Normalmente son emitidos en fase gas, de manera que pueden permanecer como tal, agruparse entre ellos y/o con otros contaminantes dando lugar a aerosoles, o quedar adsorbidos en partículas en suspensión (Bomboi *et al.*, 1999; Rehwagen *et al.*, 2005 y Chirino, 2008). La distribución de estos compuestos entre la fase gas y las partículas atmosféricas está condicionada por factores como la temperatura ambiente, la humedad relativa, las propiedades y concentración de los HAP y la composición química de los aerosoles. Como regla general puede considerarse que los HAP de menor peso molecular (2-3 anillos aromáticos) están preferentemente en fase gas, los de peso molecular intermedio (4 anillos aromáticos) están distribuidos entre la fase gas y asociados a partículas, mientras que los HAP de mayor peso molecular (5-6 anillos) son predominantes en las partículas atmosféricas (Blasco, 2008).



La figura 4 muestra el ciclo de estos compuestos en el ambiente, comenzando con la liberación de HAP a la atmósfera.



**Fig. 4.** Esquema general del ciclo que siguen los HAP desde que son emitidos a la atmósfera (Modificado de Lehndorff y Schwark, 2004).

Durante el tiempo de residencia en la atmósfera, los HAP pueden reaccionar con contaminantes atmosféricos como el ozono, óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre para transformarse en dionas, nitro y dinitro derivados y ácidos sulfónicos, respectivamente. De modo que es posible generar compuestos más polares y, por lo tanto, más solubles en agua que los compuestos iniciales. Igualmente pueden sufrir oxidaciones fotoquímicas dando lugar a quinonas, fenoles y dihidrodioles, generando algunos productos de carácter mutagénico (Blasco, 2008).

Es posible que sean transportados por acción del viento, dado su carácter semivolátil, o depositados sobre la superficie terrestre mediante los mecanismos de deposición húmeda (las precipitaciones) y seca (la sedimentación de las partículas atmosféricas conteniendo HAP sobre la superficie terrestre). Así estos compuestos son transferidos de la atmósfera a las aguas superficiales, suelos, sedimentos o son bioacumulados por la materia vegetal (Blasco, 2008).



En los sistemas acuáticos, los HAP, además de ser introducidos por las deposiciones atmosféricas, también son liberados mediante vertidos directos, como en los vertidos de crudo. Por lo general, las cantidades de HAP que entran anualmente en el medio acuático son significativamente menores de las que lo hacen en la atmósfera o suelo. Además, si estos compuestos fueran distribuidos por igual a través de los ríos, mares y océanos que pueblan La Tierra, su concentración resultaría indetectable. Pero normalmente estos compuestos permanecen relativamente cerca del punto de entrada en el medio acuático, decreciendo su concentración con la distancia al punto de entrada. Por esta razón, las mayores concentraciones de HAP se encuentran en ríos, estuarios y costas marinas (Pino *et al.*, 2002; González *et al.*, 2006 y Guitart *et al.*, 2007).

Dada su baja solubilidad en agua tienden a permanecer en las partículas en suspensión o en el fondo del acuífero en el que se encuentran. En el agua, estos compuestos también sufren procesos de transformación mediante fotooxidación, oxidación química y biodegradación por la acción de hongos y bacterias. Sin embargo, la persistencia de los HAP en el medio acuático es mayor que en el aire, provocando su acumulación en la fauna marina y en los sedimentos (Navarro *et al.*, 2006; Soriano *et al.*, 2007 y Fernández-González *et al.*, 2008).

Los HAP incorporados en los suelos (Motelay-Massei *et al.*, 2004 y Nadal *et al.*, 2007), pueden también verse involucrados en procesos de transformación debido a microorganismos y oxidaciones químicas y fotoquímicas. De igual modo pueden ser transferidos a las plantas, que los absorben del suelo a través de las raíces, incorporándose así en la cadena alimenticia (Kipopoulo *et al.*, 1999).

3.1.3.5. Efectos en la salud de los HAP: Como regla general, el mayor peso molecular, y los mayores valores de Log  $K_{ow}$  del hidrocarburo incrementan su toxicidad (Orozco *et al.*, 2004). La toxicidad aguda de muchos HAP, al menos en los roedores comúnmente utilizados para estos experimentos, suele ser baja (valores de la dosis letal para 50% de la población expuesta (LD50) generalmente superiores a los 50



mg/Kg peso vivo). Sin embargo, su verdadero peligro viene dado por sus efectos a largo plazo. La genotoxicidad de los HAP es debida en gran parte a su estructura, la cual le confiere a una parte de algunas de sus moléculas propiedades electrofílicas elevadas que le permiten interaccionar con los enlaces covalentes. Los HAP son caracterizados por poseer efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutágenos, pero en muchos casos el efecto es atribuido a la presencia conjunta de más de un compuesto de la familia y de algunos de sus derivados, principalmente los nitroderivados. Los nitroderivados de los HAP (NHAP), comprobados como potentes mutágenos para la *Salmonella typhimurium* (test de Ames), para bacterias y células eucariotas (células de ovario de hamster, células epiteliales de ratón RL4) (Vives *et al.*, 2001).

Tras la exposición prolongada pueden producir cáncer cutáneo (escroto y cara), cáncer broncogénico en vías respiratorias, cáncer de vejiga; originar leucemia y linfoma (Lawerys, 1994).

Ciertos autores han desarrollado un listado de la capacidad carcinogénica de algunos HAP, asignando un valor de toxicidad a cada uno respecto al benzo[a]pireno. El más utilizado es el factor de toxicidad equivalente (TEQ) desarrollado por Nisbet y Lagoy (1992), que se emplea para calcular la toxicidad de una mezcla de HAP respecto al benzo[a]pireno con la ecuación:

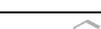
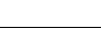
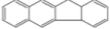
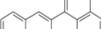
$$TEQ = \sum (C_i \times TEF_i)$$

Donde  $C_i$  es la concentración de cada HAP y TEF el valor de toxicidad asignado a cada HAP relativo al benzo[a]pireno.

Los factores de toxicidad referida al benzo[a]pireno (TEF) asignados a cada HAP son mostrados en la tabla 5.



**Tabla 5.** Toxicidad de cada HAP relativa al benzo[a]pireno (TEF) establecida por Nisbet y Lagoy (1992).

HAP	TEF	Estructura
Naftaleno	0,001	
Acenaftileno	0,001	
Acenafteno	0,001	
Fluoreno	0,001	
Fenantreno	0,001	
Antraceno	0,01	
Fluoranteno	0,001	
Pireno	0,001	
Benzo[a]antraceno	0,1	
Criseno	0,01	
Benzo[b]fluoranteno	0,1	
Benzo[k]fluoranteno	0,1	
Benzo[a]pireno	1	
Dibenzo[a,h]antraceno	5	
Benzo[g,h,i]perileno	0,01	
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,1	



**3.1.4. Control de la calidad del aire.** Las técnicas convencionales para el seguimiento o monitoreo de los HAP en la atmósfera, suelen ser su determinación y cuantificación químicas en muestras de partículas sedimentables, partículas totales suspendidas (PTS), partículas menores a 10  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) y partículas menores a 2,5  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ), mediante muestreadores de alto y bajo volumen, en el caso de la fase sólida de los HAP; y el empleo de espumas de poliuretano (PUFs, por sus siglas en inglés) para el muestreo de la fase gaseosa. Sin embargo, los altos costos de estos dispositivos, así como las dificultades logísticas que acarrearán su transporte y posicionamiento, han contribuido a la búsqueda de otras técnicas para evaluar la contaminación atmosférica o calidad del aire. Es por ello que durante las últimas décadas, el empleo de organismos para la evaluación de la calidad del aire de un ecosistema, ha tomado un gran auge.

3.1.4.1. Evaluación de la calidad del aire empleando organismos vivos: Está referida a la evaluación de los receptores de los contaminantes, y suele aplicarse cuando el área de muestreo es de gran tamaño y es difícil contar con instrumentos para todos los puntos de muestreo. A continuación son definidos los términos bioindicador, biomonitor y bioacumulador, según Hawksworth (1992):

Bioindicador: Organismo que manifiesta síntomas particulares en respuesta a cambios medioambientales, generalmente de manera cuantitativa. Un ejemplo lo constituye el decrecimiento de una determinada población animal o vegetal, como consecuencia de la presencia de DDT (1, 1, 1-Tricloro-2, 2-bis (4-clorofenil) etano) en cantidades peligrosas en el agua, con lo cual dicho decrecimiento poblacional, de esas especies animales o vegetales estaría indicando el estado de deterioro del ecosistema.

Biomonitor: Organismo, su distribución o poblaciones, estudiadas a lo largo del tiempo, y comparadas con valores estándar o encuestas (base-line Surrey), tomando en cuenta las desviaciones del comportamiento esperado. El seguimiento de la variación temporal y espacial de la concentración de cadmio en algas, constituye un ejemplo en el cual dicho término puede ser empleado.



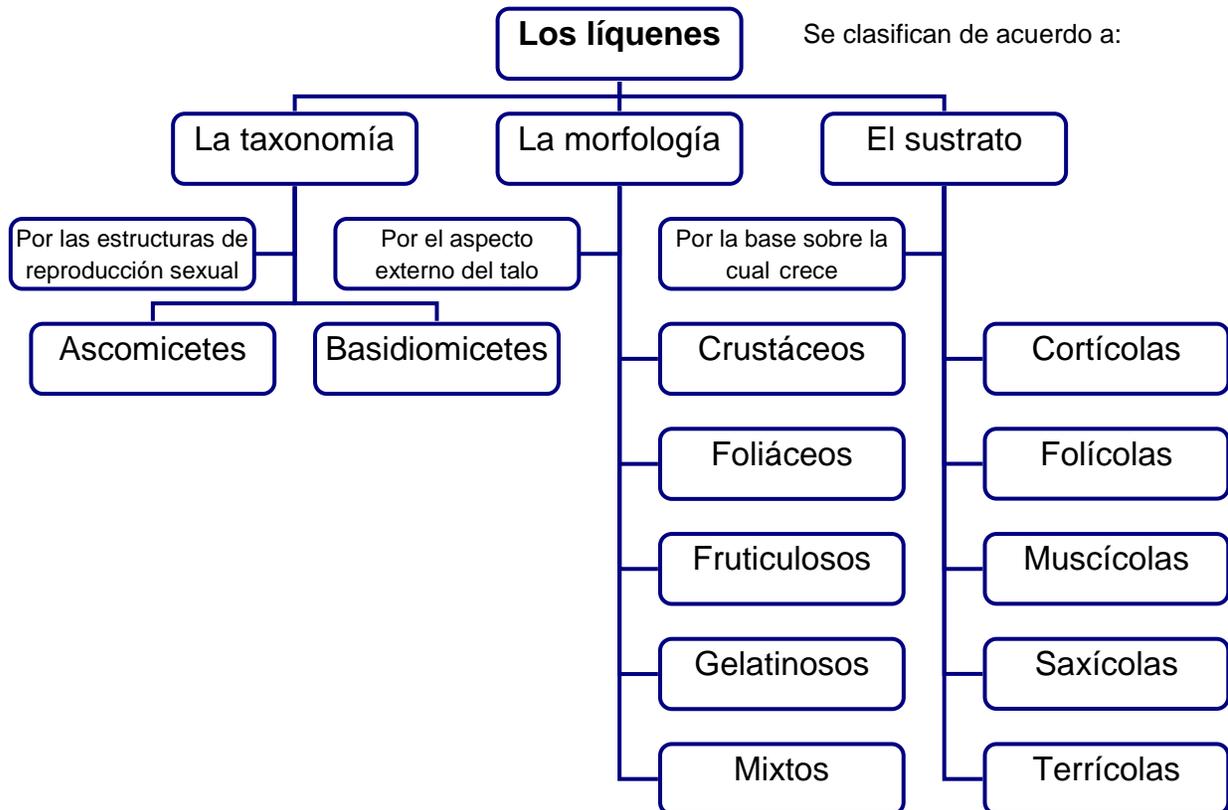
**Bioacumulador:** Organismo que acumula sustancias particulares dentro de sus tejidos, cuyas concentraciones son determinadas mediante métodos químicos. Por ejemplo, la acumulación de plomo en algunas especies de ostras y moluscos, por la ausencia de un mecanismo de exclusión o de expulsión de dicha especie química.

El establecimiento de una condición de normalidad o de la línea base de concentración para un contaminante específico en un área dada, es crucial en estudios de biomonitoreo (Pignata *et al.*, 2008).

El empleo de bioindicadores/biomonitores presenta la ventaja de proporcionar información acumulativa, integrada y discriminada, gracias a su capacidad de respuesta frente a las alteraciones del medio, la cual nunca puede ser detectada a través de las mediciones fisicoquímicas convencionales (Pignata *et al.*, 2008).

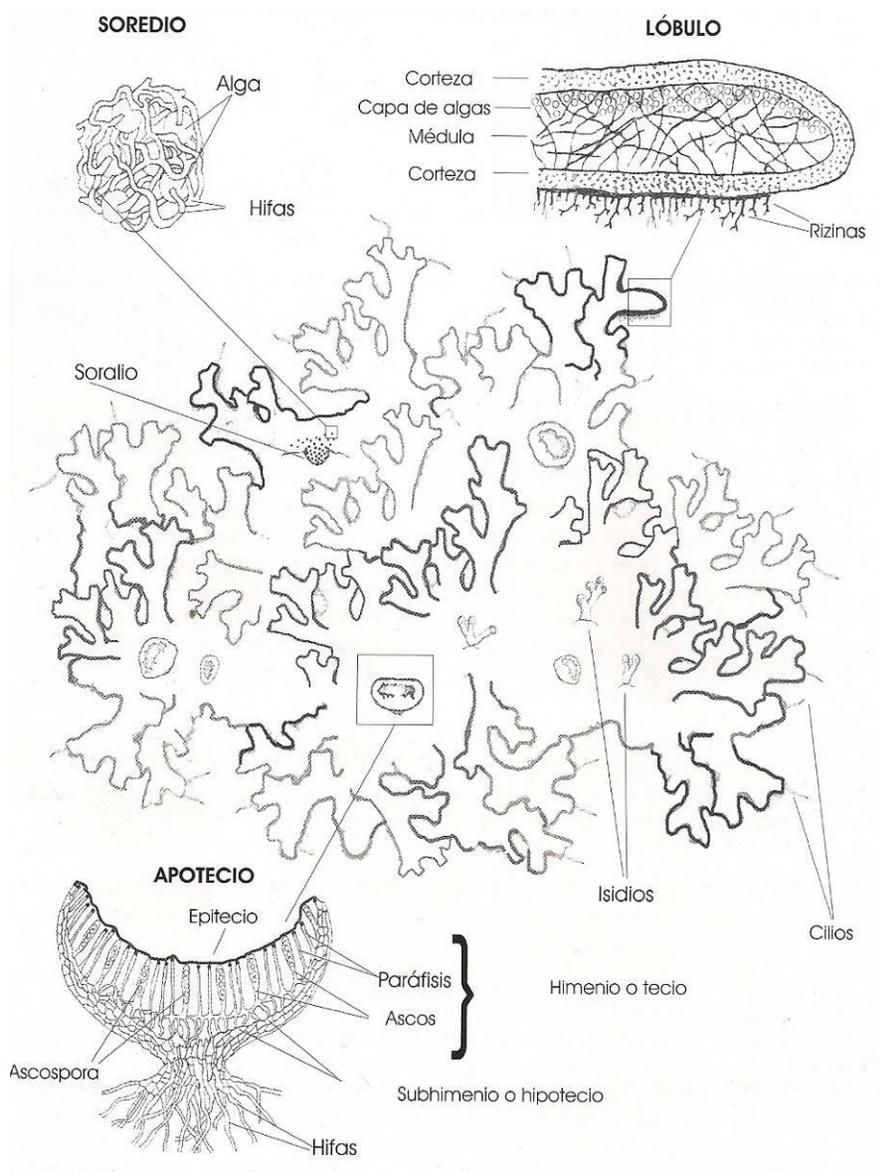
En áreas donde todavía existen los líquenes, es posible realizar estudios a través de un análisis directo de las especies presentes (biomonitoreo pasivo). Sin embargo, en áreas donde no hay soportes sobre los cuales los líquenes crecen o bien han desaparecido por efecto de los elevados niveles de contaminación (desiertos de líquenes), es necesario el empleo de la técnica de transplante biomonitoreo activo (Pignata *et al.*, 2008).

**3.1.5. Líquenes.** “Conocidos también como hongos liquenizados, son organismos constituidos por una asociación aún no bien entendida, entre dos organismos radicalmente diferentes: un hongo (micobionte), la mayoría de las veces un ascomiceto, y un organismo fotosintético, una cianobacteria o un alga verde o clorofita (ficobionte). De esa interacción es originado un talo estable con estructura, ecología y fisiología específicas diferentes a las que tienen los hongos o algas por separado”. (Moreno *et al.*, 2007). Cubren prácticamente el 8 % de la superficie terrestre, y la comunidad científica ha considerado que hay mundialmente alrededor de 20 000 especies. La figura 5 muestra la clasificación básica de los líquenes, de acuerdo a su taxonomía, morfología y el sustrato al cual se adhieren.



**Fig. 5.** Clasificación básica de los líquenes (Tomado de Moreno et al., 2007).

Es importante aclarar algunos términos empleados comúnmente en la bibliografía sobre líquenes. El talo está referido al cuerpo o estructura vegetativa del líquen, mientras que los apotecios constituyen la estructura de reproducción sexual del micobionte (cuerpo fructífero en forma de disco o copa). De igual forma, los isidios son proyecciones de la superficie del talo, revestidas de corteza, de forma cilíndrica o globular, generalmente erguidos, en cuyo interior están hifas y gonidios entremezclados y sirven de elementos de multiplicación vegetativa cuando el talo se seca. Los soredios son pequeñas granulaciones situadas en los sorolios, constituidos por gonidios e hifas entremezclados; pueden dar lugar a un nuevo líquen, una vez son dispersados a través de medios como aire, agua e insectos (Moreno et al., 2007). La figura 6 muestra las generalidades anatómicas de los líquenes.



**Fig. 6.** Generalidades anatómicas de los líquenes (Tomado de Moreno et al., 2007).

A continuación, son mostradas las características fundamentales que identifican a los géneros de líquenes empleados en esta investigación:

3.1.5.1. Género *Parmotrema*: Líquenes foliáceos (formas hojosas, son planos y sólo están parcialmente pegados al sustrato), talo de lóbulos anchos y apicalmente rotundos. Corteza inferior desnuda y limpia en una zona más o menos amplia a lo largo



del margen. Cilios marginales ocasionales. Apotecios, cuando están presentes son numerosos y con bordes talinos. Género representado en Venezuela por 71 especies. (Moreno *et al.*, 2007).

3.1.5.2. Género *Usnea*: Líquenes fruticulosos (formas de cabello, correa o de arbusto), talo color verdoso-amarillento cuando está húmedo y marrón-amarillento cuando está deshidratado. Talo colgante, con un cordón central, con marcada tendencia a presentar una base con la cual está adherido al sustrato. Soredios e isidios ausentes. Apotecios, cuando están presentes, ubicados en los extremos de las ramas. Esporas hialinas. Ficobionte *Protococcus*. Género representado en Venezuela por 84 especies. (Moreno *et al.*, 2007).

La figura 7 muestra dos fotografías correspondientes a los géneros de líquenes empleados en este trabajo.



**A**



**B**

**Fig. 7.** Líquenes de los géneros *Parmotrema* sp (A) y *Usnea* sp (B).

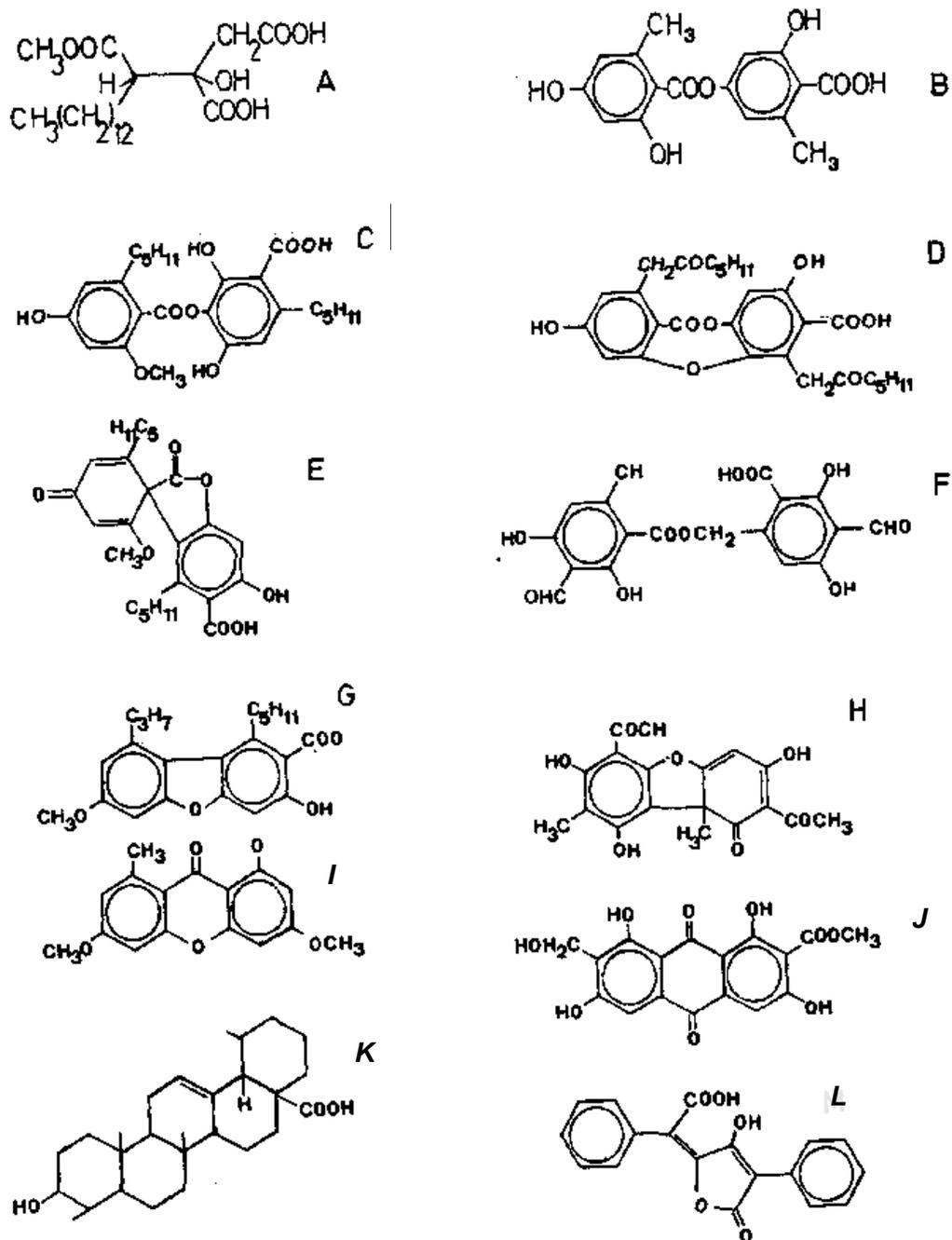
3.1.5.3. Química de los líquenes: Contienen a nivel intracelular aminoácidos libres como leucina, isoleucina, fenilalanina, entre muchos otros aminoácidos esenciales que han logrado ser extraídos. La composición de las membranas de las hifas, no está completamente conocida. Pueden encontrarse diferentes compuestos ternarios: calosa,



compuestos pécticos, hemicelulosas, liquenina e isoliquenina. Como en los hongos autónomos, la quitina está extendida en la membrana de las hifas de numerosos líquenes. El número y la variedad de los glúcidos encontrados es considerable y constantemente son extraídos otros nuevos. Es conocida, principalmente en las hifas, la existencia de glóbulos lipídicos, con frecuencia en gran número, sobre todo en la médula de las especies calcícolas. Asimismo, destaca la metacromatina, como una importante sustancia proteica presente en los líquenes con gonidios Cianofíceos y en las hifas de los líquenes que contienen tales gonidios. De igual forma, en los líquenes han sido registradas numerosas diastasas (enzimas), responsables del metabolismo del carbono y del nitrógeno. También, es posible reconocer en algunos casos la existencia de algunas vitaminas A (retinol), B1 (tiamina), B3 (niacina), C (ácido ascórbico), D y ácido fólico, siempre en pequeña cantidad (Des Abbayes *et al.*, 1989).

*Productos excretados al exterior de las células:* El oxalato cálcico es con frecuencia muy abundante en los líquenes. Las sustancias más notables producidas por los líquenes son las que han sido denominadas, impropriamente, ácidos liquénicos (ver figura 8), ya que no todos son ácidos, los cuales pueden representar varias centésimas del peso seco del talo, a veces incluso más. Estos cuerpos son insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos neutros. Es conocida la constitución química exacta de alrededor de ochenta de ellos, pero otros cincuenta han sido aislados y denominados sin conocerse exactamente su fórmula (Des Abbayes *et al.*, 1989).

Algunos cuantos, pocos numerosos, pertenecen, a la serie alifática (ácidos grasos) o a la serie acíclica (triterpenoides). En la serie aromática, son encontrados derivados del ácido pulvínico, todos coloreados de amarillo; los dibenzofuranos, como el ácido usnínico, que colorea de amarillo el talo de muchas especies; quinonas, como la parietina; xantonas (liquexantona); los dépsidos y las depsidonas derivados de la orcina o de la  $\beta$ -orcina (Des Abbayes *et al.*, 1989). Asimismo, contienen otros compuestos extracelulares como derivados de ácidos tetrónicos y derivados de diacetopiperazinas (Mason, 1974).

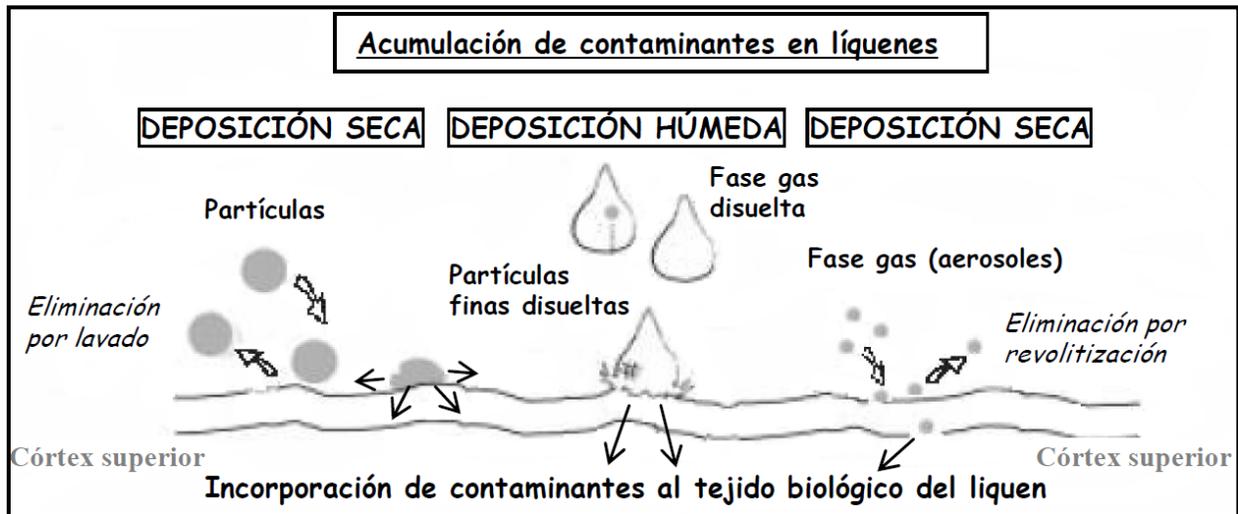


**Fig. 8.** Estructura química de algunos ejemplos de sustancias líquénicas: Ácido caperático (A), ácido lecanórico (B), ácido criptochlorofaeico (C), ácido alectorónico (D), ácido picrolíquénico (E), ácido barbatólico (F), ácido didímico (G), ácido usneico (H), liquenxantona (I), ácido rodocladónico (J), ácido ursólico (K) y ácido pulvínico (L) (Tomado de Manrique, 1989).



3.1.5.4. Líquenes como bioindicadores/biomonitores de la contaminación atmosférica: Algunas características que hacen a los líquenes excelentes bioindicadores o biomonitores de la contaminación atmosférica son: su ubicuidad y fácil muestreo, son excelentes bioacumuladores, son relativamente longevos (con una tasa de crecimiento muy lenta, por lo tanto, mantienen una morfología uniforme a lo largo del tiempo), son altamente sensibles a los cambios medio ambientales y no tienen cutícula (están expuestos) ni raíces (toman sus nutrientes del aire) (Conti y Cecchetti 2000).

Uno de los mecanismos propuestos a través del cual los líquenes incorporan y acumulan nutrientes y contaminantes (capacidad bioacumuladora), es la incorporación pasiva. Dicha incorporación consiste en la fijación de material particulado atmosférico, tanto en ambientes contaminados como no contaminados. Dichas partículas, de acuerdo a su composición y área superficial pueden estar constituidas por HAP, o tenerlos adsorbidos en su superficie (Pignata *et al.*, 2008). Debido a la morfología de los talos liquénicos, el material particulado presente en la atmósfera puede quedar atrapado en la superficie y dentro de los espacios intercelulares de la corteza. De igual forma, se piensa que muchos compuestos orgánicos de naturaleza lipofílica, que están en la superficie de los líquenes, interaccionan con los HAP, mediante distintos tipos de fuerzas intermoleculares, características de los compuestos orgánicos con polaridad muy baja. La figura 9 muestra un esquema del modo en que los contaminantes se acumulan en los líquenes, tanto por la vía húmeda, seca y absorción de gases.



**Fig. 9.** Esquema de la incorporación de contaminantes al tejido biológico del líquen debido a las deposiciones húmedas y secas sobre la superficie del líquen y la absorción de compuestos en fase gas (Tomado de Blasco, 2008).

**3.1.6. Técnica de extracción estática asistida por ultrasonidos.** En términos generales, el proceso de extracción se basa fundamentalmente en la puesta en contacto de la muestra con un disolvente adecuado. Posteriormente, la mezcla de la muestra sólida con el disolvente líquido es sometida a una serie de tratamientos de distintos rangos de agresividad, que van desde la simple agitación hasta la puesta del disolvente en condiciones críticas de presión y temperatura, dependiendo de la fortaleza de la interacción entre el analito y la matriz (Blasco, 2008).

Los ultrasonidos se definen como sonidos cuyas frecuencias se encuentran más allá del rango perceptible por el ser humano. Las frecuencias de los ultrasonidos generalmente se encuentran entre 20 y 500 Mhz (Clark y Macquarrie, 2002).

El efecto de los ultrasonidos en el campo de la Química Analítica basa su eficacia en el proceso de cavitación acústica, que depende fuertemente de la potencia del ultrasonido. Este proceso puede ser caracterizado por la formación, crecimiento e implosión de burbujas de gas en disolución. Cuando las ondas de los ultrasonidos de alta potencia se propagan por el líquido, ocurre una ruptura de la continuidad de dicho



líquido con la formación de la burbuja de cavitación, creando zonas de presiones negativas. La cavitación así formada se llena del vapor y de los gases disueltos en el líquido colindante. Entonces, la burbuja de gas formada colapsa y se destruye rápidamente bajo la acción de la compresión siguiente (Soudagar y Samant, 1995). Esta destrucción da como resultado la creación de una gran fuerza hidráulica que tiene una fuerte acción destructiva (Blasco, 2008).

La duración de este estado de baja presión, mientras aparecen las burbujas de cavitación, decrece con el incremento de la frecuencia del ultrasonido. De modo que el efecto de la cavitación se reduce con ultrasonidos de frecuencias altas (Suslick, 1988 y Arrojo *et al.*, 2007).

La aplicación de los ultrasonidos en la etapa de extracción se lleva a cabo, generalmente, en los baños de ultrasonidos. En este caso, la muestra sólida se pone en contacto con el disolvente dentro de un recipiente de extracción que se introduce en un baño de ultrasonidos. Estos son recipientes de acero inoxidable de 5 a 150 litros de capacidad que se alimentan eléctricamente. La mayoría de ellos trabajan a 40 KHz aunque es posible encontrarlos de frecuencias menores, pero frecuencias más bajas pueden dañar el producto, además de producir mucho más ruido durante el funcionamiento. Las ondas de ultrasonidos provocan la vibración de las moléculas aumentando la eficacia de los choques entre ellas y debilitando así las interacciones entre los analitos y la matriz. La difusión del disolvente dentro de los poros de la muestra sólida también se ve favorecida, mejorando el contacto entre el disolvente y la muestra. Estos baños, en realidad, lo que hacen es transformar la energía eléctrica en energía ultrasónica. La eficiencia de esta transformación depende no sólo del equipo sino también de las condiciones de trabajo (Blasco, 2008).

El efecto de los ultrasonidos depende de muchas variables. Las más importantes atañen a las características químicas del medio donde se produce la reacción (densidad, viscosidad, tensión superficial, entre otras), la presión, la temperatura, la frecuencia, potencia del aparato y el tamaño y geometría tanto del aparato como del recipiente de extracción (Suslick, 1988). Asimismo, hay que tener en cuenta que la



extracción también dependerá de la posición del recipiente dentro del baño (De los Santos, 2005). Por lo que habrá que tener cuidado en colocar el recipiente siempre en el mismo lugar prefijado en el baño, para que se encuentre expuesto a las ondas de ultrasonidos de la misma manera y evitar así problemas en la baja reproducibilidad de los experimentos (Blasco, 2008).

En comparación con la aplicación de agitación mecánica convencional, la aplicación de ultrasonidos en los procesos de extracción de muestras sólidas mejora la eficacia de la extracción (Blasco 2008). La figura 10 muestra una fotografía del baño de ultrasonido empleado en esta investigación.



**Fig. 10.** Baño de ultrasonido Cole-Parmer modelo 8894.

**3.1.7. Instrumental Analítico.** Los métodos usados frecuentemente para la separación, identificación y cuantificación de HAP en diversas matrices ambientales son: la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) y la Cromatografía de Gases (CG), siendo métodos complementarios. La tabla 6 muestra las ventajas del uso del HPLC para los fines de cuantificación de HAP, asociados a tejidos líquénicos, a pesar de su elevado costo económico.



**Tabla 6. Cuadro comparativo de los instrumentales HPLC y CG, relativo a HAP**

(Tomado de Peltonen y Kuljukka, 1995; Réquiz, 2006 y Chirino, 2008).

Aspecto considerado	HPLC	CG/EM
Estabilidad térmica	La separación de los analitos ocurre a temperatura ambiente, permitiendo el análisis de compuestos de diferente peso molecular.	Es indispensable que la muestra sea volátil y no se degrade térmicamente; de lo contrario se requiere la síntesis de un derivado de la muestra que sí reúna tales condiciones.
Resolución	Posee dos fases donde pueden existir interacciones selectivas, la del soluto tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil, ambas proporcionan parámetros adicionales que mejoran la separación.	El flujo de gas tiene poca interacción con los solutos y la separación se logra principalmente en la fase estacionaria.
Rapidez	El tiempo de análisis se realiza en menos de 1 hora, en algunos casos sólo en unos pocos minutos.	Cada análisis puede demorar un poco más de 1 hora.
Sensibilidad	Puede utilizar detectores de fotodiodos en serie, donde se obtienen espectros UV-visible para cada pico, permitiendo identificar los compuestos separados y la presencia de co-eluciones. A su vez, logra detectar cantidades en el orden de los nanogramos ( $10^{-9}$ g) en una amplia variedad de materiales. Los detectores de fluorescencia (FL), también empleado en el HPLC, pueden detectar cantidades en el orden de los picogramos ( $10^{-12}$ g). Cuando ambos detectores se combinan en serie, se logran importantes ventajas en el análisis de HAP.	Separa los isómeros de HAP. Permite la identificación y análisis semi-cuantitativo de los HAP en el orden de los nanogramos ( $10^{-9}$ g). Son ampliamente utilizados los sistemas cuadrupolares (SIM, selection ion mass, según sus siglas en inglés).
Recuperación eficiente de la muestra	Los detectores empleados no destruyen la muestra, permitiendo recuperar los analitos separados y detectados.	No permite recuperar los compuestos separados.
Costo	Es más costosa debido al consumo de solventes de alta pureza.	Es de bajo costo, solo consume el gas inerte.



### 3.2. Antecedentes

Diversos estudios han sido efectuados a escala global acerca del empleo de líquenes como bioindicadores/biomonitores de contaminación atmosférica, debido a las especiales características fisiológicas y ecológicas que presentan dichos organismos, que los hacen altamente sensibles a los cambios medioambientales. Entre estas características está la carencia de cutícula en el talo de crecimiento, lo cual los expone al efecto de todo tipo de sustancias líquidas y gaseosas, y el que sean muy estenoicos (sus requerimientos ecológicos son muy precisos y estrechos) (Moreno *et al.*, 2007). Las revisiones publicadas por Conti y Cecchetti (2000) y Hawksworth *et al.* (2005), mencionan la variedad de usos que puede dárseles a los líquenes como bioindicadores/biomonitores de la contaminación atmosférica. Esto es debido a la capacidad que tienen de acumular ciertas sustancias contaminantes como metales pesados e hidrocarburos; o por la alteración de su morfología y comportamiento ante la presencia de ciertas condiciones medioambientales como radiación UV, lluvia ácida, contaminación aérea por SO<sub>2</sub>, óxidos de nitrógeno y O<sub>3</sub>.

**3.2.1. Internacionales.** A nivel internacional son pocas las publicaciones en las cuales han sido empleados líquenes para el seguimiento de la contaminación atmosférica por HAP, a diferencia a los numerosos estudios efectuados con metales (Conti y Cecchetti, 2000; Hawksworth *et al.*, 2005 y Pignata *et al.*, 2008). Hasta el momento se conocen estudios realizados en cinco países, cuatro de ellos en Europa (Polonia, Italia, España y Portugal), y uno en Asia (La India). Entre dichas investigaciones pueden contarse la de Migaszewski *et al.* (2002), Guidotti *et al.* (2003 y 2009), Shukla y Upreti (2008), Blasco (2008) y Augusto *et al.* (2009). Dichos autores emplearon distintas especies de líquenes, entre las que están: *Hypogymnia physodes*, *Pseudevernia furfuracea*, *Phaeophyscia hispidula*, *Parmotrema hypoleucinum*, *Evernia prunastri*, *Parmelia Sulcata*, *Lobaria pulmonaria*, *Usnea sp.*, *Ramalina farinacea*, *Xanthoria parietina*.



Guidotti *et al.* (2003 y 2009), Shukla y Upreti (2008) y Augusto *et al.* (2009), desarrollaron sus estudios en zonas urbanas, y en su mayoría tomaron como criterio de selección de las estaciones de muestreo, los distintos niveles de flujo vehicular, en las principales avenidas y calles. Esto último, debido a que dicha actividad es una de las principales fuentes de HAP.

De todas las investigaciones, sólo Guidotti *et al.* (2003) realiza un muestreo de líquenes de tipo activo, con el objeto de colocar el biomonitor en puntos en los que no existe naturalmente y evaluar variaciones en la concentración de los HAP en el tiempo (la recolección fue hecha cada 5 meses, durante 20 meses). En el resto de las investigaciones emplearon muestreos de tipo pasivo (Migaszewski *et al.*, 2002, Shukla y Upreti, 2008, Blasco *et al.*, 2008 y Augusto *et al.*, 2009) debido a que en su mayoría son estudios piloto en los cuales uno de los objetivos es probar la factibilidad del uso de líquenes como biomonitores y/o bioindicadores de la contaminación atmosférica en dichas localidades.

De igual manera, en los estudios de Migaszewski *et al.* (2002) y Augusto *et al.* (2009), proponen comparar los valores de concentración obtenidos en los líquenes con los determinados en otros bioacumuladores como agujas de pinos, además de muestras de suelo y/o partículas de aire tomadas con un muestreador de alto volumen para PM<sub>10</sub>, con el objeto de revelar correlaciones entre los distintos métodos, además, de observar la capacidad acumulativa de las distintas especies de organismos vivos empleados. Asimismo, Blasco (2008) realiza la caracterización de seis especies de líquenes (*Parmelia sulcata*, *Evernia prunastri*, *Pseudevernia furfuracea*, *Usnea sp.*, *Lobaria pulmonaria* y *Ramalina farinacea*) en cuanto a capacidad de biomonitorización de HAP y perfil de bioacumulación de estos contaminantes, teniendo en cuenta que cada especie presenta distintas características morfológicas, de resistencia a la contaminación, necesidad de iluminación, nutrientes, humedad, entre otras.

En lo relativo al lavado del líquen, previo al tratamiento químico de la muestra, sólo Migaszewski *et al.* (2002) reporta de forma clara dicho paso (tres veces con agua



deionizada, previamente a la disgregación mecánica de los líquenes), con el objeto de remover el polen y las partículas minerales débilmente unidas a la superficie del líquen (posteriormente fueron secados a temperatura ambiente). Domeño *et al.* (2006) y Blasco *et al.* (2008) mencionan una limpieza de los líquenes (del polvo y de restos de corteza y hojas), pero no especifican la manera en la cual fue realizada, mientras que Shukla y Upreti (2008) y Augusto *et al.* (2009), no mencionan algún tipo de limpieza. Por su parte, Guidotti *et al.* (2003), indican que la limpieza del material extraño como polvo, partículas y hojas, la efectuaron con ayuda de un microscopio.

En cuanto a la temperatura y tiempo de secado de la muestra, Migaszewski *et al.* (2002) lo realizaron a temperatura ambiente (sobre los 16 °C, sin especificar tiempo); Guidotti *et al.* (2003) a 40 °C durante 48 horas; Domeño *et al.* (2006) y Blasco *et al.* (2008) a 35 °C durante 3 o 4 días; y el resto de las publicaciones no mencionan dicho paso (Shukla y Upreti, 2008 y Augusto *et al.*, 2009).

En lo referente a las metodologías de extracción de los compuestos orgánicos empleadas destacan la extracción Soxhlet (Shukla y Upreti, 2008 y Augusto *et al.*, 2009), Soxtec (Migaszewski *et al.*, 2002), ultrasonido (Guidotti *et al.*, 2003), y DSASE (dynamic sonication-assisted extraction method, por sus siglas en inglés) (Blasco *et al.*, 2008). En el caso de la técnica Soxhlet, Shukla y Upreti (2008), utilizan como solvente 100 mL de diclorometano durante 16 horas, mientras que Augusto *et al.* (2009) utilizan 200 mL de acetonitrilo por 24 horas, en ambos caso fueron tratados 2 g de la muestra de líquen. Estos últimos autores realizaron sus análisis mediante la técnica Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés), a diferencia de Migaszewski *et al.* (2002) Guidotti *et al.* (2003) y Blasco *et al.* (2008), que efectuaron los análisis por la técnica Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM). De igual forma, Migaszewski *et al.* (2002) utilizan como solvente en la extracción de los compuestos orgánicos diclorometano haciendo uso del aparato Soxtec, el cual es un equipo que realiza la extracción en continuo y por condensación, más eficiente que el aparato Soxhlet tradicional, en términos de rapidez,



exactitud y precisión, pudiendo analizar varias muestras de manera simultánea y automatizada. Guidotti *et al.* (2003), emplea como solvente 30 mL de ciclohexano en 2 g de muestra, por 30 minutos, realizando dicho procedimiento por duplicado con el mismo sólido residual, para posteriormente combinar los extractos.

Domeño *et al.* (2006) compara tres técnicas de extracción orgánica distintas, con el objeto de optimizar dicha etapa del tratamiento de la muestra. Entre dichas técnicas está la técnica de extracción DSASE (dynamic sonication-assisted extraction method), extracción Soxhlet y extracción estática con ultrasonido; las tres fueron aplicadas para una misma cantidad de muestra (0,2 g de líquen) y el mismo solvente (hexano fue el de mayor rendimiento para la mayoría de los 16 HAP con la técnica DSASE, en comparación con metanol, diclorometano y tolueno). En esta investigación se obtuvo que las tres técnicas presentaron porcentajes similares de recuperación, para los 16 HAP listados por la USEPA, y que la principal ventaja que proporciona la técnica DSASE, viene dada en términos de tiempo y de consumo de solvente. En este caso la determinación de los HAP fue realizada mediante CG/EM.

Es importante señalar que los trabajos de Guidotti *et al.* (2003) y Shukla y Upreti (2008), emplean para la etapa de limpieza o purificación de los HAP, el método 3630 de la USEPA. Dichos autores llevaron a cabo la purificación o separación de los HAP (de otros compuestos orgánicos), empleando como fase estacionaria sílica gel activada, a diferencia de Domeño *et al.* (2006), que utiliza alúmina activada (para los extractos obtenidos con Soxhlet y extracción estática con ultrasonido). Guidotti *et al.* (2003), usó como eluentes para la separación de los HAP, 25 mL de pentano, para separar los compuestos saturados, seguido de 25 mL de la mezcla diclorometano: pentano (2:3, v/v), para obtener la fracción de los compuestos aromáticos. A diferencia de este último trabajo, Domeño *et al.* (2006), realizó la elución de los analitos empleando como eluyente solo 20 mL de la mezcla hexano: diclorometano (3:1). Cabe destacar el método de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), empleado por Blasco *et al.* (2008), en el cual utiliza como fase estacionaria florisil y cartuchos de NH<sub>2</sub>-SPE (en una



mini columna), y como eluentes hexano y la mezcla hexano: diclorometano 65:35. Por otro lado, Augusto *et al.* (2009), utiliza una columna de florisil y 30 mL de acetonitrilo como eluente. Migaszewski *et al.* (2002), son los únicos que no reportan metodología de separación o purificación de los HAP con respecto al resto de los compuestos orgánicos presentes en los extractos.

La tabla 7 muestra de forma resumida los aspectos tratados anteriormente.

En cuanto al tratamiento estadístico de los datos experimentales, resalta el empleo de estadística multivariada, específicamente de Análisis de Componentes Principales (ACP) (Shukla y Upreti, 2008 y Blasco *et al.*, 2008), con el objeto de sintetizar la información, reduciendo el número de variables trabajadas, perdiendo la menor cantidad de información posible, para así facilitar la interpretación de los datos. Blasco *et al.* (2008) y Augusto *et al.* (2009) efectúan pruebas de correlación de Pearson, con el objeto de establecer relaciones presentes entre el índice de pureza atmosférica (IAP, por sus siglas en inglés) y la concentración de HAP en los líquenes, en el caso de los primeros, y en el caso de Augusto *et al.* (2009) entre la concentración de los HAP en muestras de líquenes y la concentración de HAP en muestras de suelo. Por otro lado, Augusto *et al.* (2009), realizan un análisis de varianza de una vía (ANOVA), el cual permite comprobar las diferencias significativas entre los perfiles de HAP en los diferentes medios. A diferencia de los autores anteriores, Migaszewski *et al.* (2002) y Guidotti *et al.* (2003) no emplean estadística multivariada, sino que presentan los datos organizados luego de haber realizado estadística descriptiva, además de emplear herramientas univariadas (cálculo de media y varianza) y bivariadas (comparación de dos variables de estudio, correlaciones) para su estudio e interpretaciones.



**Tabla 7. Cuadro comparativo de líquenes, metodologías de preparación, extracción y purificación empleadas por distintos autores.**

Autor	Liquen y tipo de muestreo	Lavado y secado	Técnica de extracción	Separación o purificación	Instrumental
Migaszewski <i>et al.</i> (2002); Polonia.	<i>Hypogymnia physodes</i> . Muestreo pasivo (2 localidades).	3 veces con agua deionizada. Secado a T ambiente (>16 °C).	Soxtec (diclorometano) (No menciona cantidad de muestra).	No reporta purificación.	CG/EM *
Guidotti <i>et al.</i> (2003); Italia.	<i>Pseudevernia furfuracea</i> . Muestreo activo (8 localidades).	No mencionan lavado. Secado a 40 °C durante 48 h.	Ultrasonido (30mL de ciclohexano por 30 min, dos veces al mismo sólido) (2 g de muestra).	Método 3630 de la EPA (silica gel, 25 mL de pentano y 25 mL de la mezcla diclorometano:pentano (2:3, v/v)).	CG/EM *
Shukla y Upreti (2008); La India.	<i>Phaeophyscia hispidula</i> . Muestreo pasivo (9 localidades).	No mencionan lavado ni secado.	Soxhlet (100 mL de diclorometano por 16 h) (2 g de muestra).	Método 3630 de la EPA.	HPLC *
Blasco (2008); España.	<i>Parmelia sulcata</i> , <i>Evernia prunastri</i> , <i>Ramalina farinacea</i> , <i>Pseudevernia furfuracea</i> , <i>Usnea sp.</i> y <i>Lobaria pulmonaria</i> . Muestreo pasivo (47 localidades).	No mencionan lavado. Secado a 35 °C durante 3 o 4 días.	** DSASE (flujo de hexano de 0,2 mL/min por 10 min) (0,2 g de muestra).	Florisil y cartuchos de NH <sub>2</sub> -SPE (en una mini columna), y como eluentes: hexano y la mezcla hexano:diclorometano 65:35.	CG/EM *
Augusto <i>et al.</i> (2009); Portugal.	<i>Parmotrema Hypoleucinum</i> y <i>Xanthoria parietina</i> . Muestreo pasivo (34 localidades).	No mencionan lavado ni secado.	Soxhlet (200 mL de acetonitrilo por 24 h) (2 g de muestra).	Florisil y 30 mL de acetonitrilo como eluyente.	HPLC *

\* HPLC = High Performance Liquid Chromatography/ CG/EM = Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

\*\* DSASE = Dynamic Sonication-Assisted Extraction Method



En relación a las concentraciones, los autores que emplearon un muestreo de tipo pasivo: Migaszewski *et al.* (2002), Shukla y Upreti (2008) y Blasco *et al.* (2008) y Augusto *et al.* (2009), obtuvieron concentraciones totales de HAP (expresadas en  $\mu\text{g/g}$ ) comprendidas entre, 1,184-2,253; 3,38-25,01; 0,238-6,420 y 0,0955-0,8738 respectivamente, mientras que Guidotti *et al.* (2003 y 2009), empleando un muestreo de tipo activo, encontraron concentraciones comprendidas entre 0,056-0,159  $\mu\text{g/g}$  (2003) a un tiempo de recolección de 15 meses; y entre 0,168-0,395  $\mu\text{g/g}$  (2009) a un tiempo de recolección de 3 meses.

De esta manera, Migaszewski *et al.* (2002) llegan a las siguientes conclusiones: la considerable variabilidad de la concentración de HAP en diferente especies de plantas, muestra la diversidad en la bioacumulación de los mismos; los HAP poseen un origen antrópico en la mayoría de los casos, y están asociados a la contaminación por metales pesados y azufre; la mayor parte del talo del líquen revela más altas concentraciones de hidrocarburos individuales que su corteza huésped; y las concentraciones de HAP totales en los líquenes fueron superiores a las de las plantas vasculares del mismo entorno. Por otra parte, Guidotti *et al.* (2003), demuestran la importancia de la calefacción doméstica (en la zona templada) en las concentraciones atmosféricas de HAP. Asimismo, proponen investigar los mecanismos de transporte de los HAP a través de las membranas celulares de los líquenes, para poder completar las interpretaciones al respecto; y sugiere que los líquenes constituyen un método económico y accesible para la evaluación de la contaminación atmosférica por HAP. De igual forma, Shukla y Upreti (2008), mencionan que la concentración de los HAP en líquenes permite indicar origen y proximidad de la fuente de contaminación, y que de acuerdo a la proporción en la que sean encontrados los distintos HAP, puede conocerse el origen de dichos compuestos, así como inferir su fuente de emisión. Blasco *et al.* (2008) concluyen que la calidad del aire en ambientes naturales puede ser evaluada mediante el análisis cuantitativo de los HAP en líquenes, pero que sólo puede hacerse bajo condiciones ambientales y microclimáticas similares. De igual forma, Augusto *et al.*



(2009), encuentran que los líquenes acumulan concentraciones de HAP más altas que los suelos y las agujas de pino; y que el valor de fondo (área no contaminada) de los HAP en líquenes y en suelos son diferentes, pero dichas concentraciones tienden a igualarse en zonas urbanas e industriales (áreas contaminadas).

En lo referente al estudio comparativo de capacidad de biomonitorización de HAP, y perfil de bioacumulación por parte de distintas especies de líquenes hecho por Blasco (2008), obtuvo que el mínimo valor de concentración de HAP totales lo presentó la especie *Lobaria pulmonaria* y el máximo *Evernia prunastri*. La autora concluye que la biomonitorización de la contaminación atmosférica mediante los niveles de HAP acumulados en líquenes resulta muy específica de la especie utilizada, ya que las características en cuanto a capacidad, perfil de bioacumulación de HAP y la respuesta espacial resultaron diferentes en las especies de líquenes estudiadas, por lo que el empleo de las mismas dependerá de la finalidad del estudio y de la información que interese monitorizar.

Igualmente puede observarse que en todos los trabajos publicados en los cuales emplean líquenes como bioindicadores/biomonitores de contaminación atmosférica por HAP, predominan los compuestos que poseen menos de 4 anillos, es decir, los presentes mayoritariamente en la fase gaseosa, lo cual demuestra que dichos compuestos son fácilmente bioacumulados en los líquenes (Guidotti *et al.*, 2003 y 2009), debido a que dichos organismos son muy eficientes absorbiendo nutrientes (y también contaminantes) de la fase gaseosa o vapor (Augusto *et al.*, 2009).

Guidotti *et al.* (2003 y 2009), Shukla y Upreti (2008) y Blasco *et al.* (2008), llegan a la conclusión de que efectivamente la actividad vehicular constituye una de las fuentes más importante de HAP emitidos a la atmósfera, debido a que establecen una relación directa y proporcional entre los niveles de afluencia o tráfico vehicular, y las concentraciones de HAP en las distintas estaciones o puntos de muestreo.



**3.2.2. Nacionales.** Los primeros estudios acerca de la contaminación atmosférica en la ciudad de Caracas, empleando líquenes, fueron publicados por Vareschi (1953), utilizando un método biológico para ubicar las mayores masas de aire impurificadas y las zonas de aire poco modificado de la capital venezolana. Para ello fue comprobada la ausencia o presencia de ciertas especies de líquenes, a lo largo y ancho de la ciudad, así como el desarrollo que presentaban los mismos. El autor elabora un mapa de la ciudad de Caracas, indicando las zonas con aire campestre (zona normal de líquenes exuberantes), débilmente impurificado (zona de líquenes menos reducidos), medianamente impurificado (zona de líquenes muy reducidos) y fuertemente impurificado (desierto de líquenes).

Específicamente en Venezuela, Quijada (2006), Díaz (2008) y Arguello (2009) utilizaron líquenes para el monitoreo de metales pesados en la Ciudad de Caracas. Quijada (2006) y Díaz (2008) realizaron muestreos de tipo activo, mientras que Arguello (2009), empleó un muestreo de tipo pasivo. En dichos trabajos, fueron utilizados los géneros: *Ramalina sp.*, *Pyxine sp.*, *Parmotrema sp.* y *Physcia sp.*

A nivel nacional la única investigación conocida referente al empleo de líquenes para el seguimiento de la contaminación atmosférica por HAP, es la de Réquíz (2006). La misma tuvo como objetivo principal estudiar el uso potencial de los líquenes como bioacumuladores de HAP en la fase gaseosa de la atmósfera. El estudio fue realizado en la ciudad de Caracas, mediante un muestreo de tipo pasivo de líquenes pertenecientes al género *Pyxine sp.*, tomando como criterio principal para la selección de las zonas de muestreo, los diferentes niveles de tráfico vehicular y la presencia del género de líquenes antes mencionado. Hasta el momento, se desconoce de algún otro estudio de bioacumulación de HAP en el cual sea empleado el género *Pyxine sp.* Luego de recolectados los líquenes, fueron limpiados con 20 mL de agua deionizada con la finalidad de remover parte de la corteza del árbol aún remanente así como cualquier resto de polvo, partícula, hoja, entre otros; posteriormente fueron secados a 40 °C durante 48 horas. Fueron empleados para la extracción 2 g de líquen y se utilizó como



método de extracción un baño de ultrasonido y ciclohexano como solvente. Posteriormente para la separación de la fracción de compuestos aromáticos fue preparada una columna cromatográfica de sílica gel, y se emplearon como eluentes 25 mL de hexano y 40 mL de la mezcla hexano: diclorometano (2:3, v/v). La identificación de los HAP fue hecha mediante las técnicas CG/EM y HPLC (con esta última cuantificó). Logró identificar 13 HAP pertenecientes al grupo de los 16 HAP contaminantes principales, según la US-EPA. Para el tratamiento estadístico de los datos, realizó un ACP, además de otras herramientas estadísticas univariadas (histogramas, diagramas de cajas y de torta). Obtuvo como resultado que la concentración total de HAP estaba comprendida entre 0,24 y 9,08  $\mu\text{g/g}$ . En su mayoría, los HAP determinados son de bajo peso molecular (de 2 a 4 anillos), con lo cual llegó a la conclusión de que efectivamente los líquenes pueden ser utilizados como bioacumuladores de HAP, en la fase gaseosa de la atmósfera en la ciudad de Caracas.

Entre las recomendaciones que efectúa la autora para posteriores investigaciones están: comparar el empleo de la técnica ultrasonido con respecto a técnicas convencionales como el Soxhlet, con el objeto de corroborar los valores obtenidos bajo la extracción con ultrasonido con respecto a las técnicas aprobadas internacionalmente; realizar un bioseguimiento utilizando los líquenes de manera activa, de tal forma que pueda evaluarse la temporalidad de absorción de los HAP sobre los líquenes; realizar estudios de los parámetros meteorológicos (velocidad y dirección de los vientos, temperatura, humedad, radiación) para lograr interpretar de manera integral la dinámica de los HAP en la atmósfera; evaluar la efectividad del uso de los líquenes como biomonitores con respecto a otros bioseguidores presentes en la Ciudad de Caracas, así como con otros equipos especializados para la recolección de muestras de aire; y realizar un estudio de la cantidad de compuestos lipídicos contenida en los líquenes, para evaluar la relación entre dicha cantidad de sustancias y su capacidad de bioacumulación de HAP.



### 3.3. Área de estudio

**3.3.1. Ubicación geográfica y datos demográficos.** La ciudad de Caracas está situada en la zona centro-norte del país, a unos 15 km del Mar Caribe, localizado geográficamente a la longitud oeste de 66° 55' y latitud norte de 10° 30'. El Municipio Libertador sólo lo constituye el Distrito Capital, y junto con los Municipios Baruta, Chacao, El Hatillo y Sucre, pertenecientes al estado Miranda, conforma el Distrito Metropolitano. Caracas tiene una extensión territorial de 650 km<sup>2</sup>, y una población de 3.220.540 habitantes (sin incluir ciudades periféricas). Posee 1.246.910 vehículos (aproximadamente el 24% del parque automotor en circulación de Venezuela) (Instituto Nacional de Estadística, 2010).

3.3.1.1. Fuentes Móviles de contaminación: Las vías más importantes de Caracas incluyen las autopistas del Este, Valle-Coche, Francisco Fajardo, Francisco de Miranda, Boyacá (Cota Mil), Caracas-Baruta y Caracas-La Guaira. No se cuenta con datos de mediciones de flujo vehicular en todas estas vías. Sin embargo, los volúmenes de tráfico más grandes están ubicados en la autopista del Este. Otras vías de mediano tráfico, incluye las avenidas Libertador, Sucre y Bolívar (MARN-PDVSA, 2005).

3.3.1.2. Fuentes Fijas de contaminación: Las zonas industriales mayores se localizan al Este y Suroeste del área metropolitana, en los municipios Sucre y Libertador respectivamente. Las zonas del Este incluyen Los Ruices, Boleita Norte, Los Cortijos y Petare, donde son halladas industrias ligeras de alimentos, textiles, cosméticos y farmacéuticos. En el área de Baruta, Las Minas y La Trinidad son encontradas, adicionalmente a las ya mencionadas, industrias ligeras de plásticos. En el Suroeste, en el área de la Yaguara, Capara y La Vega se encuentran industrias pesadas de hierro y acero, cementeras, químicos, producción de pieles, textiles, alimentos, entre otras (MARN-PDVSA, 2005).



**3.3.2. Condiciones climáticas.** El clima de Caracas es de tipo intertropical de montaña con precipitaciones que varían entre los 900 y 1300 mm anuales, en la ciudad, y hasta los 2000 mm en algunas partes de la Cordillera. Entre los meses de Mayo a Diciembre incrementan las precipitaciones, denominada época de lluvia, esta condición se ve reducida entre los meses de Enero a Abril, denominada época de sequía (Observatorio ARVAL, 2008). Las características del terreno hacen que el viento sea canalizado en la dirección Este; así mismo, la mayor parte del tiempo las masas de aire están calmadas, notándose que en las tardes y temprano en las mañanas el aire queda atrapado en la cuenca y se crea una inversión de capas. Los vientos predominantes en el Parque Nacional Warayra Repano (El Ávila) y la Cordillera Central son los Alisios del N-E, los cuales soplan todo el año. Sin embargo, durante los meses marzo, abril y mayo los vientos alisios confluyen con los vientos que vienen del Sur hacia el Norte y N-O. La temperatura media anual varía conforme a la ubicación y altitud de la cordillera, teniendo que la temperatura media anual en el valle de Caracas, ronda los 21 °C (MARN-PDVSA, 2005).

**3.3.3. Fisiografía.** Caracas está ubicada en una cuenca hidrográfica con un valle angosto, que limita por el Norte con la Cadena Litoral, al Sur con los Altos de Pipe y por el Oeste con la Cordillera de la Costa, sin encontrar al Este ningún tipo de obstáculo geográfico.



#### 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El primer paso para abordar los objetivos ambientales que persigue este trabajo fue el diseño y ejecución de la etapa de muestreo, que consistió en el transplante de los líquenes desde una zona suburbana hacia la ciudad de Caracas. Sin embargo, previo a dicha fase fueron aplicadas algunas herramientas estadísticas que permitieron determinar el número mínimo de muestras que debían ser colocadas en las localidades de estudio para su posterior recolección y análisis de los HAP.

Según Montgomery y Runger (2007), el número óptimo de especímenes a tomar puede ser calculado si existen muestreos pilotos que permitan estimar algunos parámetros estadísticos. En la presente investigación fueron usados los resultados obtenidos por Réquiz (2006), con el objeto de conseguir el número mínimo de muestras de líquenes que deben ser colocados para que los valores de HAP sean estadísticamente representativos. Para ello fueron realizados un conjunto de cálculos estadísticos, que permitieron estimar los parámetros necesarios para la obtención del N óptimo de muestreo, tales como la media poblacional ( $X$ ) y la varianza ( $S^2$ ).

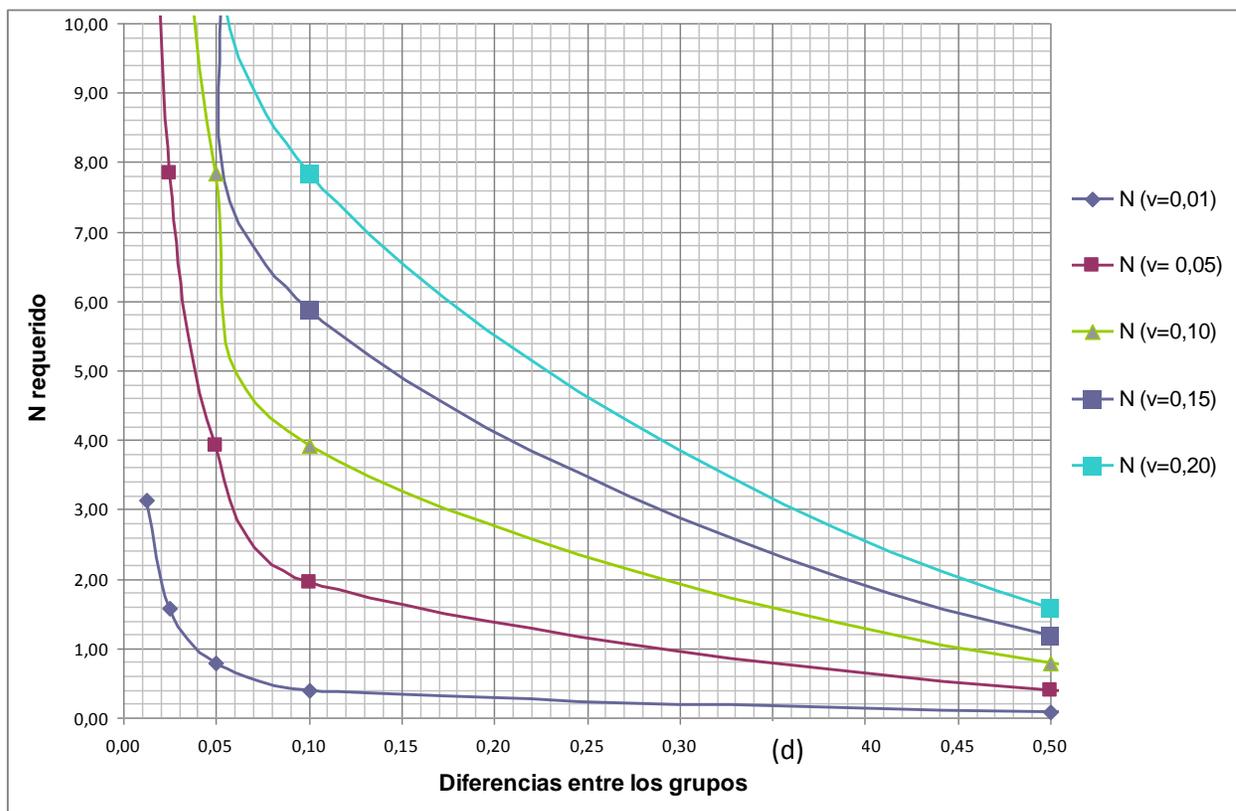
Para dicha deducción fue fijado un nivel de significancia para  $\alpha$  y  $\beta = 0,05$ , lo cual reduce al mínimo aconsejable los errores de tipo I y II respectivamente (Yamane, 1979; Wonnacott y Wonnacott, 2004 y Salama, 2002). Fijando dichas constantes a 0,05 (5 %), el cálculo de N dependerá de dos variables:

1. La desviación estándar ( $S$ ) promedio de los 14 HAP cuantificados por Réquiz (2006).
2. La diferencia de concentraciones en la cual dos muestras son consideradas distintas ( $d$ ).



Según dichos parámetros, la gráfica mostrada en la figura 11 relaciona la desviación estándar ( $S$ ) y la diferencia de concentraciones ( $d$ ), y permite estimar el  $N$  óptimo de un muestreo para cada HAP.

Tomando el promedio de la diferencia mínima y máxima entre localidades para cada HAP (0,44), así como desviación estándar promedio (0,17) (ver apéndice A y B) pudo obtenerse que 2 muestras de un determinado tipo de líquen es un número suficiente para garantizar la representatividad estadística de la mayoría de los HAP acumulados.



**Fig. 11.** Gráfico que relaciona las diferencias entre los grupos poblacionales y la varianza de los HAP, con el  $N$  de muestreo.



#### 4.1. Etapa de campo (muestreo activo)

Para el desarrollo del muestreo de tipo activo (transplante de los líquenes), el procedimiento experimental puede ser dividido en cuatro fases o pasos principales: colección de los líquenes en la zona suburbana, preparación de los líquenes, colocación de los líquenes en las localidades a evaluar y recolección de la muestra (posterior a la exposición).

**4.1.1. Colección de los líquenes en la zona suburbana.** La toma de líquenes fue hecha entre los días 16 y 18 de diciembre del 2009, en los jardines de la Universidad Simón Bolívar (USB) (ver figura 12), ubicada en el Valle de Sartenejas, Baruta, estado Miranda, a una altura de aproximadamente 1190 msnm. Esta localidad fue seleccionada debido a su fácil accesibilidad y a que en dicha zona la población de líquenes de los géneros de interés es abundante en comparación con otras localidades, además de tener condiciones microclimáticas similares a las presentes en la ciudad de Caracas. Dicha jornada fue dirigida por el licenciado en Biología Jesús Hernández (especialista en el estudio de líquenes), perteneciente a la Fundación Instituto Botánico de Venezuela.



**Fig. 12.** Fotografía del jardín de la USB en el que fueron colectados los líquenes.



En principio se efectuó una recolección de todas las ramas que estaban en el suelo y contenían diversos géneros de líquenes. Seguidamente, fueron escogidas aquellas ramas en las cuales estaban presentes los géneros *Parmotrema sp.* y *Usnea sp.* (ver figura 7), y con respecto al género *Parmotrema sp.*, fueron seleccionados aquellos individuos en los cuales pudo observarse la presencia de cilios (órganos anexos filamentosos ubicados al borde del talo o apotecios); esto último debido a que la presencia de cilios incrementa la eficiencia para la captación de partículas (Puckett y Finegan, 1980). Fueron escogidos dichos géneros debido a que ambos presentan una elevada superficie expuesta (mayor área por gramo de peso seco) a las condiciones atmosféricas (en comparación con los que poseen una morfología crustácea, como es el caso del género *Pyxine sp.*, empleado por Réquíz (2006) y del género *Physcia sp.* utilizado por Díaz (2008)), así como la posterior facilidad que tienen para ser removidos del sustrato. A la recolección de las ramas caídas recientemente, siguió la toma de ramas distales, que fueron cortadas y adecuadas para el estudio.

El criterio de selección que predominó para la elección del género *Parmotrema sp.* como bioindicador principal en el presente estudio fue su abundancia en las zonas adyacentes a la ciudad de Caracas (que pudiera ser recolectada la cantidad necesaria sin devastar la población de dicho género). Adicionalmente, su superficie rugosa facilita la captación de partículas atmosféricas. Se considera que los talos foliosos muestran mayores niveles de acumulación que los fruticulosos (Pignata *et al.*, 2008).

En el caso del género *Usnea sp.*, la escasez de publicaciones científicas en las cuales hayan empleado dicho género como biomonitor de HAP, así como su elevada superficie de exposición (talo bastante ramificado, y por lo tanto con mayor área por gramo de peso seco) (ver figura 7), fueron los principales criterios tomados en cuenta para su selección.

Es importante señalar que los forófitos (árboles que sirven como sustrato para otras plantas) de los cuales fueron tomadas las muestras de líquenes, estaban



cercanos entre sí (menos de 100 m de distancia entre ellos) y todos pertenecen al género *Clusia sp.* Para ambos géneros de líquenes fueron tomados y debidamente preservados hasta su análisis aproximadamente 18 g (no transplantados), con el objeto de garantizar la situación de referencia o relativa normalidad.

4.1.1.1. Identificación de la especie de líquen: Teniendo en cuenta que los líquenes colectados en la USB pertenecen a una misma especie, fue realizada la caracterización de la especie perteneciente al género *Parmotrema sp.*, haciendo uso de la clave para especies parmelioides de lóbulos anchos presentes en la América tropical (Sipman, 2005). Dicha herramienta está basada en definiciones de los caracteres morfológicos del líquen, así como en reacciones del organismo frente a algunas especies químicas. La clave está organizada en dicotomías (a veces tricotomías) o dilemas, es decir, pares de afirmaciones contrapuestas. Su empleo consiste siempre en tomar una de las dos alternativas; hay que leer primero las dos afirmaciones y optar por una de ellas. Teniendo en cuenta dichos aspectos, la especie identificada fue *Parmotrema sancti-angelii* (Lynge) Hale (ver figura 13), la cual está ampliamente distribuida en la región latinoamericana.

Entre las características morfológicas que permitieron su identificación caben destacar: Presencia de soredios y ausencia de isidios en el talo; cilios muy desarrollados, presentes solamente en las axilas del lóbulo; médula blanca; talo de color gris verdoso a blanco (corteza carente de ácido úsnico); superficie inferior con una amplia zona marginal desnuda, ricinas de longitud muy variable, y de color marrón oscuro a negro, a veces pálida en los márgenes; corteza superior continua.



**Fig. 13.** Imagen de la especie *Parmotrema sancti angelii* (Lynge) Hale.

En cuanto a la reacción frente a distintas especies químicas (de acuerdo a la presencia de algunas sustancias líquénicas), una vez expuesta la médula (retirando cuidadosamente la corteza superior con una hojilla), se procedió a colocar con un capilar, una gota de una solución de hidróxido de potasio en agua al 10 %, observando que la misma tomó una coloración amarillenta, lo cual indica el contenido de atranorina y/o ácido baeomicésico. Asimismo, fue expuesta la médula a lejía comercial sin diluir, dando una coloración rosa que permitió detectar la presencia del ácido girofórico en el líquen.

**4.1.2. Preparación de los líquenes.** Para perturbar lo menos posible a los líquenes y así asegurar una mejor acumulación, se decidió dejar los líquenes con el sustrato (Pignata *et al.*, 2008). Para ello, fueron recortadas algunas ramas que contienen predominantemente un mismo género de líquenes, dejando sólo las partes de la rama donde estaba la



**Fig. 14.** Ramas con líquenes sujetas entre si.



mayor cantidad de líquenes. Posteriormente, fueron sujetas con cintas auto adhesivas de papel crepé (tirro, marca Celoven) e hilos de nylon que serían utilizados para atar las ramas a los puntos de monitoreo (ver figura 14).

**4.1.3. Colocación de los líquenes en las localidades a evaluar.** Esta etapa fue realizada el 21 de diciembre del 2009. Las localidades de muestreo fueron seleccionadas en relación a la facilidad logística que ofrecen en cuanto a accesibilidad y seguridad (evitar que las muestras puedan ser movidas, destruidas, o simplemente perturbadas por la actividad humana). Para ello, los especímenes fueron colocados en las cinco estaciones pertenecientes a la red de control de calidad del aire del Ministerio del Poder Popular para el Ambiente (Minamb), en compañía del Ingeniero Carlos García, perteneciente a la Dirección General de Calidad Ambiental del Minamb. Dichas estaciones son: CORE 5, El Cementerio, El Silencio, Bello Campo y Los Ruices. Adicionalmente, fue incluida la localidad de El Cafetal, debido a que dicha estación presentó la mayor concentración total de HAP en el trabajo de Réquiz (2006).

En la localidad de El Cafetal los biomonitores fueron colocados en ramas distales de dos árboles encontrados en la zona a una altura promedio de 3 m. La figura 15 señala los diferentes puntos de muestreo en el mapa (además de la USB), mientras que tabla 8 muestra algunas características de las localidades de muestreo (y la de la USB).

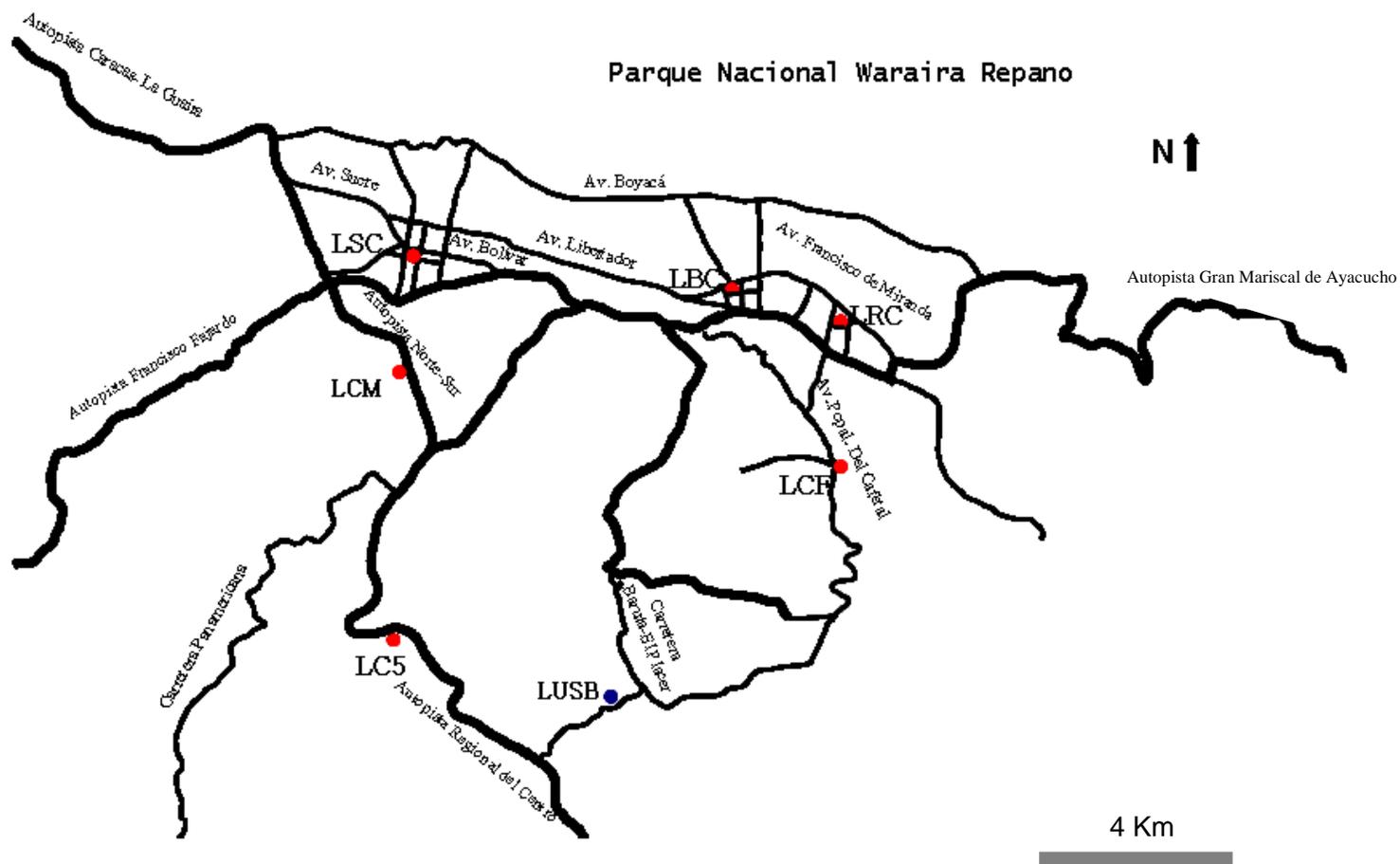
En todas las localidades fueron colocados dos especímenes de la especie *Parmotrema sancti-angelii*, y en las estaciones del Minamb de Bello Campo, CORE 5 y El Silencio, fueron colocados adicionalmente dos especímenes de líquenes del género *Usnea sp.* para comparar la capacidad de bioacumulación de los HAP de ambos tipos de líquenes. Todos los especímenes fueron colocados a distancias comprendidas entre 7 y 50 m entre si.



Para *Parmotrema sancti-angelii* cada espécimen constaba de aproximadamente 9 g del mismo, es decir que por localidad fueron colocados aproximadamente 18 g de dicha especie (ver figura 16). En el caso de *Usnea sp.*, por contar con menor cantidad en masa de dicho género, fueron colocados entre 3 y 5 g en total por localidad.

**Tabla 8.** Ubicación de las localidades de muestreo (ver apéndice V).

Muestra	Localidad	Ubicación de la estación	Altura (m.s.n.m)	Coordenadas
LRC	Los Ruices	Azotea de un edificio en la intersección entre la Av. Principal de Los Ruices y la Transversal 1 de los Cortijos. Zona industrial.	856	10° 29' 15" N 66° 49' 47" W
LBC	Bello Campo	Azotea de un centro comercial adyacente a una zona de construcción, entre la Av. Coromoto, la Av. Principal de Bello Campo y la carretera Petare-Santa Lucía. Zona con mediano a alto flujo vehicular e intensa actividad humana.	868	10° 29' 36" N 66° 51' 04" W
LC5	CORE 5	Loma adyacente a la autopista Regional del Centro. Zona con alto flujo de vehículos pesados, próximo a la incineradora de residuos de la Bonanza.	981	10° 25' 24" N 66° 55' 13" W
LCM	El Cementerio	Azotea de un edificio adyacente a la autopista Norte-Sur. Zona con elevada densidad poblacional y alto flujo de vehículos pesados.	909	10° 28' 38" N 66° 55' 05" W
LSC	El Silencio	Azotea de un edificio, Av. Oeste 8. Zona con mediano a alto flujo vehicular e intensa actividad humana.	916	10° 30' 08" N 66° 54' 58" W
LCF	El Cafetal	Parada de autobuses en la Av. Principal del Cafetal. Zona con moderado a alto flujo vehicular.	889	10° 28' 08" N 66° 50' 12" W
LUSB (R)	USB (Referencia)	Jardines del campus universitario, carretera Hoyo de La Puerta-El Placer. Zona residencial en las afueras de la ciudad.	1190	10° 24' 32" N 66° 52' 35" W



**Fig. 15.** Mapa de la ciudad de Caracas, señalando las estaciones de muestreo y las principales vías de tránsito vehicular.



**A**



**B**



**Fig. 16.** Dos especímenes de líquenes de la especie *Parmotrema sancti-angelii* (Lyngé) Hale, posicionados en la estación del Minamb de Los Ruices (A). Dos especímenes de líquenes del género *Usnea* sp., posicionados en la estación del Minamb de El Silencio (B).

En el periodo comprendido entre la colocación y recolección de las muestras fueron hechas dos jornadas de inspección, la primera el 3 de febrero del 2010 y la segunda el 24 de marzo del 2010. Pudo observarse a medida que el tiempo transcurría una atenuación del color gris verdoso de la especie *Parmotrema sancti-angelii*,



tornándose el talo mucho más gris, y en algunas zonas marrón (ver apéndice D1). Por su parte *Usnea sp.* adquirió una coloración marrón oscuro (ver apéndice D2). Las características mencionadas anteriormente, junto a la resequedad del talo, evidenciaron la pérdida de humedad por parte de los líquenes durante su exposición, como consecuencia de la incidencia directa de la radiación solar sobre las muestras. Otro factor que probablemente influyó en dicho comportamiento fueron las elevadas temperaturas que según la prensa se registraron en la ciudad en el periodo de estudio (por encima de los 33 °C). En el caso de los especímenes ubicados en la localidad de El Cafetal, no se observó una variación tan drástica en sus características físicas, debido a que por encontrarse bajo las ramas de los árboles a los cuales fueron fijados, la radiación solar no incidía directamente sobre ellos (ver apéndice D3 y G).

**4.1.4. Recolección de la muestra.** Esta salida fue realizada el 15 de abril del 2010, con lo cual los líquenes fueron expuestos en las localidades de estudio por un tiempo de 4 meses (Guidotti *et al.* (2009) efectuaron la recolección a los 3 meses). Los especímenes fueron recolectados en bolsas de papel para evitar su contaminación (Mighaszewski, 2002), envueltos en papel de aluminio (para evitar la fotólisis de los HAP) (Shukla y Upetri, 2008), y mantenidos a bajas temperaturas, con el objeto de evitar al máximo la pérdida de los HAP más volátiles (Mighaszewski *et al.*, 2002 y Augusto *et al.*, 2009) (ver figura 17).



**A**



**B**

**Fig. 17.** Fotografía de las muestras al ser recolectadas (A) y preservación de las mismas bajo 0 °C (B).

Una vez en el laboratorio, los especímenes de cada localidad (excluyendo a El Cafetal) fueron mezclados y les fueron hechos análisis (tratamiento químico) por triplicado, a excepción de El Cementerio, cuya muestra fue seleccionada para la prueba del lavado (3 tratamientos químicos por réplica). En el caso de la muestra de El Cafetal, fueron hechos análisis por sextuplicado (3 por espécimen), para descartar la existencia de algún tipo de variabilidad intralocal (homogeneidad de la muestra). La figura 18 indica el esquema de muestreo.

La tabla 9 muestra las variables de estudio a considerar en la etapa de campo, así como una breve descripción de las mismas.

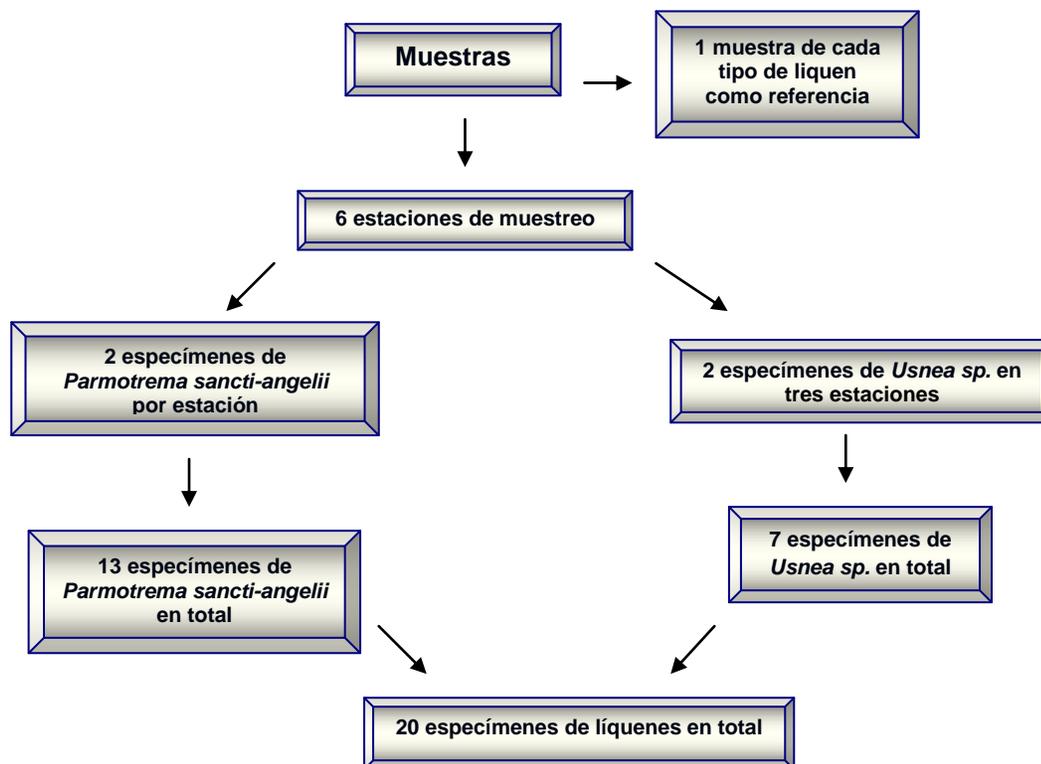


Fig. 18. Esquema de recolección de muestras.

Tabla 9. Variables a considerar durante la etapa de campo.

Variable	Descripción
Localidad	Variable independiente. Corresponde a cada uno de los lugares en los cuales fueron colocados los líquenes (las 5 estaciones del Minamb y El Cafetal).
Tipo de líquen	Variable independiente. Corresponde a los dos tipos de líquenes que fueron utilizados para el estudio ( <i>Parmotrema sancti-angelii</i> y <i>Usnea sp.</i> ).
Concentración de los 16 HAP contaminantes principales según la US-EPA	Variable dependiente.



## 4.2. Etapa de laboratorio

**4.2.1. Optimización de la metodología de extracción y separación de la fracción aromática.** Uno de los objetivos planteados en este trabajo ha sido la optimización de la extracción de los HAP de la matriz del líquen, mediante el empleo de la técnica de extracción estática asistida por ultrasonidos. Es importante mencionar que la bibliografía apenas contempla la determinación de HAP en este tipo de muestras y mediante dicha técnica (Guidotti *et al.*, 2003 y 2009, y Blasco, 2008). La elección de dicha técnica fue hecha tomando en cuenta las ventajas que la misma ofrece en términos de tiempo y cantidad de solvente empleado, en comparación con el método de extracción convencional HAP en muestras ambientales (Soxhlet).

Son varios los factores que influyen en la extracción de los HAP mediante dicha técnica (tiempo de extracción, temperatura del baño de ultrasonidos, solventes empleados), este estudio se limitó a evaluar el solvente empleado (hexano y diclorometano), en términos de porcentajes de recuperación para cada HAP. Dicha variable es esencial para garantizar la disolución de los analitos, mediante su desorción y arrastre desde la matriz.

Adicionalmente, fue optimizada la separación o limpieza de la fracción aromática, mediante la técnica de cromatografía en columna, variando los volúmenes de hexano empleados para la elución de los compuestos saturados.

A continuación son detallados los equipos y materiales empleados para la extracción, separación y análisis de los HAP en esta etapa:

- Tubos de ensayo de vidrio con capacidad para 50 mL.
- Rejilla de soporte metálica para la colocación de los tubos de ensayo.
- Un baño de ultrasonido modelo Cole-Parmer 8894.
- Papeles de filtro *Advantec* N° 2.



- Minicolumnas de vidrio para cromatografía de 25 cm de longitud y 1 cm de diámetro.
- Lámpara de radiación UV.
- El estándar certificado (*Standard Mix*) conformado por una mezcla de los 16 HAP bajo estudio de 200 µg/mL c/u en acetonitrilo (PNA-550JM). Fue adquirido 1 mL de dicha solución, suministrado por la empresa SCL Sistemas C.A.
- Hexano, diclorometano y acetonitrilo grado HPLC, suministrados por Didacta C.A. (Caracas, Venezuela).
- Sílica gel (0,06-0,2 mm).
- Sulfato de sodio anhidro.
- Lana de vidrio.
- Agua deionizada, obtenida a partir de un sistema de purificación Milli-Q. Gradient, Millipore.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Hewlett Packard 1100, con bomba cuaternaria y automuestreador. Detector de fluorescencia modelo 1046 A y detector UV (conectados en serie) (ver apéndice E).
- Columna de fase reversa C18, 799250D-584 Lichrospher 100 RP-18 (5 µm, 250 x 4 mm), marca HP.
- Sistema de adquisición de datos ChemStation versión A.05.02 (Agilent Technologies).

4.2.1.1. Lavado del material de vidrio: El material de vidrio fue dejado en remojo durante 4 horas en un detergente de uso común y enjuagado con agua natural, posteriormente varias veces curado con agua deionizada y se dejó secar al aire libre.



Los viales de 5 y 1,5 mL empleados para pesar las fracciones y la inyección de las muestras, fueron lavados con diclorometano, seguido de agua y jabón, y finalmente curados con acetona y secados en la estufa a 40 °C por 1 h.

4.2.1.2. Preparación de las muestras: Debido a que los HAP apenas han sido determinados en muestras de líquenes, aún no existe material de referencia certificado para estos compuestos, por lo que tuvo que recurrirse al método convencional de preparación de muestras de líquenes enriquecidas con una cantidad conocida de los HAP estudiados para optimizar el método de extracción.

Las muestras de líquenes utilizadas para optimizar el método de extracción, pertenecen a la especie *Parmotrema sancti-angelii* (Lyngby) Hale (ver figura 13). Esta especie fue tomada de la localidad de referencia en la USB, recojiéndola directamente del tronco de los árboles.

Una vez en el laboratorio, los líquenes fueron separados de las ramas (sustrato) y limpiados de todo tipo de residuo o materiales que pudieran haber quedado adheridos (restos de corteza de árbol, insectos y restos de otros líquenes) mediante el uso de una lupa binocular y pinzas de acero (ver figura 19) (Guidotti *et al.*, 2009).

Luego, los líquenes fueron pulverizados haciendo uso de un mortero y empleando nitrógeno líquido (ver figura 20).



**Fig. 19.** Lupa binocular con aumento de hasta 4,5 X.



**Fig. 20.** Pulverización de los líquenes empleando nitrógeno líquido.

Seguidamente, fueron colocados en vidrios de reloj, y secados a 40 °C durante 48 horas (Guidotti *et al.*, 2009).

La solución empleada para el enriquecimiento contenía los 16 HAP (*Standard Mix*) en una concentración de 9 µg/mL. El enriquecimiento fue hecho añadiendo 1 mL de la solución antes mencionada, a porciones de 1,4 g de líquen. De este modo la concentración resultante de cada HAP en la muestra fue de aproximadamente 6,4 µg/g (ver apéndice H). Tras el enriquecimiento, las réplicas permanecieron durante 43 horas, en ausencia de luz y a temperatura ambiente en un desecador.

En dicha etapa fueron utilizadas 6 alícuotas de líquen enriquecidas (3 para la extracción con hexano y 3 con diclorometano) como se mencionó anteriormente, y seis sin enriquecer, empleadas como blanco (3 para la extracción con hexano y 3 con diclorometano), extraídas bajo las mismas condiciones. Asimismo, para la evaluación del volumen adecuado de hexano elución de los saturados, fueron empleados volúmenes de 15, 20 y 25 mL de dicha sustancia para cada solvente empleado en la extracción (hexano y diclorometano) (ver tabla 10).



Con el fin de comparar el rendimiento de extracción de los diferentes solventes, el porcentaje de extracción obtenido con cada uno fue calculado como muestra la siguiente ecuación (Blasco, 2008):

$$\text{Porcentaje de extracción (\%)} = \frac{\text{HAP en muestras enriquecidas} - \text{HAP en alícuotas blanco}}{\text{HAP añadidos en el enriquecimiento}} \times 100$$

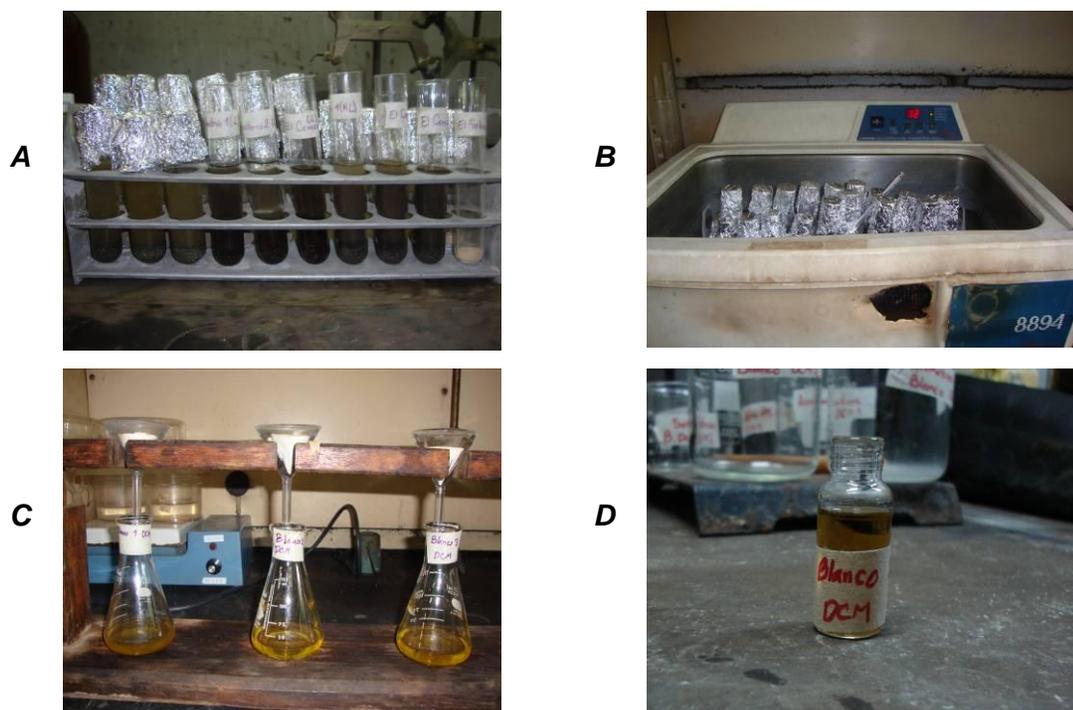
Cabe destacar que previo a los experimentos, le fue agregada cierta cantidad de sulfato de sodio anhidro a las botellas con los solventes, para eliminar el agua que los mismos pudieran contener.

4.2.1.3. Extracción: Consiste en la obtención de alícuotas de extracto orgánico bajo la acción de ultrasonidos, mediante 2 extracciones consecutivas de 15 minutos utilizando 30 mL del solvente (hexano o diclorometano) en cada una (Guidotti *et al.*, 2009). Para dicho paso las muestras fueron colocadas en tubos de ensayo de 50 mL de capacidad en contacto directo con el solvente. La temperatura del baño de ultrasonidos estuvo por debajo de los 32 °C. Los extractos de cada extracción fueron filtrados empleando papel de filtro tipo *Advantec* N° 2 y fiolas de 125 mL. Una vez filtrados, ambos extractos se combinaron y fueron llevados a sequedad dejándolos en una campana de extracción encendida (debido a la elevada volatilidad de los solventes). Luego fueron trasvasados a viales de 5 mL de capacidad con el mismo solvente con el cual fueron extraídos y se dejó evaporar el solvente (ver figura 21).

4.2.1.4. Separación de la fracción aromática: La limpieza del extracto de líquenes fue realizada en una minicolumna de vidrio rellena de una suspensión de sílica gel (activada a 80 °C durante 16 horas) y hexano (empacado de 14 cm de longitud, figura 22 A). En la parte inferior de la columna fue agregada lana de vidrio, para evitar el paso de la suspensión por la llave. Previo al empacado de la columna, la misma fue curada 3 veces con 10 mL de hexano, lo cual también permitió verificar la ausencia de fugas.



Para el empacado de la columna fueron empleadas pipetas Pasteur en la transferencia de la suspensión, y a medida que era agregado, se le daban golpes leves a la columna para impedir la formación de burbujas.



**Fig. 21.** Alícuotas de líquen en contacto con el solvente (A); muestras en el baño de ultrasonidos (B); filtrado de los extractos (D) y extracto reconstituido en un vial de 5 mL.

Posterior al empacado de la columna fueron añadidos 2 mL del extracto, reconstituidos en su respectivo solvente de origen. La elución fue iniciada con 15, 20 o 25 mL de hexano (de acuerdo a la alícuota de líquen) (ver tabla 10), para separar los compuestos saturados. Los analitos fueron eluidos de la columna con 40 mL de mezcla hexano: diclorometano (2:3, v/v) para obtener la fracción de los compuestos aromáticos, la cual fue seguida mediante una lámpara de UV, debido a que los HAP poseen la propiedad de fluorecer y de esta manera pudo apreciarse claramente su elución (ver figura 22 B) (modificado de Guidotti *et al.*, 2009). Dicho eluato fue recolectado en vasos de precipitado de 100 mL de capacidad y llevado a sequedad mediante evaporación del

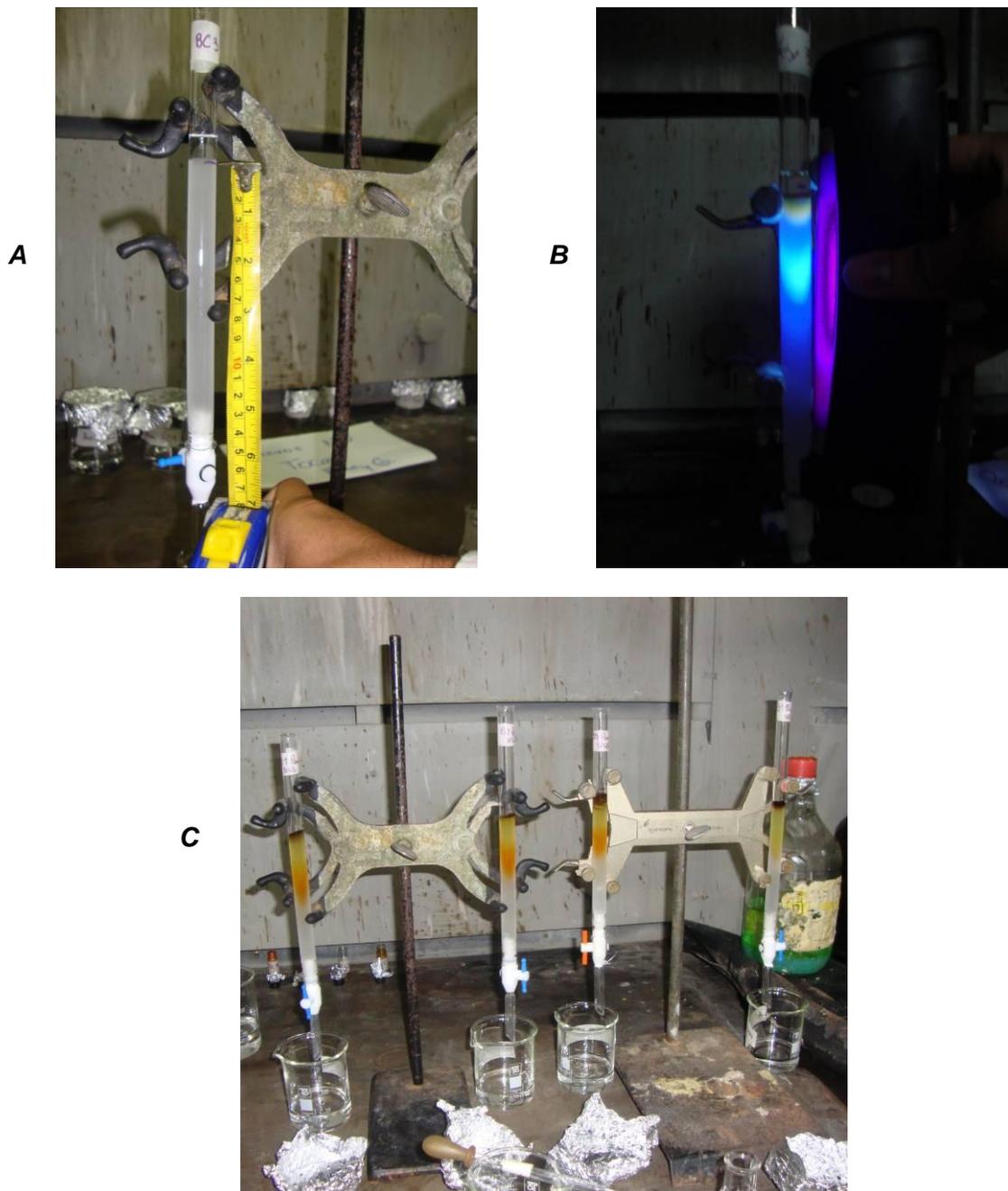


solvente por extracción en la campana. Ambas fracciones fueron transferidas a viales de 5 mL de capacidad con el mismo solvente o mezcla de solventes con la cual fueron eluidos.

**Tabla 10.** *Diseño experimental para la optimización de la extracción y separación de la fracción aromática.*

	<b>Vol. empleados para separación de la fracción saturada</b>	<b>Vol. empleado para separación de la fracción aromática (Réquiz, 2006)</b>
<b>Alícuota</b>	<b>Vol. de hexano (mL)</b>	<b>Vol. de hex:DCM (3:2, v/v) (mL)</b>
B1 DCM	15	40
B2 DCM	20	40
B3 DCM	25	40
DCM 1	15	40
DCM 2	20	40
DCM 3	25	40
B1 Hex	15	40
B2 Hex	20	40
B3 Hex	25	40
Hex 1	15	40
Hex 2	20	40
Hex 3	25	40

Tanto los extractos orgánicos, como las fracciones saturadas y aromáticas, fueron pesadas, una vez llevadas a sequedad para mantener un estricto control gravimétrico.



**Fig. 22.** Fotografía de las columnas cromatográficas en las que puede observarse la longitud de las mismas (A), la elución de la fracción aromática (B) y un montaje simultáneo de 4 columnas (C).



4.2.1.5. Condiciones del análisis instrumental: Las fracciones aromáticas fueron transferidas a los viales de 1,5 mL dispuestos para el análisis, con 500  $\mu$ L de acetonitrilo, y posteriormente fueron inyectadas al cromatógrafo líquido de alta eficiencia. El análisis fue hecho a un flujo constante de 1,0000 mL/min, volumen de inyección de 25,0  $\mu$ L, y temperatura de inyección entre 27 y 30 °C. El gradiente de la mezcla acetonitrilo:agua empleado fue 70:30 (0-15 min), 85:15 (15-20 min) y 100:0 (20:35 min). La duración de la corrida fue de 35 min.

La detección y cuantificación de los HAP fue hecha empleando los detectores de UV y FL conectados en serie. La longitud de onda para la absorbancia UV fue de 254 nm, mientras que para el detector de fluorescencia fueron empleadas como longitud de excitación 340 nm y de emisión 425 nm, con un tiempo de respuesta de 2 segundos.

**4.2.2. Estudio del lavado del líquen.** Entre los objetivos propuestos en la presente investigación, estuvo la evaluación del efecto que tiene el lavado de los líquenes con agua deionizada en la determinación de los HAP. Esto debido a que entre todos los estudios que emplean líquenes para el biomonitoreo de HAP sólo Migaszewski *et al.* (2002) y Réquíz (2006) incluyen dicho paso como parte de la limpieza del líquen (remoción del polen y las partículas minerales débilmente unidas a la superficie del líquen), y ninguno de los autores hace una apreciación adecuada de la efectividad del mismo, además del porcentaje de analitos que pueden perderse en este paso.

La mencionada prueba fue hecha sobre la muestra de El Cementerio. Para ello, dicha muestra fue en primer lugar homogeneizada (fueron combinados los especímenes) y posteriormente replicada, de modo que se hicieron tratamientos químicos por triplicado a la réplica lavada y a la no lavada.

En total fueron lavados con agua deionizada 8 g de líquen con 120 mL de agua en un vaso de precipitado de 250 mL. El líquen fue sujeto con pinzas de acero y sumergido en el agua, agitando manualmente la muestra dentro del agua. Entre los



residuos observados se encontraban partículas de polvo, restos de madera y hojas, trozos de líquen e insectos. La figura 23 muestra los residuos producto del lavado del líquen.

Posteriormente, fueron sometidos al mismo tratamiento físico (pulverización y secado), químico (extracción y separación de la fracción aromática) y analizados bajo las mismas condiciones en el HPLC, que las alícuotas procesadas en la optimización de la extracción. Las únicas variantes fueron que el solvente seleccionado para la extracción fue una mezcla de hexano:diclorometano (3:2, v/v) y la cantidad de hexano empleada en la elución de los saturados fue de 20 mL.



**Fig. 23.** Residuos producto del lavado de la muestra de El Cementerio.

**4.2.3. Tratamiento de las muestras recolectadas.** En este caso, como fue mencionado anteriormente, los especímenes fueron mezclados, para efectuar análisis triplicados por cada localidad y a los blancos de ambos tipos de líquenes, a excepción de las localidades LCM y LCF dónde se hicieron por sextuplicado.

Por cuestiones de tiempo y recursos fue seleccionada la localidad LSC para efectuar la comparación entre diferentes tipos de líquenes (tratamiento químico por duplicado para el género *Usnea sp.* debido a la cantidad de muestra), por lo que fueron debidamente guardadas las muestras de *Usnea sp.* de LC5 y LBC. El apéndice F contiene algunas fotografías de las muestras observadas con el microscopio.



Las muestras fueron sometidas al mismo tratamiento físico (limpieza, pulverización y secado) y químico (extracción y separación de la fracción aromática) y analizadas bajo las mismas condiciones en el HPLC, que las alícuotas sometidas a pruebas de extracción, pero y al igual que la muestra LCM las únicas variantes fueron que el solvente seleccionado para la extracción fue una mezcla de hexano:diclorometano (3:2, v/v) y la cantidad de hexano empleada en la elución de los saturados, que fue de 20 mL. El apéndice I contiene las masas de las alícuotas empleadas para el tratamiento químico, así como el porcentaje de extracto orgánico con respecto a dicha masa inicial de líquen y los porcentajes de las fracciones aromáticas con respecto al extracto orgánico.

Adicionalmente, fueron seleccionadas 7 submuestras, 1 por cada localidad de muestreo, para ser analizadas mediante la técnica CG/EM, para realizar una comparación con la técnica HPLC en términos de identificación de los HAP estudiados. Para ello fue empleado un cromatógrafo de gases modelo 6890N de la Agilent Technologies, con detector de masas Agilent 5975 y columna capilar HPS-MS (60 m x 0,250 mm x 0,25  $\mu$ m). La temperatura inicial de la columna fue de 120 °C durante 3,00 min, seguido de una tasa de calentamiento de 15,00 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 180 °C, en la cual estuvo por 8,00 min, luego a razón de 15 °C/min hasta 200 °C por 5,00 min, para continuar con un tasa de 6,00 °C/min hasta llegar a 256 °C por 5,00 min, para finalmente aumentar la temperatura a una tasa de 2,00 °C/min hasta alcanzar los 310 °C, temperatura a la cual se mantuvo por 20,00 min, para un total de 79,67 min de duración.

La figura 24 muestra el esquema experimental de forma resumida.

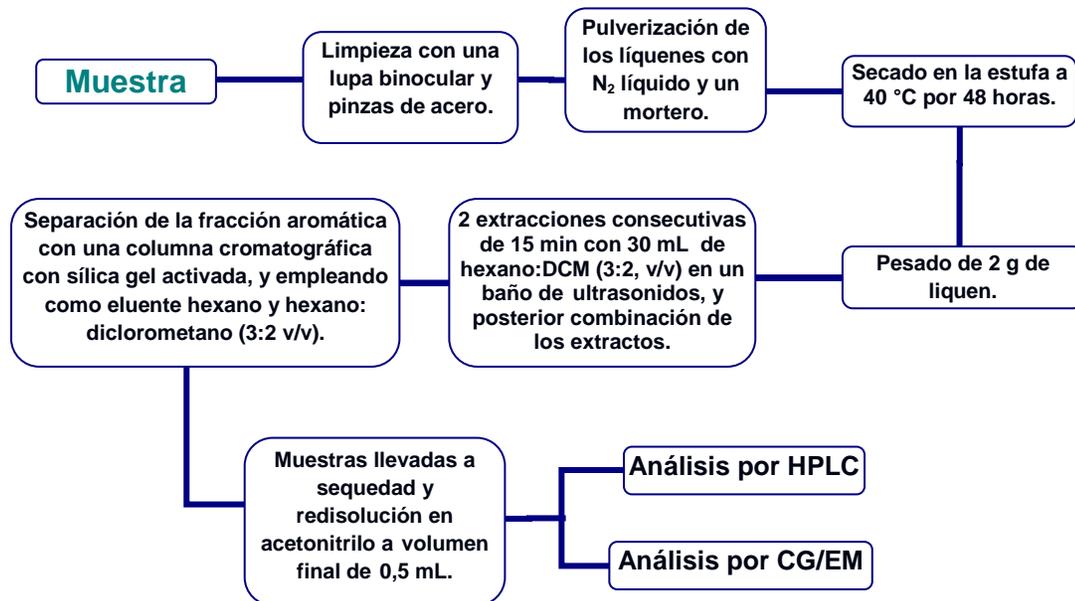


Fig. 24. Esquema experimental (modificado de Guidotti et al., 2009).

**4.2.4. Mezcla estándar y tratamiento.** La preparación de los patrones fue hecha a partir de la mezcla estándar (*Standard Mix*) conformada por los 16 HAP de 200 µg/mL c/u en acetonitrilo (PNA-550JM). De dicha solución original se preparó una solución madre de 33,3 µg/mL en acetonitrilo. Luego tomando esta solución de acetonitrilo fueron preparadas soluciones de soluciones de 9,52; 4,96; 2,18; 0,812 y 0,411 µg/mL, para realizar la curva de calibración de los compuestos y optimizar la metodología de extracción.

**4.2.5. Análisis de recuperación.** El análisis de recuperación fue realizado agregando 0,3 mL de la solución de 9 µg/mL de los 16 HAP (*Standard Mix*) a alícuotas de líquenes de aproximadamente 1,5 g. De este modo la concentración resultante de cada HAP en la muestra fue de aproximadamente 1,8 µg/g.

En dicha etapa fueron utilizadas 2 alícuotas de líquen enriquecidas y 1 sin enriquecer, empleada como blanco, a las cuales se les aplicó todo el procedimiento



experimental al cual fueron sometidas las muestras recolectadas en la ciudad de Caracas para evaluar la eficacia del método de extracción estática asistida por ultrasonidos, separación y determinación de los HAP utilizando líquenes como bioacumuladores de este tipo de compuestos.

Asimismo, fueron enriquecidas siguiendo el mismo procedimiento anterior, 2 alícuotas de líquen para ser procesadas mediante la técnica de extracción convencional Soxhlet, con su respectivo blanco, para establecer comparación entre ambas técnicas.

Para el caso la técnica extracción Soxhlet (Shukla y Upreti, 2008 y Blasco, 2008) los 1,5 g fueron colocados en un dedal (*Whatman* N° 42), el cual posteriormente fue introducido en el aparato Soxhlet, utilizando como solvente 250 mL de la mezcla hexano:diclorometano (3:2, v/v) durante 16 horas. Luego el extracto fue reconstituido a 2 mL, utilizando un rotoevaporador al vacío. Seguidamente las muestras fueron sometidas a la misma metodología de separación de la fracción aromática. El instrumental analítico empleado en esta prueba fue CG/EM, en las mismas condiciones de análisis descritas para las muestras.

### 4.3. Tratamiento estadístico de los datos

Una vez obtenidos los datos de los análisis químicos fueron procesados para su posterior interpretación mediante las herramientas análisis de varianza (ANOVA), análisis de componentes principales (ACP) y análisis de *cluster*. Asimismo, fue aplicada la prueba *U* de Mann-Whitney para comparar las medias de dos poblaciones de datos. Estos análisis son de gran importancia para el desarrollo de este trabajo, debido a que permiten el análisis objetivo del sistema geoquímico de estudio, brindando a la investigación un alto grado de confiabilidad.

El Análisis de Varianza permite comparar los valores de un conjunto de datos con los valores de otro conjunto de datos, para evaluar si son significativamente distintos o no, mediante la asociación a una probabilidad (pruebas de significancia entre dos o más



conjuntos numéricos simultáneamente). Para ello es separada la variación total de un conjunto de datos, mediante la suma de cuadrados de las desviaciones con respecto a la media (varianza), en componentes asociados a fuentes definidas de variación, la cual es utilizada como criterio para la clasificación de los datos (la varianza total es dividida en componentes atribuibles a algún origen identificable) (Vicéns *et al.*, 2005).

El análisis de la varianza es un método para comparar dos o más medias, puede ser empleado para detectar la existencia de relaciones fijas entre medias de una población y para estimar los parámetros que definen tales relaciones.

Cuando a los resultados de un experimento le pueden afectar dos factores, debe emplearse el análisis de la varianza de dos factores para estudiar sus efectos (Vicéns *et al.*, 2005).

El Análisis de Componentes Principales posibilita la síntesis de la información mediante la reducción del número de variables. Dicha reducción es efectuada perdiendo la menor cantidad de información posible. De esta forma se obtienen nuevos componentes principales o factores, que serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí. Dicha reducción dimensional del sistema original, permite explorar grandes conjuntos de datos, proporcionando adicionalmente, representaciones gráficas sencillas de las relaciones existentes entre las variables involucradas.

Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales (Greenacre y Blasius, 1994).

Con el Análisis de Cluster es utilizada la información de un conjunto de variables para cada sujeto u objeto y conforme a estas variables es medida la similitud entre ellos. Una vez medida la similitud son organizadas en: grupos homogéneos internamente y diferentes entre si (Gnanadesikan, 1997).



La Prueba  $U$  de Mann-Whitney es la contraparte no paramétrica de la prueba  $t$  de student usado para comparar medias de dos poblaciones independientes. En dicha prueba son planteadas dos hipótesis, que las dos poblaciones son idénticas o que no lo son. El cálculo de la prueba  $U$  comienza por la designación arbitraria de dos muestras como grupo 1 y grupo 2. Los datos de ambos grupos son combinados en un grupo, en el cual los datos retenidos son identificados de acuerdo a su grupo original. Los valores agrupados son clasificados de 1 a  $n$ , asignando al menor valor un rango de 1. La sumatoria de los rangos de valores del grupo 1 es calculada y designada como  $W_1$  y la sumatoria de los rangos de valores del grupo 2 como  $W_2$  (Black, 2009).



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1. Diseño del muestreo activo en la ciudad de Caracas empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* (Lyngé) Hale como bioacumulador de HAP

Teniendo en cuenta que son escasos los estudios que reportan el trasplante de líquenes para el bioseguimiento de contaminación por HAP (Guidotti *et al.*, 2003 y 2009), fue necesario evaluar como influyen en este tipo de estudios, variables como altura a la cual son colocados los biomonitores, superficie líquénica expuesta y protección a la radiación solar.

En este aspecto, los resultados indican que la altura respecto a la carretera fue un factor clave en los valores de concentración de HAP obtenidos en las distintas localidades. Este hecho pudo constatarse en El Cafetal, donde los líquenes fueron colocados a menos de 4 m de altura del suelo (muy cerca de la avenida), razón determinante para que las concentraciones de HAP en dicha localidad hayan sido mayores que en el resto de las localidades, en las cuales los líquenes estaban ubicados en azoteas de edificios. De igual forma, la pérdida de humedad de los líquenes debido a la incidencia directa de la radiación solar en las muestras ubicadas en azoteas fue determinante en la pérdida de los compuestos de bajo y mediano peso molecular (3 y 4 anillos aromáticos) con respecto a la localidad de referencia (LUSB), como evidencian los resultados discutidos en la sección: *concentraciones y perfil de HAP biomonitoreados en las localidades de estudio*.

El estudio de *variabilidad intralocal de los HAP bioacumulados por los líquenes trasplantados* muestra como la adsorción de los compuestos asociados a las partículas atmosféricas estuvo fuertemente relacionada a la superficie expuesta del líquen, debida a la forma en la cual fueron ubicados en los árboles.

Por los motivos antes expuestos puede decirse que los factores: altura respecto al suelo, sombra o protección a la radiación solar, y superficie de talo líquénico



expuesta, aportan varianza a la etapa de muestreo, por lo que deben ser estandarizados para disminuir dicha variabilidad y hacer comparaciones mucho más objetivas entre las localidades a las cuales son transplantados los líquenes.

Los líquenes deben ser protegidos de la incidencia directa de la radiación solar, así como colocarlos entre 2 y 5 m de altura respecto al suelo, preferiblemente a la misma altura, y garantizar que el área superficial expuesta de los biomonitores sea lo mayor y más homogénea posible en todas las localidades estudiadas.

## **5.2. Evaluación del efecto que tiene el lavado de los líquenes con agua deionizada en la determinación de los HAP**

Fueron identificados y cuantificados en las réplicas seleccionadas para esta evaluación (El Cementerio) 8 de los HAP bajo estudio: fenantreno, antraceno, pireno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno (ver tabla 11). La concentración de HAP totales para la réplica no lavada fue de  $3,52 \pm 1,70 \mu\text{g/g}$ , mientras que para la lavada fue de  $2,12 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$ .

Para proporcionar mayor objetividad a la interpretación de los resultados para cada HAP, fue realizada una prueba probabilística para poblaciones no paramétricas denominada prueba *U* de Mann-Whitney, en la cual fue fijado un nivel de significancia ( $p$ )  $< 0,05$  ( $< 5\%$ ). Los resultados obtenidos muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa en la determinación de los 8 HAP cuantificados, al efectuar el lavado del líquen (apéndice J).

Akyüz y Çabuk (2009) encuentran una fuerte relación entre el contenido de partículas menores a  $2,5 \mu\text{m}$  y la concentración de HAP totales en las partículas, teniendo que efectivamente con el incremento de  $\text{PM}_{2,5}$  incrementa la concentración de HAP. Rehwagen *et al.* (2005) señalan que más del 50 % de los HAP están asociados a partículas menores a  $0,49 \mu\text{m}$ . La asociación de los HAP a estas partículas de menor



tamaño dificulta la remoción significativa de estas sustancias a lavar el líquen. Sin embargo, existe cierta tendencia a que las concentraciones de estos compuestos sean menores al lavar el líquen.

**Tabla 11.** Concentración en  $\mu\text{g/g}$  para cada HAP en la evaluación del efecto del lavado del líquen con agua deionizada para la determinación de los HAP.

Concentraciones ( $\mu\text{g/g}$ )	LCM L1	LCM L2	LCM L3	LCM NL1	LCM NL2	LCM NL3
Fenantreno	0,165	0,136	0,234	0,128	0,316	0,342
Antraceno	0,063	0,015	0,145	0,010	0,246	0,268
Pireno	ND	ND	0,075	ND	0,184	0,199
Criseno	0,112	0,096	0,136	0,092	0,175	0,207
Benzo [b] Fluoranteno	ND	0,093	ND	ND	0,110	0,148
Benzo [k] Fluoranteno	ND	0,105	ND	ND	ND	0,247
Dibenzo [a,h] Antraceno	0,339	0,311	0,389	0,316	0,609	0,996
Indeno [1,2,3-cd] Pireno	1,27	1,43	1,25	1,44	1,57	2,94

ND= no detectado

La tendencia observada es consecuencia de que una porción de las partículas atmosféricas adheridas a la superficie del talo líquénico es removida al sumergirlo en agua (preferiblemente las de mayor tamaño), con lo cual tiende a disminuir las concentraciones de los HAP de 4, 5 y 6 anillos. En cuanto a la tendencia observada para los HAP de bajo peso molecular (fenantreno y antraceno), la misma probablemente sea debida a que dichos compuestos, a pesar de ser poco solubles en agua (ver tabla 3), la proporción de agua (120 mL) con respecto a las pequeñas cantidades (en el orden de ppm) de HAP encontradas en el tejido del líquen disuelve



cierto porcentaje de dichos compuestos. Lo mismo ocurre con los HAP de 4, 5 y 6 anillos, aunque en menor proporción (ver coeficiente octanol/agua, tabla 3).

El porcentaje de extracto orgánico para la réplica lavada estuvo por debajo del porcentaje de extracto orgánico de la réplica no lavada (ver tabla 12), lo cual, aunado a la coloración amarillenta que adquirió el agua, permite asegurar que hubo una pérdida de sustancias líquénicas durante dicha prueba de lavado, lo cual coincide con las tendencias anteriormente mencionadas para los 8 HAP cuantificados.

**Tabla 12.** Porcentajes de extractos orgánicos obtenidos para la muestra lavada y no lavada

Réplica	% de E.O.
LCM 1 (L)	0,8479
LCM 2 (L)	0,7317
LCM 3 (L)	0,7744
LCM 1 (NL)	0,8246
LCM 2 (NL)	1,1031
LCM 3 (NL)	0,9637

Los resultados de la prueba de lavado indican que no es recomendable la inclusión de dicho paso en la determinación de los HAP en líquenes usados como biomonitores, debido a que parte de estos compuestos está adherida a la superficie del líquen (Pignata *et al.*, 2008), incorporados por acumulación pasiva de partículas o por interacción entre la fase gaseosa y las sustancias líquénicas; por lo que su inmersión en agua acarrea remoción de dichos compuestos.

### 5.3. Optimización de la extracción y separación de la fracción aromática

En todas las muestras fueron identificados y cuantificados 13 de los 16 HAP estudiados mediante la técnica HPLC. Los compuestos acenafteno y fluoreno, presentan una volatilidad bastante elevada, lo cual dificultó su determinación. El



naftaleno pudo ser identificado en algunas localidades de estudio. La tabla 13 resume los resultados obtenidos en esta etapa.

**Tabla 13.** HAP obtenidos en la fase de optimización de la extracción y separación de la fracción aromática.

<b>SOLVENTE</b>	<b>HEX</b>	<b>HEX</b>	<b>DCM</b>	<b>DCM</b>
<b>Vol. de Hex. empleado en la elución de saturados</b>	<b>15 mL</b>	<b>25 mL</b>	<b>20 mL</b>	<b>25 mL</b>
Acenaftileno	X	X	X	X
Fenantreno		X		
Antraceno		X		
Fluoranteno	X	X	X	X
Pireno	X	X		
Criseno	X	X		
Benzo [a] Antraceno	X	X	X	X
Benzo [b] Fluoranteno	X	X	X	X
Benzo [k] Fluoranteno	X	X	X	X
Benzo [a] Pireno	X	X	X	X
Dibenzo [a,h] Antraceno	X	X	X	
Benzo [g,h,i] Perileno	X	X	X	X
Indeno [1,2,3-cd] Pireno	X	X		
<b>%E.O</b>	0,8768	0,8473	2,0967	2,2735
<b>% Fracción aromática</b>	9,6491	10,924	1,3605	2,5078

Las réplicas faltantes (HEX y DCM) fueron excluidas de la interpretación por presentar valores anómalos, atribuidos a errores indeterminados.

El hexano presenta mayores porcentajes de extracción de la fracción aromática, mientras que el diclorometano presenta mayores % de extracto orgánico, ya que por ser un solvente con mayor polaridad es capaz de extraer mayor cantidad de sustancias polares adsorbidas en la superficie del líquen. Esto quiere decir, que el hexano es más eficiente en la extracción de los compuestos de interés (aromáticos), además de ser



mucho más selectivo que el diclorometano, lo cual contribuye a reducir las interferencias al momento del análisis instrumental.

Al observar los resultados para la prueba de extracción de cada HAP por ambos solventes (apéndice K 1), es fácil deducir que existe una tendencia del hexano a presentar mejores resultados de extracción para acenaftileno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno, mientras que únicamente el benzo[g,h,i]perileno posee una tendencia ser extraído mejor con diclorometano. A modo de ejemplo, el apéndice K 2 muestra las tendencias anteriormente mencionadas para 6 de los HAP estudiados.

Dichos resultados son bastante similares a los obtenidos por Blasco (2008), en los cuales el hexano proporcionó mejores resultados en la extracción (método DSASE, dynamic sonication-assisted extraction method) de la mayoría de los HAP, a excepción de fenantreno y benzo[g,h,i]perileno, que resultaron ser extraídos más eficientemente utilizando diclorometano. Dicha tendencia en los porcentajes de extracción de los HAP, indica que en términos generales el hexano mejora la desorción desde la matriz líquénica de la mayoría de los HAP bajo estudio, así como el arrastre de dichos compuestos por los poros del sólido (mayor afinidad, debida a la polaridad del mismo).

La tabla 13 muestra que en el caso de las alícuotas extraídas con hexano existe una clara tendencia a mejorar el número de HAP determinados a medida que aumenta el volumen de elución de los saturados, teniendo que los 13 compuestos pudieron ser determinados con 25 mL de hexano como eluyente de la fracción saturada, mientras que con 20 mL de hexano sólo fueron determinados 11. Dicha tendencia tiene relación directa con los coeficientes de reparto de cada uno de los HAP entre la fase estacionaria y el hexano. A pesar de que la mayoría de los HAP bajo estudio quedan retenidos en el *slurry* durante la elución de los saturados, al agregar el hexano, cierta proporción de ellos es arrastrada por dicho eluyente, por lo que a mayores volúmenes de



hexano la separación de los HAP del resto de las sustancias contenidas en el extracto orgánico es mucho más eficaz (mayor desplazamiento), permitiendo así obtener una mayor cantidad de HAP.

En el caso de las alícuotas extraídas con diclorometano la tendencia es a mejorar los porcentajes de recuperación a menores volúmenes de elución de la fracción saturada. Esto es debido a que a diferencia de las alícuotas extraídas con hexano, estas fueron transferidas a la columna cromatográfica empleando 2 mL de diclorometano, propiciando el arrastre de los HAP desde el comienzo de la elución de la fracción saturada con hexano, por lo que a mayores volúmenes de dicho eluyente, parte de los HAP tiende a eluir con la fracción saturada. Debido a esto, la fracción aromática obtenida posteriormente con la mezcla hexano:diclorometano (3:2, v/v), se empobrece en dichos compuestos. Lo mencionado anteriormente indica que debe tenerse en cuenta la polaridad del solvente con el cual es transferido el extracto orgánico a la columna cromatográfica.

Aunque existen tendencias generales en los % R en cuanto a tipo de solvente empleado en la extracción y al variar los volúmenes de elución en la columna cromatográfica, no existe un solvente de extracción, ni un volumen de elución de la fracción saturada ideal para todos los HAP bajo estudio, lo cual es debido al amplio rango de propiedades físico-químicas que cubren dichas sustancias, sobre todo respecto a la polaridad. Por ello generalmente resulta necesario llegar a una solución compromiso, de acuerdo a los objetivos planteados en el estudio y a si existe el deseo de estudiar un determinado compuesto o grupo particular de HAP. En este sentido, el hexano constituye el mejor solvente a emplear, debido a que permite un mayor rendimiento en la etapa de extracción de al menos 12 de los 16 HAP listados como contaminantes principales por la US-EPA. Otra opción es el empleo de una mezcla de hexano y diclorometano, colocando al hexano en mayor proporción con respecto diclorometano (3:2, 4:1 ó 5:1). Asimismo, pudo obtenerse que el mejor volumen



empleado para la elución de la fracción saturada, al extraer con hexano, es 25 mL de hexano, lo cual coincide con el volumen utilizado por Réquiz (2006).

#### **5.4. Recuperación de los HAP en las alícuotas de líquen enriquecidas con el *Standard Mix***

La prueba de recuperación fue hecha con la finalidad de evaluar el sesgo o error sistemático en el tratamiento químico de las muestras, teniendo en cuenta que los compuestos analizados se encuentran en concentraciones muy bajas (compuestos traza), a la inexistencia de una metodología validada para el análisis de este tipo de compuestos en matrices líquénicas y al amplio rango de propiedades físico-químicas de dichos compuestos.

Los resultados muestran que los mayores porcentajes de recuperación, para ambas técnicas de extracción (ultrasonido y Soxhlet), fueron obtenidos para los HAP de 4, 5 y 6 anillos aromáticos (entre 45-70 % para ultrasonido y 3-50 % para Soxhlet), mientras que los menores valores están asociados a los HAP de 2 y 3 anillos. Dicho comportamiento evidencia que la volatilidad (incluso con capacidad de sublimar) de los HAP de bajo peso molecular sigue siendo un factor clave en la determinación exacta de estos compuestos. Este comportamiento también fue descrito, Guidotti *et al.* (2003), Domeño *et al.* (2006) y Réquiz (2006), entre otros investigadores. El aumento de temperatura en el caso de la técnica Soxhlet, con el posterior empleo del rotoevaporador afecta la recuperación de los HAP, en especial los de bajo peso molecular. Asimismo, al tratarse la extracción estática asistida por ultrasonidos de un sistema abierto, también afecta en la recuperación de dichas sustancias.

La filtración simple empleando papel de filtro convencional constituye otra potencial fuente de pérdida de dichos compuestos. García *et al.* (1999) señalan algunas ventajas de la técnica de centrifugación y posterior decantación del extracto orgánico,



en términos de separación de las fases líquida y sólida, en comparación con la técnica de filtración.

Las sucesivas transferencias y reconstituciones de los extractos orgánicos y de las fracciones aromáticas purificadas, contribuyen a la pérdida de los compuestos durante el tratamiento químico de las muestras, teniendo en cuenta las bajas concentraciones en las cuales están dichos compuestos en la matriz líquénica.

Adicionalmente, el volumen de la mezcla hexano:diclorometano (3:2, v/v) empleado para eluir la fracción aromática en la etapa de purificación o separación de dicha fracción (Réquiz, 2010), pudo haber sido otra fuente de pérdida de estos compuestos (dicho paso no fue optimizado), debido a que tal vez la cantidad de eluyente necesaria para arrastrar toda la fracción aromática era mayor a los 40 mL empleados .

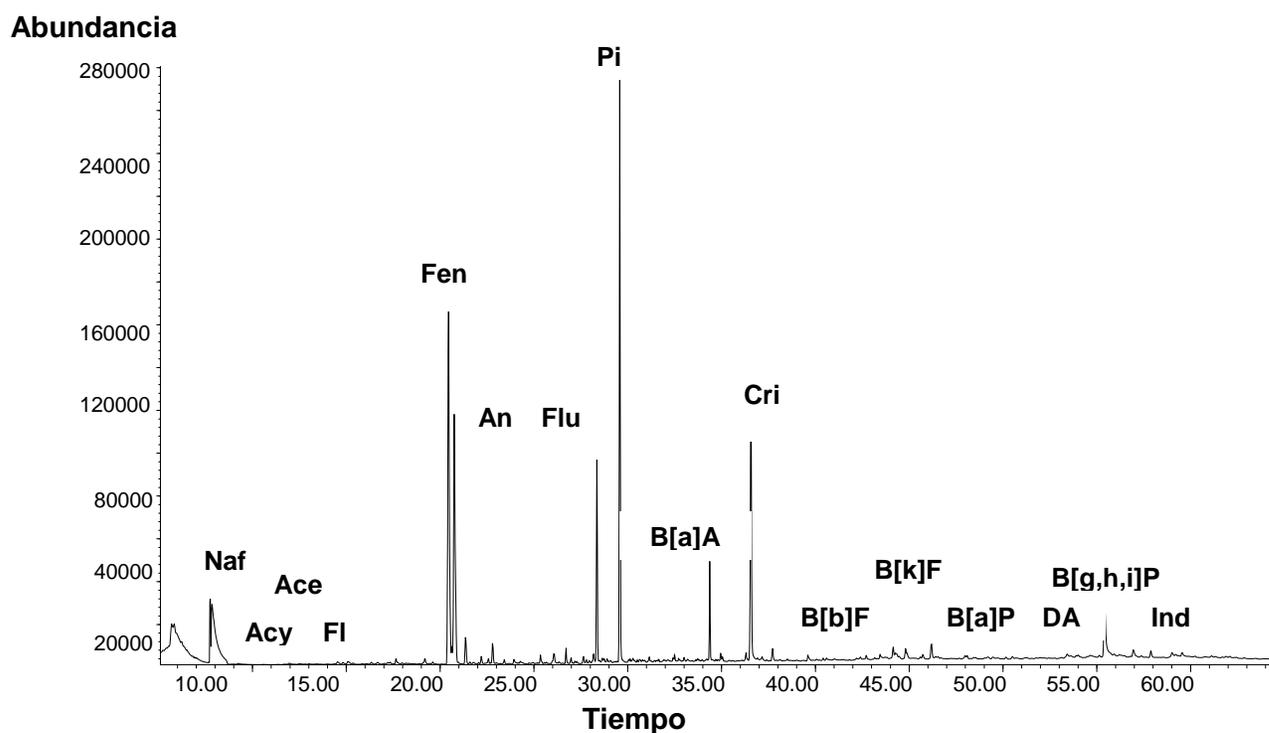
Es importante señalar que la técnica de extracción estática con ultrasonidos presenta %R similares a los obtenidos con la técnica Soxhlet para casi todos los HAP, lo cual ratifica la ventaja en términos de cantidad de solvente y tiempo empleado mediante la técnica con ultrasonidos, en comparación con la técnica de extracción convencional Soxhlet (Domeño *et al.*, 2006 y Plaza-Bolaños *et al.*, 2010).

Guidotti *et al.* (2003), Réquiz (2006) y Chirino (2008) reportan porcentajes de recuperación entre 43-86 %, 65-96 % y 85-128 %, respectivamente, por lo que tienden a ser superiores a los obtenidos en esta investigación. Dichos porcentajes de recuperación son consecuencia de un conjunto de errores aditivos asociados a las distintas etapas del tratamiento químico de las muestras (Linsinger, 2008).



### 5.5. Identificación de HAP bioacumulados por la especie *Parmotrema sancti-angelii* (Lyngé) Hale en la ciudad de Caracas mediante CG/EM

Fueron identificados los 16 HAP mediante la técnica CG/EM en todas las muestras analizadas (todas las localidades estudiadas). El apéndice M muestra el cromatograma del patrón de 2,18 µg/mL y la figura 25 el cromatograma obtenido para una de las muestras.



**Fig. 25.** Cromatograma de gases obtenido para la muestra de El Cafetal.

La tabla 14 muestra los HAP identificados mediante la técnica CG/EM en distintos trabajos de biomonitorio de dichas sustancias empleando líquenes.



**Tabla 14.** Comparación del trabajo actual con otras investigaciones en términos de HAP identificados en matrices líquénicas por CG/EM.

HAP	Migaszewski et al. (2002)	Guidotti et al. (2003)	Réquiz (2006)	Blasco et al. (2008)	Guidotti et al. (2009)	Actual
Naftaleno			+	+	+	+
Acenaftileno	+		+	+		+
Acenafteno	+		+	+		+
Fluoreno	+		+	+		+
Fenantreno	+	+	+	+	+	+
Antraceno	+	+	+	+	+	+
Fluoranteno	+	+	+	+	+	+
Pireno	+	+	+	+	+	+
Benzo[a]Antraceno	+		+	+	+	+
Criseno	+	+	+	+	+	+
Benzo[b]Fluoranteno	+		+	+	+	+
Benzo[k]Fluoranteno	+		+	+	+	+
Benzo[a]Pireno	+		+	+	+	+
Dibenzo[a,h]Antraceno	+		+	+	+	+
Benzo[g,h,i]Perileno	+			+	+	+
Indeno[1,2,3-cd]pireno	+				+	+

La presencia de los 16 compuestos estudiados en la ciudad de Caracas, biomonitorizados mediante un muestreo de tipo activo, evidencia una intensa actividad humana generadora de estos compuestos (actividad vehicular, zonas en construcción y restaurantes, principalmente). Además de la influencia de factores estacionales como lo fue la sequía durante el periodo de estudio, los cuales serán explicados detalladamente en el siguiente apartado de la investigación.

## 5.6. Cuantificación de HAP en los líquenes mediante HPLC

Fueron identificados 14 de los 16 HAP estudiados, de los cuales sólo 13 pudieron ser cuantificados mediante la técnica HPLC (la no detección del naftaleno en la mezcla estándar impidió su cuantificación). Los HAP cuantificados fueron: acenaftileno,



fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno (ver apéndice S 1).

Para la cuantificación de los HAP, fue utilizado el detector UV para los compuestos: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, criseno benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[ghi]perileno e indeno[1,2,3,cd]pireno; y el detector de FL para los compuestos: antraceno, fluoranteno, pireno y benzo[a]antraceno. La detección fluorescencia es más sensible que la detección por UV (parámetro evaluado a partir de la pendiente de las curvas de regresión lineal, ver apéndice Ñ). No todos los compuestos podían fluorescer bajo las condiciones instrumentales seleccionadas, por lo que existe esta limitación.

Al momento de los análisis no se contaba con detectores de fotodiodos en serie (UV), por lo que lamentablemente, no pudo ser optimizada la longitud de onda para cada HAP, sino que las mediciones fueron hechas solo a 254 nm. La baja resolución obtenida en la separación de los isómeros benzo[b]fluoranteno y benzo[k]fluoranteno, está relacionada al tipo de columna empleada (no específica para HAP) y a las condiciones de gradiente (variación en la proporción de solventes) establecidas en la elución.

Un de las principales ventajas mostrada por la técnica HPLC con respecto a CG fue el tiempo de análisis (35 min para HPLC y 79,67 min para CG). Por otra parte, La mayor selectividad y mejor resolución de los picos arrojados por la técnica CG/EM, facilitó la elucidación de isómeros de una manera mucho más eficiente, en comparación con la técnica HPLC. Esto último, debido al empleo de un sistema cuadrupolar, empleando el método SIM (selection ion mass, según sus siglas en inglés).



### **5.7. Distribución espacial de HAP bioacumulados por la especie *Parmotrema sancti-angelii* (Lyngé) Hale en la ciudad de Caracas**

Los primeros parámetros empleados para estudiar el comportamiento espacial de los HAP bioacumulados por el líquen *P. sancti-angelii* fueron la concentración de HAP totales, la concentración de los HAP<sup>comb</sup> y el perfil en término de número de anillos. La concentración de HAP totales varía entre  $6,47 \pm 3,80 \mu\text{g/g}$  y  $2,30 \pm 0,49 \mu\text{g/g}$ , correspondientes a las localidades de El Cafetal y Los Ruices respectivamente. Este máximo valor de concentración de HAP totales en la localidad de El Cafetal coincide con los resultados obtenidos por Réquíz (2006), quien aplicando un muestreo de tipo pasivo para el líquen *Pyxine sp.* obtuvo valor total de HAP de  $9,08 \pm 2,74 \mu\text{g/g}$  (en su caso también es el mayor valor de concentración de HAP totales). Dicha concentración presenta una tendencia a ser mayor a la obtenida en el presente estudio, lo cual puede ser atribuido al tipo de muestreo (los líquenes muestreados por ella estuvieron expuestos mucho más tiempo a los contaminantes). Adicionalmente, debe tenerse en cuenta que se trata de dos géneros distintos de líquenes (probablemente difieran en su capacidad bioacumulativa de HAP).

Al comparar con los estudios llevados a cabo por Guidotti *et al.* (2003 y 2009); en los cuales fueron empleados muestreos de tipo activo en ambientes urbanos, encontrando concentraciones de HAP totales comprendidas entre  $0,056\text{-}0,159 \mu\text{g/g}$  (2003) a un tiempo de recolección de 15 meses; y  $0,168\text{-}0,395 \mu\text{g/g}$  a un tiempo de recolección de 3 meses (2009); puede notarse que los valores obtenidos en el presente estudio son mucho mayores a los hallados por dichos autores. Cabe destacar que en esas investigaciones fue empleada la especie *Pseudevernia furfuracea* como biomonitor.

De igual forma, al comparar con los datos obtenidos por Augusto *et al.* (2009) quienes determinaron concentraciones entre  $0,443$  y  $0,562 \mu\text{g/g}$  realizando un muestreo pasivo en una zona industrial, empleando el líquen *Parmotrema hypoleucinum*, puede



observarse que los valores obtenidos en dicha investigación están muy por debajo de los registrados en el presente estudio, a pesar de que en el caso de Caracas los líquenes fueron transplantados (menor tiempo de exposición a las condiciones atmosféricas).

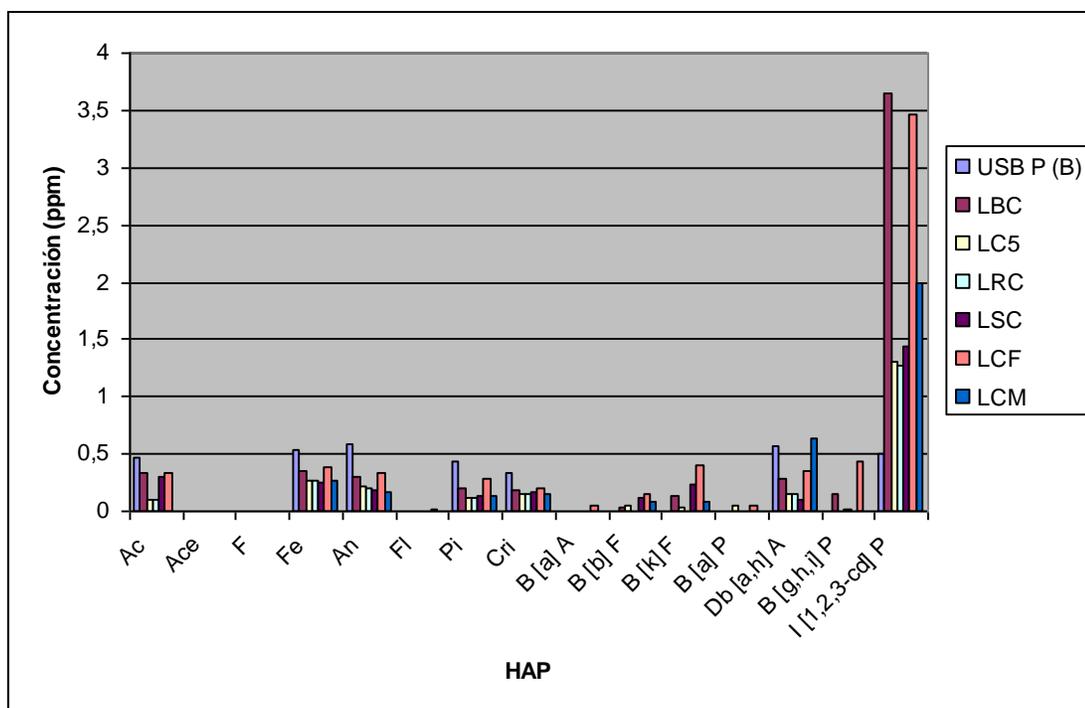
Es importante señalar que la no cuantificación de naftaleno, así como la pérdida de los compuestos de 3 anillos durante la marcha analítica son factores determinantes en el perfil obtenido para todas las localidades de Caracas. Sin embargo, al tratarse de un error sistemático, al cual estuvieron sometidas todas las muestras, es posible estudiar las variaciones en las proporciones en las que se encuentran dichos compuestos en las distintas localidades de estudio.

De los 13 compuestos cuantificados, el más abundante fue indeno[1,2,3-cd]pireno seguido por fenantreno y dibenzo[a,h]antraceno (ver figura 26). El indeno[1,2,3-cd]pireno es un compuesto comúnmente asociado a la quema de vegetación, debido a que generalmente suele encontrarse ocluido o adsorbido en las partículas de hollín generadas durante los procesos de combustión (Ortiz *et al.*, 2007). Este hecho puede asociarse a los incendios que ocurrieron en el Parque Nacional Waraira Repano durante el periodo de sequía (Sarmiento, 2010 Marzo 24), tiempo en el cual los líquenes estuvieron expuestos a la atmósfera de la ciudad de Caracas (el apéndice X muestra algunas fotografías de este hecho). El incremento de las concentraciones de partículas suspendidas en el aire estuvo potenciado por el fenómeno de alta presión registrado en la atmósfera caraqueña, la cual produjo un debilitamiento de los vientos alisios del noreste, generando una gran estabilidad atmosférica (Minci, 2010 Marzo 7).

El que fenantreno mostrara una mayor concentración que su isómero antraceno era ya esperado, ya que este último es menos estable por ser más propenso a las reacciones fotoquímicas (Mighaszewski *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2005). La concentración igualmente alta para dibenzo[a,h]antraceno, criseno y pireno, es



asociada a las emisiones de vehículos a motor (Rehwagen *et al.*, 2005), lo cual indica la contribución del tráfico a la carga de HAP.



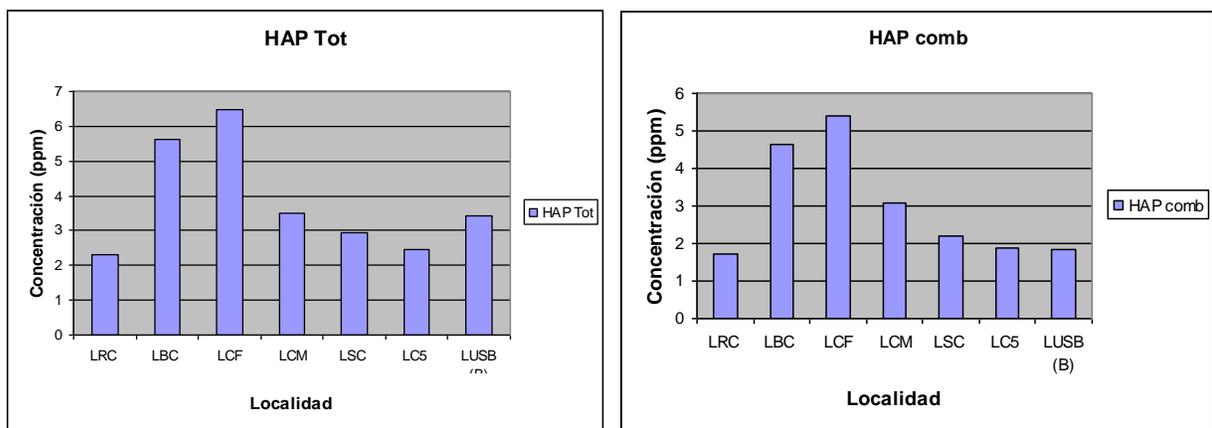
**Fig. 26.** Concentración de HAP ( $\mu\text{g/g}$ ) en las muestras de líquenes recolectadas en las localidades a las que fueron transplantadas en la ciudad de Caracas.

Además de la concentración individual de cada compuesto y los HAP totales, fueron evaluados en cada una de las muestras la suma de HAP constituidos por 4 o más anillos ( $\text{HAP}^{\text{comb}}$ ) (Blasco, 2008 y Guidotti *et al.*, 2009) y el perfil en términos de número de anillos. Los  $\text{HAP}^{\text{comb}}$  son considerados generalmente como característicos de la combustión, porque su formación requiere de las altas temperaturas que se dan en estos procesos.

**5.7.1. Concentraciones y perfil de HAP biomonitoreados en las localidades de estudio.** Con el objeto de tener una visión general de la abundancia y distribución de los HAP, se procedió a comparar los valores de HAP totales y HAP de combustión entre



las distintas localidades (ver figura 27). Puede observarse que las tendencias a mostrar un mayor contenido de HAP totales con respecto a la estación de referencia (LUSB) se presentan en las localidades LCF (88%) LBC (64 %) y LCM (2%), mientras que LRC, LC5 y LSC tienen una tendencia a la baja en HAP totales. Esta última debida a la pérdida de acenaftileno, fenantreno, antraceno, pireno, criseno y dibenzo[a,h]antraceno, la cual será explicada más adelante.



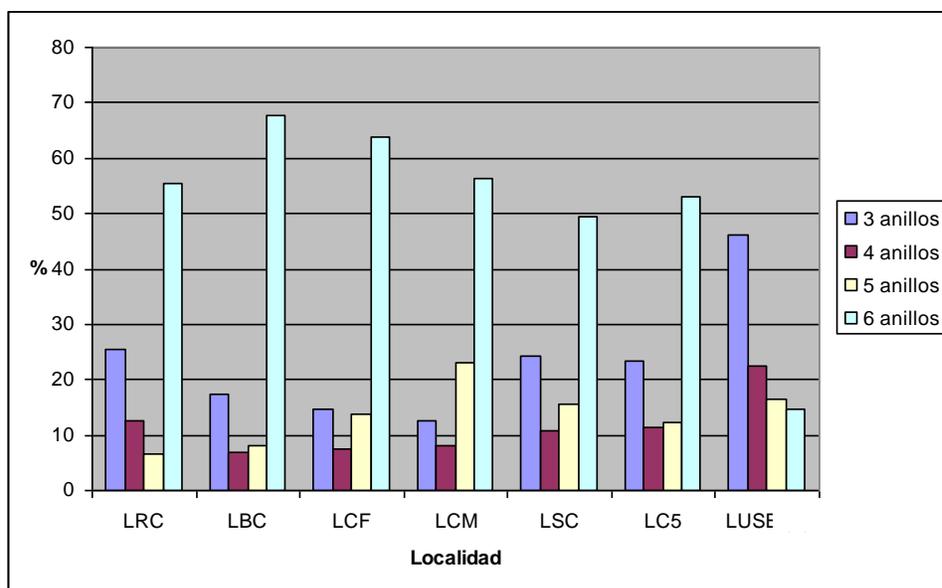
**Fig. 27.** Comparación de concentración de HAP totales y el contenido de HAP<sup>comb</sup> bioacumulados por los líquenes en cada localidad de Caracas.

En el caso de los HAP característicos de los procesos de combustión, todas las localidades (de 2 % para LC5 a 192 % para LCF), a excepción de LRC presentan una tendencia a acumular dichos compuestos (> 4 anillos) en relación a la referencia (LUSB). Esto indica que la fuente de emisión de dichos compuestos (> 4 anillos) fue mayor al ser transplantedos, así como la captación de los mismos por parte de los líquenes.

Al estudiar el perfil de acumulación en términos de número de anillos de los HAP para cada localidad, se observa que a diferencia de LUSB, que presenta un perfil de acumulación rico en compuestos de bajo peso molecular (3>4>5>6 anillos), el resto de



las localidades presentan un enriquecimiento en compuestos de 6 y 5 anillos (6>5>3>4 para LCM; 6>3>5>4 para LCF, LBC, LSC y LC5; 6>3>4>5 para LRC) (ver figura 28).



**Fig. 28.** Perfil de bioacumulación de HAP según el contenido (%) de compuestos constituidos por 3, 4, 5 y 6 anillos en las localidades estudiadas.

Existe una fuerte relación entre el contenido de partículas menores a 2,5  $\mu\text{m}$  y la concentración de HAP totales en las partículas, teniendo que efectivamente con el incremento de  $\text{PM}_{2,5}$  incrementa la concentración de HAP (Akyüz y Çabuk, 2009). La mayor proporción de HAP de 5 y 6 anillos aromáticos en los líquenes, al ser transplantados a la ciudad, está directamente relacionada a la combustión incompleta de material orgánico producto de las actividades humanas en localidades como El Cafetal, El Silencio, El Cementerio, CORE 5 y Bello Campo. Adicionalmente, Rehwagen *et al.* (2005) señalan que más del 50 % de los HAP están asociados a partículas menores a 0,49  $\mu\text{m}$ , que dicho tamaño de partícula está asociado al tráfico vehicular, y que otras fuentes de combustión están relacionadas con partículas entre 0,49 y 0,95  $\mu\text{m}$ .



Para determinar diferencias significativas entre las localidades estudiadas para cada uno de los 13 HAP cuantificados, fue aplicado un ANOVA de un factor, cuyo nivel de significancia ( $p$ ) se fijó  $>0,05$  (ver apéndice W). Para la representación de los resultados fueron utilizados los diagramas de caja, debido a que proporcionan información visual muy completa acerca de la distribución de los datos (ver apéndice Z). Fenantreno, antraceno, pireno y benzo[a]pireno no mostraron diferencias relevantes entre las localidades estudiadas.

Criseno mostró una diferencia significativa con disminución de la concentración en todas las localidades de estudio, así como una disminución de dibenzo[a,h]antraceno en LRC, LC5 y LSC y de acenaftileno en LRC, LC5 y LCM; con respecto a LUSB. Dicha pérdida por parte de los líquenes de estos contaminantes es consecuencia de varios factores: LUSB posee concentraciones considerables de una parte importante de los HAP estudiados (además de los antes mencionados fueron cuantificados fenantreno, antraceno y pireno con concentraciones similares a las encontradas en la ciudad); la pérdida de humedad por parte de los líquenes al ser transplantados (ver apéndice G), como consecuencia de la fuerte sequía acaecida durante el periodo de muestreo, influyó en la capacidad de los bioacumuladores a retener dichos compuestos; la ausencia de precipitaciones evitó la deposición húmeda de contaminantes, así como el exceso de luminosidad y las temperaturas por encima de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  pudieron haber catalizado la pérdida de dichos compuestos (fotooxidaciones y volatilización de los HAP de bajo y mediano peso molecular); y la lejanía en el plano vertical a la cual fueron colocados los biomonitores con respecto a la fuente inmediata de dichos compuestos (azoteas de más de 10 m de altura). De hecho, puede observarse que los mayores niveles de concentración para la mayoría de los HAP estudiados son encontrados en la localidad LCF, en la cual los líquenes estaban a una altura máxima de 4 m de la avenida (fijos en árboles) y menos expuestos a la radiación solar.



La disminución de dichos compuestos es la principal causa por la cual LUSB presenta mayores valores de HAP totales en comparación con LRC y LC5 así como un mayor contenido de HAP<sup>comb</sup> en comparación a LRC.

Réquiz (2006) reportó que los valores para todos los 16 HAP listados por la US-EPA estaban por debajo del límite de detección (0,30 µg/g) del instrumental empleado (HPLC) en LUSB. Dichos resultados contrastan con los valores encontrados en este estudio, los cuales están entre 0,30 y 0,80 µg/g para los HAP cuantificados. Estos datos apuntan al hecho de que ha habido un incremento en la exposición de los líquenes a los HAP en los últimos 4 años. Sin embargo, debe tenerse cuidado al comparar estos valores, debido a que se trata de distintos tipos de líquenes, y las diferencias en los niveles de concentración pueden deberse a las distintas capacidades bioacumulativas de los mismos. Chang *et al.* (2006) mencionan que la fuente principal de generación de acenaftileno, fenantreno, pireno y criseno es el tráfico vehicular. Esto permite aseverar que LUSB muestra niveles apreciables de contaminación por la elevada afluencia de vehículos automotores que transitan a través del campus universitario.

La localidad El Cafetal mostró diferencias significativas para la mayor cantidad de HAP con respecto a LUSB (fluoranteno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno [1,2,3-cd]pireno), seguida por El Silencio (benzo[b]fluoranteno y benzo[k]fluoranteno) y LBC (indeno [1,2,3-cd]pireno).

Por su parte, fluoranteno y benzo[a]antraceno pudieron ser cuantificados únicamente en la localidad LCF. Benzo[b]fluoranteno y benzo[k]fluoranteno presentaron un comportamiento similar, encontrándose significativamente en mayores concentraciones en LCF en comparación con el resto de las localidades de estudio. LSC también presentó concentraciones significativamente mayores de B[b]F en comparación con LRC y de B[k]F con respecto a LRC y LC5.



La muestra El Cementerio presentó concentraciones significativamente superiores de dibenzo[a,h]antraceno en comparación con LRC, LC5 y LSC. La abundancia de dibenzo[a,h]antraceno en El Cementerio posiblemente esté relacionada con la cercanía a la autopista Norte-Sur de dicha estación de muestreo, por la cual transitan vehículos de carga pesada (apéndice V) que funcionan con motores diesel, los cuales generan perfiles de HAP más ricos en compuestos de alto peso molecular (Blasco, 2008) (esto explicaría que la mayor proporción de los HAP sean de 5 y 6 anillos en dicha localidad). Es importante señalar, que la azotea en la cual fue colocada la muestra está ubicada al este de la autopista, lo cual favorece el transporte de los HAP generados por los vehículos (vientos alisios del noreste) al punto de muestreo, y que dicha localidad está ubicada en un valle interno en la ciudad de Caracas, lo cual favorece la concentración de los contaminantes en este sector. Debe tenerse en cuenta las características de la comunidad aledaña a la estación de muestreo (zona con elevada densidad poblacional), en la cual la quema de basura puede constituir una fuente de HAP en dicha localidad.

Fueron determinadas concentraciones de benzo[g,h,i]perileno en la localidad LCF estadísticamente mayores a las encontradas en el resto de las estaciones, lo cual es una clara evidencia de un aporte importante de HAP emitidos por vehículos livianos (emisiones específicas de gasolina) (Blasco, 2008). La figura 29 muestra la cercanía entre los líquenes y el tráfico vehicular.

En lo referente a la comparación entre localidades en el contenido de indeno [1,2,3-cd]pireno, LCF mostró diferencias significativas (mayores concentraciones) en este compuesto con respecto al resto de las localidades, mientras que en LBC fueron registrados mayores valores en comparación con LC5, LSC y LRC.



**Fig. 29.** Líquenes ubicados en la Avenida Principal de El Cafetal.

Es importante destacar que el benzo[a]pireno, compuesto con comprobadas propiedades genotóxicas y cancerígenas, sólo fue identificado en LCF y LC5 en concentraciones cercanas (56 y 48 ng/g respectivamente). La escasez de dicho compuesto en comparación con el resto de HAP cuantificados en la mayoría de las localidades de estudio probablemente esté relacionada a su bajo tiempo de vida media en aire (menos de 1 h) como consecuencia de su mayor reactividad (mayor índice de decaimiento), lo cual dificulta la acumulación de dicho compuesto por parte de los líquenes. Peltonen y Kuljukka (1995), han reportado reacciones químicas entre benzo[a]pireno con ozono y dióxido de nitrógeno presentes en la atmósfera, tanto en la oscuridad como en presencia de luz. En este sentido, ha sido comprobada la formación de compuestos nitro-HAP por la presencia de  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{HNO}_3$  en la atmósfera, donde se ha reportado la transformación química de HAP como: benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno y benzo[ghi]perileno, lo cual explicaría la escasez de estos compuestos en términos generales, a diferencia de otros compuestos relativamente



más abundantes como benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno y criseno (Chirino, 2008).

En el caso de las localidades LCF y LSC, la presencia de una cantidad apreciable de restaurantes de comida china, mexicana, polleras, pizzerías, entre otros, podría estar aportando a la carga de HAP cuantificados. Sobre todo en cantidades de benzo[b]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno, abundantes en el perfil generado al freír comidas (Wei *et al.*, 2006).

**5.7.2. Análisis de Cluster y Análisis de Componentes Principales (ACP).** Con el objeto de integrar los resultados obtenidos y aportar una visión completa del sistema de estudio se realizó un análisis de *cluster* en el cual fue medida la similitud entre las localidades de estudio, para posteriormente agruparlas en conjuntos homogéneos internamente y diferentes entre sí, en cuanto a contenido y perfil de HAP (ver apéndice S 2).

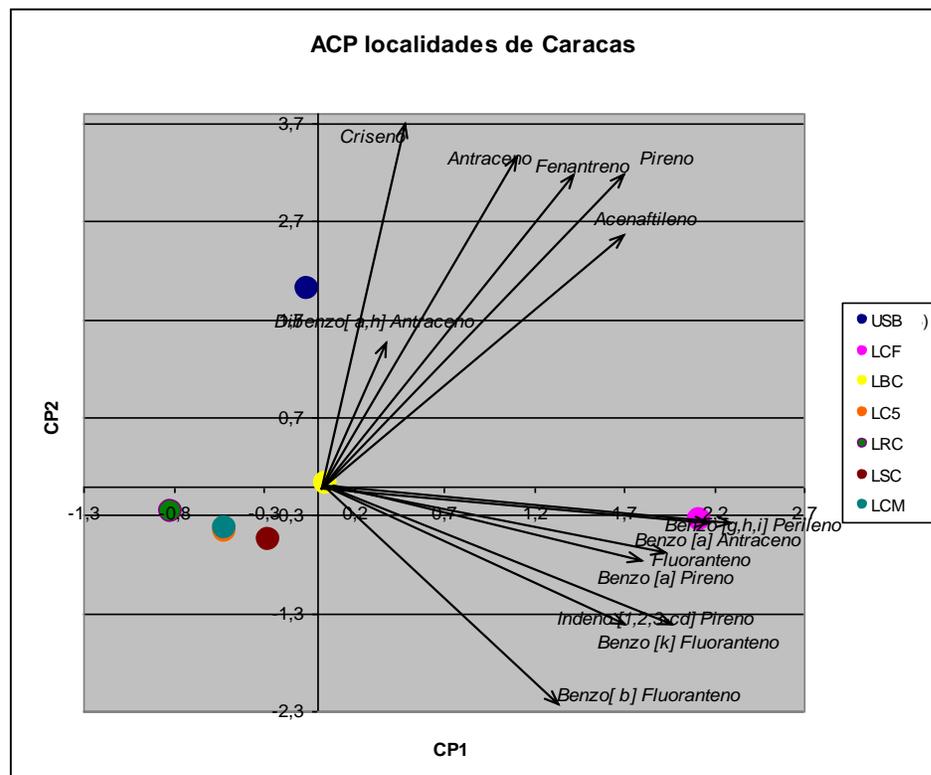
Puede observarse una clara distinción entre LCF y LBC (mayores concentraciones de HAP totales,  $HAP^{comb}$ , particularmente de indeno[1,2,3-cd]pireno) del resto de las localidades, así como las similitudes entre LRC y LC5 (menores concentraciones de la mayoría de los HAP estudiados), y la separación de LUSB y LCM (mayor valor de TEQ, ver apéndice U) de LRC, LC5 y LSC, a pesar de encontrarse en un mismo gran grupo. Para una mejor comprensión y explicación de dicho agrupamiento fue realizado un ACP (ver apéndice Y, cuyos resultados son mostrados en la figura 30 y 31).

Pudo obtenerse que los dos primeros componentes principales (CP) o ejes de representación, acumulan el 82,209 % de la variabilidad total del sistema, con lo cual al efectuar una gráfica de dispersión de los casos (muestras) y las variables (HAP), puede discriminarse la variabilidad más importante del sistema (figura 30). Lo primero que se observa en el gráfico es la separación de las muestras LCF y LUSB del resto de muestras por medio del primer y segundo CP, respectivamente. La discriminación de



LCF es consecuencia de un mayor contenido de compuestos de mediano y alto peso molecular como fluoranteno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno e indeno [1,2,3-cd]pireno; siendo esta localidad la que presenta mayores niveles de HAP totales, y en la cual están presentes los 13 HAP cuantificados. Por su parte LUSB presenta un mayor contenido en HAP de bajo y mediano peso molecular como acenaftileno, antraceno, fenantreno, criseno y pireno, además de cantidades apreciables de dibenzo[a,h]antraceno. Este mayor contenido en HAP de bajo y mediano peso molecular, asociados a la fase gaseosa puede ser consecuencia de variables meteorológicas como la precipitación y el rocío (mayor altura sobre el nivel del mar), las cuales favorecen la deposición húmeda y acumulación de gases por parte de los líquenes, que adicionalmente toman el agua y los nutrientes de la atmósfera (Augusto *et al.*, 2009). Debe tenerse en cuenta que los líquenes son metabólicamente más activos en climas húmedos, y además la lluvia es rica en nutrientes y contribuye a la bioacumulación por vía húmeda (Blasco, 2008). Asimismo, la abundancia de árboles y arbustos provee una temperatura óptima para la condensación y absorción por parte de las plantas y líquenes (Shukla y Upreti 2008). Ollivon *et al.* (2002) encontró una dependencia entre la temperatura y la deposición de fenantreno y pireno, teniendo que a menores temperaturas dicha deposición tiende a aumentar.

Seguidamente, puede distinguirse LBC del resto de las localidades por un mayor contenido de gran parte de los HAP en comparación con LRC, LCM LSC y LC5. Sin embargo, la distinción de esta localidad no es tan clara como en el caso de LCF, por el menor contenido de HAP (en general) y la ausencia de compuestos como fluoranteno, benzo[a]fluoranteno y benzo[a]pireno, que sí están presentes en LCF.



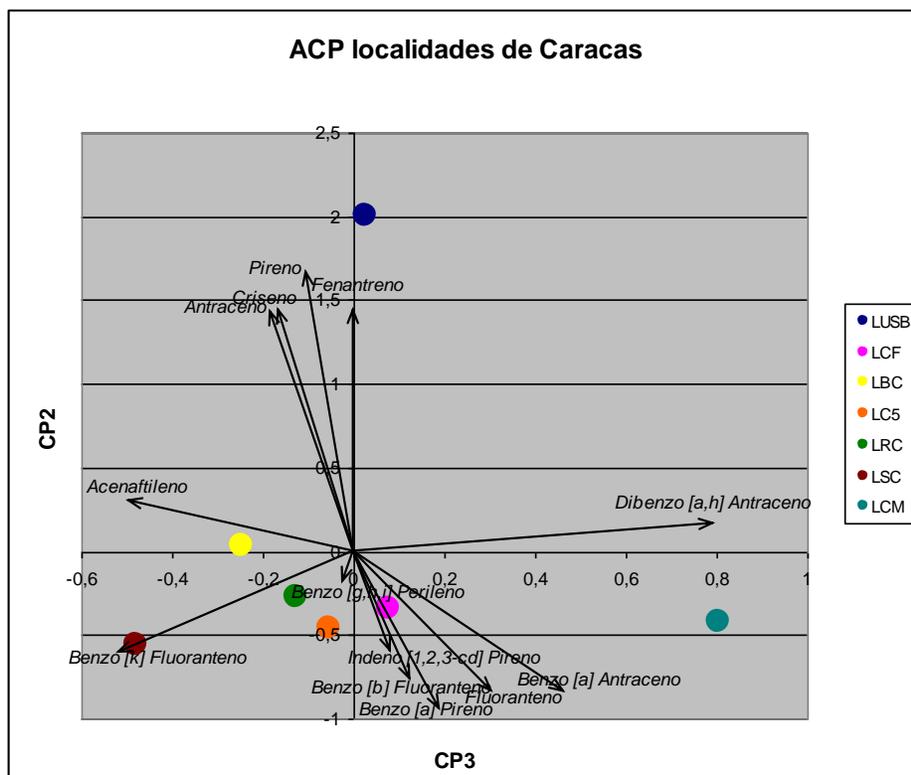
**Fig. 30.** Análisis de Componentes Principales de las 7 muestras analizadas. Representación de CP1 y CP2.

Para una mejor discriminación de las localidades LRC, LSC, LCM y LC5 fue realizada una representación gráfica de las puntuaciones correspondientes a las muestras respecto a segundo y tercer componente principal, que es mostrada en la figura 31. La tendencia más importante observada en esta gráfica es la separación de LCM del resto de las localidades, como consecuencia de un mayor contenido en dibenzo[a,h]antraceno. Asimismo se distingue LSC por presentar un mayor contenido en benzo[k]fluoranteno.

Puede observarse una correlación positiva entre los compuestos fenantreno-antraceno, criseno-pireno y benzo[b]fluoranteno-benzo[k]fluoranteno, la cual es debida fundamentalmente a la similitud en las propiedades físicas y químicas de dichas



compuestos isómeros (misma fuente, reactividad, puntos de fusión, ebulición y solubilidad similares, entre otras).



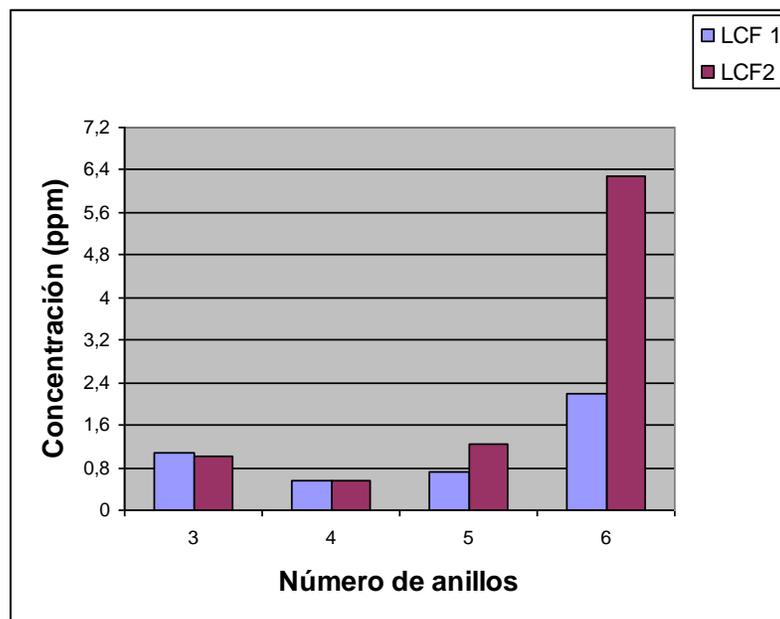
**Fig. 31.** Análisis de Componentes Principales de las 7 muestras analizadas. Representación de CP2 y CP3.

Las muestras LRC y LC5 presentan bajas concentraciones para todos los compuestos, y no revelan un contenido preferencial de alguno de los HAP.

**5.7.3. Variabilidad intralocal de los HAP bioacumulados por los líquenes *transplantados*.** Con el objeto de evaluar las variaciones que pueden existir en una misma localidad en un radio menor a 50 m en cuanto al perfil y contenido de HAP totales, HAP característicos de combustión y distribución por número de anillos, acumulados por la especie *Parmotrema sancti-angelii*, fueron analizados por triplicado



cada uno de los dos especímenes colocados en El Cafetal (ver apéndice V) a 50 m de distancia (ambos lados de la Av. Principal del Cafetal). Para dicho análisis fueron incluidos ambos especímenes en el ANOVA efectuado para estudiar variabilidad entre localidades (ver apéndice W). Pudo detectarse diferencias significativas en la concentración de fluoranteno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno entre los especímenes. Las mayores concentraciones de estos compuestos fueron obtenidas en el espécimen 2 (ver apéndice Z). Puede observarse que las variaciones se presentan en los compuestos de alto peso molecular (5 y 6 anillos, ver figura 32), los cuales están asociados predominantemente a la fase de partículas.



**Fig. 32.** Concentración de compuestos constituidos por 3, 4, 5 y 6 anillos en los especímenes ubicados en El Cafetal.

Dicha variabilidad conlleva a analizar características muy específicas de la forma en que fueron colocados los especímenes y de la localidad de estudio. Entre dichas características cabe destacar el hecho de que la superficie expuesta del espécimen 1 era menor a la del espécimen 2, lo cual es debido a que el espécimen 1 estaba



aglomerado en una misma rama del árbol al cual fue amarrado, mientras que el espécimen 2 se encontraba distribuido en dos ramas. En ese sentido, el principal mecanismo de incorporación de partículas a las hojas de las plantas y el talo líquénico es la acumulación pasiva (Jouraeva et al., 2002; Lehndorf y Schwark, 2004; Pignata et al., 2008), la cual probablemente esté directamente relacionada a la superficie expuesta del biomonitor.

Otro factor determinante en la variabilidad observada es la cercanía de la parada de autobuses al punto en el cual fue colocado el espécimen 2, así como al acceso del estacionamiento de una de los edificios residenciales ubicados en dicha localidad, lo cual está directamente relacionado a la facilidad de los líquenes de captar aerosoles producto de la combustión incompleta de gasolina, en el caso de los vehículos livianos y gasolina y/o diesel por parte de los vehículos de transporte público.

**5.7.4. Relaciones diagnósticas en las localidades de estudio.** Algunas de las relaciones diagnósticas más frecuentemente empleadas, han sido determinadas para comparar el origen de los HAP cuantificados en las localidades. La tabla 16 muestra las relaciones  $Fe/An$ ,  $An/(An+Fe)$ ,  $Flu/Pi$ ,  $Flu/(Flu+Pi)$  (Shukla y Upreti 2008),  $B[a]A/(B[a]+Cri)$ ,  $B[g,h,i]P/B[a]P$  (Blasco, 2008) e  $Ind/(Ind+B[g,h,i]P)$  (Ortiz et al., 2007), calculadas con los valores promedios de HAP.

Las relaciones  $Fe/An$  y  $An/(An+Fe)$  ( $<10$  y  $>0,1$  respectivamente) indican un aporte pirolítico a la mezcla de HAP determinados en todas las localidades. Por su parte las relaciones  $Flu/Pi$ ,  $Flu/(Flu+Pi)$  y  $B[a]A/(B[a]+Cri)$  arrojan valores "0" debido a la ausencia de fluoranteno y benzo[a]antraceno en todas las localidades, a excepción de El Cafetal.

Los valores en El Cafetal señalan la presencia de compuestos petrogénicos en dicha localidad, por lo que se tendría una mezcla de HAP producto de los derivados del petróleo (por la cercanía a la avenida) y la quema de combustibles fósiles. La contaminación petrogénica por deposición atmosférica puede relacionarse a las



emisiones de aceites lubricantes inquemados del escape de los vehiculos (Shukla y Upreti 2008).

La relación  $Ind/(Ind+B[g,h,i]P) > 0,5$  en todas las localidades, indica la presencia de HAP provenientes de la quema de vegetación (Ortiz *et al.*, 2007).

Por último, el cociente  $B[g,h,i]P/B[a]P$ , comúnmente empleado para estimar la incidencia de las emisiones provenientes específicamente de la quema de gasolina (Brandli *et al.*, 2007), pudo encontrarse como era esperado, que los valores de esta relación para la localidad de El Cafetal son sumamente elevados ( $>0,6$ ), consecuencia de que la misma está fuertemente afectada por el tráfico.

**Tabla 15.** Relaciones diagnósticas promedio calculadas para cada una de las localidades.

Localidad	Fe/An	Flu/Pi	An/ (An+Fen)	B[a]A/(B[a]A+Cri)
LUSB	0,90	0,00	0,53	0,00
LCF	1,15	0,07	0,47	0,21
LBC	1,13	0,00	0,47	0,00
LC5	1,28	0,00	0,44	0,00
LRC	1,28	0,00	0,44	0,00
LSC	1,47	0,00	0,40	0,00
LCM	1,44	0,00	0,41	0,00

Localidad	$B[g,h,i]P/B[a]P$	$Ind/(Ind+B[g,h,i]P)$	$Flu/(Flu+Pi)$
LUSB	-	1,00	0,00
LCF	4,30	0,91	0,06
LBC	-	0,96	0,00
LC5	0,00	1,00	0,00
LRC	-	1,00	0,00
LSC	-	1,00	0,00
LCM	-	1,00	0,00

Al igual que en los estudios de Réquíz (2006) y Chirino (2008), no fueron evidenciadas tendencias espaciales o delimitaciones geográficas claras, sino que cada



localidad posee características particulares que influyen en la cantidad y perfil de HAP determinados. Entre estas características están la afluencia vehicular, el tipo de vehículos automotores que transita predominantemente, los hábitos de conducir, presencia de locales de comida, calidad de las vías, densidad poblacional, dirección de los vientos y topografía. A esto debe adicionarse la varianza aportada durante el muestreo activo, debida a factores como altura respecto al suelo, sombra o protección de la radiación solar, y superficie de talo líquénico expuesta.

El caso del indeno[1,2,3-cd]pireno es bastante particular, ya que el mismo estuvo mucho más ampliamente distribuido en la ciudad de Caracas que otros compuestos, como consecuencia de la deposición seca de partículas provenientes de los incendios forestales.

#### **5.8. Caracterización de los HAP bioacumulados por *Parmotrema sancti-angelii* (Lynge) Hale y *Usnea sp.***

Con el objeto de establecer comparación en la capacidad bioacumulativa y perfil de HAP captados por distintas variedades de líquenes, fueron seleccionados *Parmotrema sancti-angelii* y *Usnea sp.* La escogencia de dichos líquenes estuvo basada en que ambos presentan una elevada superficie expuesta (mayor área por gramo de peso seco) a las condiciones atmosféricas (en comparación con los que poseen una morfología crustácea), así como la posterior facilidad que tienen para ser removidos del sustrato. En el caso de la especie *Parmotrema spancti angelii*, su abundante población en la afueras de la ciudad de Caracas hace de ella un potencial organismo a ser empleado como bioindicador/biomonitor de la contaminación atmosférica en dicha área geográfica (valle del tramo central de la cordillera de la costa). Adicionalmente, la presencia de cilios en la especie *Parmotrema sancti angelii* incrementa la eficiencia para la captación de partículas (Puckett y Finegan, 1980). En el caso del género *Usnea sp.*, la escasez de publicaciones científicas en las cuales hayan



empleado dicho género como biomonitor de HAP (Blasco, 2008), así como su elevada superficie de exposición (talo bastante ramificado, y por lo tanto con mayor área por gramo de peso seco), fueron los principales criterios tomados en cuenta para su selección (ver figura 7).

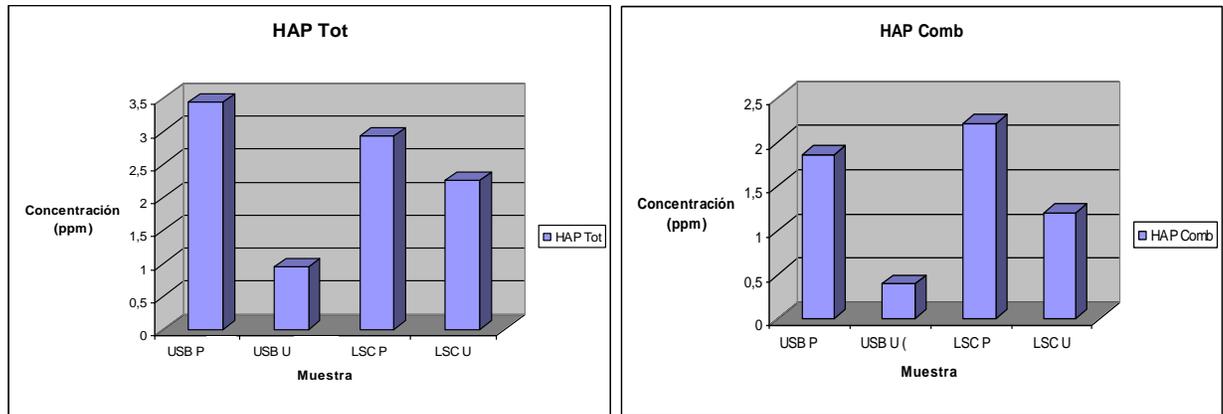
El análisis por triplicado de las muestras de *Parmotrema sancti-angelii* y *Usnea sp.* de la USB (tomadas de su ecosistema natural) y de la localidad de El Silencio (transplantadas), generó un conjunto de datos de concentración de los HAP estudiados que se encuentran en el apéndice P 1. Fueron identificados y cuantificados 10 de los HAP estudiados: acenaftileno, fenantreno, antraceno, pireno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno. Explorando los datos de manera general puede observarse que el nivel de HAP totales varía entre 0,43  $\mu\text{g/g}$  (*Usnea sp.*) y 4,18  $\mu\text{g/g}$  (*Parmotrema sancti-angelii*). De los 10 compuestos cuantificados, el indeno[1,2,3-cd]pireno fue el más abundante, seguido por fenantreno, antraceno y acenaftileno.

Además de la concentración individual de cada compuesto y los HAP totales, fueron evaluados en cada una de las muestras la suma de HAP constituidos por 4 o más anillos (HAP<sup>comb</sup>) y el perfil en términos de número de anillos.

**5.8.1. Capacidad y perfil de bioacumulación de HAP en las dos variedades de líquenes.** Los valores totales de HAP obtenidos para las dos especies en las cuatro muestras son comparados en la figura 33. Puede observarse que en la localidad de la USB hay diferencias sobresalientes en el total de HAP acumulados por ambos tipos de líquenes, pero al ser transplantadas a El Silencio dichas diferencias se ven reducidas hasta el punto de hacerse no significativas. Esto es debido a que, en general, *Usnea sp.* presenta una tendencia a bioacumular HAP (9 de los 10 HAP cuantificados) al ser transplantado (139 % de acumulación de HAP totales respecto al blanco), mientras *P. sancti-angelii* mostró una tendencia a disminuir en contenido total de HAP (bioacumuló



3 de los 10 HAP cuantificados). A pesar de esto, los valores de HAP totales para la especie *P. sancti-angelii*, siempre tienen tendencia a ser mayores que los de *Usnea sp.*



**Fig.33.** Comparación de la concentración de HAP totales y HAP<sup>comb</sup> de cada muestra de líquenes de las dos variedades estudiadas.

*P:* *Parmotrema sancti-angelii*

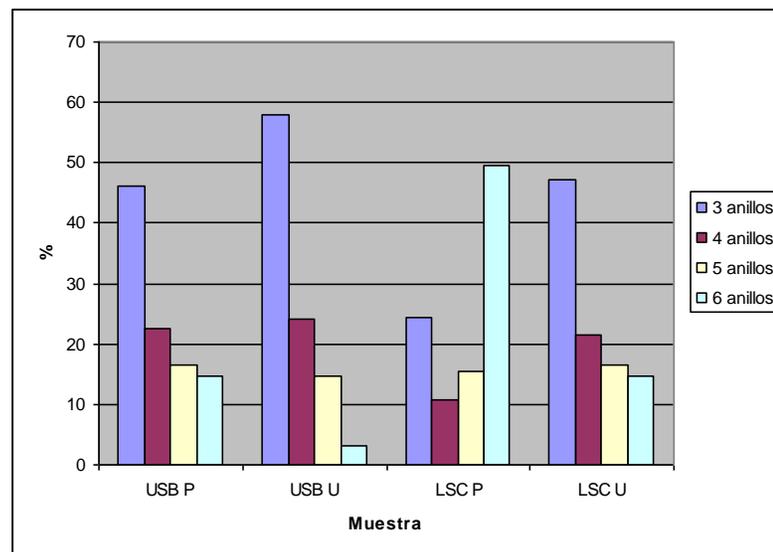
*U:* *Usnea sp.*

En lo referente a los HAP característicos de la combustión (HAP<sup>comb</sup>), puede observarse que la tendencia en el caso de *Usnea sp.* se mantiene igual que con los HAP totales (acumulación de 204 %), no obstante, en el caso de *P. sancti-angelii*, la tendencia al ser transplantado es a acumular dichos compuestos (19 %), a diferencia de la tendencia observada con los HAP totales.

Para evaluar el perfil de acumulación de HAP en líquenes, el contenido de compuestos constituidos por 3, 4, 5 y 6 anillos fue representado en la figura 34. Ambos tipos de líquenes presentaron un perfil de acumulación rico en compuestos de 3 anillos en la localidad USB, así como un contenido bajo en los formados por 6 anillos, teniendo un perfil de acumulación de dichos compuestos en su ecosistema natural en orden decreciente 3 > 4 > 5 > 6. Esto coincide con los resultados obtenidos por Blasco (2008) para 6 especies diferentes de líquenes en sus ecosistemas naturales (como



biomonitores pasivos), entre las que se encuentran *Usnea sp.*, y líquenes con morfologías similares a la de *P. sancti-angelii* (*Parmelia sulcata* y *Lobaria pulmonaria*). Por su parte la muestra LSC U presentó un perfil de acumulación similar al de la USB, lo cual no ocurre con LSC P, cuyo perfil de acumulación resultó en orden decreciente  $6 > 3 > 5 > 4$ . De hecho, el contenido de HAP constituidos por 5 y 6 anillos fue de 65 % en la muestra LSC P, mientras que en la muestra LSC U fue de 31 %.



**Fig. 34.** Perfil de bioacumulación de HAP según el contenido (%) de compuestos constituidos por 3, 4, 5 y 6 anillos en las cuatro muestras estudiadas.

Para una comparación mucho más detallada en cuanto a la capacidad de bioacumulación de ambos tipos de líquenes para cada HAP cuantificado, fue aplicado un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, cuyo nivel de significancia ( $p$ ) fue fijado  $< 0,05$  ( $< 5\%$ ). En dicho análisis se obtuvo que fenantreno, no mostró diferencias estadísticamente significativas en las cuatro muestras analizadas.

Al efectuar la prueba a posteriori del ANOVA (prueba de Duncan, apéndice Q) se obtuvo que en su ecosistema natural (USB), ambos tipos de líquenes presentaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de acenaftileno, antraceno,



pireno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno, mostrando en todos los casos que el contenido de dichas especies químicas es mayor en la especie *P. sancti-angelii*. Al comparar los HAP acumulados por ambas variedades de líquenes al ser transplantados (LSC), puede observarse que benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno son estadísticamente diferentes, y nuevamente es la especie *P. sancti-angelii* la que presenta un mayor contenido en estos compuestos (ver apéndice P 1).

En lo referente a la comparación de las muestras transplantadas con respecto a LUSB, pudo observarse que para *P. sancti-angelii* existen diferencias significativas en el contenido de antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno. Antraceno, criseno y dibenzo[a,h]antraceno disminuyen su concentración (debido a variables como precipitación, rocío, temperatura, luminosidad, altura respecto a la fuente y vegetación, explicadas anteriormente), mientras que benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno aumentan. Para *Usnea sp.* únicamente existe diferencia significativa en el contenido de benzo[b]fluoranteno (aumenta su concentración al ser transplantado).

**5.8.2. Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Cluster.** Con el objeto de tener una visión mucho más amplia e integral en la comparación de ambos tipos de líquenes en las localidades de estudio, fue realizado un ACP. El número de casos se refiere al número de muestras analizadas (4) y las variables están referidas como los valores de concentración para cada HAP.

De esta forma pudo determinarse que los dos primeros componentes principales (CP) o ejes de representación, acumulan el 96,102 % de la variabilidad total del sistema (ver tabla 16), lo cual indica en términos generales que la variación de los valores de concentración entre las muestras es baja, se decir, existe cierta homogeneidad entre los datos. El ACP dio como resultado una representación gráfica de las puntuaciones



correspondientes a las muestras respecto a los dos primeros componentes principales, que es expuesta en la figura 35. Los pesos de las variables correspondientes a los dos componentes principales son presentados en la tabla 16.

La figura 35 muestra que el CP1 es el de mayor poder discriminante, estableciendo una gran diferencia entre USB P y el resto de las muestras. Este comportamiento es consecuencia de la elevada concentración en dicha muestra de acenaftileno, fenantreno, antraceno, pireno, criseno y dibenzo[a,h]antraceno. Este comportamiento evidencia el empobrecimiento en estos compuestos del líquen *P. sancti-angelii* al ser transplantado a la localidad de El Silencio, así como un enriquecimiento en bezo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno en dicha localidad. Además, en dicho componente puede observarse como *P. sancti-angelii* acumula un perfil mucho más rico en estos compuestos que *Usnea sp.* en su ecosistema natural (USB), esto último debido a que los biotipos o talos foliáceos exponen prácticamente toda la superficie del talo a la atmósfera (Blasco, 2008), lo cual los hace mucho más propensos a la acumulación de contaminantes provenientes de las deposiciones húmedas y secas. Adicionalmente, la presencia de cilios incrementa la eficiencia para la captación de partículas (Puckett y Finegan, 1980).

El segundo componente principal, que es el siguiente en poder discriminante, marca la diferencia entre USB U y LSC U, debida al enriquecimiento por parte de esta última en todos los HAP cuantificados, debido a la exposición de este líquen a las condiciones atmosféricas del centro de la ciudad (vías con alta afluencia vehicular y cocinas de restaurantes) a excepción de benzo[g,h,i]perileno el cual pudo ser identificado en la localidad USB, y también es un indicador de fuente vehicular de contaminación (presencia de vehículos automotores en la USB).

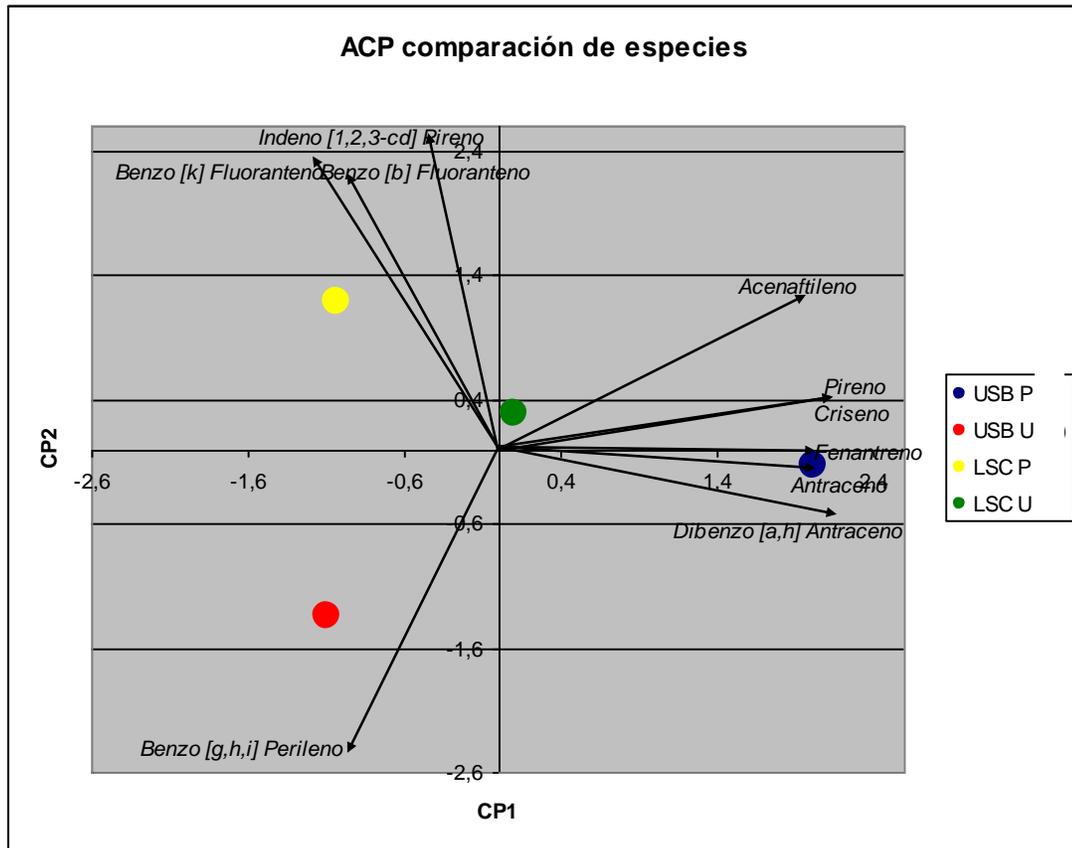


**Tabla 16.** Pesos de las variables correspondientes a los dos primeros componentes obtenidos con el ACP. Entre paréntesis, el poder de discriminación de cada uno en porcentaje.

# de anillos	HAP	CP 1 (63,267 %)	CP 2 (32,835 %)
3	Acenaftileno	<b>0,349</b>	<b>0,264</b>
	Fenantreno	<b>0,396</b>	0
	Antraceno	<b>0,397</b>	-0,018
4	Pireno	<b>0,394</b>	0,069
	Criseno	<b>0,394</b>	0,063
5	Benzo [b] Fluoranteno	<b>-0,162</b>	<b>0,469</b>
	Benzo [k] Fluoranteno	<b>-0,192</b>	<b>0,481</b>
	Dibenzo [a,h] Antraceno	<b>0,383</b>	-0,084
6	Benzo [g,h,i] Perileno	<b>-0,199</b>	<b>-0,47</b>
	Indeno [1,2,3-cd] Pireno	-0,062	<b>0,492</b>

El ACP permitió observar la tendencia por parte de *Usnea sp.* a bioacumular un perfil de HAP intermedio al ser transplantados, mientras que *P. sancti-angelii* muestra un contenido más alto en compuestos de 5 y 6 anillos. Esto debido a la toxicidad más alta que soporta *P. sancti-angelii*, además de otras características morfológicas que serán discutidas más adelante.

Asimismo, fueron agrupadas las muestras de acuerdo sus similitudes mediante un análisis de *cluster* (ver apéndice P 2). En dicho análisis puede observarse una clara diferencia entre el género *Usnea sp.* (LSC U y USB U se encuentran en un mismo conglomerado) y la especie *P. sancti-angelii*, lo cual permite corroborar la diferencia observada con los análisis anteriores respecto a la capacidad y perfil de acumulación de HAP por cada tipo de líquen.



**Fig. 35.** Resultados del análisis de componentes principales. Representación de los dos primeros CP.

Para explicar los diferentes perfiles encontrados debe tenerse en cuenta la morfología de cada especie, ya que la misma puede influir sobre la tendencia a tomar los nutrientes procedentes de un tipo de deposiciones u otras, y por lo tanto, sobre la biomonitorización de un patrón de HAP determinado (Blasco, 2008). Los líquenes fruticulosos como el género *Usnea sp.* (ver figura 7) son mucho más dependientes de las deposiciones húmedas que los foliáceos, ya que estas penetran hasta la superficie del talo menos expuesta a la atmósfera. Por el contrario, los líquenes foliáceos, como la especie *P. sancti-angelii*, exponen prácticamente toda la superficie del talo a la



atmósfera, facilitando la toma de nutrientes, tanto a través de las partículas depositadas sobre el mismo como por vía húmeda (Blasco, 2008). Esto permite explicar el hecho de que *P. sancti-angelii* muestre un espectro completo de biomonitorización de HAP al ser transplantado, con un contenido más alto en compuestos asociados a partículas atmosféricas (5 y 6 anillos) que el género *Usnea sp.*, en el cual predominan los compuestos formados por 3 y 4 anillos aromáticos, probablemente adsorbidos en forma gaseosa o disuelta.

Otro factor a tener en cuenta en la explicación de las tendencias en cuanto a perfiles encontrados para cada tipo de líquen es la cantidad de sustancias líquénicas excretadas por las células de dichos organismos. Esto debido a que uno de los mecanismos propuestos de asimilación de los contaminantes gaseosos en los líquenes es la adsorción por fuerzas intermoleculares entre las sustancias líquénicas y los contaminantes orgánicos, entre los que se encuentran los HAP. En este sentido, al comparar los % de extracto orgánico obtenido para ambos tipos de líquenes, puede observarse que en el caso de *Usnea sp.* dichos valores son superiores a los de *P. sancti-angelii* (ver apéndice I), con lo cual *Usnea sp.* presenta un mayor contenido de sustancias líquénicas adsorbidas en el talo. Esto puede relacionarse con la tendencia de *Usnea sp.* a acumular una mayor proporción de HAP de bajo y mediano peso molecular (3 y 4 anillos) que *P. sancti-angelii* al ser transplantados (muestreo activo).



## 6. CONCLUSIONES

Los factores: altura respecto al suelo, sombra o protección a la radiación solar, y superficie de talo liquénico expuesta, aportan varianza a la etapa de muestreo, por lo que deben ser estandarizados para disminuir dicha variabilidad y hacer comparaciones mucho más objetivas entre las localidades a las cuales son transplantados los líquenes.

La concentración de HAP totales para la réplica no lavada mostró una tendencia a ser mayor respecto a la de la réplica lavada, lo cual indica una propensión a perder HAP en este paso del tratamiento físico.

Existe una tendencia del hexano a extraer en mayor proporción los compuestos: acenaftileno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno de matrices liquénicas, empleando la técnica de extracción estática con ultrasonido.

La técnica CG/EM permitió identificar eficazmente los 16 HAP listados como contaminantes principales por la US-EPA utilizando el líquen *Parmotrema sancti-angelii*, como consecuencia de su buena selectividad, por lo que es recomendable emplearla de manera conjunta con el HPLC al efectuar este tipo de análisis.

El rango de concentración de HAP totales estuvo comprendido entre  $6,47 \pm 3,80$   $\mu\text{g/g}$  y  $2,30 \pm 0,49$   $\mu\text{g/g}$ , correspondientes a las localidades de El Cafetal y Los Ruices respectivamente.

Los líquenes de la especie *Parmotrema sancti-angelii* presentaron, al ser transplantados a la ciudad de Caracas, un enriquecimiento en compuestos de 6 y 5 anillos (6>5>3>4 para LCM; 6>3>5>4 para LCF, LBC, LSC y LC5; 6>3>4>5 para LRC)



asociados a las partículas atmosféricas comúnmente generadas en procesos de combustión.

Los valores de HAP totales para la especie *Parmotrema sancti-angelii*, siempre tienen tendencia a ser mayores que los de *Usnea sp.* (en su ecosistema natural y al ser transplantados), y *Parmotrema sancti-angelii* presenta un contenido más alto en compuestos asociados a partículas atmosféricas (5 y 6 anillos) que el género *Usnea sp.*, en el cual predominan los compuestos formados por 3 y 4 anillos aromáticos, asociados a la fase gaseosa.



## 7. RECOMENDACIONES

Realizar la cuantificación del naftaleno identificado en todas las muestras, mediante el empleo de patrones para este compuesto en particular, con la finalidad de incluirlo en la carga de HAP totales, comparar su concentración con la del resto de HAP y determinar variaciones entre las localidades estudiadas.

Evaluar el empleo de bromeliáceas biomonitores/bioindicadores de la contaminación atmosférica por HAP, debido su amplia distribución geográfica en la ciudad de Caracas y resistencia a la contaminación atmosférica.

Aplicar un muestreo activo mucho más extenso, con localidades mucho más cercanas entre sí (cada 500 m), para establecer tendencias espaciales en la distribución de HAP y tener una visión completa del sistema bajo estudio (elaboración de mapas de isoconcentración).

Proteger los líquenes una vez transplantados de la incidencia directa de la radiación solar, así como colocarlos entre 2 y 5 m de altura respecto al suelo, preferiblemente a la misma altura, y garantizar que el área superficial expuesta de los biomonitores sea lo mayor y más homogénea posible en todas las localidades estudiadas.

Emplear técnicas de extracción y separación de la fracción aromática que requieran menores cantidades de muestra, tiempo y solvente como extracción en fase sólida (SPE) o extracción dinámica por ultrasonidos (DSASE), con el objeto de aumentar el número de análisis que pueden efectuarse con una misma cantidad de insumos, para así reducir los desechos producto del tratamiento químico y el impacto de la sustracción de los biomonitores/bioindicadores de su ecosistema.



---

Optimizar las condiciones de separación y cuantificación de los HAP en matrices líquénicas mediante las técnicas HPLC y CG/EM.

Medir en cada localidad los valores de presión atmosférica, luminosidad (reacciones químicas y fotoquímicas), precipitación, rocío y temperatura (intercambio entre las fases partícula y gaseosa) para una interpretación mucho más completa.



## 8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1995). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Department of Health and Human Services Public Health Service. EEUU.
- Akyüz, M; Ç abuk, H. (2009). Meteorological variations of PM<sub>2.5</sub>/PM<sub>10</sub> concentrations and particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheric environment of Zonguldak, Turkey. *Journal of Hazardous Materials* 170: 13–21.
- Arguello, E. (2009). Distribución de metales pesados entre quebrada Quintero y Altamira-Caracas empleando líquenes y bromeliáceas como biomonitores de contaminación atmosférica. Trabajo especial de grado, Licenciatura en Geoquímica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 110 pp.
- Arrojo, S; Nerín, C; Benito, Y. (2007). Application of salicylic acid dosimetry to evaluate hydrodynamic cavitation as an advanced oxidation process. *Ultrasonic Sonochemistry* 14: 343-349.
- Augusto, S; Máguas, C; Matos, J; Pereira, M; Branquinho, C. (2009). Lichens as an integrating tool for monitoring PAH atmospheric deposition: A comparison with soil, air and pine needles. *Environmental Pollution* 158, 2: 483-489.
- Baumard, P; Budzinski, H; Garrigue, P. (1998) Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean sea. *Environmental Toxicological Chemistry* 17: 765-776.
- Black, K. (2009). Business Statistics. Sexta edición. EE UU: John Wiley and Sons. 836 pp.
- Blasco, M. (2008). Evaluación analítica de líquenes como biomonitores de la contaminación atmosférica en ecosistemas naturales a través de la determinación de PAHs. Tesis de doctorado, Departamento de Química



- Analítica, Centro Politécnico Superior, Universidad de Zaragoza, Zaragoza. 367 pp.
- Blasco, M; Domeño, C; Nerín, C. (2008). Lichens biomonitoring as feasible methodology to assess air pollution in natural ecosystems: Combined study of quantitative PAHs analyses and lichen biodiversity in the Pyrenees Mountains. *Anal Bioanal Chem* 391: 759-771.
- Bomboi, M; Méndez, J; Grimals, J; Prada, D; Cerdá, V. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air: A view of some obtained results in Spain in the last years. *Fresenius Environmental Bulletin* 8: 595-601.
- Boström, C; Gerde, P; Hanberg, A; Jernström, B; Johansson, C; Kyrklund, T; Rannung, A; Törnqvist, M; Victorin, K ; Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspective* 10: 451- 489.
- Brandli, R; Bucheli, T; Kupper, T; Mayer, J; Stadelmann, F ; Taradellas, J. (2007). Fate of PCBs, PAHs and their source characteristics ratios during composting and digestion of source-separated organic waste in full-scale plants. *Environmental Pollution* 148: 520-528.
- Bucheli, T; Blum, F ; Desaulles, E; Gustafsson, O. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon, and molecular markers in soils of Switzerland. *Chemosphere* 56: 1061-1076.
- Budzinski, H; Jones, I; Bellocq, J; Pierad, C; Garrigues, P. (1997). Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58: 85-97.
- Caselli, M. (2000). La Contaminación Atmosférica. Sexta edición. México D.F.: Siglo XXI editores. 193 pp.



- Chang K, Fang G, Chen J, Wu Y. 2006. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Asia: A review from 1999 to 2004. *Environmental Pollution* 142: 388-396.
- Chirino, Y. (2008). Evaluación de un método analítico para la extracción y determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en partículas atmosféricas sedimentadas en la ciudad de Caracas. Trabajo de grado de maestría, Centro de Estudios Avanzados, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas. 110 pp.
- Clark, J; Macquarrie, D. (2002). Handbook of Green Chemistry and Technology. Primera edición. Gran Bretaña: Blackwell Publishing. 540 pp.
- Conti, M; Cecchetti, G. (2000). Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review. *Environmental Pollution* 114: 471-492.
- De los Santos, M; Batlle, R; Salafranca, J; Nerín, C. (2005). On the extractability of paper samples: Subcritical water and dynamic sonication-assisted solvent extraction of fluorescent whitening agents and azo dyes. *Journal of Chromatography A* 1064: 135-141.
- Des Abbayes, H.; Chadefaud, M.; Feldmann, J.; De Ferré, Y.; Gausson, H.; Grassé, P. P.; Prévot, A. R. (1989). Botánica: vegetales inferiores. Segunda edición (edición en español). Barcelona: Editorial Reverté, S. A. 757 pp.
- Díaz, J. (2008). Determinación de metales pesados (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn y V) en líquenes y partículas atmosféricas (PM10), en la ciudad de Caracas. Trabajo especial de grado, Licenciatura en Geoquímica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 152 pp.
- Domeño, C; Blasco, M; Sánchez, C; Nerín C. (2006). A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used



as biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods. *Analytica Chimica Acta* 569: 103-112.

Douben, P. (2003). PAHs: An ecological perspective. Chichester: John Wiley & Sons, Inc. 399 pp.

Fernández-González, V; Concha-Grana, E; Muniategui-Lorenzo, S; López-Mahía, P; Prada-Rodríguez, D. (2008). A multivariate study of the programmed temperature vaporization injection-gas chromatographic-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons - Application to marine sediments analysis. *Talanta* 74: 1096-1103.

Figueredo, J.; Dávila, M. (2004). Química Física del ambiente y de los procesos medioambientales. España: Editorial Reverté S.A. 606 pp.

García, A.; Bonen, M.; Ramirez-Vick, J.; Sadaka, M.; Vuppu, A. (1999). Bioseparation Process Science. USA: Blackwell Science, Inc. 425 pp.

Gnanadesikan, R. (1997). Methods for Statistical Data Analysis of Multivariate Observations. Segunda edición. New York: John Wiley & Sons, Inc. 353 pp.

González, J; Vinas, L; Franco, M; Fumega, J; Soriano, J; Grueiro, G; Muniategui, S; López-Mahía, P; Prada, D; Bayona, J; Alzaga, R; Alabaigés, J. (2006). Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 53: 250-259.

Greenacre, M.; Blasius, J. (1994). Correspondence Analysis in the Social Sciences. Londres: Academic Press. 370 pp.

Guidotti, M; Stella, D; Owczarek, M; De Marco, A; De Simone, C. (2003). Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *Journal of Chromatography A* 985: 185-190.



- Guidotti, M; Stella, D; Dominici, C; Blasi, G; Owczarek, M; Vitali, M; Protano, C. (2009). Monitoring of Traffic-Related Pollution in a Province of Central Italy with Transplanted Lichen *Pseudovernia furfuracea*. *Bull Environ Contam Toxicol* 83: 852-858.
- Guitart, C; García-Flor, N; Bayona, J; Albaigés, J. (2007). Occurrence and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the coastal surface microlayer. *Marine Pollution Bulletin* 54: 186-194.
- Hawksworth, D.(1992). Litmus tests for ecosystem health: the potential of bioindicators in the monitoring of biodiversity. Swaminathan MS, Jana WS (Eds.) *Biodiversity: Implications for global food security*: 184-204.
- Hawksworth, D; Iturriaga, T; Crespo A. (2005). Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos. *Revista Iberoamericana Micol* 22: 71-82.
- Instituto Nacional de Estadística (2010). [Página Web en línea]. Demografía y Vehículos en el Distrito Capital. Disponible: <http://www.ine.gov.ve> [Consulta: 2010, Junio 29].
- Jouraeva, V; Johnson, D; Hassett, J; Nowak, D. (2002). Differences in accumulation of PAHs and metals on the leaves of *Tiliaxeuchlora* and *Pyrus calleryana*. *Environmental Pollution* 120: 331-338.
- Kipopoulou, A; Manoil, E; Samara, C. (1999). Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environmental Pollution* 106: 369-380.
- Lawerys, R. (1994). Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. Versión española. Barcelona: Masson, S.A. 615 pp.
- Lehndorff, E; Schwark, L. (2004). Biomonitoring of air quality in the Cologne Conurbation using pine needles as a passive sampler—Part II: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Atmospheric Environment* 38: 3703-3808.



- Ley 34/2007 de calidad del aire y protección de la atmósfera. (2007, Noviembre 15). Boletín Oficial del Estado (España) número 275, Noviembre 16, 2007.
- Ley Orgánica del Ambiente (Resolución N° 046). (2007, Abril 17). Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela, 38.692, Mayo 28, 2007.
- Linsinger, T. (2008). Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution. *Trends in Analytical Chemistry* 27 (10): 916-923.
- Manahan, S. (2007). Introducción a la Química Ambiental. Primera edición. Barcelona: Editorial Reverté. 667 pp.
- Manrique, E. (1989). Aplicación de técnicas analíticas e interpretación de las variaciones químicas en líquenes. *Anales Jardín Botánico de Madrid* 46(1): 249-257.
- MARN-PDVSA., (2005). Informe de la calidad del aire en las principales ciudades de Venezuela (periodo enero- agosto). Dirección general de calidad ambiental.
- Martín, P. (2000). Estudio cinético de reacciones de interés atmosférico: reacciones del radical NO<sub>3</sub> con terpenos y cicloalquenos. España: Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha. 257 pp.
- Martínez, E.; Díaz, Y. (2004). Contaminación Atmosférica (Colección Ciencia y Técnica 45). Primera edición. España: Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha. 289 pp.
- Mason E. Hale. (1974). The Biology of Lichens. Segunda edición. Contemporary Biology. London. 180 pp.
- Migaszewski, Z; Galuszka, A; Paslawski, P. (2002). Polynuclear aromatic hydrocarbons, phenols, and trace metals in selected soil profiles and plant bioindicators in the Holy Cross Mountains, South - Central Poland. *Environment International* 28: 303-313.



- Ministerio del Poder Popular para la Comunicación e Información (2010). [Página web en línea]. Análisis de calidad del aire en Caracas arroja resultados positivos. Disponible en: [http://www.minci.gob.ve/noticias/1/196867/analisis\\_de\\_calidad.html](http://www.minci.gob.ve/noticias/1/196867/analisis_de_calidad.html) [Consulta: 2010, Marzo 7].
- Mochida I.; Song C.; Hsu, C. (2000). Chemistry of diesel fuels. Londres: Francis & Taylor. 297 pp.
- Montgomery, D.; Runger, G. (2007). Probabilidad y Estadística aplicadas a la ingeniería. Segunda edición. México: Editorial Limusa Wiley. 817 pp.
- Moreno, E.; Sánchez, A.; Hernández, J. (2007). Guía Ilustrada de Hongos Liqueenzados en Venezuela. Caracas: Ediciones del Departamento de Publicaciones de la Fundación Instituto Botánico de Venezuela. 94 pp.
- Motelay-Massei, A; Ollivon, D; Garban, B; Teil, M; Blanchard, M; Chevreuil, M. (2004). Distribution and spatial trends of PAHs and PCBs in soils in the Seine River basin, France. *Chemosphere* 55: 555-565.
- Nadal, M; Schuhmacher, M; Doming, J. (2007). Levels of metals, PCBs, PCNs and PAHs in soils of a highly industrialized chemical/petrochemical area: temporal trend. *Chemosphere* 66: 267-276.
- Navarro, A; Tauler, R; Lacorte, S; Barceló, D. (2006). Chemometrical investigation of the presence and distribution of organochlorine and polyaromatic compounds in sediments of the Ebro River Basin. *Analytical and Bioanalytical chemistry* 385: 1020-1030.
- Nisbet, I; Lagoy, P. (1992). Toxic equivalent factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 16: 290- 300.
- Observatorio ARVAL (2008). [Página Web en línea]. *Lluvia y temperatura en Venezuela*. Disponible: <http://www.oarval.org/PluvVNZ.htm> [Consulta: 2010, 15 Enero].
- Ollivon, D; Blanchoud, H; Motelay-Massei, A; Garban, B. (2002). Atmospheric deposition of PAHs to an urban site, Paris, France. *Atmospheric Environment* 36: 2891-2900.



- Orozco, C.; Pérez, A.; González, M.; Rodríguez, F.; Alfayate, J. (2004). Contaminación Ambiental (Una visión desde la Química). Primera edición. Madrid: Thomson Editores. 680 pp.
- Ortiz, R; Siebe, C; Díaz, G; Cram, S. (2007). Fuentes de hidrocarburos en suelos orgánicos. *Terra Latinoamericana* 25 (2): 105-113.
- Peltonen, K; Kuljukka, T. (1995). Air sampling and análisis of polycyclic aromatic hydrocarbons. Review. *Journal of Chromatography A* 710: 93-108.
- Pino, V; Ayala, J; Alfonso, A; González, V. (2002). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following micelle-mediated preconcentration. *Journal of Chromatography A* 949: 291-299.
- Plaza-Bolaños, P; Garrido, A; Martínez, J. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *Journal of Chromatography A* 1217: 6303-6326.
- Puckett, K; Finegan, E. (1980). An analysis of the element content of lichens from Northwest Territories, Canada. *Canadian Journal of Botany* 58: 2073-2089.
- Quijada, M. (2006). Líquenes como biomonitores de contaminación por metales pesados (Pb, Cu, Zn, Cd, Ni, V y Cr) en la ciudad de Caracas-Venezuela. Trabajo especial de grado, Licenciatura en Geoquímica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 91 pp.
- Rehwagen, M; Müller, A; Massolo, L; Herbarth, O; Ronco, A. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial area. *The Science of the Total Environment* 348: 199-210.
- Réquiz, M. (2006). Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos utilizando líquenes como bioacumuladores en estudios de contaminación atmosférica en el área de la Ciudad de Caracas. Trabajo especial de grado, Licenciatura en Química, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 85 pp.



- Salama, D. (2002). Estadística: Metodología y aplicaciones. Quinta edición. Caracas: Editorial Torino. 310 pp.
- Sarmiento, M. (2010, Marzo 24). Ni el Ávila se distingue por nube de humo sobre Caracas. *Últimas Noticias*, p. 3.
- Shukla, V; Upreti, D. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in lichen, *Phaeophyscia hispidula* of DehraDun City, Garhwal Himalayas. *Environ Monit Assess* DOI 10.1007/s10661-008-0225-6.
- Sipman, H. (2005). Key to wide-lobed parmelioid species occurring in tropical America (genera *Canomaculina*, *Parmotrema*, *Rimelia*, *Rimeliella*) [Documento en línea]. Disponible: <http://www.bgbm.org/sipman/keys/Neoparmo.htm> [Consulta: 2010, Febrero 20].
- Skoog, D.; Holler, F.; Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. Madrid: Mc Graw Hill. 1028 pp.
- Soriano, J; Vinas, L; Franco, M; González, J; Nguyen, M; Bayona, J; Albaigés, J. (2007). Spatial and temporal trends of polycyclic aromatic hydrocarbons in wild mussels from the Cantabrian coast (N Spain) after the Prestige oil spill. *Journal of Environmental Monitoring* 9: 1018-1023.
- Soudagar, S; Samant, S. (1995). Semiquantitative characterization of ultrasonic cleaner using a novel piezoelectric pressure intensity measurement probe. *Ultrasonic Sonochemistry* 2: 49-53.
- Suslick, K. (1988). Ultrasound. Its chemical, physical and biological effects. New York: VCH Publishers, Inc. 336 pp.
- Pignata, M.; Gozález, C.; Carreras, H.; Wannaz, E. (2008). Guía para el muestreo de líquenes y plantas epífitas que se emplean como biomonitores de acumulación de metales pesados y elementos traza en Latinoamérica. Proyecto ARCAL RLA 2013 04 Córdoba. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Física y Naturales, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal.



- Vareschi, V. (1953). La Influencia de los Bosques y Parques sobre el Aire de la Ciudad de Caracas. *Acta Científica Venezolana* Volumen 4, Número 3: 89-95.
- Vicéns, J; Herrarte, A; Medina, E. (2005). Análisis de la Varianza (ANOVA). Universidad Autónoma de Madrid. ISSN 1697-5731, Vol. 26, N° 1. 285-286.
- Vives, I; Grimalt, J; Guitart, R. (2001). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología* 3: 45-51.
- Wei, S; Karthikeyan, S; Balasubramanian, R. (2006). Health risk assessment of occupational exposure to particulate-phase polycyclic aromatic hydrocarbons associated with Chinese, Malay and Indian cooking. *Journal of Environmental Monitoring* 8: 369-376.
- Wonnacott, T.; Wonnacott, R. (2004). Introducción a la estadística. México D.F.: Editorial Limusa. 788 pp.
- Yamane, T. (1979). Estadística. Tercera edición. México D.F.: Harla S.A. 771 pp.
- Yunker, M; Macdonald, R; Vingarzan, R; Mitchell, H; Goyette, D; Sylvestre, S. (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33: 489-515.
- Zhang, X; Tao, S; Liu, W; Yang, Y; Zuo, Q; Liu, Z. (2005). Source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons based on species ratios: a multimedia approach. *Environmental Science & Technology* 39: 9109-9114.
- Zhou, J; Wang, T; Huang, Y ; Mao, T ; Zhong, N. (2005). Size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban and suburban sites of Beijing, China. *Chemosphere* 61: 792-799.



## 9. APÉNDICE

**Apéndice A.** Fórmula para el cálculo del número óptimo de muestras (N).

$$N = 1,96^2 \times \text{Varianza} / d^2$$

**Apéndice B.** Tabla con parámetros estadísticos empleados en el cálculo del N óptimo de muestreo.

HAP	Desviación estándar promedio	d máx	d mín	d promedio	N
Naftaleno	0,12	1,57	0,04	0,80	0,34
Acenaftileno	0,28	1,11	0,69	0,9	1,48
Acenafteno	0,90	2,02	0,46	1,24	8,09
Fluoreno	0,10	0,03	0,03	0,03	170,73
Fenantreno	0,05	0,22	0,01	0,12	2,90
Antraceno	0,04	0,03	0,01	0,02	61,46
Fluoranteno	0,26	0,59	0,06	0,32	9,83
Pireno	0,10	0,02	0,02	0,02	384,16
1.2 Benzo [a] antraceno	0,04	0,15	0,03	0,09	3,03
Criseno	0,06	0,35	0,27	0,31	0,57
Benzo [b] fluoranteno	0,08	0,59	0,04	0,32	0,99
Benzo [k] fluoranteno	0,16	0,79	0,04	0,42	2,28
Benzo [a] pireno	0,10	1,52	1,52	1,52	0,06
Dibenzo [a,h] antraceno	0,10	0,15	0,02	0,08	21,26
<b>Promedio</b>	0,17	0,65	0,23	0,44	<b>2,29</b>



**Apéndice C.** Temperaturas de fusión y de ebullición de 16 HAP (Tomado de Réquiz, 2006).

HAP	Temperatura de fusión (°C)	Temperatura de ebullición (°C)
<b>Bajo peso molecular</b>		
Naftaleno	80,2-82,5	218
Acenaftileno	92	270
Acenafteno	95	279
Fluoreno	117	294
Fenantreno	101	338
Antraceno	215,8	340
<b>Mediano peso molecular</b>		
Fluoranteno	111	380
Pireno	151,2	393
Benzo[a]antraceno	160	425
Criseno	255-256	431
<b>Alto peso molecular</b>		
Benzo[b]fluoranteno	168,3	481
Benzo[k]fluoranteno	215,7	480
Benzo[a]pireno	178	496
Dibenzo[ah]antraceno	266	535
Benzo[ghi]perileno	278,3	542
Indeno[1,2,3-cd]pireno	163,6	536



**Apéndice D 1.** Fotografías de uno de los especímenes de la especie *Parmotrema sancti-angelii* de la localidad Los Ruices para el 21 de diciembre del 2009 (A) y el 15 de abril del 2010 (B).



**A**



**B**



**Apéndice D 2.** Fotografías de uno de los especímenes del género *Usnea* sp. de la localidad de El Silencio para el 21 de diciembre del 2009 (A) y el 15 de abril del 2010 (B).



**A**



**B**



**Apéndice D 3.** Fotografías de uno de los especímenes de la especie *Parmotrema sancti-angelii* de la localidad de El Cafetal para el 21 de diciembre del 2009 (A) y el 15 de abril del 2010 (B).

**A**



**B**



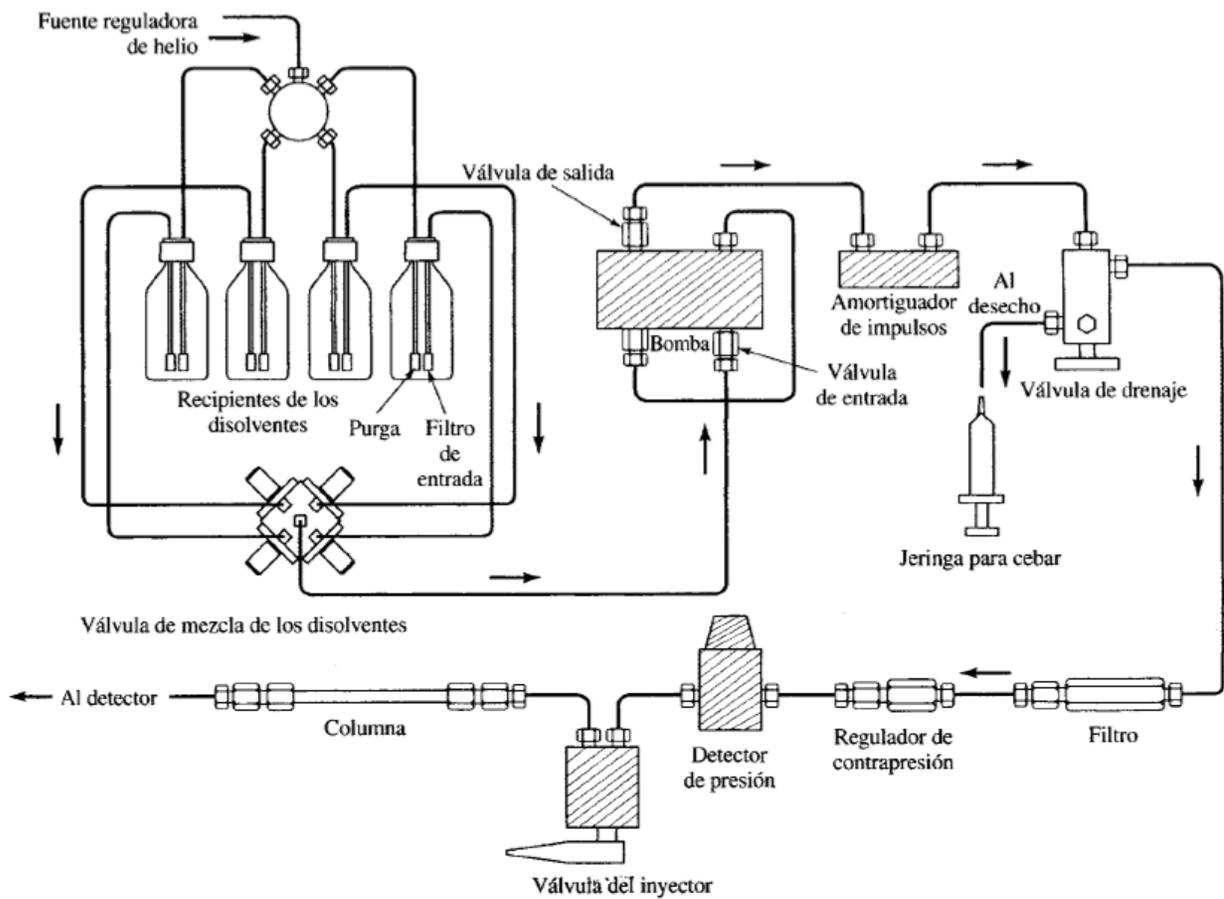


**Apéndice E 1.** Cromatógrafo líquido de alta eficiencia Hewlett Packard 1100.



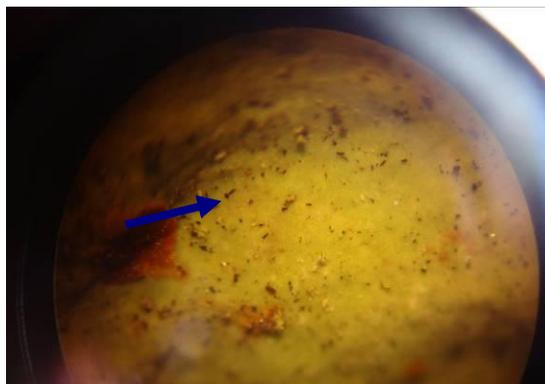
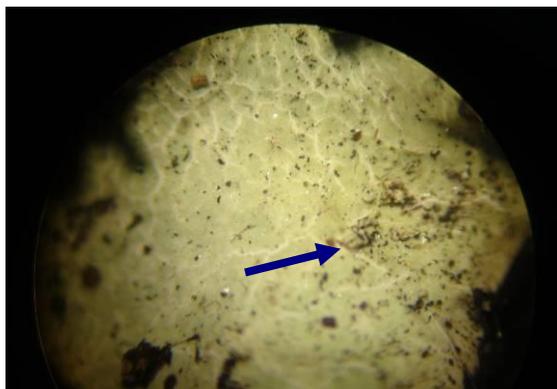


**Apéndice E 2.** Esquema de un aparato de HPLC (Tomado de Skoog *et al.*, 2001).

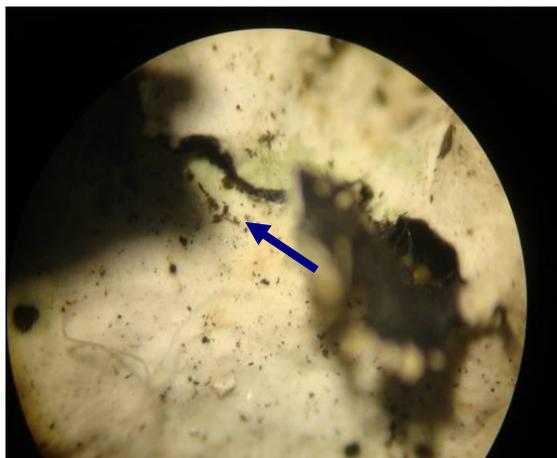




**Apéndice F.** Fotografías de los líquenes observados con la lupa binocular (aumento de 4X), en las cuales son señaladas algunas partículas de polvo adheridas.



**LCF: *Parmotrema sancti-angelii***



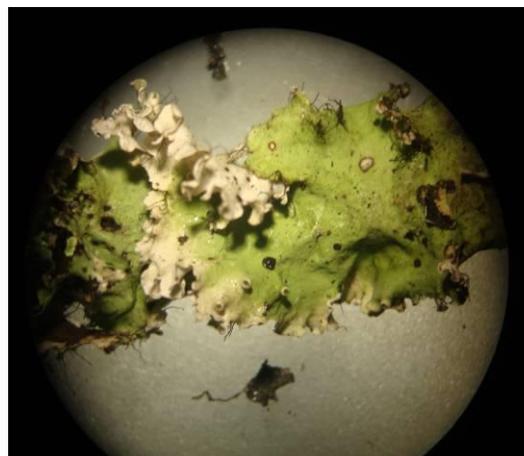
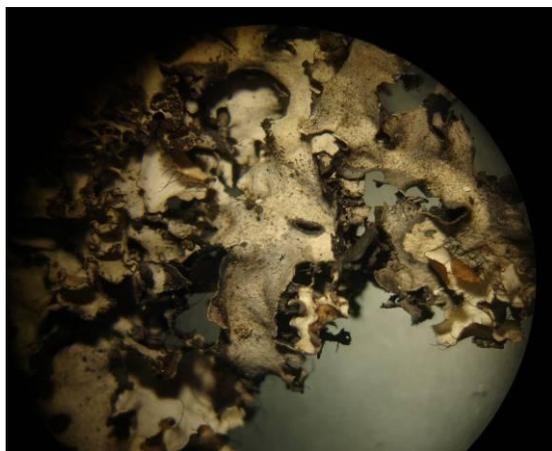
**LCF: *Parmotrema sancti-angelii***



**LSC: *Usnea sp.***



**Apéndice G.** Fotografía de los líquenes de las localidades LRC (izquierda) y LCF (derecha) observados con la lupa binocular (aumento de 0,67X).



**Apéndice H.** Masa de las alícuotas líquen extraído y cantidad de HAP añadidos en el enriquecimiento (optimización de la metodología de extracción y separación de los HAP).

Alícuota de prueba	Masa del líquen extraído( $\pm 0,0001g$ )	$C_s$ ( $\mu g/g$ )
B1 Hex	1,4052	
B2 Hex	1,4053	
B3 Hex	1,4058	
1 Hex	1,3001	6,92
2 Hex	1,4041	6,41
3 Hex	1,4045	6,41
B1 DCM	1,4045	
B2 DCM	1,4022	
B3 DCM	1,4021	
1 DCM	1,4023	6,42
2 DCM	1,4022	6,42
3 DCM	1,4031	6,41

$C_s$ = HAP añadidos en el enriquecimiento.



**Apéndice I.** Masa de líquen extraído, de extracto orgánico y de fracción aromática para cada submuestra, así como los porcentajes de extracto orgánico (% E.O.) y de fracción aromática (calculado con respecto a la masa de extracto orgánico).

Prueba de lavado

Submuestra	Masa de líquen ( $\pm 0,0001$ g)	Masa de E.O. ( $\pm 0,0001$ g)	Masa de fracción aromática ( $\pm 0,0001$ g)	% de E.O.	% de fracción aromática
LCM 1 (L)	2,0049	0,0170	0	0,8479	0
LCM 2 (L)	2,0089	0,0147	0,0002	0,7317	1,3605
LCM 3 (L)	1,9885	0,0154	0,0003	0,7744	1,9480
LCM 1 (NL)	2,0010	0,0165	0,0004	0,8246	2,4242
LCM 2 (NL)	2,0034	0,0221	0,0004	1,1031	1,8100
LCM 3 (NL)	2,0027	0,0193	0,0009	0,9637	4,6632

Comparación entre tipos de líquenes

Submuestra	Masa de líquen ( $\pm 0,0001$ g)	Masa de E.O. ( $\pm 0,0001$ g)	Masa de fracción aromática ( $\pm 0,0001$ g)	% de E.O.	% de fracción aromática
LUSB 1 (U)	2,0040	0,0285	0,0007	1,4222	2,4561
LUSB 2 (U)	2,0075	0,0286	0,0008	1,4246	2,7972
LUSB 3 (U)	2,0087	0,0273	0,0008	1,3591	2,9304
LUSB 1 (P)	2,0013	0,0169	0,0005	0,8444	2,9586
LUSB 2 (P)	2,0026	0,0210	0,0007	1,0486	3,3333
LUSB 3 (P)	2,0035	0,0192	0,0004	0,9583	2,0833



### Muestras

Submuestra	Masa de líquen ( $\pm 0,0001$ g)	Masa de E.O. ( $\pm 0,0001$ g)	Masa de fracción aromática ( $\pm 0,0001$ g)	% de E.O.	% de fracción aromática
LBC 1	2,0013	0,0232	0,0008	1,1592	3,4483
LBC 2	2,0032	0,0157	0,001	0,7837	6,3694
LBC 3	2,0030	0,0169	0,001	0,8437	5,9172
LRC 1	2,0018	0,0192	0,0007	0,9591	3,6458
LRC 2	2,0047	0,0216	0,0012	1,0775	5,5556
LRC 3	2,0071	0,0193	0,0009	0,9616	4,6632
LSC U1	2,0039	0,0337	0,0003	1,6817	0,8902
LSC U2	2,0067	0,0216	0	1,0764	0
LSC P1	2,0026	0,0254	0,0001	1,2684	0,3937
LSC P2	2,0025	0,023	0,0003	1,1486	1,3043
LSC P3	2,0049	0,0233	0,0001	1,1622	0,4292
LC5 1	2,0043	0,0183	0,0005	0,9130	2,7322
LC5 2	2,0070	0,0117	0,0008	0,5830	6,8376
LC5 3	2,0034	0,017	0,0006	0,8486	3,5294
LCF 1.1	2,0078	0,0248	0	1,2352	0
LCF 1.2	2,0020	0,0226	0,0008	1,1289	3,5398
LCF 1.3	2,0021	0,0301	0,0003	1,5034	0,9967
LCF 2.1	2,0073	0,0276	0,0002	1,3750	0,7246
LCF 2.2	2,0057	0,0307	0,0008	1,5306	2,6059
LCF 2.3	2,0010	0,0244	0,0004	1,2194	1,6393



**Apéndice J.** Resultados de la prueba U de Mann-Whitney aplicada para las réplicas lavada y no lavada de la muestra de El Cementerio, con nivel de significancia  $p < 0,05$ .

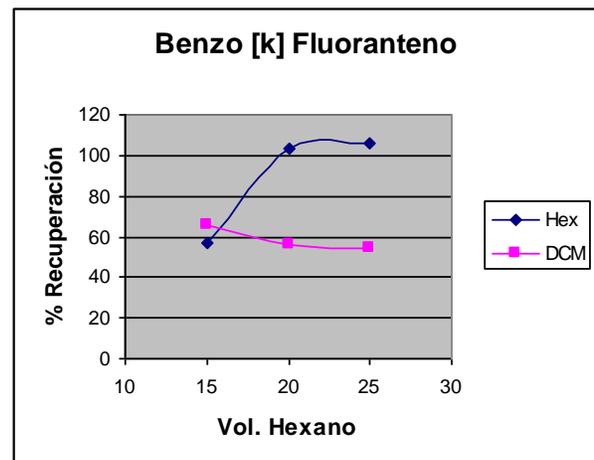
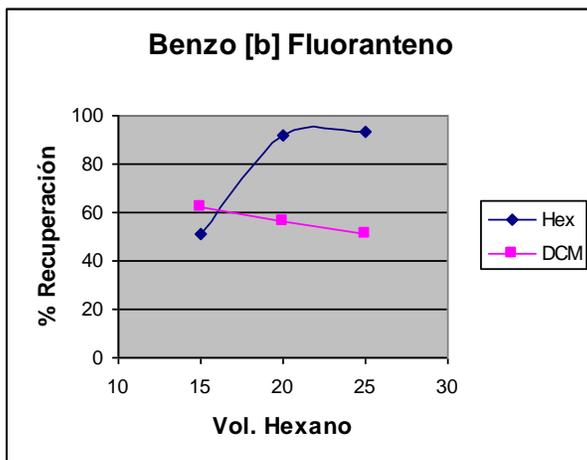
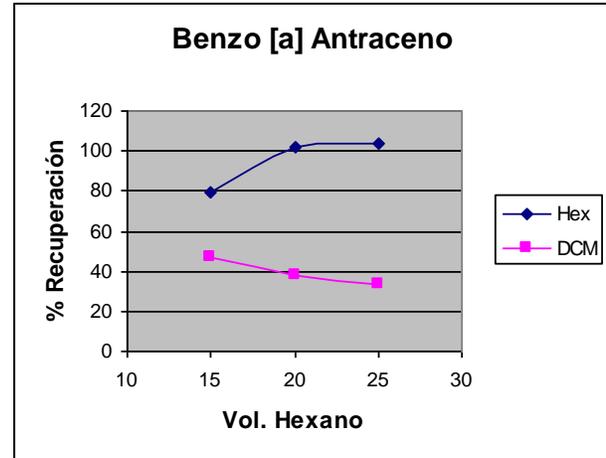
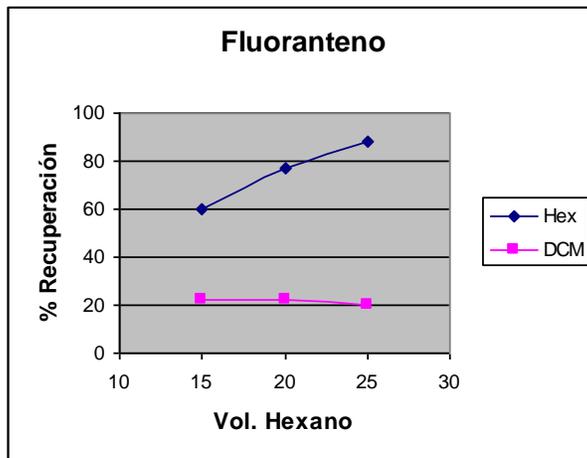
HAP	Rango de sumatoria LCM L	Rango de sumatoria LCM NL	U	Z	Nivel-p
Fenantreno	9,00	12,0	3,00	-0,654	0,513
Antraceno	8,50	12,5	2,50	-0,873	0,383
Pireno	8,00	13,0	2,00	-1,09	0,275
Criseno	9,00	12,0	3,00	-0,655	0,513
Benzo [b] Fluoranteno	8,00	13,0	2,00	-1,09	0,275
Benzo [k] Fluoranteno	10,0	11,0	4,00	-0,218	0,827
Dibenzo [a,h] Antraceno	8,00	13,0	2,00	-1,09	0,275
Indeno [1,2,3-cd] Pireno	6,00	15,0	0,00	-1,96	0,0500

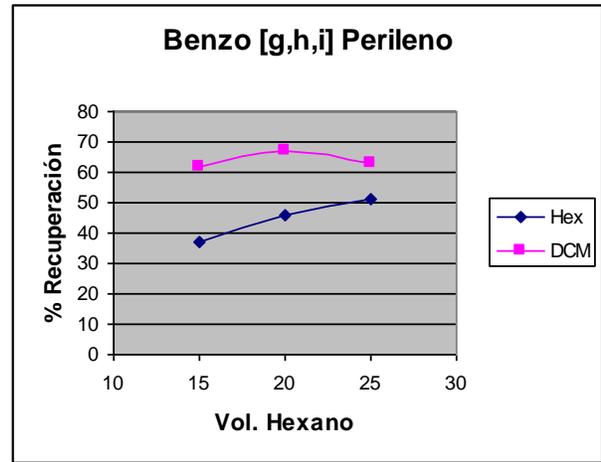
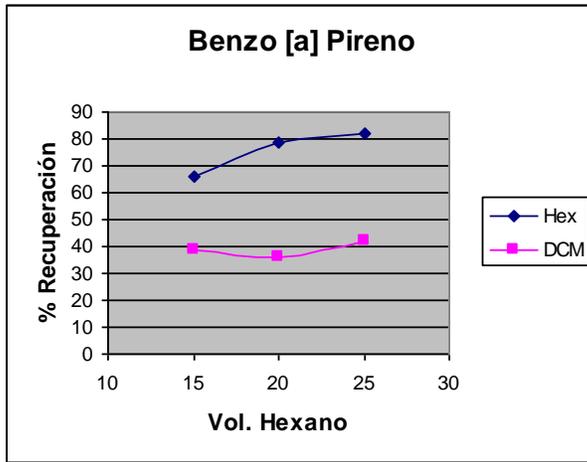
**Apéndice K 1.** Porcentajes de recuperación (%R) obtenidos para 13 HAP en la fase de optimización de la extracción y separación de la fracción aromática.

HAP	% R 1 HEX	%R 2 HEX	%R 3 HEX	%R 1 DCM	%R 2 DCM	%R 3 DCM
Acenaftileno	27	69	97	43	59	56
Fenantreno	-	19	40	-	-	-
Antraceno	-	27	19	-	-	-
Fluoranteno	60	77	88	22	22	20
Pireno	40	87	72	-	-	-
Criseno	8	9	1	-	-	-
Benzo [a] Antraceno	79	102	104	47	38	33
Benzo [b] Fluoranteno	51	92	93	62	56	51
Benzo [k] Fluoranteno	57	103	106	66	56	54
Benzo [a] Pireno	66	79	82	39	36	42
Dibenzo [a,h] Antraceno	43	91	98	-	43	-
Benzo [g,h,i] Perileno	37	46	51	62	67	63
Indeno [1,2,3-cd] Pireno	54	103	110	-	-	-
<b>Vol. de hexano empleado en la elución de saturados.</b>	<b>15 mL</b>	<b>20 mL</b>	<b>25 mL</b>	<b>15 mL</b>	<b>20 mL</b>	<b>25 mL</b>



**Apéndice K 2.** Gráficos de dispersión de los % de recuperación para 6 HAP de acuerdo al volumen de hexano empleado en la separación de la fracción saturada de la aromática y al solvente empleado en la extracción.



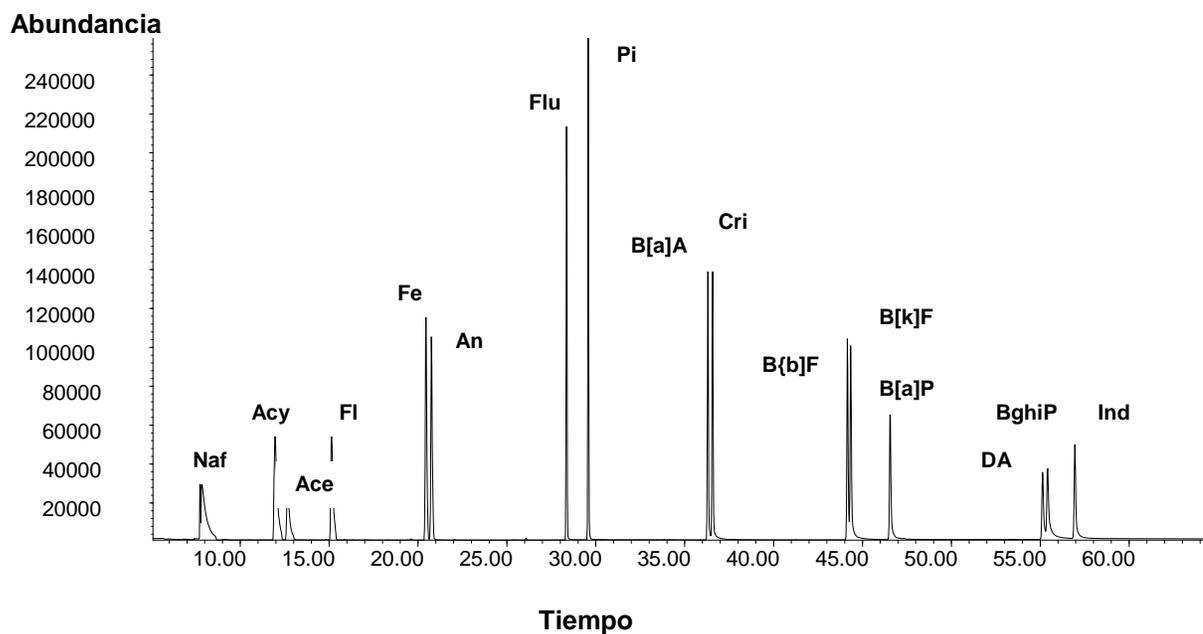


**Apéndice L.** Resultados del análisis de recuperación de los HAP obtenidos con ambas técnicas de extracción.

HAP	% R extracción estática con ultrasonidos	% R extracción Soxhlet
Naftaleno	19	2
Acenaftileno	-	1
Acenafteno	1	1
Fluoreno	-	10
Fenantreno	19	32
Antraceno	22	17
Fluoranteno	45	47
Pireno	46	35
Benzo[a]Antraceno	50	42
Criseno	50	50
Benzo[b]Fluoranteno	53	50
Benzo[k]Fluoranteno	50	46
Benzo[a]Pireno	49	25
Dibenzo[a,h]Antraceno	63	-
Benzo[g,h,i]Perileno	70	3
Indeno[1,2,3-cd]pireno	56	27



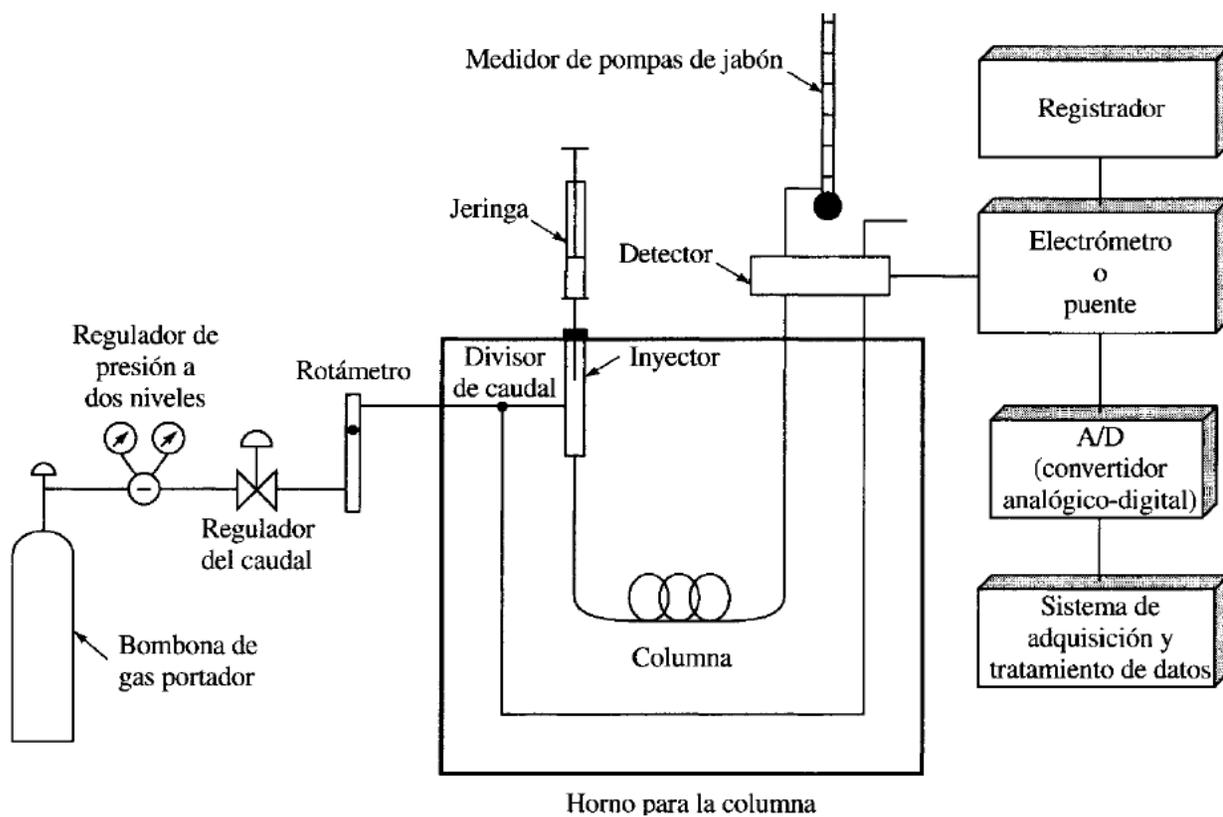
**Apéndice M.** Cromatograma de gases para el estándar 2,18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y los iones moleculares característicos ( $m/z$ ) para cada HAP identificado.



Naftaleno [128], acenaftileno [152], acenafteno [152], fluoreno [166], fenantreno [178], antraceno [178], fluoranteno [202], pireno [202], benzo[a]antraceno [228], criseno [228], benzo[b]fluoranteno [252], benzo[k]fluoranteno [252], benzo[a]pireno [252], dibenzo [a,h]antraceno [276], benzo [g,h,i]perileno [278] e indeno[1,2,3-cd]pireno [276].

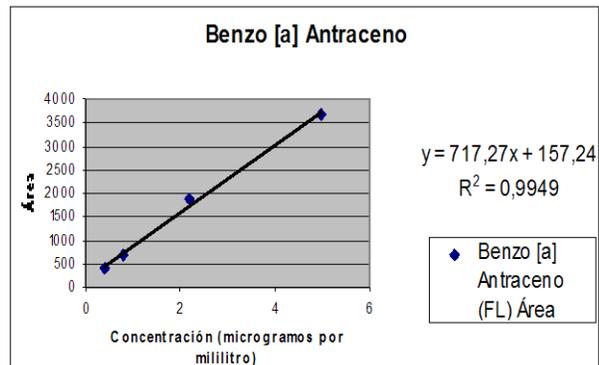
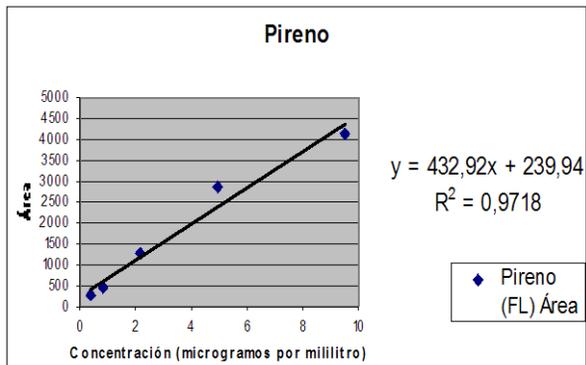
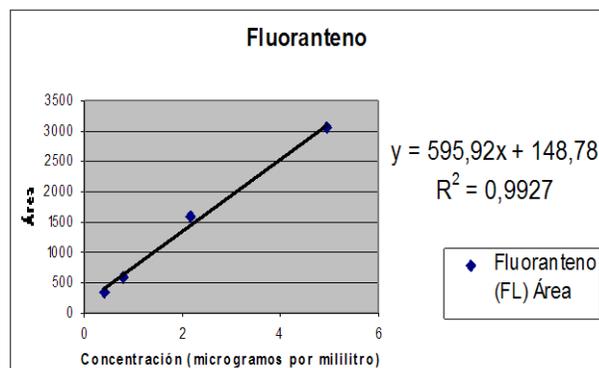
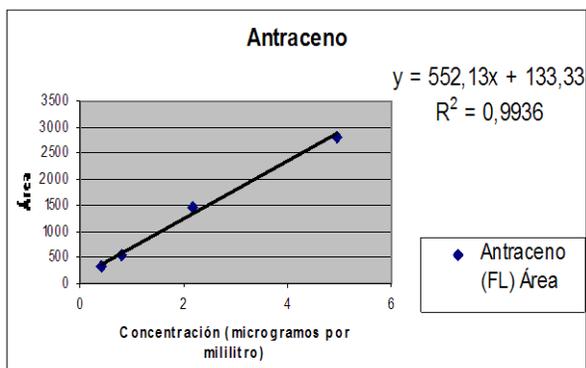
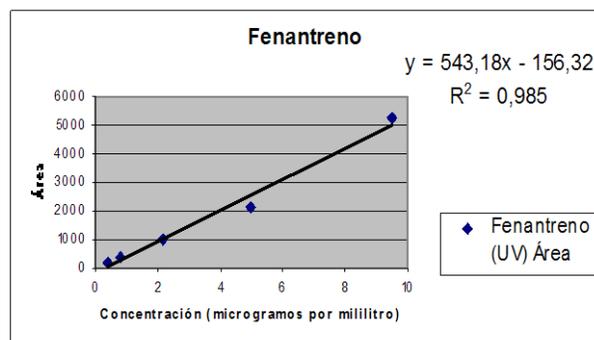
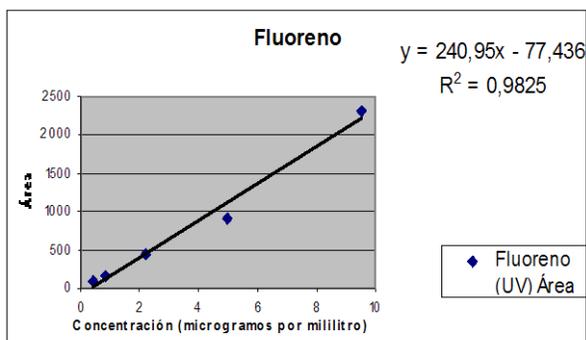
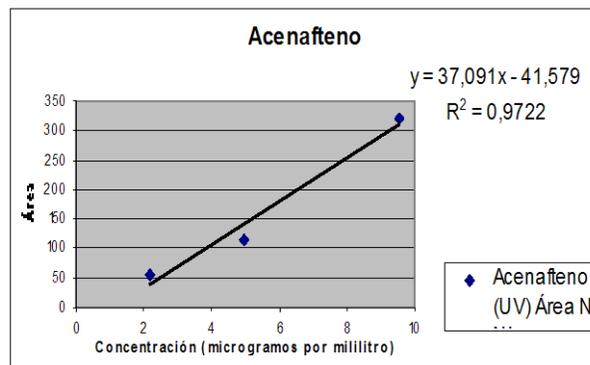
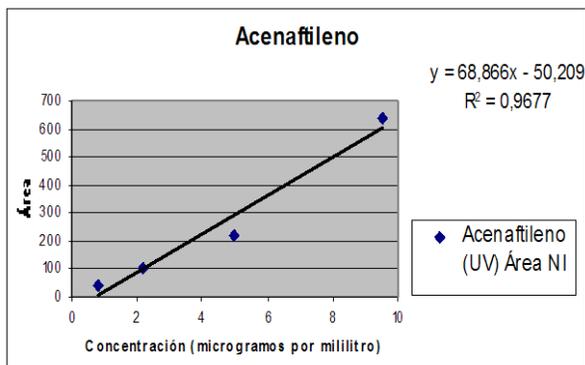


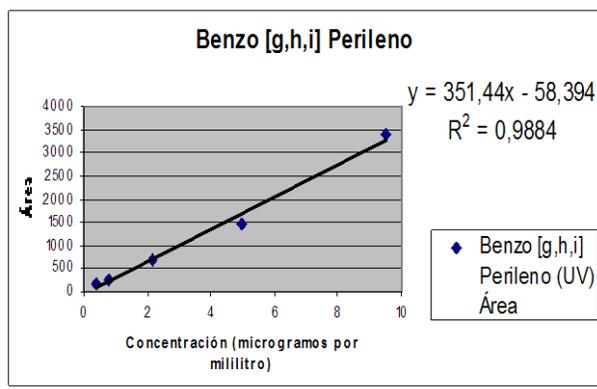
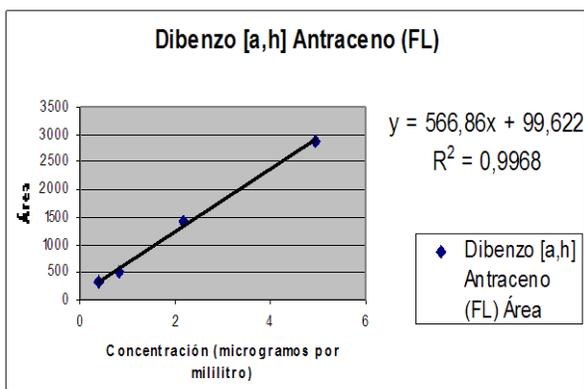
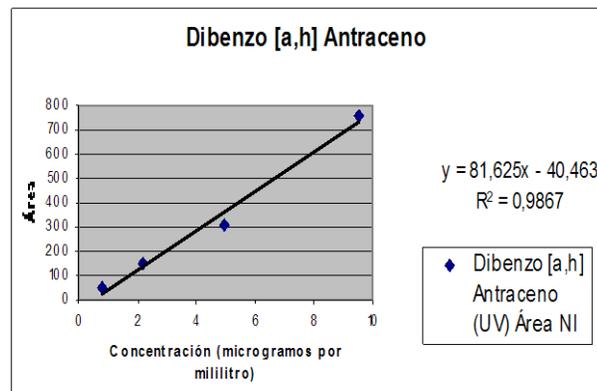
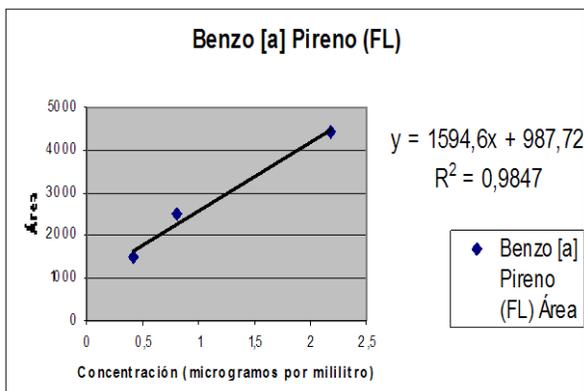
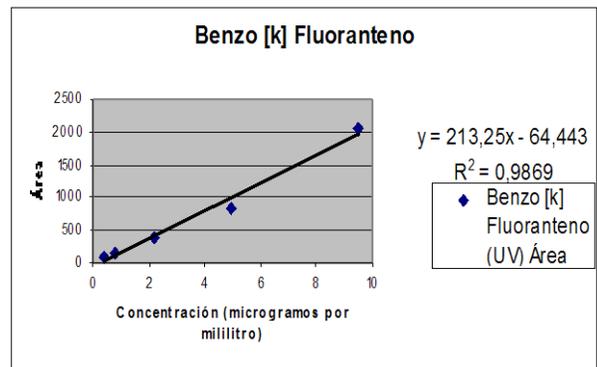
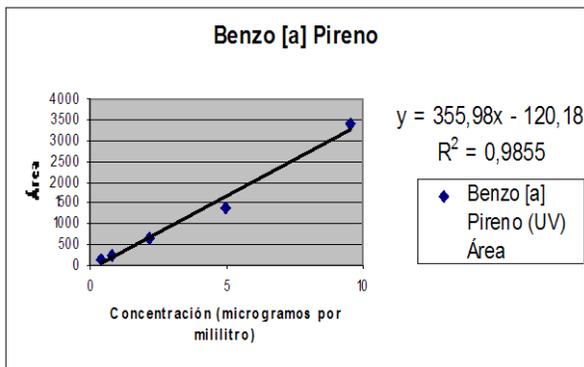
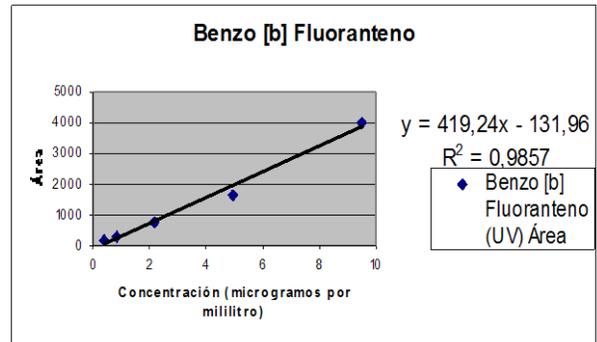
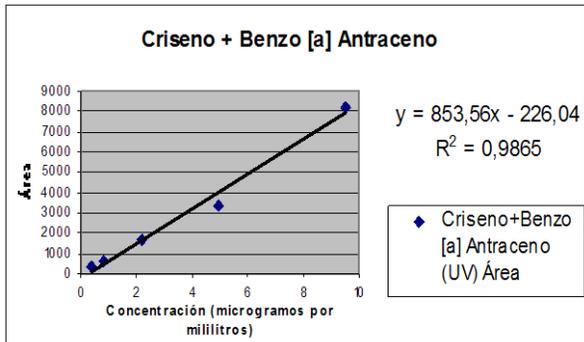
**Apéndice N.** Esquema de un aparato de CG (Tomado de Skoog *et al.*, 2001)

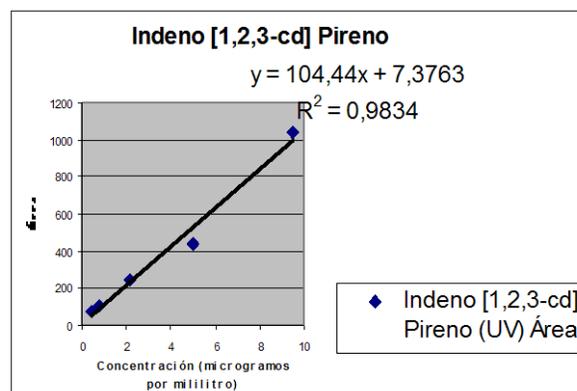
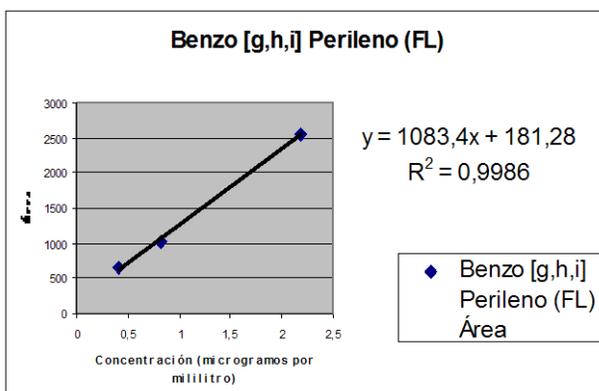




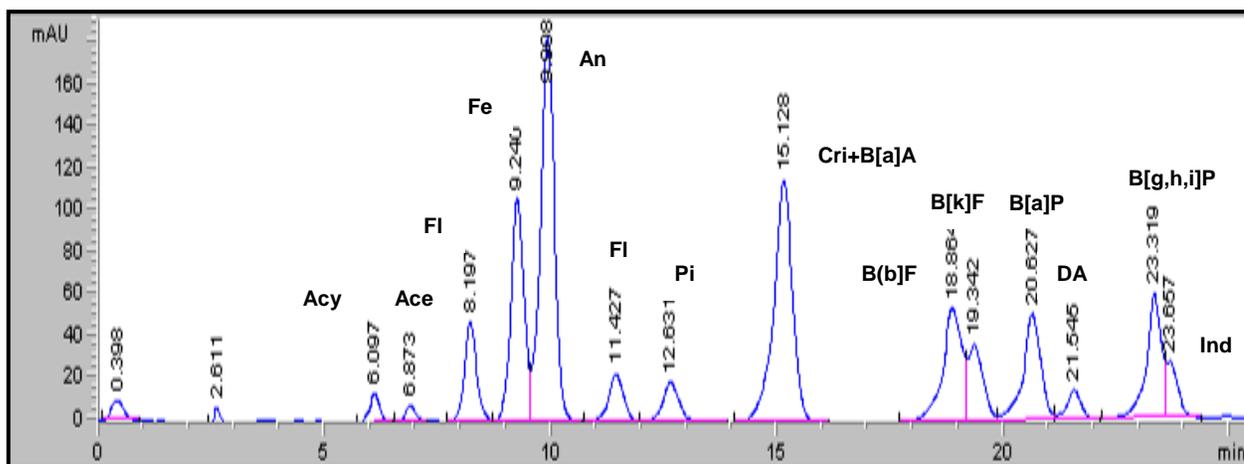
### Apéndice N. Curvas de calibración realizadas para cada HAP por HPLC (UV y FL).







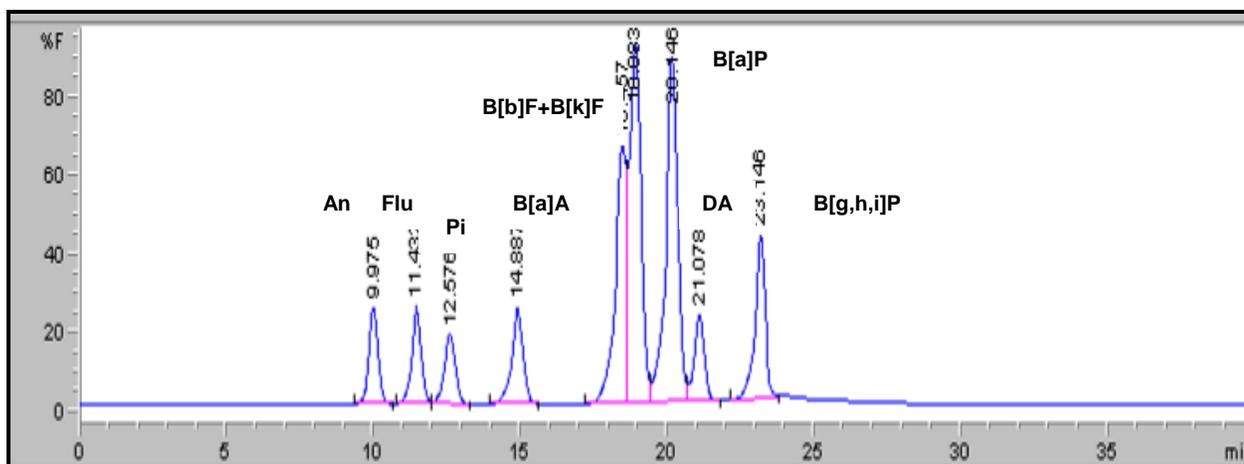
**Apéndice O 1.** Cromatograma líquido de alta eficiencia para el estándar de 4,96 µg/mL (detector UV, 254 nm).



Acenaftileno (Acy), acenafteno (Ace), fluoreno (FI), fenantreno (Fe), antraceno (An), fluoranteno (Flu), pireno (Pi), criseno + benzo[a]antraceno (Cri+B[a]A), benzo[b]fluoranteno (B[b]F), benzo[k]fluoranteno (B[k]F), benzo[a]pireno (B[a]P), dibenzo [a,h]antraceno (DA), benzo [g,h,i]perileno (B[g,h,i]P) e indeno[1,2,3-cd]pireno (Ind).



**Apéndice O 2.** Cromatograma líquido de alta eficiencia para el estándar de 0,812  $\mu\text{g/mL}$  (detector FL,  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emi}} = 340/425 \text{ nm}$ ).



Antraceno (An), fluoranteno (Flu), pireno (Pi), benzo[a]antraceno (B[a]A), benzo[b]fluoranteno + benzo[k]fluoranteno (B[b]F+B[k]F), benzo[a]pireno (B[a]P), dibenzo [a,h]antraceno (DA), benzo [g,h,i]perileno (B[g,h,i]P).



Evaluación de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos,  
empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* y aplicando un muestreo de tipo activo  
en la ciudad de Caracas



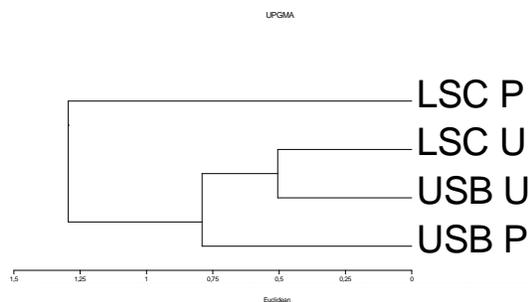
**Apéndice P 1.** Concentración de los HAP ( $\mu\text{g/g}$ ) para los líquenes *Parmotrema sancti angelii* (P) y *Usnea sp.* (U) estudiados.

HAP	USB P1 (R)	USB P2 (R)	USB P3 (R)	USB U1 (R)	USB U2 (R)	USB U3 (R)	LSC P1	LSC P2	LSC P3	LSC U1	LSC U2
Acenaftileno	0,558	0,525	0,324	0,361	ND	ND	0,306	0,285	0,297	0,407	0,274
Fenantreno	0,687	0,621	0,288	0,348	0,219	0,178	0,239	0,274	0,249	0,460	0,290
Antraceno	0,791	0,711	0,260	0,316	0,136	0,079	0,154	0,204	0,170	0,453	0,232
Pireno	0,625	0,528	0,158	0,225	0,045	ND	0,139	0,156	0,130	0,377	0,146
Criseno	0,409	0,416	0,190	0,176	0,125	0,108	0,168	0,183	0,169	0,266	0,176
Benzo [b] Fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,114	0,132	0,120	0,114	0,105
Benzo [k] Fluoranteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,162	0,307	0,247	0,176	< LOQ
Dibenzo [a,h] Antraceno	0,709	0,800	0,191	0,253	0,096	0,067	0,102	0,088	0,094	0,255	0,121
Benzo [g,h,i] Perileno	ND	ND	ND	0,088	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Indeno [1,2,3-cd] Pireno	0,398	0,496	0,633	ND	ND	ND	0,768	2,05	1,51	0,323	0,338
<b>HAP Tot</b>	4,18	4,10	2,04	1,77	0,62	0,43	2,15	3,68	2,98	2,83	1,68

ND = no detectado



**Apéndice P 2.** Análisis de cluster para las cuatro muestras del estudio comparativo entre *P. sancti-angelii*. y *Usnea sp.*



**Apéndice Q.** Resultados del ANOVA (Prueba de Duncan) aplicado en la comparación de los dos tipos de líquenes, con un nivel de significancia  $p < 0,05$ .

Acenaftileno

Error: entre MS = 0,018505, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R) {1}		0,0277	0,200	0,318
USBU(R) {2}	0,0277		0,185	0,116
LSC P {3}	0,200	0,185		0,704
LSC U {4}	0,318	0,116	0,704	

Fenantreno

Error: entre MS = 0,017426, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R) {1}		0,0522	0,0507	0,209
USBU(R) {2}	0,0522		0,978	0,327
LSC P {3}	0,0507	0,978		0,323
LSC U {4}	0,209	0,327	0,323	

Antraceno

Error: entre MS = 0,031419, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R) {1}		0,0383	0,0389	0,152
USBU(R) {2}	0,0383		0,967	0,332
LSC P {3}	0,0389	0,967		0,330
LSC U {4}	0,1523	0,332	0,330	

Pireno

Error: entre MS = 0,025086, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R) {1}		0,0472	0,0788	0,239
USBU(R) {2}	0,0472		0,692	0,263
LSC P {3}	0,0788	0,692		0,423
LSC U {4}	0,239	0,263	0,423	



Criseno

Error: entre MS = 0,005705, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R) {1}		0,0222	0,0442	0,109
USBU(R) {2}	0,0222		0,593	0,260
LSC P {3}	0,0442	0,593		0,499
LSC U {4}	0,109	0,260	0,499	

Benzo [b] Fluoranteno

Error: entre MS = 0,000036, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R) {1}			0,000114	0,000244
USBU(R) {2}			0,000084	0,000114
LSC P {3}	0,000114	0,000084		0,0232
LSC U {4}	0,000244	0,000114	0,0232	

Benzo (k) Fluoranteno

Error: entre MS = 0,003943, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R)			0,00388	0,142
USBU(R)			0,00433	0,155
LSC P {3}	0,00388	0,00433		0,028
LSC U {4}	0,142	0,155	0,0283	

Dibenzo [a,h] Antraceno

Error: entre MS = 0,034855, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R) {1}		0,0388	0,0283	0,0504
USBU(R) {2}	0,0388		0,781	0,789
LSC P {3}	0,0283	0,781		0,602
LSC U {4}	0,0504	0,789	0,602	

Benzo [g,h,i] Perileno

Error: entre MS = 0,000771, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R) {1}		0,276		
USBU(R) {2}	0,276		0,269	0,252
LSC P {3}		0,269		
LSC U {4}		0,252		

Indeno [1,2,3-cd] Pireno

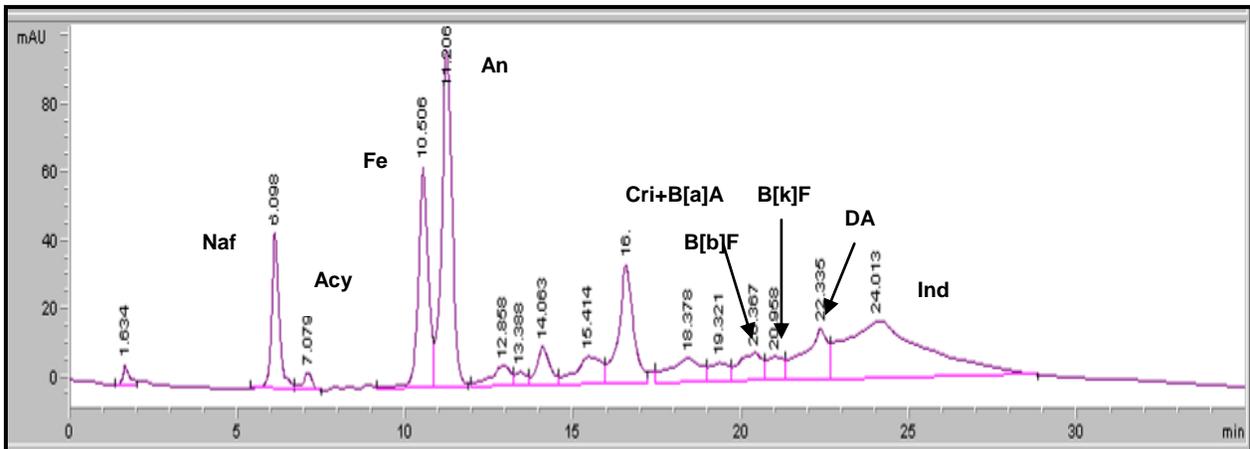
Error: entre MS = 0,121810, df = 7

Muestra	{1}	{2}	{3}	{4}
USBP(R) {1}		0,148	0,0178	0,570
USBU(R) {2}	0,148		0,00286	0,311
LSC P {3}	0,0178	0,00286		0,00949
LSC U {4}	0,570	0,311	0,00949	



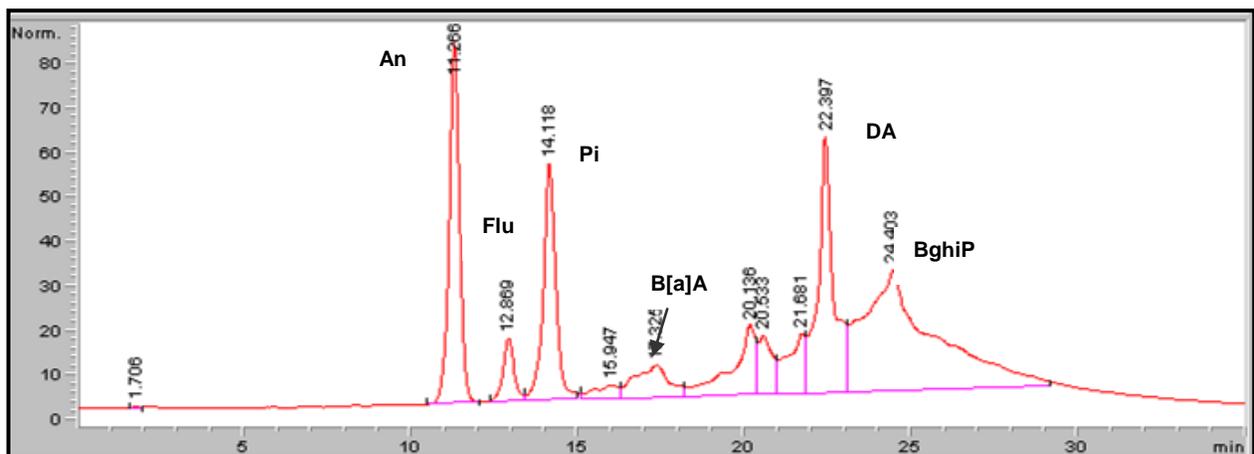
## Apéndice R. Ejemplos de cromatogramas obtenidos para ambos tipos de líquenes.

### LCF 2.2 UV (*Parmotrema sancti angelii*)



Naftaleno (Naf), acenaftileno (Acy), fenantreno (Fe), antraceno (An), criseno + benzo[a]antraceno (Cri+B[a]A), benzo[b]fluoranteno (B[b]F), benzo[k]fluoranteno (B[k]F), dibenzo[a,h]antraceno (DA), indeno[1,2,3-cd]pireno (Ind).

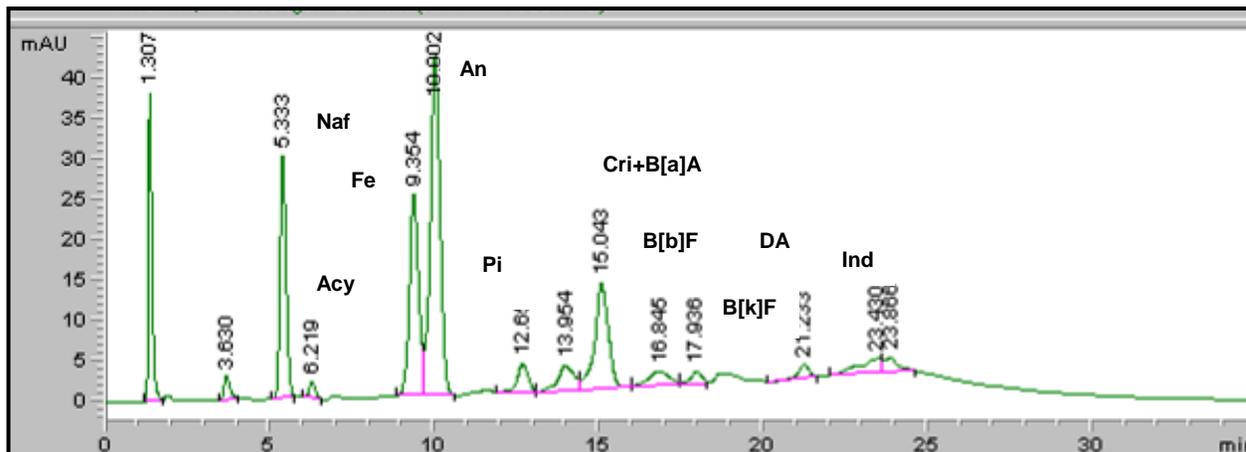
### LCF 2.2 FL (*Parmotrema sancti angelii*)



Antraceno (An), fluoranteno (Flu), pireno (Pi), benzo[a]antraceno (B[a]A), dibenzo[a,h]antraceno (DA) benzo[g,h,i]perileno (BghiP).

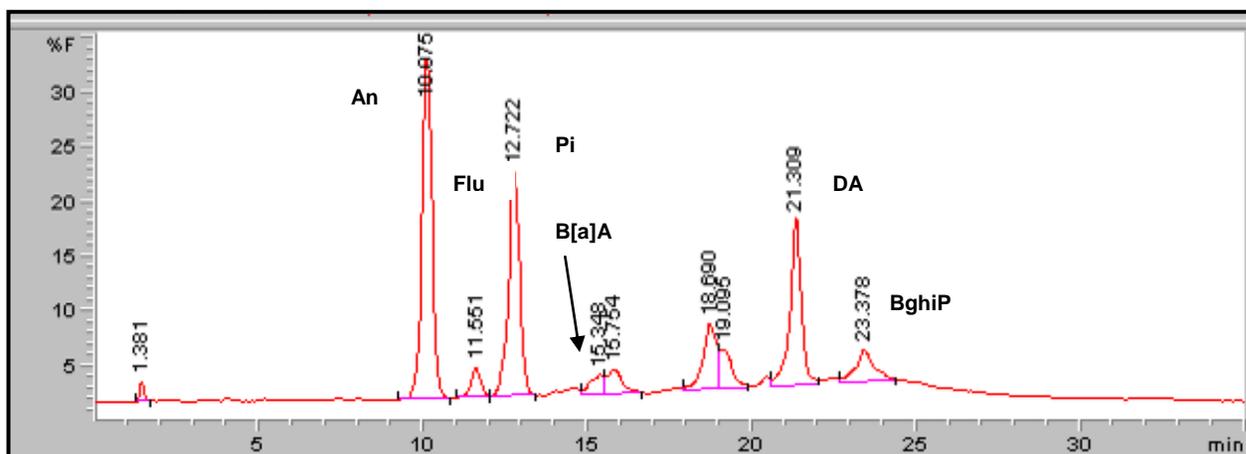


### LSC U2 UV (*Usnea sp*)



Naftaleno (Naf), acenaftileno (Acy), fenantreno (Fe), antraceno (An), pireno (Pi), criseno + benzo[a]antraceno (Cri+B[a]A), benzo[b]fluoranteno (B[b]F), benzo[k]fluoranteno (B[k]F), dibenzo[a,h]antraceno (DA) e indeno [1,2,3-cd]pireno (Ind).

### LSC U2 FL (*Usnea sp*)



Antraceno (An), fluoranteno (Flu), pireno (Pi), benzo[a]antraceno (B[a]A), dibenzo[a,h]antraceno (DA) y benzo[g,h,i]perileno (BghiP).



**Apéndice S 1.** Concentración de los HAP ( $\mu\text{g/g}$ ) cuantificados en las muestras de *Parmotrema sancti-angelii*.

Muestra	HAP						
	Acenaftileno	Fenantreno	Antraceno	Fluoranteno	Pireno	Criseno	Benzo [a] Antraceno
USB P1 (R)	0,558	0,687	0,791	ND	0,625	0,409	ND
USB P2 (R)	0,525	0,621	0,711	ND	0,528	0,416	ND
USB P3 (R)	0,324	0,288	0,260	ND	0,158	0,190	ND
LCF 1.1	0,628	0,794	0,813	ND	0,663	0,377	0,005
LCF 1.2	0,301	0,240	0,156	ND	0,130	0,182	0,007
LCF 1.3	ND	0,215	0,134	0,015	0,132	0,114	0,044
LCF 2.1	0,535	0,266	0,196	ND	0,178	0,163	0,042
LCF 2.2	0,524	0,686	0,713	0,081	0,647	0,251	0,127
LCF 2.3	ND	0,119	ND	0,030	ND	0,073	0,091
LBC 1	0,315	0,296	0,243	ND	0,157	0,165	ND
LBC 2	0,354	0,366	0,332	ND	0,213	0,194	ND
LBC 3	0,346	0,370	0,336	ND	0,225	0,195	ND
LC5 1	ND	0,241	0,150	ND	0,075	0,142	ND
LC5 2	0,285	0,358	0,342	ND	0,228	0,199	ND
LC5 3	ND	0,219	0,139	ND	0,062	0,134	ND
LRC 1	ND	0,206	0,125	ND	0,047	0,130	ND
LRC 2	0,304	0,338	0,296	ND	0,195	0,186	ND
LRC 3	ND	0,274	0,204	ND	0,129	0,155	ND
LSC P1	0,306	0,239	0,154	ND	0,139	0,168	ND
LSC P2	0,285	0,274	0,204	ND	0,156	0,183	ND
LSC P3	0,297	0,249	0,170	ND	0,130	0,169	ND
LCM 1	ND	0,128	0,010	ND	ND	0,092	ND
LCM 2	ND	0,316	0,246	ND	0,184	0,175	ND
LCM 3	ND	0,342	0,268	ND	0,199	0,207	ND

ND = no detectado



Evaluación de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos,  
empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* y aplicando un muestreo de tipo activo  
en la ciudad de Caracas

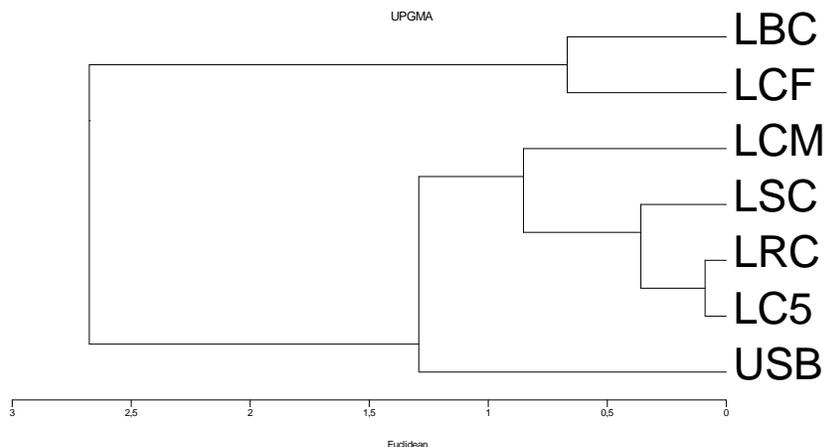


Muestra	HAP					
	Benzo [b] Fluoranteno	Benzo [k] Fluoranteno	Benzo [a] Pireno	Dibenzo [a,h] Antraceno	Benzo [g,h,i] Perileno	Indeno [1,2,3- cd] Pireno
USB P1 (R)	ND	ND	ND	0,709	ND	0,398
USB P2 (R)	ND	ND	ND	0,800	ND	0,496
USB P3 (R)	ND	ND	ND	0,191	ND	0,633
LCF 1.1	0,121	0,275	0,156	0,449	0,107	1,74
LCF 1.2	0,135	0,340	0,187	0,091	0,059	2,31
LCF 1.3	ND	0,165	ND	0,217	0,307	ND
LCF 2.1	0,175	0,434	0,224	0,318	0,345	3,33
LCF 2.2	0,206	0,532	ND	0,771	0,873	6,76
LCF 2.3	0,234	0,625	ND	0,305	0,902	6,69
LBC 1	0,114	0,236	ND	0,306	0,298	4,94
LBC 2	ND	0,186	ND	0,270	0,092	3,74
LBC 3	ND	ND	ND	0,280	0,076	2,27
LC5 1	0,155	ND	0,144	0,117	0,019	0,682
LC5 2	ND	ND	ND	0,250	ND	1,5
LC5 3	ND	0,110	ND	0,106	ND	1,71
LRC 1	ND	ND	ND	0,093	ND	1,46
LRC 2	ND	ND	ND	0,161	ND	1,39
LRC 3	ND	ND	ND	0,193	0,069	0,957
LSC P1	0,114	0,162	ND	0,102	ND	0,768
LSC P2	0,132	0,307	ND	0,088	ND	2,05
LSC P3	0,12	0,247	ND	0,094	ND	1,51
LCM 1	ND	ND	ND	0,316	ND	1,44
LCM 2	0,110	ND	ND	0,609	ND	1,57
LCM 3	0,148	0,247	ND	0,996	ND	2,94

**Nota:** El naftaleno, aunque no fue cuantificado, fue detectado en todas las muestra.



## Apéndice S 2. Análisis de cluster para las localidades de estudio.



## Apéndice T. Ejemplo del cálculo de la concentración de HAP en $\mu\text{g/g}$ de líquen.

Compuesto	Fenantreno
Peso de líquen extraído	2,0040 g
Señal de área obtenida	1361,2
Volumen final de dilución	0,4920 mL
Ecuación de la recta	$y = 543,18x - 156,32$

A partir de la ecuación de la recta y con el valor de la señal obtenida; donde “y” es el valor de la señal en área y “x”, la concentración en  $\mu\text{g/mL}$ ; se despeja el valor de “x”, quedando:

$$X = \frac{y + 156,32}{543,18}$$

Es sustituido el valor de la señal obtenida, 1361,2.

$$X = 2,7938 \mu\text{g/mL.}$$

A 0,4920 ml de volumen final de dilución.



$$2,7938 \mu\text{g/mL} \times 0,4920 \text{ mL} = 1,3745 \mu\text{g}.$$

Entre el peso del líquen extraído.

$$\frac{1,3745 \mu\text{g}}{2,0040 \text{ g}} = 0,6859 \mu\text{g/g}.$$

Entre las réplicas del tratamiento químico o submuestras fue calculada la media y la desviación estándar.

$$\text{Media: } X = \frac{\sum X_i}{N}; \text{ Desviación estándar: } S = \frac{\sqrt{\sum (\bar{X} - X_i)^2}}{N}$$

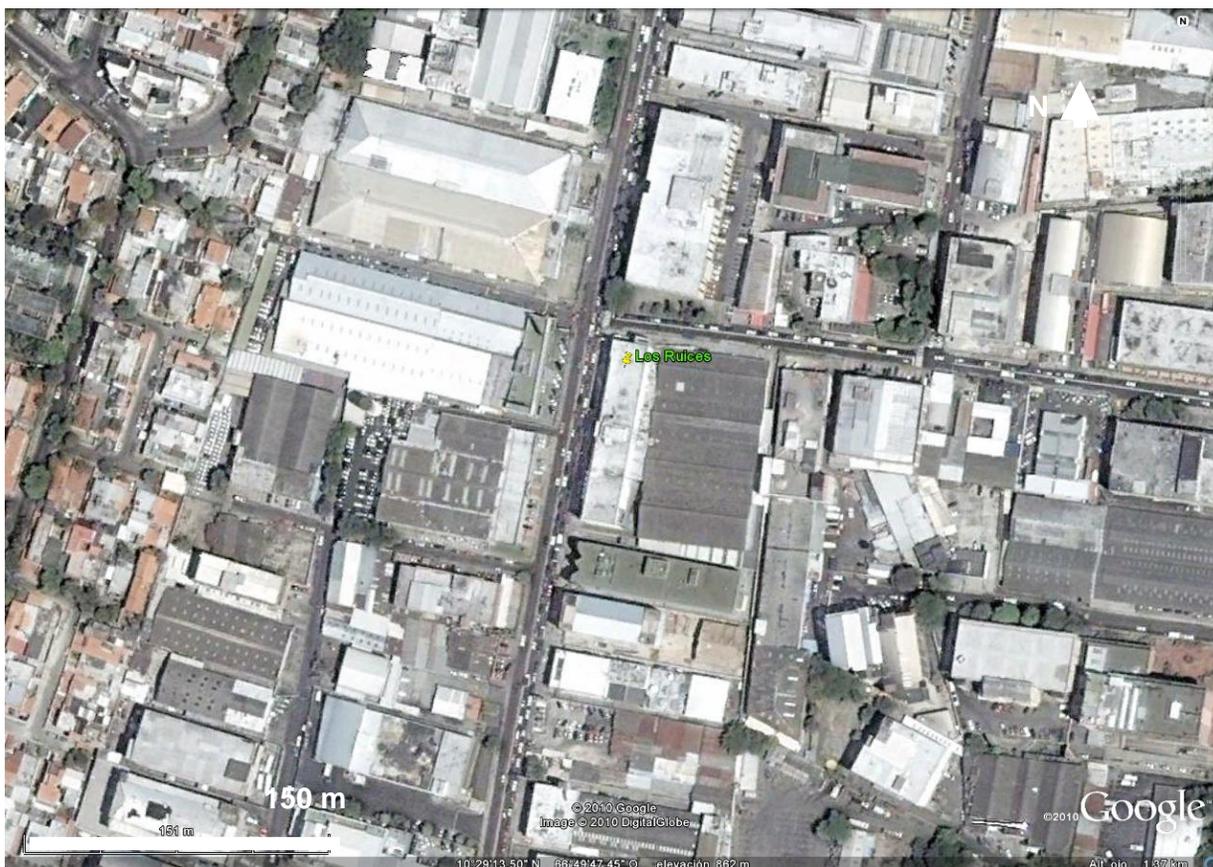
#### Apéndice U. Concentración total de HAP y toxicidad equivalente por localidad.

Localidad	HAP Tot. $\pm$ Desv. Est. ( $\mu\text{g/g}$ )	HAP <sup>comb</sup> $\pm$ Desv. Est. ( $\mu\text{g/g}$ )	TEQ $\pm$ Desv. Est. ( $\mu\text{g/g}$ )
USB P (R)	3,44 $\pm$ 1,21	1,85 $\pm$ 0,59	2,89 $\pm$ 1,64
LBC	5,64 $\pm$ 1,49	4,65 $\pm$ 1,59	1,82 $\pm$ 0,22
LC5	2,46 $\pm$ 0,72	1,88 $\pm$ 0,47	0,98 $\pm$ 0,37
LRC	2,30 $\pm$ 0,49	1,72 $\pm$ 0,21	0,88 $\pm$ 0,23
LSC	2,94 $\pm$ 0,76	2,21 $\pm$ 0,73	0,66 $\pm$ 0,04
LCF	6,47 $\pm$ 3,80	5,40 $\pm$ 3,55	2,25 $\pm$ 1,36
LCM	3,51 $\pm$ 1,70	3,07 $\pm$ 1,49	3,42 $\pm$ 1,80



**Apéndice V.** Fotografías satelitales de las localidades de estudio tomadas de *Google Earth*.

Los Ruices





## Bello Campo



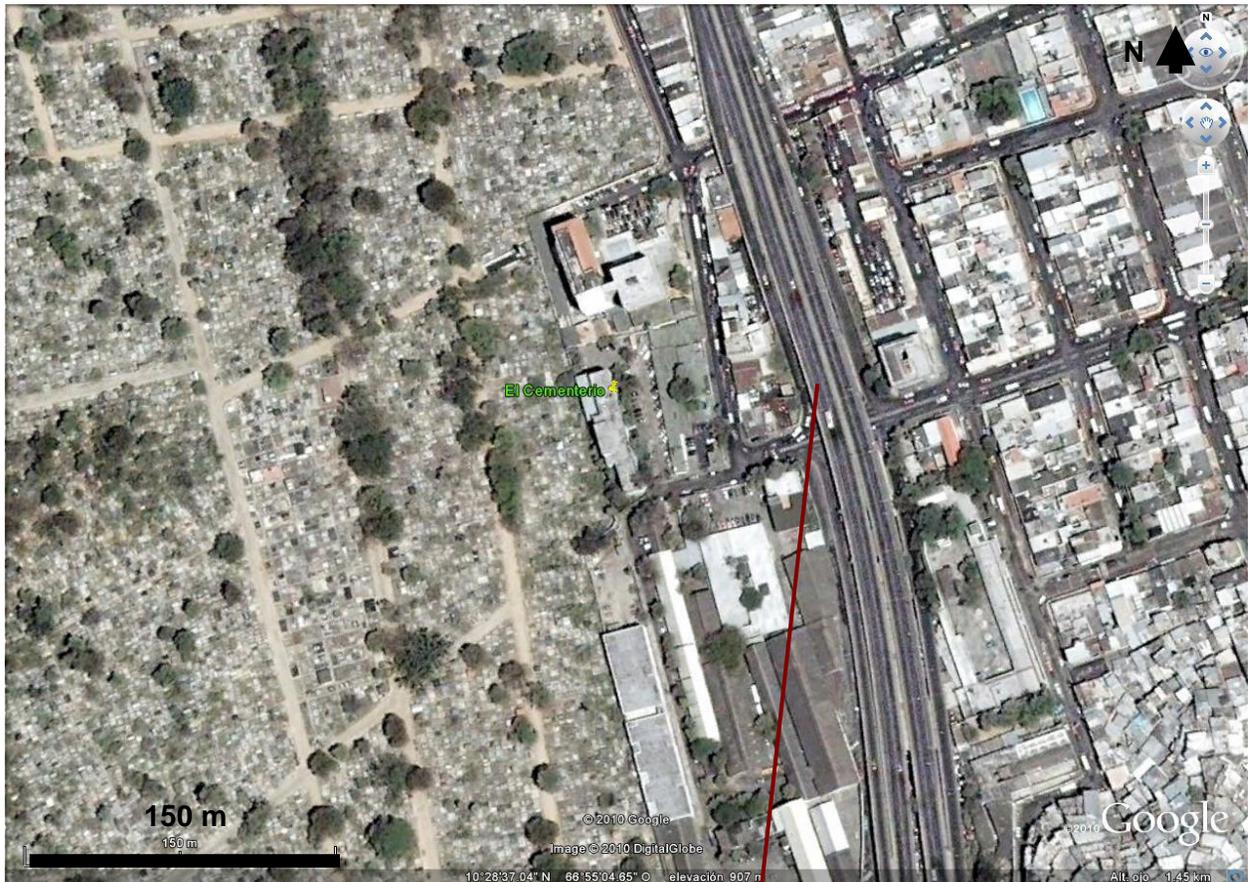


## El Cafetal





## El Cementerio



Autopista Norte-Sur



## El Silencio





## CORE 5





### Universidad Simón Bolívar





**Apéndice W.** Resultados del ANOVA (Prueba de Duncan) aplicado en la comparación de las localidades de estudio, con un nivel de significancia  $p < 0,05$ .

Acenaftileno

Error: entre MS = 0,033029, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,346	0,443	0,419	0,0400	0,0414	0,306	0,0133
LCF 1 {2}	0,346		0,802	0,860	0,197	0,198	0,912	0,0762
LCF 2 {3}	0,443	0,802		0,930	0,141	0,147	0,731	0,0525
LBC {4}	0,419	0,860	0,930		0,157	0,161	0,786	0,0589
LC5 {5}	0,0400	0,197	0,141	0,157		0,965	0,219	0,538
LRC {6}	0,0414	0,198	0,147	0,161	0,965		0,211	0,533
LSC {7}	0,306	0,912	0,731	0,786	0,219	0,211		0,0864
LCM {8}	0,0133	0,0762	0,0525	0,0589	0,538	0,533	0,0864	

Fenantreno

Error: entre MS = 0,033163, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,432	0,286	0,257	0,133	0,133	0,116	0,127
LCF 1 {2}	0,432		0,725	0,662	0,399	0,396	0,353	0,380
LCF 2 {3}	0,286	0,725		0,912	0,589	0,586	0,530	0,565
LBC {4}	0,257	0,662	0,912		0,644	0,647	0,592	0,628
LC5 {5}	0,133	0,399	0,589	0,644		0,982	0,906	0,951
LRC {6}	0,133	0,396	0,586	0,647	0,982		0,917	0,965
LSC {7}	0,116	0,353	0,530	0,592	0,906	0,917		0,947
LCM {8}	0,127	0,380	0,565	0,628	0,951	0,965	0,947	



### Antraceno

Error: entre MS = 0,051092, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,251	0,176	0,164	0,0826	0,0838	0,0660	0,0662
LCF 1 {2}	0,251		0,750	0,736	0,447	0,445	0,365	0,370
LCF 2 {3}	0,176	0,750		1,00	0,620	0,627	0,533	0,537
LBC {4}	0,164	0,736	1,00		0,639	0,637	0,537	0,544
LC5 {5}	0,0826	0,447	0,620	0,639		0,986	0,858	0,867
LRC {6}	0,0838	0,445	0,627	0,637	0,986		0,867	0,873
LSC {7}	0,0660	0,365	0,533	0,537	0,858	0,867		0,986
LCM {8}	0,0662	0,370	0,537	0,544	0,867	0,873	0,986	

### Fluoranteno

Error: entre MS = 0,000208, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,805	0,0135	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
LCF 1 {2}	0,805		0,0122	0,803	0,799	0,793	0,781	0,805
LCF 2 {3}	0,0135	0,0122		0,0126	0,0116	0,0104	0,00882	0,0142
LBC {4}	1,00	0,803	0,0126		1,00	1,00	1,00	1,00
LC5 {5}	1,00	0,799	0,0116	1,00		1,00	1,00	1,00
LRC {6}	1,00	0,793	0,0104	1,00	1,00		1,00	1,00
LSC {7}	1,00	0,781	0,00882	1,00	1,00	1,00		1,00
LCM {8}	1,00	0,805	0,0142	1,00	1,00	1,00	1,00	



### Pireno

Error: entre MS = 0,036729, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,418	0,347	0,177	0,0936	0,0980	0,109	0,0952
LCF 1 {2}	0,418		0,850	0,516	0,305	0,319	0,351	0,314
LCF 2 {3}	0,347	0,850		0,616	0,383	0,399	0,432	0,391
LBC {4}	0,177	0,516	0,616		0,664	0,687	0,738	0,678
LC5 {5}	0,0936	0,305	0,383	0,664		0,967	0,894	0,970
LRC {6}	0,0980	0,319	0,399	0,687	0,967		0,922	1,00
LSC {7}	0,109	0,351	0,432	0,738	0,894	0,922		0,917
LCM {8}	0,0952	0,314	0,391	0,678	0,970	1,00	0,917	

### Criseno

Error: entre MS = 0,006404, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,0933	0,0230	0,0327	0,0248	0,0238	0,0308	0,0248
LCF 1 {2}	0,0933		0,386	0,517	0,377	0,375	0,479	0,394
LCF 2 {3}	0,0230	0,386		0,776	0,964	0,963	0,841	1,00
LBC {4}	0,0327	0,517	0,776		0,755	0,752	0,920	0,783
LC5 {5}	0,0248	0,377	0,964	0,755		1,00	0,823	0,963
LRC {6}	0,0238	0,375	0,963	0,752	1,00		0,818	0,960
LSC {7}	0,0308	0,479	0,841	0,920	0,823	0,818		0,850
LCM {8}	0,0248	0,394	1,00	0,783	0,963	0,960	0,850	



Benzo [a] Antraceno

Error: entre MS = 0,000308, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,314	0,000069	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
LCF 1 {2}	0,314		0,000308	0,309	0,301	0,287	0,262	0,317
LCF 2 {3}	0,000069	0,000308		0,000069	0,000067	0,000088	0,000101	0,000071
LBC {4}	1,00	0,309	0,000069		1,00	1,00	1,00	1,00
LC5 {5}	1,00	0,301	0,000067	1,00		1,00	1,00	1,00
LRC {6}	1,00	0,287	0,000088	1,00	1,00		1,00	1,00
LSC {7}	1,00	0,262	0,000101	1,00	1,00	1,00		1,00
LCM {8}	1,00	0,317	0,000071	1,00	1,00	1,00	1,00	

Benzo [b] Fluoranteno

Error: entre MS = 0,003004, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,0982	0,000837	0,425	0,306	1,00	0,0283	0,0925
LCF 1 {2}	0,0982		0,0241	0,319	0,449	0,102	0,467	1,00
LCF 2 {3}	0,000837	0,0241		0,00383	0,00627	0,000902	0,0812	0,0277
LBC {4}	0,425	0,319	0,00383		0,770	0,449	0,111	0,306
LC5 {5}	0,306	0,449	0,00627	0,770		0,319	0,169	0,425
LRC {6}	1,00	0,102	0,000902	0,449	0,319		0,0298	0,0982
LSC {7}	0,0283	0,467	0,0812	0,111	0,169	0,0298		0,491
LCM {8}	0,0925	1,00	0,0277	0,306	0,425	0,0982	0,491	



Benzo [k] Fluoranteno

Error: entre MS = 0,007950, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,00517	0,000031	0,0946	0,622	1,00	0,00810	0,294
LCF 1 {2}	0,00517		0,00224	0,137	0,0127	0,00558	0,787	0,0388
LCF 2 {3}	0,000031	0,00224		0,000176	0,000041	0,000029	0,00165	0,000064
LBC {4}	0,0946	0,137	0,000176		0,197	0,100	0,189	0,448
LC5 {5}	0,622	0,0127	0,000041	0,197		0,640	0,0194	0,531
LRC {6}	1,00	0,00558	0,000029	0,100	0,640		0,00885	0,308
LSC {7}	0,00810	0,787	0,00165	0,189	0,0194	0,00885		0,0570
LCM {8}	0,294	0,0388	0,000064	0,448	0,531	0,308	0,0570	

Benzo [a] Pireno

Error: entre MS = 0,004137, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,0607	0,217	1,00	0,413	1,00	1,00	1,00
LCF 1 {2}	0,0607		0,422	0,0639	0,224	0,0563	0,068	0,0663
LCF 2 {3}	0,217	0,422		0,225	0,619	0,204	0,233	0,230
LBC {4}	1,00	0,0639	0,225		0,426	1,00	1,00	1,00
LC5 {5}	0,413	0,224	0,619	0,426		0,388	0,438	0,434
LRC {6}	1,00	0,0563	0,204	1,00	0,388		1,00	1,00
LSC {7}	1,00	0,0680	0,233	1,00	0,438	1,00		1,00
LCM {8}	1,00	0,0663	0,230	1,00	0,434	1,00	1,00	



### Dibenzo [a,h] Antraceno

Error: entre MS = 0,042283, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,104	0,547	0,128	0,0411	0,0392	0,0232	0,654
LCF 1 {2}	0,104		0,253	0,860	0,573	0,556	0,394	0,0508
LCF 2 {3}	0,547	0,253		0,300	0,111	0,107	0,0658	0,325
LBC {4}	0,128	0,860	0,300		0,486	0,465	0,321	0,0646
LC5 {5}	0,0411	0,573	0,111	0,486		0,953	0,726	0,0189
LRC {6}	0,0392	0,556	0,107	0,465	0,953		0,755	0,0180
LSC {7}	0,0232	0,394	0,066	0,321	0,726	0,755		0,0104
LCM {8}	0,654	0,0508	0,325	0,0646	0,0189	0,0180	0,0104	

### Benzo [q,h,i] Perileno

Error: entre MS = 0,016538, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,192	0,000039	0,196	0,956	1,00	1,00	1,00
LCF 1 {2}	0,192		0,000238	0,975	0,185	0,195	0,179	0,187
LCF 2 {3}	0,000039	0,000238		0,000190	0,000069	0,000038	0,000045	0,000042
LBC {4}	0,196	0,975	0,000190		0,172	0,201	0,176	0,188
LC5 {5}	0,956	0,185	0,000069	0,172		0,956	0,950	0,954
LRC {6}	1,00	0,195	0,000038	0,201	0,956		1,00	1,00
LSC {7}	1,00	0,179	0,000045	0,176	0,950	1,00		1,00
LCM {8}	1,00	0,187	0,000042	0,188	0,954	1,00	1,00	



Indeno [1,2,3-cd] Pireno

Error: entre MS = 1,070754, df = 16

Localidad	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}
USB {1}		0,374132	0,000073	0,00421	0,391	0,382	0,333	0,138
LCF 1 {2}	0,374		0,000282	0,0222	0,950	0,930	0,914	0,488
LCF 2 {3}	0,000073	0,000282		0,0354	0,000280	0,000287	0,000318	0,000860
LBC {4}	0,00421	0,022212	0,0354		0,0218	0,0221	0,0239	0,0662
LC5 {5}	0,391	0,950536	0,000280	0,0218		0,975	0,872	0,466
LRC {6}	0,382	0,930376	0,000287	0,0221	0,975		0,854	0,456
LSC {7}	0,333	0,913528	0,000318	0,0239	0,872	0,854		0,532
LCM {8}	0,138	0,488	0,000860	0,0662	0,466	0,456	0,532	

**Apéndice X.** Fotografías de los incendios registrados en el Parque Nacional Waraira Repano durante el periodo de sequía del 2010.





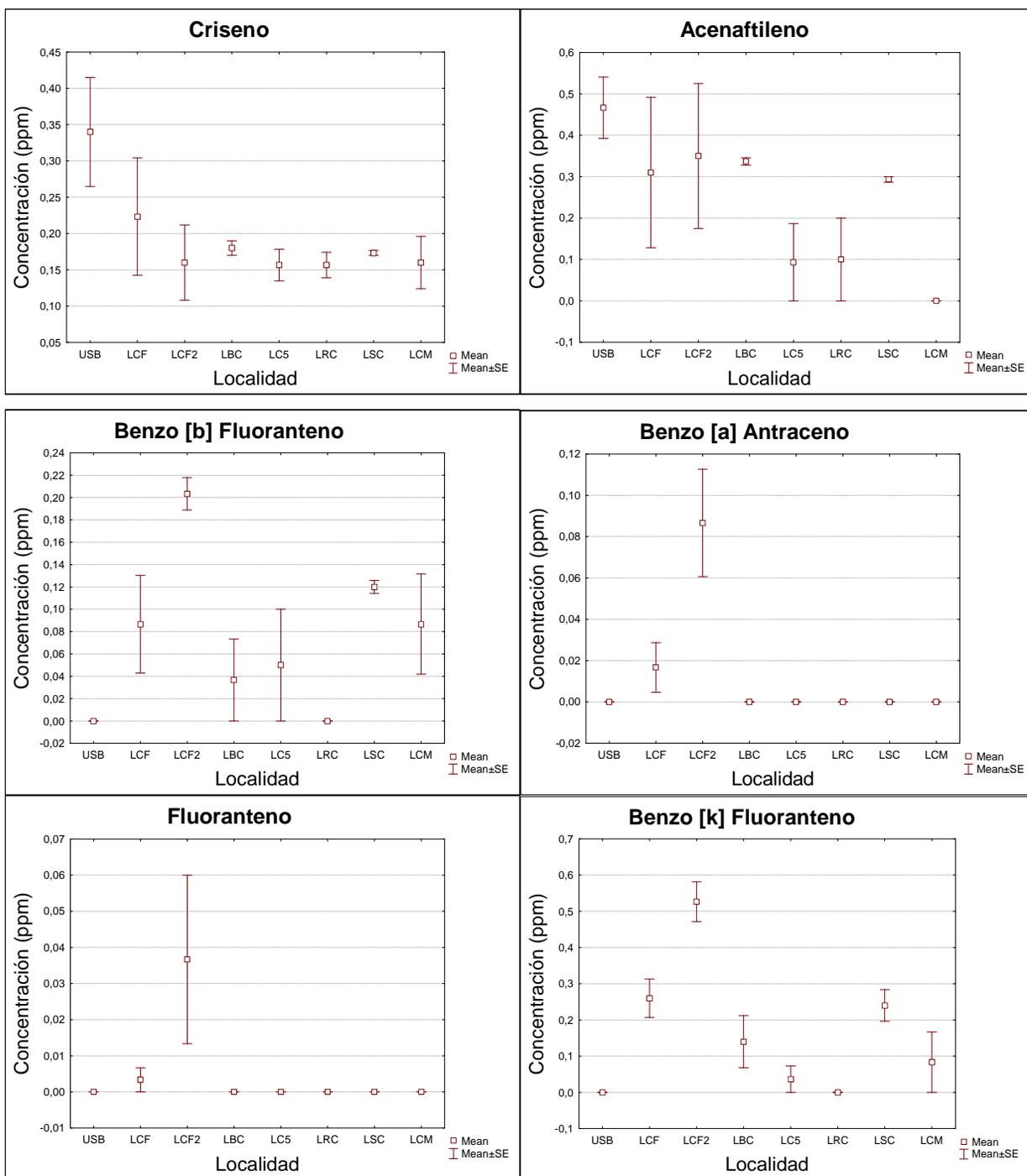


**Apéndice Y.** Pesos de las variables correspondientes a los tres primeros componentes obtenidos con el ACP, para las 13 variables (HAP) y los resultados de los 7 casos (localidades) estudiados, así como el poder de discriminación de cada CP en porcentaje.

<b>Componentes principales</b>	<b>CP 1</b>	<b>CP 2</b>	<b>CP 3</b>
<b><i>Eigenvalues</i></b>	5,759	4,928	0,96
<b>Porcentaje</b>	44,299 %	37,91 %	7,385 %
<b>Porcentaje acumulado</b>	44,299 %	82,209 %	89,594 %
<b>Pesos de las variables ACP</b>			
	<b>CP 1</b>	<b>CP 2</b>	<b>CP 3</b>
Acenaftileno	<b>0,202</b>	<b>0,301</b>	-0,508
Fenantreno	<b>0,177</b>	<b>0,407</b>	0
Antraceno	<b>0,137</b>	<b>0,424</b>	-0,022
Fluoranteno	<b>0,397</b>	-0,074	0,086
Pireno	<b>0,195</b>	<b>0,397</b>	-0,005
Criseno	0,057	<b>0,44</b>	-0,019
Benzo [a] Antraceno	<b>0,397</b>	<b>-0,074</b>	0,086
Benzo [b] Fluoranteno	<b>0,247</b>	<b>-0,259</b>	0,1
Benzo [k] Fluoranteno	<b>0,348</b>	<b>-0,18</b>	-0,169
Benzo [a] Pireno	<b>0,335</b>	<b>-0,12</b>	0,054
Dibenzo [a,h] Antraceno	0,063	<b>0,231</b>	0,826
Benzo [g,h,i] Perileno	<b>0,398</b>	-0,071	-0,017
Indeno [1,2,3-cd] Pireno	<b>0,308</b>	<b>-0,174</b>	0,033
<b>Resultados de los casos ACP</b>			
	<b>CP 1</b>	<b>CP 2</b>	<b>CP 3</b>
USB (R)	<b>-0,053</b>	<b>2,011</b>	0,025
LCF	<b>2,119</b>	<b>-0,339</b>	0,077
LBC	<b>0,049</b>	<b>0,033</b>	-0,246
LC5	<b>-0,515</b>	<b>-0,462</b>	-0,053
LRC	<b>-0,812</b>	<b>-0,266</b>	-0,127
LSC	<b>-0,275</b>	<b>-0,553</b>	-0,479
LCM	<b>-0,512</b>	<b>-0,423</b>	0,803

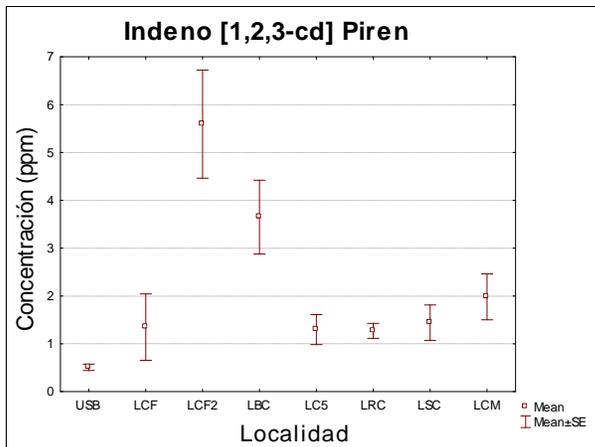
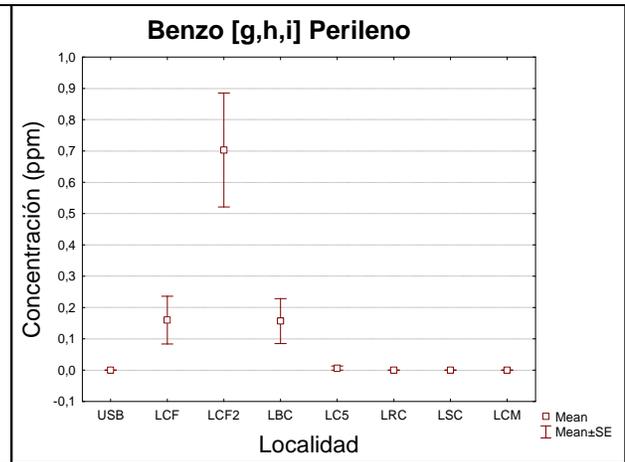
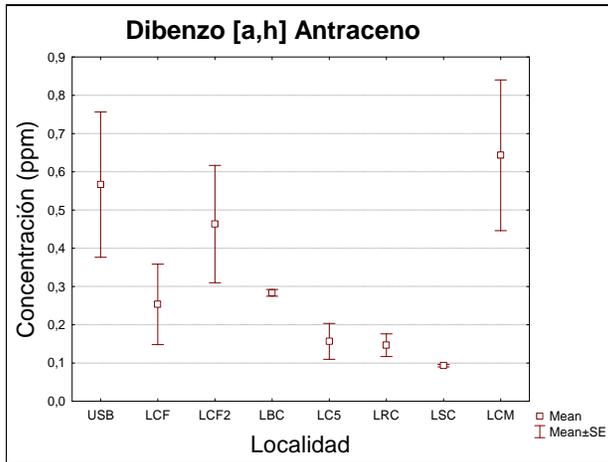


**Apéndice Z.** Diagramas de caja de cada HAP con diferencias significativas para las localidades de estudio.





Evaluación de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos, empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* y aplicando un muestreo de tipo activo en la ciudad de Caracas



Media   
Media ± desviación estándar 