

LÍQUENES COMO BIOMONITORES DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA POR HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP) - REVISIÓN -

HENRY GÓMEZ ¹, RAIZA FERNÁNDEZ ^{1*}, ZULLY BENZO ², FEDERICO GALARRAGA ¹, JESÚS HERNÁNDEZ ³,
ANTONIO ROSCHMAN-GONZÁLEZ ⁴

¹ Centro de Geoquímica, Instituto de Ciencias de la Tierra, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Apartado 3895, Caracas 1010-A, Venezuela. E-mails: geo_henry_david@hotmail.com, raiza.fernandez@ciens.ucv.ve y federico.galarraga@ciens.ucv.ve

² Laboratorio de Química Analítica, Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Apartado 21827, Caracas 1020-A, Venezuela. E-mail: zbenzo@ivic.ve

³ Fundación Instituto Jardín Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser, Jardín Botánico de Caracas. Universidad Central de Venezuela (UCV). Apartado 2156, Caracas 1010-A, Venezuela. E-mail: jesus.hernandez@ucv.ve

⁴ Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Apartado 47140, Caracas 1041-A, Venezuela. E-mail: roschman.gonzalez@ciens.ucv.ve

Recibido: agosto 2011

Recibido en forma final revisado: octubre 2012

RESUMEN

Los líquenes pueden ser empleados como biomonitores para la investigación y el control de la contaminación del aire, por comportarse como instrumentos válidos para evaluar la calidad del aire afectada por emisiones provenientes de fuentes móviles o fijas. En este contexto, esta publicación pretende recopilar abundante información sobre el progreso de las investigaciones relativas al uso de los líquenes como biomonitores de la calidad del aire, con énfasis en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). El objetivo de esta revisión es recopilar los resultados de investigaciones que en esta materia se han desarrollado, posteriores al año 2001, cuando se realiza la publicación de Conti & Cecchetti (*Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review*). La presente revisión señala las líneas más importantes en el estado del arte del conocimiento en este campo, evaluando las aplicaciones metodológicas de los líquenes (muestreo, tratamiento físico y químico, instrumentación analítica, herramientas estadísticas y perspectivas futuras) al igual que las ventajas/desventajas con respecto a los métodos de monitoreo convencionales.

Palabras clave: Contaminación atmosférica, Monitoreo biológico, Líquenes, Bioacumulación, Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

LICHENS AS BIOMONITORS OF AIR POLLUTION WITH POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) - A REVIEW -

ABSTRACT

Lichens can be used as a biomonitors for research and control of air pollution since they are valid instruments for assessing air quality affected by emissions from mobile or fixed sources. In this context, this paper manages to collect extensive information about the progress of research on the use of lichens as biomonitors of air quality, with emphasis on the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The aim of this review is to compile the results of research in this area that have been developed after 2001, when performing the publication of Conti and Cecchetti (*Biological monitoring: lichens as bioindicators of Pollution assessment - a review*). This review discusses the most important lines in the state of the art knowledge in this field, assessing the lichens methodological applications (sampling, physical and chemical treatment, instrumental analysis techniques, statistical tools and future prospects) and their advantages / disadvantages with respect to conventional research methods.

Keywords: Air pollution, Biological monitoring, Lichens, Bioaccumulation, Polycyclic aromatic hydrocarbons.

MONITOREO BIOLÓGICO

En los últimos años se ha desarrollado notablemente el uso de los líquenes como organismos capaces de evaluar la contaminación del aire. Dichos organismos incorporan contaminantes ambientales tales como metales e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) entre otros y pueden ser usados como indicadores de la biodisponibilidad de este tipo de sustancias en el tiempo, permitiendo en ciertos casos comparar los niveles de contaminación en diferentes áreas geográficas (Conti & Cecchetti, 2001).

En este sentido, diversos países del mundo (Argentina, Eslovenia, España, Estados Unidos, Francia, Italia, Portugal, entre otros) han continuado el desarrollo de investigaciones con el fin de examinar en detalle el potencial de los líquenes como bioindicadores de la presencia de metales y biomonitores de la calidad del aire (Carignan *et al.* 2002; Jeran *et al.* 2002; Bennett & Berson, 2005; Carreras *et al.* 2009).

Del mismo modo, países como Brasil y Venezuela se han incorporado recientemente al estudio de tan importante tema, especialmente en zona urbanas, con énfasis en evaluar el potencial de los líquenes como biomonitores de la contaminación del aire por metales y HAP (Saiki *et al.* 2006; Figueredo *et al.* 2007; Fuga *et al.* 2008; Fernández *et al.* 2011).

Los bioindicadores son organismos que pueden ser usados para la identificación y determinación cualitativa de los contaminantes ambientales generados por los humanos mientras que la definición de biomonitores aplica a aquellos líquenes que son utilizados principalmente para la determinación cuantitativa de contaminantes y pueden ser clasificados como sensibles o acumulativos (Hawksworth *et al.* 2005).

Los biomonitores sensibles pueden ser del tipo óptico y son usados como integradores del estrés causado por los contaminantes y como sistemas de alarmas preventivos. Su uso se basa en el hecho de que manifiestan efectos ópticos y cambios morfológicos evidentes en función de los contaminantes ambientales o alteración en los aspectos físicos y químicos de la actividad enzimática así como también en sus actividades fotosintéticas y respiratorias.

Los bioindicadores acumulativos (biomonitores) tienen la capacidad de almacenar los contaminantes en sus tejidos y son usados para la medición integrada de la concentración de tales sustancias en el ambiente. La bioacumulación es el resultado de los procesos de equilibrio de la biota en la toma

y descarga de los compuestos desde y hacia el ambiente circundante (Wolterbeek, 2002).

LÍQUENES COMO BIOINDICADORES/ BIOMONITORES DE CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA POR HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

A diferencia del elevado número de estudios en los cuales han sido empleados líquenes como bioindicadores/biomonitores de metales pesados (Branquinho *et al.* 1999; Bernasconi *et al.* 2000; Nimis *et al.* 2001; Conti & Cecchetti, 2001; Jeran *et al.* 2002; Scerbo *et al.* 2002; Carreras & Pignata, 2002; Zschau *et al.* 2003; Garty *et al.* 2003; Tuncel *et al.* 2004; Williamson *et al.* 2004; Bennett & Berson, 2005; Cloquet *et al.* 2006; Monnet *et al.* 2006; Bergamaschi *et al.* 2007; Brunialti & Frati, 2007; Carreras & Pignata, 2007; Godinho *et al.* 2008; Rusticelli *et al.* 2008; Sorbo *et al.* 2008; Basile *et al.* 2008; Branquinho *et al.* 2008; Conti *et al.* 2009), son escasas las investigaciones que reportan el empleo de líquenes como bioindicadores/biomonitores de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). A nivel internacional encontramos menos de treinta (30) publicaciones referidas a la determinación de este grupo de compuestos en líquenes, siendo ocho los países pioneros en esta línea de investigación: España, Italia, India, Canadá, Polonia, Portugal, Suecia y Venezuela

Al igual que para el resto de las especies químicas, los mecanismos propuestos para la incorporación de estos contaminantes al tejido biológico son la deposición húmeda y deposición seca de partículas, así como la absorción de compuestos en fase gaseosa ya sea disueltos en agua o como aerosoles (Blasco *et al.* 2006, 2008; Augusto *et al.* 2009; Shukla *et al.* 2010; Satya *et al.* 2012).

El estudio de los HAP presentes en el aire, empleando líquenes como biomonitores, pasa por la planificación y ejecución de cada una de las etapas propias de cualquier investigación, es decir desde la recolección y preservación adecuada de las muestras, hasta el tratamiento estadístico de los resultados a fin de derivar las conclusiones más exactas.

MUESTREO DE LÍQUENES EN ESTUDIOS DE CALIDAD DEL AIRE PARA LA DETERMINACIÓN DE HAP BIOACUMULADOS

El empleo de líquenes como indicadores biológicos de HAP ha tenido aplicación principalmente en zonas urbanas, tomando como criterio de selección de las estaciones de muestreo los distintos niveles de flujo vehicular en las principales calles y avenidas. En algunos casos se ha

diseñado la toma de los líquenes de acuerdo a la cercanía o lejanía de la autopista principal a la zona de estudio, debido a que la actividad de los vehículos a motor es una de las principales fuentes de HAP (Owczarek *et al.* 2001; Guidotti *et al.* 2003; Shukla & Upreti, 2009; Augusto *et al.* 2009; Guidotti *et al.* 2009; Shukla *et al.* 2010; Gómez, 2010; Fernández *et al.* 2011; Blasco *et al.* 2011; Satya *et al.* 2012). Diversos estudios se han efectuado en zonas rurales o remotas (Migaszewski *et al.* 2002; Blasco *et al.* 2006, 2008; Shukla *et al.* 2010; Blasco *et al.* 2011), zonas industriales (Augusto *et al.* 2009; Satya *et al.* 2012) y mineras (Naeth & Wilkinson, 2008).

En la mayoría de las investigaciones han sido efectuados muestreos de tipo pasivo, es decir se colectan y analizan los líquenes desde sus ecosistemas naturales (Owczarek *et al.* 2001; Migaszewski *et al.* 2002; Blasco *et al.* 2006, 2008; Naeth & Wilkinson, 2008; Shukla & Upreti, 2009; Augusto *et al.* 2009; Shukla *et al.* 2010; Fernández *et al.* 2011; Blasco *et al.* 2011; Satya *et al.* 2012), la razón del empleo de este tipo de muestreo radica en que en su mayoría estas investigaciones corresponden a estudios de tipo piloto (evaluaciones preliminares) 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. Hasta el presente, sólo Guidotti *et al.* (2003; 2009) y Gómez (2010) han trasplantado los biomonitores de su ecosistema natural (localidad de referencia) a zonas urbanas, exponiéndolos a dicha atmósfera por más de 3 meses, para evaluar variaciones en la concentración de los HAP en el tiempo.

En lo que respecta a la ubicación de los líquenes una vez trasplantados, la variable altura juega un importante papel. Generalmente, altura a la cual son tomados los líquenes desde el sustrato varía entre 1,0-3,5 m del suelo (Owczarek *et al.* 2001; Migaszewski *et al.* 2002; Domeño *et al.* 2006; Blasco *et al.* 2006, 2007 y 2008; Guidotti *et al.* 2003 y 2009; Fernández *et al.* 2011; Blasco *et al.* 2011; Satya *et al.* 2012), de esta forma procura evitarse la influencia de las partículas procedentes del suelo que probablemente también contienen HAP, además, los líquenes situados a poca altura del suelo podrían encontrarse sobreprotegidos de las deposiciones atmosféricas por la existencia de maleza. Igualmente, destaca el empleo de navajas, pinzas y espátulas de acero para la toma de los líquenes y su posterior remoción de la corteza (Migaszewski *et al.* 2002; Blasco *et al.* 2006, 2007 y 2008; Gómez, 2010; Fernández *et al.* 2011), así como de materiales como nylon (Guidotti *et al.* 2003 y 2009; Gómez, 2010), nitrilo (Naeth & Wilkinson, 2008) y bolsas de papel (Naeth & Wilkinson, 2008; Gómez, 2010) en la manipulación de los mismos, lo cual se hace para minimizar

la contaminación de las muestras por compuestos orgánicos provenientes del plástico.

En caso del biomonitorio activo (método de trasplante) los procedimientos deben ser muy bien estandarizados debido a que muchos otros factores pueden afectar la respuesta de los líquenes a los contaminantes en un área donde usualmente los líquenes no crecen (Gómez, 2010). En este sentido, es recomendable protegerlos una vez trasplantados de la incidencia directa de la radiación solar, 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 (Pignata *et al.* 2008).

Cuidados adicionales en la toma de las muestras para el análisis de los HAP, son el no fumar cerca de las muestras para evitar su contaminación y secar las muestras a temperatura ambiente antes de ser guardadas, con el fin de prevenir su descomposición (Migaszewski *et al.* 2002). En relación con la edad de los líquenes a colectar, Blasco *et al.* (2006; 2007; 2008) indican que estos deben corresponder a todas las edades (de forma aleatoria). Por otro lado, Shukla *et al.* (2010) señalan haber tomado líquenes con talos entre 3 y 5 cm de diámetro, delimitando así la edad de los mismos, para así minimizar cualquier varianza en el muestreo introducida por este factor.

Con respecto al número de muestras tomadas por cada localidad o estación de muestreo, Guidotti *et al.* (2003; 2009) y Gómez (2010) posicionan los líquenes en al menos 2 árboles (forofitos), para de esta forma tener en cuenta la dispersión intralocal de los HAP, mientras que Owczarek *et al.* (2001) y Blasco *et al.* (2006, 2007, 2008) muestrearon en cada punto al menos 4 árboles diferentes. En este sentido, Naeth & Wilkinson (2008), tomaron 3 muestras líquenes terrícolas ubicados a 10 m entre ellas, teniendo en cuenta dicha variabilidad intralocal (debida a diferencias sutiles en la posición en que se encuentran ubicados los líquenes).

ESPECIES DE LÍQUENES FRECUENTEMENTE EMPLEADAS

En la mayoría de las publicaciones se ha reportado el empleo de líquenes con talo de morfología foliácea y/o fruticulosa (Owczarek *et al.* 2001; Migaszewski *et al.* 2002; Domeño *et al.* 2006; Blasco *et al.* 2006, 2007 y 2008; Naeth & Wilkinson, 2008; Shukla *et al.* 2009; Augusto *et al.* 2009; Guidotti *et al.* 2003 y 2009; Shukla *et al.* 2010; Gómez, 2010; Fernández *et al.* 2011; Blasco *et al.* 2011) debido principalmente a la facilidad que presenta este tipo de líquenes para ser removidos del sustrato, en comparación con los de morfología tipo crustáceo,

que se presentan mucho más adheridos al sustrato. Adicionalmente los líquenes crustáceos son más resistentes a la contaminación debido a su menor superficie lo que trae como consecuencia una menor acumulación de las especies de interés (Vareschi, 1953). Entre las especies de talo foliáceo utilizadas como bioindicadores/biomonitores de contaminación por HAP, destacan: *Dermatocarpon vellereum* Zschacke, *Heterodermia angustiloba* (Müll. Arg.) D.D. Awasthi, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl, *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm., *Parmelia sulcata* Taylor, *Parmotrema hypoleucinum* (J. Steiner) Hale, *Parmotrema sancti-angelii* (Lyngé) Hale, *Phaeophyscia hispidula* (Ach.) Essl., *Phaeophyscia orbicularis* (Neck.) Moberg, *Physcia adscendens* (Fr.) H. Olivier, *Pyxine coralligera* Malme y *Xanthoria parietina* (L.) Beltr; entre las de talo fruticulosos: *Cladina arbuscula* (Wallr.) Burgaz, *Usnea* sp., *Flavocetraria nivalis* (L.) Kärnefelt & A. Thell y *Flavocetraria cucullata* (Bellardi) Kärnefelt & A. Thell; entre las que poseen características intermedias foliáceo-fruticulosas están: *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf y *Ramalina farinacea* (L.) Ach.; con características intermedias crustáceo-escuamulosos: *Acarospora bullata* Anzi, *Aspicilia praeradiosa* (Nyl.) Poelt & Leuckert y *Dimelaena oreina* (Ach.) Norman; y con talo crustáceo: *Rinodina sophodes* (Ach.) Massal.

Otro criterio importante para la selección de la especie de líquen a emplear es la abundancia de dicha especie en la zona de estudio. La mayoría de las investigaciones emplean líquenes que viven o crecen sobre la corteza de los árboles (corticícolas) (Owczarek *et al.* 2001; Migaszewski *et al.* 2002; Domeño *et al.* 2006; Blasco *et al.* 2006, 2007 y 2008; Guidotti *et al.* 2003 y 2009; Augusto *et al.* 2009; Shukla *et al.* 2010; Gómez, 2010; Fernández *et al.* 2011; Blasco *et al.* 2011; Satya *et al.* 2012). Naeth & Wilkinson (2008) utilizan líquenes que crecen sobre el suelo o la tierra (terricólicas) y Shukla *et al.* (2010) toman líquenes que viven sobre las rocas (saxícolas). En este aspecto, cabe destacar que el parámetro altura respecto al suelo, mencionado en la etapa de muestreo, es mucho más fácil de controlar en los organismos epífitos que en aquellos que crecen directamente en la roca o en el suelo.

TRATAMIENTO FÍSICO DE LOS LÍQUENES

En el periodo de tiempo comprendido desde la toma de los líquenes y su tratamiento físico y químico en el laboratorio, las muestras deben ser debidamente preservadas a baja temperatura con el objeto de evitar al máximo la pérdida de los HAP más volátiles y protegidas de la radiación solar para evitar la fotólisis de los compuestos de interés. En este orden de ideas, Migaszewski *et al.* (2002) reportan

que las muestras fueron colocadas en frascos oscuros de vidrio y refrigeradas a -10 °C. Domeño *et al.* (2006) y Blasco *et al.* (2006; 2007; 2008; 2011) preservaron los líquenes en papel de aluminio, y hasta el momento del análisis, los almacenaron en viales de vidrio sellados y a una temperatura de 4 °C; por su parte, Shukla & Upreti (2009), Shukla *et al.* (2010) y Satya *et al.* (2012) indican que los líquenes fueron envueltos en papel de aluminio y mantenidos a baja temperatura hasta el momento de los análisis y previeron realizar los análisis a menos de una semana de la recolección de las muestras, lo cual es recomendable en el estudio de este tipo de compuestos, ya que permite minimizar los riesgos asociados con su elevada inestabilidad fisicoquímica. Augusto *et al.* (2009) colocaron las muestras en botellas de vidrio marrones, protegidas de la luz del sol, e inmediatamente las almacenaron a 4 °C; Gómez (2010) mantuvo los líquenes envueltos en papel de aluminio y a bajas temperaturas, con el objeto de evitar al máximo la pérdida de los HAP más volátiles y la fotólisis de los mismos. Asimismo, Fernández *et al.* (2011) mantuvieron las muestras a -20 °C en frascos de vidrio ámbar hasta su análisis.

Otro aspecto a destacar es el referido al tratamiento físico de las muestras el cual no ha sido estandarizado, por lo que cada autor reporta pasos distintos para esta etapa de los análisis. Owczarek *et al.* (2001) efectuaron un lavado de las muestras para eliminar el polvo, las mantuvieron por 48 h a una temperatura de 45 °C y las pulverizaron en un mortero de ágata. Migaszewski *et al.* (2002) secaron las muestras a temperatura ambiente (sobre 16 °C), fueron lavadas 3 veces con agua deionizada para remover las partículas minerales y de polen y secadas nuevamente a temperatura ambiente, para posteriormente disgregarlas manual o mecánicamente y las tamizaron hasta tener un tamaño < 0,063 mm. Guidotti *et al.* (2003; 2009) secaron los líquenes a 40 °C por 48 h en una estufa; las muestras fueron limpiadas, removiendo material extraño como polvo, restos de hojas, insectos y guijarros empleando un microscopio. Luego fueron pulverizadas en un mortero de ágata; dicho procedimiento fue seguido también por Gómez (2010) y Fernández *et al.* (2011), los cuales adicionalmente emplearon nitrógeno líquido en la pulverización de las muestras. Fernández *et al.* (2011) incluyen previo al secado de los líquenes el lavado o enjuague de los mismos empleando agua deionizada y agitando suavemente, sin embargo, Gómez (2010) recomienda prescindir de dicho paso debido a que en el mismo se tienden a perder HAP, tanto asociados con las partículas, como con la fase gaseosa. Por su parte, Domeño *et al.* (2006) y Blasco *et al.* (2006; 2007; 2008; 2011), una vez en el laboratorio, eliminaron restos de corteza o de otros materiales que pudieran haber quedado adheridos a

los líquenes y los secaron a una temperatura de 35 °C de 3 a 4 días; una vez secos, fueron triturados y homogeneizados hasta tener una muestra pulverizada. Asimismo, Satya *et al.* (2012) dejaron secar los líquenes al aire.

Por último, Naeth & Wilkinson (2008) enjuagaron los líquenes con agua destilada para remover las partículas finas, y posteriormente fueron secados al aire. Todo el material liquenáceo fue pulverizado en el laboratorio mediante un equipo de molienda, el cual fue lavado entre muestra y muestra con un detergente no corrosivo y libre de interferencias analíticas, y enjuagado 3 veces con agua deionizada.

A pesar de no tener un protocolo estandarizado, puede observarse que la mayoría de los autores incluyen la limpieza de las muestras, la pulverización u homogenización de las mismas y su secado; esto es debido a que factores como la presencia de materiales distintos al talo liquénico, heterogeneidad de la muestra y humedad, introducen una mayor varianza y/o error en la pesada y en la determinación misma de los HAP.

EXTRACCIÓN

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 distinta intensidad, 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).

En este sentido, el método de extracción convencional HAP en muestras ambientales ha sido el empleo del aparato Soxhlet (Naeth & Wilkinson, 2008; Augusto *et al.* 2009; Shukla & Upreti, 2009 Shukla *et al.* 2010 y Satya *et al.* 2012), tomando como referencia principal los métodos 3540 de la United States-Environmental Protection Agency (US-EPA) (16-24 h, 300 mL de solvente). Este método suele considerarse como un procedimiento exhaustivo para extraer los contaminantes a partir de las matrices sólidas, sin embargo constituye el método de referencia que valida cualquier otro método de extracción. Shukla & Upreti (2009), Shukla *et al.* (2010) y Satya *et al.* (2012) utilizan como solvente 100 mL de diclorometano durante 16 h (método 8310 de la US-EPA), mientras que Augusto *et al.* 2009 utilizan 200 mL de acetonitrilo por 24 h, en ambos casos fueron tratados 2 g de la muestra de líquen. Por su parte, 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.

Owczarek *et al.* (2001), Guidotti *et al.* (2003; 2009), Gómez (2010) y Fernández *et al.* (2011) emplean como metodología de extracción la técnica de extracción estática asistida por ultrasonidos. 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 (Soxhlet). Owczarek *et al.* (2001) utilizan como solvente diclorometano, efectuando la extracción por duplicado, durante 20 min para 1 g de muestra. Guidotti *et al.* (2003; 2009) emplean como solvente 30 mL de ciclohexano en 2 g de muestra, por 30 min, realizando dicho procedimiento por duplicado con el mismo sólido residual, para posteriormente combinar los extractos. Asimismo, Fernández *et al.* (2011), siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado, extraen 2 g de líquen con 30 mL de la mezcla ciclohexano:diclorometano (4:1 v/v) empleando un baño de ultrasonido a temperatura ambiente por 30 min, realizando dicho procedimiento por duplicado con el mismo sólido residual, para posteriormente combinar los extractos. Gómez (2010) logra reducir el tiempo de extracción a 15 min y emplea como solvente la mezcla hexano:diclorometano (3:2 v/v), para la misma cantidad de sólido y solvente empleada por Fernández *et al.* (2011).

La contribución más significativa en términos de tiempo de extracción, cantidad de solvente y masa de muestra requerida para la cuantificación de los HAP fue la aportada por Domeño *et al.* (2006), quienes con el objeto de optimizar dicha etapa del tratamiento de la muestra, compararon tres métodos de extracción orgánica distintos. Entre dichos métodos están 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 presentan porcentajes similares de recuperación, para los 16 HAP listados por la US-EPA, y que la principal ventaja que proporciona la técnica DSASE, viene dada en términos de tiempo y de consumo de solvente. La técnica DSASE fue implementada posteriormente por Blasco *et al.* (2006; 2007; 2008; 2011). Dicha comparación de solventes

también es efectuada por Gómez (2010), coincidiendo con Domeño *et al.* (2006), en que el hexano mejora la desorción desde la matriz líquida 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). 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.

PURIFICACIÓN O LIMPIEZA DE LA FRACCIÓN AROMÁTICA

En sus respectivas investigaciones, Guidotti *et al.* (2003; 2009), Shukla & Upreti (2009), Shukla *et al.* (2010), Gómez (2010), Fernández *et al.* (2011) y Satya *et al.* (2012) emplean para la etapa de limpieza o purificación de los HAP, el método 3630 de la US-EPA, el cual consiste en la preparación de una columna de sílica gel para purificar sustancias no polares. Dichos autores llevaron a cabo la purificación o separación de los HAP (de otros compuestos orgánicos) empleando como fase estacionaria sílica gel activada. Guidotti *et al.* (2003; 2009) y Satya *et al.* (2012), usaron 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. Gómez (2010) y Fernández *et al.* (2011) realizan la activación de la sílica gel dejándola en la estufa a 80 °C durante 16 horas, previas a su uso. Posterior al empacado de la columna, se añadieron los 2 mL del extracto. Se comenzó la elusión con 25 mL de hexano. Seguidamente con 40 mL de mezcla hexano-diclorometano (2:3, v/v). La purificación puede ser efectuada empleando otras fases estacionarias, un ejemplo de esto es la metodología aplicada por Domeño *et al.* (2006) y Blasco *et al.* (2006), los cuales utilizaron alúmina activada a 550 °C por 5 h, eluyendo los analitos con 20 mL de la mezcla hexano:diclorometano (3:1). Augusto *et al.* (2009) utilizan una columna de florisil y 30 mL de acetonitrilo como eluyente. Cabe destacar el método de extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), empleado por Blasco *et al.* (2007; 2008; 2011), en el cual utilizan como fase estacionaria florisil y cartuchos de NH₂-SPE (en una mini columna), y como eluentes 0,5 mL hexano y 2 mL de la mezcla hexano: diclorometano (65:35). Esta técnica de purificación, es por mucho la más eficiente en términos del bajo consumo de tiempo y solventes, en comparación con el método convencional de cromatografía en columna.

Naeth & Wilkinson (2008) sometieron el extracto orgánico

a limpieza mediante cromatografía con gel, para eliminar los lípidos, proteínas y polímeros que podrían interferir en los análisis, aplicando el método 3640 de la US-EPA. El material que permite este tipo de purificación es un copolímero entrecruzado de divinilbenceno y estireno (gel hidrofóbico). Usando disolventes orgánicos puede usarse para separar selectivamente macromoléculas polares del extracto de la muestra al favorecer su paso por el gel, reteniendo las moléculas de menor tamaño en los poros del gel. Los analitos estudiados se desplazan a través del gel con un disolvente orgánico de menor tamaño como cloruro de metileno.

Es importante señalar que las tendencias en el análisis de HAP en matrices ambientales se centran en la reducción de volúmenes de los extractos finales, debido a que mayores volúmenes acarrearán posibles pérdidas de los compuestos más volátiles a causa de la etapa de evaporación posterior.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL COMÚNMENTE EMPLEADAS

La caracterización y cuantificación de HAP es efectuada mediante las técnicas Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés), acoplada a detector de fluorescencia y/o UV-visible, y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS, por sus siglas en inglés). Ambas técnicas permiten la separación de un elevado número de moléculas con características estructurales similares, lo que las hace idóneas en este tipo de análisis. Los HAP comúnmente cuantificados son los 16 que han sido listados por la US-EPA como contaminantes principales: 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, teniendo en cuenta sus niveles de toxicidad y la abundancia natural de los mismos. Migaszewski *et al.* (2002) incluyen en su estudio la determinación de benzo[e]pireno y perileno.

Owczarek *et al.* (2001), Migaszewski *et al.* (2002), Domeño *et al.* (2006), Blasco *et al.* (2006; 2007; 2008; 2011) Naeth & Wilkinson (2008) y Guidotti *et al.* (2003; 2009) utilizaron la técnica de Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS) para la cuantificación de los HAP, referida en el método 8270 de la US-EPA. La gran eficiencia de columnas capilares sobre las empaquetadas permite el análisis de un gran número de analitos. Entre las columnas empleadas pueden mencionarse la HP-5MS (25 m x 0,20 mm x 0,33 µm) (Migaszewski *et*

al. 2002), DB5-MS (30 m x 0,250 mm x 0,25 μ m) y factor four VF5-ms (60 m x 0,250 mm x 0,25 μ m) (Domeño *et al.* 2006; Blasco *et al.* 2006; 2007; 2008 y 2011) y HP-5MS (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) (Guidotti *et al.* 2009). La fase estacionaria de la columna HP-5MS está basada en (5 %-fenil)-metilpolisiloxano, la Factorfour VF5-ms basada en 95% polidimetilsiloxano y 5% difenilsiloxano y la DB5-MS en 5 % fenil metil-polisiloxano.

Todos los autores coinciden en el empleo del método SIM (Selective Ion Monitoring, por sus siglas en inglés), empleando las masas características de cada uno de los compuestos, lo cual permite eliminar interferencias debido a la detección de otros compuestos en los mismos tiempos de retención de los HAP. En cuanto a los límites de cuantificación (LOQs), Owczarek *et al.* 2001 señalan un valor de 4 ng/g para todos los HAP; Domeño *et al.* (2006) y Blasco *et al.* (2006; 2007; 2008; 2011) reportan límites de detección (LODs) comprendidos entre 21 y 32 ng/g; Guidotti *et al.* (2003) reportan LOQs entre 0,5 y 3,6 ng/g y Guidotti *et al.* (2009) LOQs de 1 ng/g para todos los HAP.

Augusto *et al.* (2009), Shukla & Upreti (2009), Shukla *et al.* (2010), Gómez (2010), Fernández *et al.* (2011) y Satya *et al.* (2012) emplearon la técnica Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) para la cuantificación de los HAP, referida en el método 8310 de la US-EPA. La columna cromatográfica utilizada para este tipo de compuestos es la fase reversa C-18. Cabe mencionar la columna simétrica hecha por Waters específica para HAP (250 nm x 4,6 mm x 5 μ m) (Shukla & Upreti, 2009; Fernández *et al.* 2011; Shukla *et al.* 2010; Satya *et al.* 2012) y la 799250D-584 Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m, 250 nm x 4 mm) marca HP (Gómez, 2010). Augusto *et al.* (2009) utilizaron dos columnas acopladas para mejorar la separación de los analitos (Agilent C-18 y Phenomenex C-18).

Shukla & Upreti (2009), Shukla *et al.* (2010) y Satya *et al.* (2012) utilizan el detector UV-visible para la cuantificación de todos los HAP estudiados, seleccionando como longitud de onda 254 nm. Dicha longitud de onda también es seleccionada por Fernández *et al.* (2011) y Gómez (2010). Adicionalmente, Fernández *et al.* (2011) emplean la longitud de onda de 208 nm, debido a que en líneas generales los HAP de bajo peso molecular presentan una mayor sensibilidad ante 208 nm y los de mayor peso molecular a 254 nm. Sin embargo, en el caso de fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, la sensibilidad fue mayor ante 208 nm. La aplicación de detectores de fotodiodos en serie (UV) permite optimizar la longitud de onda para cada HAP. Es importante señalar que la detección por UV-visible tiene numerosas desventajas, en términos

de selectividad, sensibilidad y en no poder discriminar interferencias de la matriz, especialmente en matrices complejas, como es el caso de los líquenes. Por otra parte, el detector de fluorescencia es más selectivo (muchos componentes de la matriz no fluorescen) y sensible. Gómez (2010) utilizó como longitud de excitación 340 nm y de emisión 425 nm y Fernández *et al.* (2011) como longitud de excitación 375 nm y de emisión a 425 nm. A pesar de ello, no todos los HAP comúnmente estudiados fluorescen (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, criseno e indeno[1,2,3-cd]pireno no fluorescen), por lo que Augusto *et al.* (2009), Gómez (2010) y Fernández *et al.* (2011) emplearon ambos detectores (UV-visible y fluorescencia) acoplados para la cuantificación de los HAP. En cuanto a los LODs, Shukla & Upreti (2009) y Shukla *et al.* (2010) publican límites de detección comprendidos entre 10 y 30 ng/g, Fernández *et al.* (2011) encuentran LODs entre 8 y 519 ng/g, así como LOQs entre 250 y 1730 ng/g, dependiendo del HAP analizado, mientras que Satya *et al.* (2012) reportan LODs entre 8 y 50 ng/g y LOQs entre 10 y 107 ng/g para todos los HAP.

Gómez (2010) menciona que una de las principales ventajas mostrada por la técnica HPLC con respecto a GC/MS es el tiempo de análisis, siendo comúnmente mayor para GC/MS. Por otra parte, la mayor selectividad y mejor resolución de los picos arrojados por la técnica GC/MS, facilita la elucidación de isómeros de una manera mucho más eficiente, en comparación con la técnica HPLC. Esto último, debido al empleo del método SIM. Además, GC/MS permite la determinación de los HAP que no fluorescen junto con los que fluorescen, empleando un solo detector. En este sentido, Gómez (2010) recomienda emplear las técnicas instrumentales de manera conjunta para este tipo de estudios.

HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS, GEOQUÍMICAS Y TOXICOLÓGICAS EMPLEADAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En cuanto al tratamiento estadístico de los datos experimentales, resalta el empleo de estadística multivariada, específicamente de Análisis de Componentes Principales (ACP) (Shukla & Upreti, 2009; Blasco *et al.* 2008; Gómez, 2010; Fernández *et al.* 2011), 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. Owczarek *et al.* (2001), Blasco *et al.* (2008) y Augusto *et al.* (2009) efectúan pruebas de correlación de Pearson; Owczarek *et al.* (2001) con la finalidad de evaluar el grado de correlación entre los diferentes contaminantes determinados en los líquenes

(metales-HAP y entre los distintos HAP); Blasco *et al.* (2008) con el objeto de establecer relaciones presentes entre el índice de pureza atmosférica (IPA) y la concentración de HAP en los líquenes; 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, Blasco (2008), Augusto *et al.* (2009), Gómez (2010), Blasco *et al.* (2011) y Satya *et al.* (2012), realizan un análisis de varianza de una vía (ANOVA), el cual permite comprobar en el caso de Augusto *et al.* (2009) las diferencias significativas entre los perfiles de HAP en los diferentes medios, en el caso de Blasco (2008) y Blasco *et al.* (2011) las diferencias significativas entre los perfiles de HAP en distintas especies de líquenes, mientras que Gómez (2010) y Satya *et al.* (2012) determinan la presencia o no de diferencias significativas en la concentración de los compuestos estudiados entre las distintas localidades. Blasco (2008) y Blasco *et al.* (2011) aplican el análisis discriminante para determinar tendencias en cuanto al perfil de acumulación de las distintas especies de líquenes empleadas. Asimismo, Blasco *et al.* (2011) hacen uso de la Prueba de Turkey o Games-Howell.

A diferencia de los autores anteriores, Migaszewski *et al.* (2002), Guidotti *et al.* (2003; 2009), Blasco *et al.* (2006) y Shukla *et al.* (2010) 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.

Otra herramienta de gran utilidad empleada por distintos autores son las relaciones diagnósticas de fuentes de contaminación, que permiten inferir el origen de la mezcla de HAP presentes. Dichas relaciones han sido empleadas por Migaszewski *et al.* (2002), Blasco *et al.* (2006; 2007), Shukla & Upreti, (2009), Shukla *et al.* (2010), Gómez (2010), Fernández *et al.* (2011), Blasco *et al.* (2011) y Satya *et al.* (2012), estableciendo de esta forma la procedencia petrogénica y/o pirogénica (Fen/An, Flu/Pi, Naf/Fen, An/(An+Fen) y B[a]A/(B[A]A+Cri)) de los compuestos estudiados. Adicionalmente, algunas relaciones diagnósticas permiten especificar mucho más los procesos que aportan cantidades variables de HAP a la atmósfera: incendios (IP/(IP+B[g,hi]P) y Flu/(Flu+Pi), quema de maleza, material leñoso y/o carbón), emisiones vehiculares (B[a]P/B[g,h,i]P, quema de gasolina y/o diesel), entre otras fuentes.

Blasco *et al.* (2008; 2011) y Gómez (2010) emplean como parámetro la toxicidad equivalente (TEQ), para medir el potencial dañino de una determinada carga o mezcla de

HAP, en la cual se multiplica la concentración de cada HAP por el valor de toxicidad (TEF) asignado a cada HAP relativo al benzo[a]pireno. Por último, cabe destacar el uso de la relación Expuesto/Control (EC), empleada por Guidotti *et al.* (2009), calculada en términos de la relación entre la concentración del compuesto en el líquen después y antes de su exposición a las condiciones del ambiente urbano. Dicha herramienta permite observar el factor de acumulación para cada HAP en los especímenes de líquenes transplantados.

COMPARACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ACUMULATIVA PARA DISTINTAS ESPECIES DE LÍQUENES Y OTRAS MUESTRAS AMBIENTALES

La Tabla 1 resume las concentraciones de HAP determinadas en las distintas especies empleadas para el biomonitoreo de HAP, en distintos lugares del mundo y empleando ambas técnicas de muestreo (pasivo y activo). Resulta comprometedor efectuar comparaciones entre los valores de concentración de HAP totales obtenidos en los distintos estudios, debido a las diferentes modalidades de muestreo empleadas, a la gran variedad de espacios geográficos estudiados y a que se trata de especies de líquenes con disímiles características morfológicas y ecológicas que les permiten tener capacidades de bioacumulación particulares. A pesar de esto, puede observarse que son los líquenes de morfología netamente foliácea los que muestran mayores niveles de concentración de HAP totales. Asimismo, se observa como en aquellos trabajos en los cuales los muestreos fueron de tipo pasivo, los valores de concentración tienden a ser mayores que aquellos en los que los líquenes fueron transplantados de una localidad de referencia a la zona de estudio, lo cual puede relacionarse directamente con el periodo tiempo en el cual estos organismos han estado expuestos a la atmósfera estudiada, así como a su adaptación a la misma.

Gran parte de los estudios indican que los líquenes tienden a presentar un perfil de HAP rico en compuestos de 2, 3 y 4 anillos, asociados con la fase gaseosa con respecto a los compuestos de 5 y 6 anillos, asociados con la las partículas atmosféricas (Owczarek *et al.* 2001; Migaszewski *et al.* 2002; Blasco *et al.* 2006 y 2008; Augusto *et al.* 2009; Guidotti *et al.* 2003 y 2009, Shukla & Upreti, 2009; Shukla *et al.* 2010; Fernández *et al.* 2011; Blasco *et al.* 2011; Satya *et al.* 2012). Sin embargo, Blasco (2008), Shukla *et al.* (2010), Gómez (2010) y Blasco *et al.* (2011) revelan que dicho perfil dependerá en muchos casos de la morfología del líquen empleado, señalando que los líquenes de morfología fruticuloso y crustáceo-escuamuloso tienden a acumular preferiblemente HAP asociados a la fase gaseosa, mientras

que aquellos con morfología foliácea tienden a retener más fácilmente en su superficie los HAP asociados las partículas (monitorizan el espectro completo de HAP). Dicho aspecto tiene implicaciones en cuanto a la elección de la especie adecuada de acuerdo a la finalidad específica que persiga el estudio, debido a que uno u otro tipo de líquen permitirán monitorizar una información distinta. En este sentido, los líquenes más resistentes a la contaminación atmosférica permitirán monitorizar una mezcla más tóxica de HAP.

Migaszewski *et al.* (2002) concluyen que la considerable variabilidad de la concentración de HAP en diferentes especies de plantas, muestra la diversidad en la bioacumulación de los mismos. 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 (5 a 10 veces mayores) a las de las plantas vasculares del mismo entorno. De igual forma, Augusto *et al.* (2009) encuentran que los líquenes acumulan concentraciones de HAP más altas que las agujas de pino atribuyéndolo a que ellos absorben todos los nutrientes directamente de la atmósfera y a que su carencia de cutícula les permite exponer toda su superficie y captar contaminantes, más que otros biomonitores como las agujas de pino. Migaszewski *et al.* (2002) y Augusto *et al.* (2009) encontraron que el patrón de HAP presente en los líquenes es diferente al de la vegetación adyacente, teniendo que en las cortezas de los árboles y las agujas de pino dominan los HAP de 3 anillos mientras que en los líquenes dominan los HAP de 4 anillos, lo cual es atribuido a diferencias morfológicas y de porosidad entre las ramas de los árboles y los líquenes.

Augusto *et al.* (2009) hallaron que los líquenes acumulan concentraciones de HAP más altas que los suelos 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), dichos resultados coinciden con los de Migaszewski *et al.* (2001) que encontraron mayores concentraciones de HAP en los líquenes que en el suelo. En cuanto al perfil encontrado en los suelos, Migaszewski *et al.* (2002) determinaron que en comparación con los líquenes en los cuales los compuestos de 3 anillos son más abundantes que los de 5 anillos, en los suelos dicha abundancia está invertida, asociado precisamente a que los HAP de 5 anillos suelen quedar sedimentados (asociados con la fase de partículas), mientras que los de 3 anillos están asociados a la fase gaseosa.

Blasco *et al.* (2006) determinaron que las concentraciones de HAP partículas se encuentran 2 órdenes de magnitud

por encima de las concentraciones de HAP en los líquenes. Blasco *et al.* (2006) y Augusto *et al.* (2009) coinciden en que en ambos perfiles (el de las partículas y el de los líquenes) los HAP de 4 anillos son los más abundantes. Blasco *et al.* (2006) concluyen que existe una buena correlación entre los niveles de HAP hallados en los líquenes y en las muestras de aires en las distintas estaciones de muestreo, además de coincidencias significativas en las relaciones diagnósticas empleadas, por lo que sugiere que son excelentes biomonitores de la calidad del aire.

Blasco *et al.* (2006), Augusto *et al.* (2009) y Blasco *et al.* (2011) señalan un alto contenido de HAP de 2 y 3 anillos en los líquenes mientras que las partículas presentan un mayor contenido de HAP de 5 y 6 anillos, lo cual está directamente relacionado a que los HAP de 5 y 6 anillos se encuentran en las partículas, mientras que los de 2 y 3 anillos en la fase gaseosa. Shukla *et al.* (2010) y Gómez (2010) indican que la biosíntesis de metabolitos secundarios por parte de los líquenes, comúnmente dépsidos y depsidonas, además de otras sustancias liquénicas, constituidos por anillos ricos en radicales -OH proveen el grupo hidroxilo para la formación de aductos. Esto explicaría la elevada acumulación de compuestos de 2 y 3 anillos en los líquenes, la cual se infiere es debida a que los líquenes analizados contienen dépsidos y depsidonas con sitios -OH activos las cuales se combinan con los HAP formando aductos.

Blasco *et al.* (2006) aseveran que ambas técnicas de muestreo (biomonitorio y monitoreo convencional) proveen de información complementaria, debido a que los líquenes registran información de la contaminación atmosférica por prolongados periodos (de forma integrada) mientras que las muestras de partículas dan información generada durante el periodo de muestreo (puntual).

Por último, Blasco *et al.* (2006) determinan la existencia de una correlación entre el significado IPA y la concentración de HAP característicos de procesos de combustión (constituidos 4 o más anillos) La combinación de ambos métodos señala que valores bajos del Índice de Pureza Atmosférica (IPA) y por tanto una flora liquénica escasa, puede asociarse con la presencia de mezclas de HAP de toxicidad alta y se relaciona con un contenido elevado en la mayoría de los HAP recomendados como indicadores de la calidad del aire (fenantreno, fluoranteno, pireno, dibenzo[a,h]antraceno y benzo[g,hi]perileno).

Tabla 1. Especies de líquenes empleadas en diferentes áreas geográficas, con sus respectivas concentraciones promedio o rangos de concentración de HAP totales ($\mu\text{g/g}$, peso seco)

Especie	Lugar	ΣHAP ($\mu\text{g/g}$)	Nota	Referencia
<i>Acarospora bullata</i> (C-E)	Mana Village, Uttaranchal, Garhwal Himalayas	30,07	P, área rural	Shukla <i>et al.</i> 2010
<i>Aspicilia praeradiosa</i> (C-E)	Mana Village, Uttaranchal, Garhwal Himalayas	22,98	P, área rural	Shukla <i>et al.</i> 2010
<i>Cladina arbuscula</i> (Fc)	Northwest Territories, Canadá	ND	P, Mina de diamante Diavik	Naeth & Wilkinson, 2008
<i>Dermatocarpon vellereum</i> (F)	Joshimath, Uttaranchal, Garhwal Himalayas	33,72	P, área rural	Shukla <i>et al.</i> 2010
<i>Dimelaena oreina</i> (C-E)	Mana Village, Uttaranchal, Garhwal Himalayas	18,00	P, área rural	Shukla <i>et al.</i> 2010
<i>Evernia prunastri</i> (F-Fc)	Valles pirenaicos del Aspe y del Aragón	0,444-6,240	P, ecosistema natural	Blasco, 2008
<i>Flavocentraria Nivalis</i> (Fc)	Northwest Territories, Canadá	ND	P, Mina de diamante Diavik	Naeth & Wilkinson, 2008
<i>Flavocentraria cucullata</i> (Fc)	Northwest Territories, Canadá	ND	P, Mina de diamante Diavik	Naeth & Wilkinson, 2008
<i>Heterodermia angustiloba</i> (F)	Badrinath, Uttaranchal, Garhwal Himalayas	32,98	P, área urbana	Shukla <i>et al.</i> 2010
<i>Hypogymnia physodes</i> (F)	Región surcentral de Polonia	1,184-2,253	P, Holy Cross Mountains	Migaszewski <i>et al.</i> 2002
<i>Lobaria pulmonaria</i> (F)	Valles pirenaicos del Aspe y del Aragón	0,238-1,093	P, ecosistema natural	Blasco, 2008
<i>Parmelia sulcata</i> (F)	Valles pirenaicos del Aspe y del Aragón	0,408-2,320	P, ecosistema natural	Blasco, 2008
<i>Parmotrema hypoleucinum</i> (F)	Región de Sines al suroeste de Portugal	0,096-0,874	P, área urbana y altamente industrializada	Augusto <i>et al.</i> 2009
<i>Parmotrema sancti-angelii</i> (F)	Ciudad de Caracas	2,30-6,47	A, área urbana	Gómez, 2010
<i>Phaeophyscia hispidula</i> (F)	DehraDun city, Uttaranchal, Garhwal Himalayas	3,38-25,01	P, área urbana	Shukla & Upreti, 2009
<i>Phaeophyscia hispidula</i> (F)	DehraDun city y Badrinath, Uttaranchal, Garhwal Himalayas	0,683-7,69	P, área urbana	Shukla <i>et al.</i> 2010
<i>Phaeophyscia orbicularis</i> (F)	Srinagar city, Uttaranchal, Garhwal Himalayas	2,653	P, área urbana	Shukla <i>et al.</i> 2010
<i>Physcia adscendens</i> (F)	Ciudad de Rieti	1,879-0,217	P, área urbana	Owczarek <i>et al.</i> 2001
<i>Pseudevernia furfuracea</i> (F-Fc)	Valles pirenaicos del Aspe y del Aragón	0,318-2,699	P, ecosistema natural	Blasco, 2008
<i>Pseudevernia furfuracea</i> (F-Fc)	Ciudad de Rieti	0,056-0,159	A, área urbana	Guidotti <i>et al.</i> 2003
<i>Pseudevernia furfuracea</i> (F-Fc)	Viterbo	0,168-0,395	A, área urbana	Guidotti <i>et al.</i> 2009
<i>Pyxine coralligera</i> (F)	Ciudad de Caracas	0,24-9,08	P, área urbana	Fernández <i>et al.</i> 2011
<i>Ramalina farinacea</i> (F-Fc)	Valles pirenaicos del Aspe y del Aragón	0,336-1,732	P, ecosistema natural	Blasco, 2008
<i>Rinodina sophodes</i>	Ciudad Kanpur	0,189-0,494	P, área urbana e industrial	Satya <i>et al.</i> 2012
<i>Usnea sp.</i> (Fc)	Valles pirenaicos del Aspe y del Aragón	0,384-2,132	P, ecosistema natural	Blasco, 2008
<i>Usnea sp.</i> (Fc)	Ciudad de Caracas	1,68-2,83	A, área urbana	Gómez, 2010
<i>Xanthoria parietina</i> (F)	Región de Sines al suroeste de Portugal	0,167-0,256	P, área urbana	Augusto <i>et al.</i> 2009

F (Foliáceo), Fc (Fruticuloso), F-Fc (Entre Foliáceo y Fruticuloso), C-E (Entre Crustáceo y escumuloso), P (Pasivo), A (Activo), ND (no detectado).

PERSPECTIVAS FUTURAS DE ESTE TIPO DE ESTUDIOS AMBIENTALES

A pesar de que en la última década se ha avanzado mucho en el estudio de los líquenes como biomonitores de la contaminación atmosférica por HAP, aún quedan aspectos importantes por dilucidar e investigar. Entre dichos aspectos pueden ser enumerados los siguientes:

1. Protocolizar de la forma más rigurosa posible la etapa de muestreo, poniendo especial énfasis en los cuidados que deben tenerse al transplantar los líquenes de sus ecosistemas naturales a un área contaminada (muestreo activo).
2. Estandarizar las metodologías de extracción y purificación de los HAP en matrices liquenáceas a nivel internacional, seleccionando dispositivos que presenten mayor eficiencia en términos de cantidad de muestra, tiempo del tratamiento y cantidad de solvente empleado (SPE, SPME, DSASE, DSWE, SFE, entre otras).
3. Elaborar un material de referencia certificado para HAP en líquenes, que permita validar las metodologías empleadas, así como garantizar la calidad que ameritan los resultados arrojados por este tipo de estudios, teniendo en cuenta las limitaciones que presenta el enriquecimiento (Spike) de muestras mediante patrones de dichos compuestos, comúnmente mezclados (Standard Mix).
4. Optimizar las condiciones de separación y cuantificación de los HAP en matrices liquenáceas mediante las técnicas HPLC y CG/EM.
5. Efectuar estudios que conduzcan a la selección de al menos un HAP trazador de la contaminación por este grupo de compuestos (benzo[b]fluoranteno, benzo[k] fluoranteno y dibenzo[a,h]antraceno son posibles opciones), teniendo en cuenta lo complejo del análisis de compuestos con propiedades fisicoquímicas tan heterogéneas de forma simultánea. Dicho compuesto debe ser típico de actividades humanas, importante desde el punto de vista toxicológico y poco reactivo en la atmósfera, para facilitar su detección.
6. Establecer normativas a escalas regionales, nacionales y locales de límites máximos permisibles para este tipo de compuestos en líquenes, teniendo en cuenta la especie empleada y la zona geográfica de estudio.

7. Realizar estudios que muestren las variaciones estacionales en cuanto al contenido de HAP en líquenes en zonas tropicales y templadas, así como de variaciones altitudinales (referentes a los líquenes corticícolas o epífitos)
8. Investigar a fondo los mecanismos de transporte de los HAP a través de las membranas celulares de los líquenes, para poder completar las interpretaciones al respecto.

AGRADECIMIENTO

A Irania Fuentes, Kizzy De Freitas, Melesio Quijada, María Gabriela Réquíz, José Gregorio Díaz, Erika Arguello, Wilbert Hurtado y Jesús Pérez, quienes de una u otra forma, directa e indirectamente han participado y colaborado en la concreción de esta revisión.

REFERENCIAS

- 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.
- BASILE, A., SORBO, S., APRILE, G., CONTE, B., COBIANCHI, R. (2008). Comparison of the heavy metal bioaccumulation capacity of an epiphytic moss and an epiphytic lichen. *Environmental pollution*, 151 (2): 401-407.
- BENNETT, J. & BENSON, S. (2005). Elemental content of lichens of the Point Reyes Peninsula, northern California. *Science of the Total Environment*, 343: 199-206.
- BERGAMASCHI, L., RIZZIO, E., GIAVERI, G., LOPPI, S., GALLORINI, M. (2007). Comparison between the accumulation capacity of four lichen species transplanted to a urban site. *Environmental Pollution*, 148: 468-476.
- BERNASCONI, E., DE VITO, I., MARTÍNEZ, L., RABA, J. (2000). Lichen *Usnea densirostra* como bioindicador de metales pesados. Determinación por ICP-AES acoplado con nebulizador ultrasónico. *Ars Pharmaceutica*, 41 (3): 249-257.
- BLASCO, M., DOMEÑO, C., NERÍN, C. (2006). Use of Lichens as Pollution Biomonitors in Remote Areas: Comparison of PAHs Extracted from Lichens and Atmospheric

- Particles Sampled in and Around the Somport Tunnel (Pyrenees). *Environmental Science & Technology*, 40: 6384-6391.
- BLASCO, M., DOMEÑO, C., BENAYEB, K., NERÍN, C. (2007). Solid –phase clean-up procedure for the analysis of PAHs in lichens. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 87: 833-846.
- 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.
- 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, España.
- BLASCO, M., DOMEÑO, C., LÓPEZ, P., NERÍN, C. (2011). Behaviour of different lichen species as biomonitors of air pollution by PAHs in natural ecosystems. *Journal of Environmental Monitoring*, 13: 2588-2596.
- BRANQUINHO, C., CATARINO, F., BROWN H., PEREIRA M., SOARES, A. (1999). Improving the use of lichens as biomonitors of atmospheric metal pollution. *The Science of the total environment*, 232: 67-77.
- BRANQUINHO, C., GAIO-OLIVEIRA, G., AUGUSTO, S., PINHO, P., MÁGUAS, C., CORREIA, O. (2008). Biomonitoring spatial and temporal impact of atmospheric dust from a cement industry. *Environmental Pollution*, 151: 292-299.
- BRUNIALTI, G. & FRATI, L. (2007). Biomonitoring of nine elements by the lichen *Xanthoria parietina* in Adriatic Italy: A retrospective study over a 7- year time span. *Science of the Total Environment*, 387 (1-3): 289-300.
- CARIGNAN, J., SIMONETTI, A., GARIÉPY, C. (2002). Dispersal of atmospheric lead in northeastern North America as recorded by epiphytic lichens. *Atmospheric Environment*, 36: 3759-3766.
- CARRERAS, H. & PIGNATA, M.L. (2002). Biomonitoring of heavy metals and air quality in Cordoba City, Argentina, using transplanted lichens. *Environmental Pollution*, 117: 77–87.
- CARRERAS, H. & PIGNATA, M. (2007). Effects of the heavy metals Cu+2, Ni+2, Pb+2, and Zn+2 on some physiological parameters of the lichen *Usnea amblyoclada*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 59–66.
- CARRERAS, H.A., RODRIGUEZ, J.H., GONZÁLEZ, E.D., WANNANZ, F., FERREYRA ARCIA, C.A., PIGNATA, M.L. (2009). Assesment of the relationship between total suspended particles and the response of two biological indicators transplanted to an urban area central Argentina. *Atmospheric Environment*, 431 (8): 2944-2949.
- CLOQUET, C., CARIGNAN, J., LIBOUREL, G. (2006). Atmospheric pollutant dispersion around an urban area using trace metal concentrations and Pb isotopic compositions in epiphytic lichens. *Atmospheric Environment*, 40: 574–587.
- CONTI, M.E., CECCHETTI, G. (2001). Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review. *Environmental Pollution*, 114: 471-492.
- CONTI, M., PINO, A., BOTRE, F., BOCCA, B., ALIMONTI, A. (2009). Lichen *Usnea barbata* as biomonitor of airborne elements deposition in the Province of Tierra del Fuego (Southern Patagonia , Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (4): 1082-1089.
- DOMEÑO, C., BLASCO, M., SANCHEZ, C., NERIN, 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.
- FERNÁNDEZ, R., GALARRAGA, F., BENZO, Z., MÁRQUEZ, G., FERNÁNDEZ, A., RÉQUIZ, M., HERNÁNDEZ, J. (2011). Lichens as biomonitors for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Caracas Valley, Venezuela. *Intern J Environ Anal Chem*, 91 (3): 230-240.
- FIGUEIREDO, A., NOGUEIRA, C., SAIKI, M., MILIAN, F., DOMINGOS, M. (2007). Assessment of atmospheric metallic pollution in the metropolitan region of São Paulo, Brazil, employing *Tillandsia usneoides* L. as Biomonitor. *Environmental Pollution*, 145: 279-292.
- FUGA, A., SAIKI, M., MARCELLI, M., SALDIVA, P. (2008). Atmospheric pollutants monitoring by analysis of epiphytic lichens. *Environmental Pollution*, 151: 334-

- 340.
- GARTY, J., TOMER, S., LEVIN, T., LEHR, H. (2003). Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel. *Environmental Research*, 91: 186–198.
- GODINHO, R., WOLTERBEEK, H., VERBURG, T., FREITAS, M. (2008). Bioaccumulation behaviour of transplants of the lichen *Flavoparmelia caperata* in relation to total deposition at a polluted location in Portugal. *Environmental Pollution*, 151: 218-325.
- GÓMEZ, H. (2010). Evaluación de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos, empleando el liquen *Parmotrema sancti-angelii* y aplicando un muestreo de tipo activo en la ciudad de Caracas. Tesis de licenciatura no publicada, Departamento de Geoquímica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- GUIDOTTI, M., STELLA, D., OWCZARECK, 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.
- HAWKSWORTH, DL., ITURRIAGA, T., CRESPO, A. (2005). Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos – Revisión. *Rev Iberoam Micol*, 22: 71-82.
- JERAN, Z., JACIMOVIC, R., BATIC, F., MASVSAR, R. (2002). Lichens as integrating air pollution monitors. *Environmental Pollution*, 120: 107-113.
- 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.
- MONNET, F., BORDAS, F., DELUCHAT, V., BAUDU, M. (2006). Toxicity of copper excess on the lichen *Dermatocarpon luridum*: Antioxidant enzyme activities. *Chemosphere*, 65: 1806-1813.
- Naeth, M., Wilkinson, S. (2008). Lichens as Biomonitors of Air Quality around a Diamond Mine, Northwest Territories, Canada – Technical Reports: Atmospheric Pollutants And Trace Gases. *J Environ Qual*, 37: 1675–1684.
- NIMIS, P., ANDREUSSI, S., PITTAO E. (2001). The performance of two lichen species as bioaccumulators of trace metals. *Science of the total environment*, 275: 43-51.
- OWCZAREK, M., GUIDOTTI, M., BLASI, G., DE SIMONE, C., DE MARCO, A., SPADONI, M. (2001). Traffic pollution monitoring using lichens as bioaccumulators of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Fresenius Environmental Bulletin*, 10: 42-45.
- 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.
- RUSTICHELLI, C., VISIOLI, G., KOSTECKA, D., VURRO, E., SANITA DI TOPPI, L., MARMIROLI, N. (2008). Proteomic analysis in the lichen *Physcia adscendens* exposed to cadmium stress. *Environmental Pollution*, DOI:10.1016/j.envpol.2008.04.010.
- SAIKI, M., FUGA, A., ALVES, E. R., VASCONCELLOS, M.B.A., MARCELLI, M.P. (2006). Biomonitoring of the atmospheric pollution using lichens in the metropolitan area of São Paulo city, Brazil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 271 (1): 213-219.
- SCERBO, R., RISTORI, T., POSSENTI, L., LAMPUGNANI, L., BARALE, R., BARGHIGIANI, C. (2002). Lichen (*Xanthoria parietina*) biomonitoring of trace element contamination and air quality assessment in Pisa Province (Tuscany, Italy). *The science of the Total Environment*, 286: 27-40.
- SATYA, UPRETI, D. K., PATEL, D. K. (2012). *Rinodina sophodes* (Ach.) Massal.: a bioaccumulators of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Kanpur City, India. *Environ Monit Assess* 184: 229–238.
- SHUKLA, V. & UPRETI, D. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in lichen, *Phaeophyscia hispidula* of DehraDun City, Garhwal Himalayas. *Environ Monit Assess*, 149 (14): 1-7.

- SHUKLA, V., UPRETI, D., PATEL, D., TRIPATHI, R. (2010). Accumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in some lichens of Garhwal Himalayas, India. *International Journal of Environment and Waste Management*, 5 (1-2): 104-113.
- SORBO, S., APRILE, G., STRUMIA, S., CASTALDO, C., COBIANCHI, A., LEONE, A., BASILE, A. (2008). Trace element accumulation in *Pseudovernia furfurácea* (L) Zopf exposed in Italys so called Tiangle of Death. *Science of the Total Environment*, 407(1): 647-654.
- TUNCEL, S.G., YENISOY, S., DOGANGUN, A. (2004). Determination of metal concentrations in lichen samples by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy technique after applying different digestion procedures. *Talanta*, 66 (2): 273-277.
- US-EPA. Wastes - Hazardous Waste - Test Methods. Recuperado el 20 de marzo de 2011, de <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/>
- VARESCHI, V. (1953). La influencia de los bosques y parques sobre el aire de la ciudad de Caracas. *Acta Cient. Venez.*, 4: 89 - 95.
- WILLIAMSON, B.J, MIKHAILOVA, I., PURVIS, O.W. (2004). SEM-EDX analysis in the source apportionment of particulate matter on *Hypogymnia physodes* lichen transplants around the Cu smelter and former mining town of Karabash, South Urals, Russia. *The science of the total environment*, 322: 139–154.
- WOLTERBEEK, B. (2002). Biomonitoring of trace elements in air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental pollution*, 120: 11-21.
- ZSCHAU, T., GETTY, S., GRIES, C., AMERON, Y., ZAMBRANO, A., NASH, T. (2003). Historical and current atmospheric deposition to the epilithic lichen *Xanthoparmelia* in Maricopa County, Arizona. *Environmental Pollution*, 125: 21–30.