



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
DMFS-CLAR PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN CULTIVOS DE *Colpoda cucullus*”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. F. B. JOSÉ DE JESÚS OLMOS ESPEJEL



TUTOR: DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

AÑO: 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por su asesoría y el apoyo que me ha dado durante todo este tiempo. *Muchas gracias.*

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por darme la oportunidad de formarme como profesional y como persona.

A mis compañeros del laboratorio Anexo 3-D.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por la beca de Maestría otorgada.

Al proyecto **PAPIIT-IN205707-2** “Desarrollo de un método para la determinación de contaminantes orgánicos en protozoarios” de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** (DGAPA) por el apoyo otorgado.

Al *Dr. Víctor Manuel Luna Pabello* y a la *M. en B. Lourdes Patricia Castro Ortiz* del laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM, por facilitar los cultivos de protozoarios y por las sugerencias que sin duda hicieron posible gran parte de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones durante la revisión de este trabajo.

- Dr. Rafael Villalobos Pietrini
- Dra. Luz Elena Vera Ávila.
- Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
- Dra. Fabiola Monroy Guzmán
- Dr. Eduardo Rodríguez De San Miguel Guerrero

Dedicado con cariño a mis hermanos *Tania* y *Giovanny*.

Nada que pueda conseguirse sin pena y sin trabajo es verdaderamente valioso.

Joseph Addison (1672-1719)

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de la Dra. Martha Patricia
García Camacho del laboratorio de Análisis de Trazas en el Anexo 3-D
del edificio A de la Facultad de Química, UNAM.

Parte de este trabajo fue presentada en:

III Congreso de Ecotoxicología y Química Ambiental. Facultad de Ciencias, UNAM.
México, D. F. 7 al 12 de Abril de 2008. *“Desarrollo de un método analítico para HAP’s en
protozoarios por HPLC”*. J. de J. Olmos Espejel y M. P. García Camacho. *Cartel*.

XXII Congreso Nacional de Química Analítica. Mérida, Yucatán. 25 al 27 de junio de 2008.
*“Desarrollo y validación de una metodología para extracción de HAP’s en cultivos de
Colpoda cucullus”*. J. de J. Olmos Espejel y M. P. García Camacho. *Presentación Oral*.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de tablas	
Índice de figuras	
Glosario de términos	
Resumen	I
Abstract	II
Introducción	III
Objetivos	V
Capítulo 1. Antecedentes	1
1.1. Microorganismos y contaminación.	1
1.1.1. Estudios recientes de los efectos de contaminantes orgánicos en microorganismos.	2
1.1.2. Determinación de contaminantes en microorganismos	5
1.2. Características del microorganismo <i>Colpoda cucullus</i> .	8
1.3. Propiedades de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's)	10
1.3.1. Estructura Química de los HAP's.	10
1.3.2. Fuentes de producción de los HAP's y usos.	13
1.3.3. Toxicología y metabolismo de los HAP's.	15
1.3.4. Presencia y comportamientos de los HAP's en el medio ambiente.	19
1.3.5. Presencia en México de los HAP's.	21
1.3.6. Propiedades fisicoquímicas.	24
1.4. Análisis de HAP's por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).	26
1.5. Extracción en Fase Sólida (EFS).	30
1.5.1. Factores que afectan a la EFS.	33
1.5.2. Parámetros de la EFS.	34
1.5.3. Ventajas de la EFS.	41
1.5.4. Extracción de HAP's por EFS en muestras acuosas.	41
1.6. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).	44

1.6.1. Factores que afectan a la DMFS.	45
1.6.2. Ventajas de la DMFS como técnica de extracción.	49
Capítulo 2. Desarrollo experimental.	50
2.1 Materiales y equipos.	50
2.1.1 Sistema Cromatográfico.	50
2.1.2 Materiales y equipo para la obtención de la muestra.	50
2.1.3 Preparación de la muestra.	51
2.1.4 Otros equipos y accesorios utilizados.	51
2.1.5 Disolventes y reactivos.	51
2.1.6 Preparación de disoluciones estándar de HAP's.	52
2.2 Experimentación.	52
2.2.1 Optimización y validación de la separación analítica y la detección de los HAP's por CLAR-DF	54
2.2.1.1 Condiciones óptimas para la detección.	54
2.2.1.2 Condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los HAP's.	54
2.2.1.3 Validación del sistema cromatográfico.	55
2.2.1.3.1 Linealidad.	55
2.2.1.3.2 Límites de detección y cuantificación.	55
2.2.1.3.2 Precisión.	56
2.2.2 Obtención de la muestra de protozoarios libre de materia orgánica.	56
2.2.3 Desarrollo y validación de la DMFS para la extracción de HAP's en protozoarios.	57
2.2.3.1 Preparación de la columna de dispersión.	57
2.2.3.2 Optimización de la elución de los HAP's. DMFS con estándar.	57
2.2.3.3 Optimización de la elución selectiva de los HAP's. DMFS con estándares y muestras de protozoarios.	59
2.2.3.4 Validación del método por DMFS-CLAR. Ensayos sin muestra.	60
2.2.3.5 Validación del método por DMFS-CLAR. Ensayos con protozoarios.	60
2.2.4 Optimización y validación del método de extracción de HAP's en medios de cultivos líquidos por la técnica de EFS.	61
2.2.4.1 Ensayos de retención y elución.	61

2.2.4.2 Validación del método por EFS con muestras de agua.	62
2.2.4.3 Validación del método por EFS con muestras de medios de cultivo líquidos sin microorganismos.	63
2.2.5 Aplicación del método a muestras de cultivo expuestas a los HAP's.	64
2.2.5.1 Pruebas testigo en los cultivos de <i>C. cucullus</i> .	64
2.2.5.2 Ensayos de exposición de protozoarios a los HAP's.	65
Capítulo 3 Resultados y discusión.	66
3.1 Optimización y validación de la separación analítica y la detección de los HAP's por CLAR-DF.	66
3.1.1 Condiciones óptimas para la detección.	66
3.1.2 Condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los HAP's.	66
3.1.3 Linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación del sistema cromatográfico.	69
3.2 Obtención de la muestra de protozoarios libre de materia orgánica.	72
3.3. Desarrollo y validación de la DMFS para la extracción de HAP's en protozoarios.	76
3.3.1 Optimización de la elución de los HAP's. DMFS con estándar.	76
3.3.2 Optimización de la elución selectiva de los HAP's. DMFS con estándares y muestras de protozoarios.	79
3.3.3 Validación del método por DMFS-CLAR. Ensayos sin muestra.	80
3.3.4 Validación del método por DMFS-CLAR. Ensayos con protozoarios.	81
3.4. Optimización y validación del método de extracción de HAP's en medios de cultivos líquidos por la técnica de EFS.	82
3.4.1 Ensayos de retención y elución.	82
3.4.2 Limpieza de interferentes.	86
3.4.3 Validación del método por EFS para la extracción de HAP's en agua.	88
3.4.4 Validación del método por EFS con muestras de medios de cultivo líquidos sin microorganismos.	90
3.5. Aplicación del método a muestras de cultivos expuestos a los HAP's.	92
3.5.1 Pruebas control en los cultivos de <i>C. cucullus</i> .	92
3.5.2 Ensayos de exposición de protozoarios a los HAP's	93

Conclusiones	105
Recomendaciones	106
Bibliografía.	107
Anexo I	116
Anexo II	118
Anexo III	121

ÍNDICE DE TABLAS

	Página	
Tabla 1.1	Publicaciones recientes del estudio de contaminantes orgánicos en microorganismos.	4
Tabla 1.2	Publicaciones recientes del estudio de contaminantes inorgánicos en algunos organismos.	6
Tabla 1.3	Porcentaje de colectas tomadas de diferentes hábitats que contuvieron al protozooario <i>Colpoda cucullus</i>	9
Tabla 1.4	Propiedades de algunos Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	12
Tabla 1.5	HAP's considerados como sustancias potencialmente cancerígenas y genotóxicas	18
Tabla 1.6	Ejemplos típicos de concentraciones de algunos HAP's en el medio ambiente	19
Tabla 1.7	Magnitud de las actividades antropogénicas que pueden generar emisiones que contienen HAP's.	21
Tabla 1.8	Concentraciones de HAP's en diferentes matrices en México.	23
Tabla 1.9	Límites máximos permisibles en suelos según la NOM-138- SEMARNAT/SS-2003 y niveles de limpieza en suelos en Estados Unidos (en mg/kg).	24
Tabla 1.10	Métodos publicados recientemente para la determinación de HAP's usando la técnica de CLAR.	27
Tabla 2.1	Ensayos para optimizar la obtención de la muestra de protozoarios por centrifugaciones.	57
Tabla 2.2	Ensayos para optimizar la extracción de los HAP's.	58
Tabla 2.3	Ensayos para optimizar la elución selectiva de los HAP's	59
Tabla 3.1	Longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas en el análisis de lo compuestos.	66
Tabla 3.2	Orden de elución de los HAP's en estudio en la columna C18. Fase móvil a un flujo de 1 mL min ⁻¹ y composición de MeOH variable para cada ensayo.	67
Tabla 3.3	Resultados de la precisión del sistema cromatográfico. Coeficientes de variación % del área para 5 inyecciones a dos niveles de concentración.	70
Tabla 3.4	Repetitividad, límites de detección y cuantificación del sistema cromatográfico (inyección de 20 µL)	71

Tabla 3.5	Ensayo 1. Elución de los compuestos con 100% de acetonitrilo. Fortificación a 16 ng g ⁻¹ de fase. Cartuchos empacados con 0.1 g de fase.	76
Tabla 3.6	Ensayo 2. Elución de los compuestos con mezclas agua: acetonitrilo de polaridad decreciente. Fortificación a 16 ng g ⁻¹ de fase. Cantidad de fase utilizada 0.1 g.	77
Tabla 3.7	Ensayo 3. Optimización de la limpieza de interferentes. Fortificación a 16 ng g ⁻¹ de fase. Cantidad de fase utilizada 0.1 g.	78
Tabla 3.8	Resultados de la validación de la técnica de DMFS sin muestra.	80
Tabla 3.9	Resultados de la validación del método de extracción de HAP's por DMFS en muestras de protozoarios y análisis por HPLC	81
Tabla 3.10	Resultados completos de la optimización de la EFS en agua. Fortificación a 0.8 ng/mL de cada compuesto.	84
Tabla 3.11	Optimización de la limpieza de interferentes en EFS. Fortificación a 0.8 ng mL ⁻¹ de muestra. Cantidad de muestra utilizada 15 mL de cultivo sin protozoarios.	87
Tabla 3.12	Resultados de la validación del método por EFS-HPLC en muestras de agua grado cromatográfico.	89
Tabla 3.13	Resultados de la validación del método por EFS-CLAR en medios de cultivo libres de protozoarios.	90
Tabla 3.14	Cantidades de HAP's recuperadas por EFS en los cultivos control de adsorción a los diferentes tiempos de exposición.	94
Tabla 3.15	Cantidades de HAP's recuperadas en las muestras de protozoarios sometidas a diferentes tiempos de exposición.	95
Tabla 3.16	Cantidades de HAP's recuperadas en las muestras de cultivo líquido libre de protozoarios sometidos a diferentes tiempos de exposición.	99
Tabla 3.17	Cantidades de HAP's recuperadas en las muestras de cultivo líquido libre de protozoarios sometidos a diferentes tiempos de exposición.	102

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 <i>Colpoda inflata</i> . Micro-fotografía electrónica de una célula vegetativa (A). Micro-fotografía óptica de un quiste de reproducción (B) presentando micronúcleo (m), macronúcleo (M) y una cromatina macronuclear (e). Micro-fotografía electrónica de un quiste de resistencia (C). Barra = 5 μ m	9
Figura 1.2 <i>Colpoda cucullus</i> . Micro-fotografías electrónica (A) y óptica (B) de una célula vegetativa.	10
Figura 1.3 Estructura química de algunos HAP's.	11
Figura 1.4 Posible mecanismo para la formación de HAP's durante la combustión de materia orgánica.	13
Figura 1.5 Reacciones conocidas del metabolismo del antraceno y del fenantreno por <i>P. chrysosporium</i> .	20
Figura 1.6 Rutas de eliminación de los HAP's durante su descomposición bioquímica en suelo.	20
Figura 1.7 Algunas formas de eluir los disolventes en la EFS.	31
Figura 1.8 Esquema general de un experimento de EFS.	33
Figura 1.9 Similitud entre la EFS y la cromatografía de líquidos. a) Perfil de fuga obtenido en el monitoreo del efluente de una precolumna o cartucho de EFS. b) Pico de elución del analito aplicado a una precolumna por medio de una inyección directa de una disolución concentrada.	35
Figura 1.10 Efecto del coeficiente de retención ($\log k'$) del analito en curvas de fuga y recobro teóricas vs volumen de la muestra. (Calculados con 450 mg de adsorbente C18 y N = 20).	40
Figura 1.11 Diagrama general del proceso de DMFS.	46
Figura 2.1 Diagrama General de la metodología.	53
Figura 3.1 Variación de factor de capacidad (k') de los HAP's en estudio, en función del porcentaje de metanol en la fase móvil. Columna VARIAN 150 x 4.60 mm, empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μ m. Flujo de 1 mL min ⁻¹ . Concentración de cada uno de los HAP's 10 ng mL ⁻¹ . Volumen de inyección 20 μ L.	67

Figura 3.2	Cromatograma obtenido de una disolución estándar de la mezcla de HAP's a una concentración de 12 ng/mL para cada compuesto. Columna VARIAN 150 x 4.60 mm, empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 µm. Flujo de 1 mL min ⁻¹ con fase móvil MeOH 100%. Volumen de inyección 20 µL.	69
Figura 3.3	Curva de calibración obtenida para los tres HAP's en estudio en el intervalo de concentraciones de 0.9-20 ng mL ⁻¹ .	70
Figura 3.4	Diagrama del método de obtención de la muestra de protozoarios.	72
Figura 3.5	Observación al microscopio óptico de una muestra de cultivo de <i>C. cucullus</i> centrifugada a 3500 rpm durante 8 minutos	74
Figura 3.6	Observación al microscopio óptico de una muestra de cultivo de <i>C. cucullus</i> sometido al procedimiento descrito en la figura 3.4.	75
Figura 3.7	Comparación de los recobros promedio obtenidos en la fracción de acetonitrilo, después de utilizar las dos secuencias de limpieza en la DMFS sin muestra.	78
Figura 3.8	Cromatogramas de extractos obtenido por DMFS con muestras de protozoarios fortificadas con 0.32 ng/mg de cada compuesto. A) DMFS sin limpieza, B) DMFS con limpieza.	79
Figura 3.9	Resultados promedio de la optimización de la extracción de los HAP's en agua por EFS con la adición de modificadores orgánicos. Fortificación a 0.8 ng/mL de cada compuesto. n=3	83
Figura 3.10	Patrones de elución para los tres HAP's en estudio. Elución con acetonitrilo 100%. Cartucho de EFS con 250 mg de fase C18-PAH. Fortificación a 0.8 ng/mL de cada compuesto. Volumen de muestra = 15 mL.	85
Figura 3.11	Cromatograma de un extracto obtenido por EFS a partir de una muestra de cultivo libre de protozoarios con una concentración de 0.8 ng/mL de cultivo para los tres HAP's en estudio.	87
Figura 3.12	Protocolo completo para la determinación de los tres HAP's en cultivos de protozoarios utilizando técnicas de extracción con adsorbentes y cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia.	91

Figura 3.13	Número de células de <i>C. cucullus</i> después de 24 hrs de crecimiento en cultivo líquido de infusión de cebada. ** Número de células en 100 μ L de cultivo.	92
Figura 3.14	Cromatograma obtenido al inyectar un extracto de una muestra de protozoarios expuestos a una concentración de cada HAP de 1 ng/mL durante un intervalo de tiempo de 5 hrs.	96
Figura 3.15	Análisis estadístico entre las cantidades de los HAP's recuperadas en las muestras de protozoarios en cada ensayo de exposición. ***Existe diferencia significativa entre los grupos comparados con una $p < 0.05$	97
Figura 3.16	Cromatograma obtenido al inyectar un extracto de una muestra de cultivo líquido libre de protozoarios, expuestos a una concentración de cada HAP de 1 ng/mL durante un tiempo de 5 hrs	100
Figura 3.17	Cromatograma obtenido al inyectar un extracto de una muestra de materia orgánica insoluble, de un cultivo expuesto a una concentración de cada HAP de 1 ng/mL durante un tiempo de 5 hrs	101
Figura 3.18	Recobros para el benzo[a]antraceno en cada una de las fracciones analizadas en los ensayos de exposición a los HAP's.	102
Figura 3.19	Recobros para el benzo[b]fluoranteno en cada una de las fracciones analizadas en los ensayos de exposición a los HAP's.	103
Figura 3.20	Recobros para el benzo[a]pireno en cada una de las fracciones analizadas en los ensayos de exposición a los HAP's.	103

ABREVIACIONES Y SIMBOLOGÍA

ACN	Acetonitrilo
BA	Benzo[a]antraceno
BP	Benzo[a]pireno
BF	Benzo[b]fluoranteno
C18	Fase sólida octadecilsilano
<i>C. cucullus</i>	<i>Colpoda cucullus</i>
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
DMFS	Dispersión de Matriz en Fase Sólida
EFS	Extracción en Fase Sólida
ELL	Extracción líquido-líquido
g	Gramos
ha	Hectáreas
HAP's	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
L. C.	Límite de cuantificación
L. D.	Límite de detección
kg	Kilogramos
Koc	Coeficiente de partición agua/materia orgánica (expresada como fracción de carbono orgánico, oc)
Kow	Coeficiente de reparto octanol/agua
kPa	Kilopascales
m³	Metros cúbicos
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mL	Mililitro
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
P. M.	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
Rs	Resolución
ton	Toneladas
tr	Tiempo de retención
Vb	Volumen de fuga
Vr	Volumen de retención
v/v	Volumen/volumen
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
μg	Microgramos
μm	Micrómetros

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son contaminantes ampliamente distribuidos en el ambiente cuya exposición representa un riesgo severo para la salud debido a su toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. Los microorganismos pueden ser excelentes indicadores de la contaminación de HAP's u otros compuestos dado su amplia variedad de hábitats. Por esta razón, en años recientes se han estado realizando diversos estudios sobre los efectos que causa la exposición a contaminantes en los microorganismos. Sin embargo, la mayoría de estos estudios son enfocados a los compuestos inorgánicos como los metales pesados, dejando más escasos los estudios relacionados con los contaminantes orgánicos. Lo anterior debido principalmente a la dificultad para hacer la determinación de estos por no contarse con los métodos de preparación de muestra adecuados. *Colpoda cucullus* es un protozooario que tiene potencial como bioindicador de contaminación porque se ha observado que puede desarrollarse en suelo y aguas contaminados. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones para extraer y analizar tres de los HAP's más pesados, como son benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno y benzo[*a*]pireno, en este protozooario y en sus medios de cultivo líquidos. El método analítico desarrollado se basó en técnicas de extracción con adsorbentes y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detección por fluorescencia. Los protozoarios fueron aislados de su medio de cultivo y concentrados mediante centrifugaciones diferenciales. La extracción de los contaminantes de los protozoarios se realizó por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (DMFS) con una sílice C18 y la limpieza de interferentes con mezclas de acetonitrilo/agua de diferente polaridad. Los recobros así obtenidos estuvieron comprendidos entre 84 y 96 %, el método de DMFS-CLAR presentó buena linealidad y repetibilidad en el intervalo de concentraciones de 0.1-2.0 ng/mg de muestra, límites de detección (L. D.) entre 0.04 y 0.06 ng/mg, y límites de cuantificación (L. C.) entre 0.12 y 0.20 ng/mg. La optimización de un método para extraer a los contaminantes del cultivo líquido se efectuó en base a la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS). La optimización se realizó con ensayos en donde se agregaron al medio de cultivo 15 % de isopropanol y de etanol a las muestras con el fin de mejorar la solubilidad y posterior elución de estos compuestos tan apolares que presentan alta adsorción a los materiales. El isopropanol fue el disolvente que produjo los mejores recobros. El método por EFS-CLAR presentó recobros comprendidos entre 70 y 74 %, buena linealidad en el intervalo de concentraciones de las muestras entre 0.15-1.2 ng/mL de muestra para cada compuesto, L.D. entre 0.03 y 0.04 ng/mL y L.C. entre 0.10 y 0.14 ng/mL. El método se aplicó a cultivos de *Colpoda cucullus* expuestos en el laboratorio a los HAP's en concentraciones de 1 ng/mL de cada compuesto en diferentes intervalos de tiempo. Los límites de detección y cuantificación de los métodos fueron lo suficientemente bajos para analizar con precisión los HAP's presentes en los protozoarios y en el medio de cultivo líquido libre de células. El mayor porcentaje de HAP's encontrados en los protozoarios, se obtuvo con un tiempo de exposición de 5 hrs. Después de este tiempo, se observó que la adsorción comienza a disminuir junto con el número de protozoarios presentes en el medio de cultivo.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) are widely distributed pollutants in the environment. Exposure to these compounds represents a severe risk to health because of their toxicity, mutagenicity and carcinogenicity. The microorganisms can be excellent indicators of pollution with PAH's and other compounds because of their wide variety of habitats. For this reason, in recent years; some authors have been conducting various studies on the effects caused by exposure to pollutants in the microorganisms. However, most of these studies are focused on inorganic compounds such as heavy metals, leaving more limited studies related to organic pollutants. This is mainly due to the difficulty to perform the determination because there are not the suitable methods of preparation of sample. *Colpoda cucullus* is a protozoan that has potential as a biomarker of contamination because it has been observed that it can live in soil and contaminated water. Therefore, the objective of this study was to establish the conditions to extract and analyze three of the heavy HAP's, such as benzo[*a*]anthracene, benzo[*b*]fluoranthene and benzo[*a*]pyrene, in this protozoan and its liquid growth media. The analytical method develop was based on extraction techniques with sorbents and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Protozoa were isolated from the culture medium and concentrate through differential spin. The removal of contaminants from the protozoa was conducted by Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) technique, with silica C18 as dispersion sorbent and clean-up with mixtures of acetonitrile/water of different polarity. The recoveries obtained were between 84 and 96 %, the MSPD-HPLC method presented a good linearity and repeatability in the range of concentrations of 0.1-2.0 ng/mg of sample, limits of detection (LOD's) between 0.04 and 0.06 ng/mg, and limits of quantification (LOQ's) between 0.12 and 0.20 ng/mg. Method optimization to removing contaminants from the liquid culture was based on the Solid Phase Extraction (SFE) technique. The optimization was performed by testing 15 % isopropanol or ethanol, added to the culture medium in order to improve the solubility and subsequent elution of these very apolar compounds that show high affinity to the materials. Isopropanol was produced the best recoveries. The method by SFE-HPLC presented recoveries between 70 and 74 %, good linearity in the range of concentrations of the samples between 0.15 and 1.2 ng/mL of sample for each compound, LOD's between 0.03 and 0.04 ng/mL, and LOQ's between 0.10 and 0.14 ng/mL. The method was applied to a growth media with *Colpoda cucullus* exposed in the laboratory to PAH's in concentrations level of 1 ng/ml for each compound at different time intervals. The limits of detection and quantification of the methods were low enough to accurately analyze the PAH's present in protozoa and in free cells liquid culture. The highest percentage of PAH's found in protozoa, was obtained with an exposure time of 5 hrs. After this time, it was observed that PAH-adsorption begins to decline along with the number of protozoa present in the culture medium

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son compuestos orgánicos formados por tres o más anillos aromáticos condensados, originados de diferentes fuentes relacionadas con la actividad humana. Los HAP's de cuatro o más anillos y sus metabolitos son considerados compuestos cuya exposición causa riesgo severo para la salud debido a su toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. Los HAP's se forman por pirólisis o combustión incompleta de la materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno (OIT, 2001).

En la actualidad se sabe que, parámetros como la biodisponibilidad, toxicidad y genotoxicidad pueden ser probados utilizando células completas en el monitoreo ambiental. Los microorganismos del reino Protista son excelentes modelos para ensayos biológicos y ecotoxicológicos. También estos organismos presentan un alto potencial como indicadores de contaminación ambiental dado que aún estando expuestos a los contaminantes, exhiben altos grados de sobrevivencia e inclusive reproducción. Esto es muy útil, cuando se pretende evaluar si la bioacumulación tiene relación con la resistencia de los microorganismos a los contaminantes (Gutiérrez, 2003, Campbell, 1997). En particular, *Colpoda cucullus* es una especie capaz de habitar diferentes ambientes, como el suelo, agua y aire, posee resistencia a diferentes condiciones ambientales como sequedad, temperaturas altas y se puede encontrar en suelos contaminados por hidrocarburos (Maeda, 2005). Los protozoarios como este microorganismo pueden ser cultivados fácilmente en el laboratorio bajo condiciones que simulen a las condiciones naturales, por lo que desde hace algún tiempo se han estado utilizando para llevar a cabo estudios sobre los efectos de compuestos xenobióticos como metales pesados, hidrocarburos y pesticidas (Gutiérrez, 2003, Campbell, 1997, Ekelund, 1994; Foissner, 1997, Trielli, 2006) en su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, en estos estudios solo se siguen los parámetros biológicos de las poblaciones y la desaparición y/o acumulación de los contaminantes se evalúa de manera indirecta en los medios de cultivo. Así que, son pocos los trabajos que hacen análisis de los contaminantes en los propios microorganismos, por no contarse con métodos de preparación de muestra adecuados.

La Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) es una técnica de preparación de muestra que se caracteriza por su eficiencia para la separación de un amplio rango de fármacos, pesticidas y otros compuestos de diversos tipos de muestras sólidas o semisólidas, ya sean vegetales o animales. La técnica consiste en dispersar la propia muestra en los adsorbentes convencionales utilizados en la Extracción en Fase Sólida (EFS), formando una columna de carácter cromatográfico único donde los componentes de la muestra son a su vez fraccionados por eluentes apropiados (*Barker, 2007*). En particular, si la cantidad de muestra disponible es muy pequeña, existe la posibilidad de miniaturizar los métodos basados en esta técnica disminuyendo la cantidad de fase dispersante a utilizar y la de disolventes de limpieza y elución (*Kristenson, 2001*). Considerando las características de la DMFS, es de notarse que puede ser aplicada a la extracción de los HAP's en microorganismos.

Los HAP's también pueden ser extraídos de medios líquidos por medio de métodos basados en la técnica de EFS con el uso de fases estacionarias apolares muy eficientes. Sin embargo, es importante aclarar que, debido a la naturaleza química de los HAP's, se aprecian pérdidas importantes en los recobros, debido a su elución incompleta de las columnas. Al respecto, varios autores han hecho esfuerzos para identificar los parámetros que afectan la exactitud y la reproducibilidad de los métodos de EFS para HAP's entre los que están la baja solubilidad de los compuestos en agua, adsorción a los materiales, velocidad de flujo a través del cartucho de extracción, cantidad y tipos de modificadores orgánicos agregados al agua, efectos de interferencia de ácido húmicos, entre otros (*Busetti, 2006*).

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue desarrollar un método que permitiera la extracción y análisis de 3 HAP's (benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno y benzo[*a*]pireno) en protozoarios utilizando la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) como método de preparación de muestra y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección por fluorescencia para el análisis de los compuestos.

La optimización de un método por EFS-CLAR para la determinación de los HAP's en los medios de cultivo fue realizado como objetivo secundario con el fin de realizar un bioensayo simple en donde se demostrara que se puede discriminar la cantidad de HAP's que se acumula en los organismos de la que permanece en el medio líquido y adsorbida a la materia orgánica.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1. Microorganismos y contaminación.

Los microorganismos son esenciales para el medio ambiente ya que regeneran ciertos nutrientes y participan en la propia limpieza de los ecosistemas mediante la degradación de materia orgánica y / o algunos contaminantes tóxicos presentes en los sedimentos, suelos y aguas. Por otra parte, en la actualidad, un gran número de compuestos peligrosos, son descargados al medio ambiente. Algunos trabajos realizados, se han enfocado en los análisis globales de estos contaminantes, en particular, a gran escala. Sin embargo, los impactos estudiados no tienen en cuenta la diversidad microbiana que es un contribuyente fundamental a la calidad del suelo, el control y la sustentabilidad a largo plazo (Bending, 2007; Díaz, 2006).

Numerosas especies de organismos superiores se alimentan de microorganismos y como consecuencia, los contaminantes pueden ser potencialmente transferidos a lo largo de las cadenas alimentarias y afectar a organismos en los niveles tróficos superiores, provocando eventualmente, efectos adversos sobre la salud humana (Trielli, 2007).

De esta forma, las comunidades microbianas desempeñan un papel importante en el comportamiento de contaminantes a través de efectos directos como la capacidad de metabolizar contaminantes orgánicos en diferentes ecosistemas y, por tanto, eliminar estos compuestos del sistema. El potencial de biorremediación que tienen los microorganismos puede ser evaluado mediante la investigación de la relación entre las concentraciones de contaminantes y los tipos de comunidades microbianas y su distribución (Slater, 2008).

Aksu, en el año 2005, presentó una revisión a cerca de la utilidad que tienen los microorganismos en la remoción de contaminantes orgánicos como pesticidas, fenoles y tintes, en aguas residuales. La remoción se lleva a cabo por un proceso denominado "*bioadsorción*" y se está convirtiendo en una alternativa prometedora para sustituir o complementar los procesos de eliminación de contaminantes orgánicos en aguas residuales usados actualmente. Las ventajas que presenta este proceso son rapidez, bajo costo, fácil disponibilidad, sencillas

condiciones de funcionamiento, alta eficiencia a concentraciones muy diluidas o concentradas; por lo cual, se han propuesto diversas metodologías para la limpieza de una gran variedad de efluentes industriales. Las bacterias, hongos y levaduras son los organismos que muestran mayor capacidad de eliminación de compuestos orgánicos de las aguas residuales. Sin embargo, la literatura indica que los estudios de bioadsorción de contaminantes orgánicos son limitados a ciertos tipos de contaminantes y al uso de cierto tipo de organismos. Actualmente, existe la necesidad de estudiar otros contaminantes orgánicos y desarrollar nuevas cepas de microorganismos con altas tasas de reproducción y que posean elevada capacidad de bioadsorción.

Otros organismos que se adaptan bien a los bioensayos son los protozoarios, ya que crecen rápidamente, tienen una delicada membrana externa que puede reaccionar rápidamente ante el estrés provocado por los contaminantes. Al ser los protozoarios organismos eucariotas, los estudios de sus reacciones a los cambios ambientales pueden estar mejor relacionados con los efectos que estos cambios producirían en organismos superiores, que los estudios hechos en organismos procariotas (Campbell, 1997).

1.1.1. Estudios recientes de los efectos de contaminantes orgánicos en microorganismos.

La habilidad de identificar el impacto de sustancias tóxicas en el medio ambiente y las especies que habitan los ecosistemas depende de la capacidad de desarrollar métodos de análisis en agua, suelo, sedimentos y tejidos de los animales afectados (Crouch y Barker, 1997). En el monitoreo ambiental, parámetros globales como biodisponibilidad, toxicidad y genotoxicidad pueden ser probadas utilizando células completas.

Sin embargo, pocos de estos trabajos reportan metodologías analíticas de extracción en donde se aíslen los propios contaminantes orgánicos de los microorganismos. La gran mayoría de ellos hacen referencia a la realización de ensayos completamente biológicos como pruebas de toxicidad de los contaminantes sobre los propios microorganismos o

experimentos de biorremediación por microorganismos. A continuación se describen algunos de estos interesantes reportes:

En su trabajo, Trielli *et al* (2006) probaron el efecto de tres pesticidas organofosforados (OF's), basudin, cidal y fénix, en el microorganismo *Colpoda inflata*, examinando su viabilidad, grado de reproducción por fisión y la capacidad de presentar y expulsar su cromatina macronuclear en el citoplasma. En los resultados se demuestra que la exposición a estos tres OF's causa un efecto dependiente de la dosis en la viabilidad de las células y reduce significativamente el grado de reproducción por fisión. De igual forma, la exposición de quistes de resistencia a diferentes concentraciones de basudin y cidal, redujo significativamente el número de quistes de los controles sin pesticidas.

Li y colaboradores (2008) utilizaron una mezcla de organismos para degradar a los HAP's en un suelo contaminado a una concentración de 15.72 mg/kg. Los resultados indicaron que hasta el 85% del contenido total de HAP's fue degradado.

Novotný y colaboradores en 2006, realizaron un estudio comparativo entre tres diferentes tipos de organismos para realizar pruebas de toxicidad de colorantes azoicos y colorantes que contienen antraquinonas. Ellos utilizaron los microorganismos *Vibrio fischeri* (bacteria), *Selenastrum capricornutum* (microalga) y *Tetrahymena pyriformis* (protozooario ciliado). Se encontró que la microalga fue el organismo de mayor sensibilidad a la prueba de toxicidad realizada. Sin embargo, los ensayos en el protozooario *Tetrahymena pyriformis* mostraron que este organismo también puede ser un buen modelo de toxicidad.

Finalmente, en la *tabla 1.1* se presenta una recopilación de los trabajos que relacionan microorganismos y contaminantes orgánicos, en donde se observa que en efecto, los estudios se enfocan a la toxicidad, biorremediación, impacto fisiológico, viabilidad y bioacumulación. Sin embargo, en estos trabajos no se hacen análisis de los contaminantes en los propios microorganismos, por no contarse con métodos de preparación de muestra adecuados. En el caso donde se da seguimiento a los niveles de estos contaminantes, se efectúan análisis en las muestras ambientales (suelos, aguas, etc.) o en los cultivos.

Tabla 1.1 Publicaciones recientes del estudio de contaminantes orgánicos en microorganismos.

Microorganismo	Matriz analizada (Extracción)	Analito	Estudio	Técnica de análisis	Ref.
<i>Paramecium caudatum</i> (protozooario)	---	Carbofurano (Pesticida)	Medición de la toxicidad aguda e impacto fisiológico del analito en el protozooario que aparece comúnmente en muestras de agua	ND	Hussain (2008)
<i>Microfauna de una muestra de suelo (protozoarios hongos, bacterias)</i>	Suelo (Extracción con disolventes)	Tebuconazol, Azoxystrobin y clorotalonil (Fungicidas)	Persistencia en el medio ambiente y efecto en las poblaciones microbianas	CLAR-UV	Bending (2007)
<i>Microfauna de una muestra de suelo fijada en PVA</i>	Suelo	Diesel	Biorremediación de sitios contaminados con diesel mediante el uso de placas con microorganismos fijos	Grav.	Cunningham (2004)
<i>Microfauna de una muestra de suelo (bacterias y hongos)</i>	Suelo (Extracción con disolventes)	Pireno y fenantreno (HC)	Observar el comportamiento de poblaciones degradadoras de estos compuestos	CLAR-UV	Gentry (2003)
<i>Euplotes crassus</i> (Protozooario)	---	Diazinon (OP), Dicofol (OC) y HgCl ₂	Observar la viabilidad del microorganismo como indicador de la toxicidad de los compuestos en sedimentos marinos.	ND	Trielli (2007)
<i>Chlorella vulgaris</i> (microalga) <i>Synechococcus elongatus</i> (cianobacteria)	Extracto obtenido de las microalgas (EFS-C18)	Triazinas (Herbicidas)	Determinar la capacidad de bioacumulación de los organismos y observar la utilidad de estos microorganismos en la remoción de los contaminantes de muestras de agua.	GC-MS	González-Barreiro (2006)
<i>Azospirillum lipoferum</i> (bacteria)	Sedimento de bacterias	Dicofol (OC)	Observar la bioacumulación del contaminante en el microorganismo y calcular factores de bioconcentración.	R. A.	Mano (1996)
<i>Microcystis aeruginosa</i> (cianobacterias)	Sedimento de cianobacterias (DMFS-C18 y ELL)	Microcistinas (Hepatotoxinas)	Desarrollar un método basado en la DMFS y la CLAR para analizar los compuestos y compararla con la técnica de ELL.	CLAR-MS	Cameán (2004)

HC = Hidrocarburos; ND = No determinado, CLAR = Cromatografía de líquidos de alta resolución, UV = Detector Ultravioleta, PVA = Alcohol Polivinílico, OP = Pesticida Organofosforado, OC = Pesticida Organoclorado, GC-MS = Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas. R. A. = Contador de radioactividad ¹⁴C; EFS = Extracción en Fase Sólida; C18 = Sílice C18, DMFS = Dispersión de Matriz en Fase Sólida; ELL = Extracción Líquido-Líquido;

1.1.2. Determinación de contaminantes en microorganismos.

Los trabajos que estudian el efecto en organismos del reino Protista son cada vez más numerosos. Estos organismos, como parte de la microfauna, son excelentes modelos para ensayos biológicos y ecotoxicológicos ya que están expuestos directamente a la contaminación ambiental y exhiben altos grados de reproducción, por lo cual, se obtienen múltiples generaciones de organismos y con esto se pueden registrar ensayos de efectos crónicos de compuestos xenobióticos en periodos de tiempo cortos (Gutiérrez, 2003; Trielli, 2006).

Una de las grandes ventajas en el manejo de los protozoarios es que pueden ser cultivados en el laboratorio bajo condiciones que simulen a las condiciones naturales. Gracias a esto, en años recientes se han llevado a cabo diversos estudios sobre el efecto, en estos organismos, de compuestos xenobióticos como metales pesados (Díaz, 2006; Martín-González, 2006, Madoni, 2006, Gutiérrez, 2003, Campbell, 1997, Fernández-Leborans, 1995), hidrocarburos y pesticidas, (Ekelund, 1994; Foissner, 1997, Trielli, 2006, Grzegorz Nacz-Jawecki, 2002).

La extracción de metales pesados se realiza comúnmente por medio de digestiones ácidas o básicas que permiten liberarlos de su matriz al destruir la materia orgánica que la constituye. Los metales no pueden degradarse, por lo que a diferencia de los contaminantes orgánicos, las condiciones drásticas de extracción no afectan su estructura. En la tabla 1.2 se presentan algunos trabajos publicados para el análisis de metales pesados en diferentes tipos de muestras.

En otros trabajos, no se realiza la determinación de los contaminantes directamente en los microorganismos. De esta manera, Díaz (2006), desarrolló una técnica de monitoreo de la contaminación ambiental por metales pesados, basándose en ensayos de toxicidad aguda y bioacumulación de Zn, Cu y Cd en los protozoarios, *Colpoda steinii*, *Colpoda inflata* y *Cyrtolophosis elongata*, aislados de diferentes muestras de suelo. Las pruebas de bioacumulación consistieron en exponer a los microorganismos a diferentes concentraciones de los metales en los medios de cultivo durante 24 hrs. manteniendo los cultivos a una temperatura de 28 °C.

Después de este tiempo, la materia orgánica fue separada del cultivo líquido mediante centrifugación y al sobrenadante se le midió la concentración de metales remanente mediante Espectrometría de Inducción de Plasma Acoplado (ICP-AES). Por diferencia entre la concentración inicial y la final de cada metal en el medio de cultivo, se determina la cantidad acumulada por las células de protozoarios.

Tabla 1.2 Publicaciones recientes del estudio de contaminantes inorgánicos en algunos organismos.

Microorganismo	Matriz analizada (Extracción)	Metales analizados	Extracción	Técnica de análisis	Ref.
<i>Pilayella littoralis</i> (alga)	Muestra pulverizada de algas unida a sílica gel	Al (III), Cu (II), Co (II) y Fe (III)	En línea con una disolución de HCl 0.12 M	ICP-OES	Carrilho (2003)
<i>Lithognathus mormyrus</i> , <i>Liza aurata</i> , (peces)	Músculo y piel	Cu, Zn, Mn, Fe, Co, Mg, Ni, Cr y B	Digestión en microondas con HNO ₃ concentrado	ICP-OES	Uysal (2008)
<i>Bacillus thuringiensis</i> (bacteria)	Bacterias inmovilizadas en fase sólido Chromosorb	Cd (II), Pb (II), Mn (II), Cr (III), Ni (II) y Co (II)	En línea con una disolución de HCl 1 M	ES-F	Mendil (2008)
<i>Rapana venosa</i> (Caracol)	Carne	Zn, Pb, Cu, Cd, As	Digestión con HNO ₃ : HClO ₄ (5:1)	ES-F y ES-G	Altug (2002)

ICP-OES = Espectrofotometría de emisión acoplada a plasma inducido; ES-F = Espectrofotometría de flama, ES-G = Espectrofotometría con horno de grafito

A pesar de que en el estudio anterior se hacen diversos testigos para medir la acumulación de los metales en otros componentes del cultivo, como bacterias, la medición no deja de ser indirecta y puede conservar cierto error con respecto al valor real bioacumulados por los protozoarios, en particular, si la naturaleza de los contaminantes les permite ser adsorbidos por la materia orgánica presente también en el medio de cultivo.

En lo que respecta a la extracción de contaminantes orgánicos, no se aplican las mismas técnicas que para los metales pesados. Por esta razón, solo se encontraron tres publicaciones de metodologías que permiten determinar al analito de interés directamente de las células de los organismos en estudio.

En el primer trabajo, Mano y cols. (1996) describieron una metodología para extraer y analizar Dicofol (marcado con ^{14}C) de un cultivo de bacterias (ver *tabla 1.1*). Los microorganismos fueron aislados del medio de cultivo por medio de centrifugación; al sedimento se le determinó la cantidad de Dicofol unido a las células por conteo de radiactividad.

En el segundo trabajo, González-Barreiro y cols. (2006) determinaron los herbicidas atrazina y terbutrin de muestras de cultivos líquidos de las microalgas, *Synechococcus elongatus* y *Chlorella vulgaris*. Después de centrifugar 200 mL del cultivo, extraen los herbicidas del sobrenadante mediante extracción en fase sólida en cartuchos empacados con sílice C-18. Los extractos se analizaron por Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas (CG-MS). El sedimento fue resuspendido en medio de Bristol y nuevamente centrifugado. Por otra parte, el sedimento fue resuspendido en metanol puro y colocado en oscuridad durante 48 hrs. Después, las células de la suspensión se rompieron al aplicarle ultrasonido y se centrifugaron de nuevo para tener un líquido libre de material celular. Finalmente, del sobrenadante se extrajeron los herbicidas por EFS en sílice C18 y se analizaron por CG-MS.

En el último trabajo encontrado, Cameán y cols. (2004), describen el análisis de microcistinas, que son una familia de hepatotoxinas producidas principalmente por cianobacterias que pertenecen a los géneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria* y *Haphalosiphon*. El método que desarrollaron se basa en la DMFS, utilizando 50 mg de células liofilizadas de *Microcystis aeruginosa* y 0.5 g de sílice C18, realizando una limpieza de interferentes con 10 mL de cloroformo y eluyendo los compuestos con 10 mL de una mezcla MeOH-ácido acético (1:1 v/v). Por otra parte, realizaron otro método de extracción con la técnica de ELL, utilizando la misma cantidad de células liofilizadas y extrayendo 3 veces con 10 mL de ácido acético y 20 mL de una mezcla MeOH-cloroformo (1:1 v/v). la suspensión de células fue colocada en un baño sónico durante 15 minutos, agitada a temperatura ambiente por 30 minutos más y centrifugada a 4,500 g por 15 minutos. Finalmente, las fases acuosas se combinaron, se evaporó en un rotaevaporador y se resuspendió con 0.5 mL de MeOH. Los investigadores obtuvieron buenas linealidades, buenos recobros y límites de cuantificación cercanos a 1 $\mu\text{g/g}$ para las dos técnicas de extracción comparadas, con lo cual

se observa que ambas técnicas son adecuadas para el análisis de las microcistinas. Sin embargo, el consumo relativo de disolventes (90 mL para la ELL y 20 mL para la DMFS) y el tiempo de análisis (5 horas para ELL y 1 hora para DMFS), hacen que la extracción por la técnica de DMFS resulte más rápida y barata.

1.2. Características del microorganismo *Colpoda cucullus*.

Los protozoarios son microorganismos eucariontes con una amplia distribución en hábitats terrestres y acuáticos. En muchos suelos, la biomasa de los protozoarios es igual o excede a la de otros grupos de organismos, excepto las lombrices (Schröter,2003).

En los protozoarios, el mayor grupo de ciliados es la familia Colpodiade. Su ciclo de vida, donde la reproducción sexual no se ha reportado, incluye un “enquistamiento resistente”, una estrategia adaptativa, que le permite a las especies sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas mediante la modificación de las estructuras y funciones celulares, ver figura 1.1 (Corliss, 1974).

Como todos los ciliados, las especies de *Colpoda* exhiben dos tipos de núcleo a través de su vida, el micronúcleo y el macronúcleo, que difieren uno del otro por su tamaño, forma, estructura y función. El micronúcleo es considerado como el núcleo de la línea germinal. El macronúcleo, es el que controla el fenotipo de la célula y coloca los cuerpos de la cromatina en el citoplasma durante la multiplicación celular formando quistes de reproducción además de la formación de quistes de resistencia, figura 1.1B (Trielli, 2006).

En particular, *Colpoda cucullus* es considerado como una especie capaz de habitar diferentes ambientes, tanto en suelo, agua y aire, principalmente se le encuentra en ambientes con vegetación como se observa en la tabla 1.3. Este ciliado edafícola, posee resistencia cuando se encuentra en forma de quistes a diferentes condiciones ambientales como sequedad, temperaturas altas (resisten 3 horas a 80 °C) y bajas (3 horas a -30 °C) (Maeda, 2005). Su ciclo de vida comienza como trofozoito (forma vegetativa activada) de 40 µm de longitud, nada mediante cilios, se alimenta y crece hasta una longitud máxima de 110

μm . Su reproducción es asexual, formando quistes de reproducción que se dividen dos veces, produciendo de esta forma cuatro células de $40 \mu\text{m}$ por quiste y el ciclo de reproducción comienza de nuevo. La ruptura del quiste de reproducción se puede retardar si el ambiente se torna seco. Desde el punto de vista funcional, en su forma trófica, cada célula cuenta con una delicada membrana externa, lo que le confiere la posibilidad de responder de forma inmediata a los cambios ambientales, y en consecuencia, a la presencia de contaminantes (Castro-Ortiz *et. al.*, 2007) Cuando el alimento o las condiciones ambientales no son óptimos, las células forman quistes de resistencia. En estos últimos, la división celular no se lleva a cabo, así que una vez que las condiciones ambientales sean favorables este quiste de resistencia se romperá, emergiendo de él una sola célula. *Colpoda cucullus* se alimenta de bacterias, pero también puede hacerlo con materia orgánica en descomposición (Mueller, 1970).

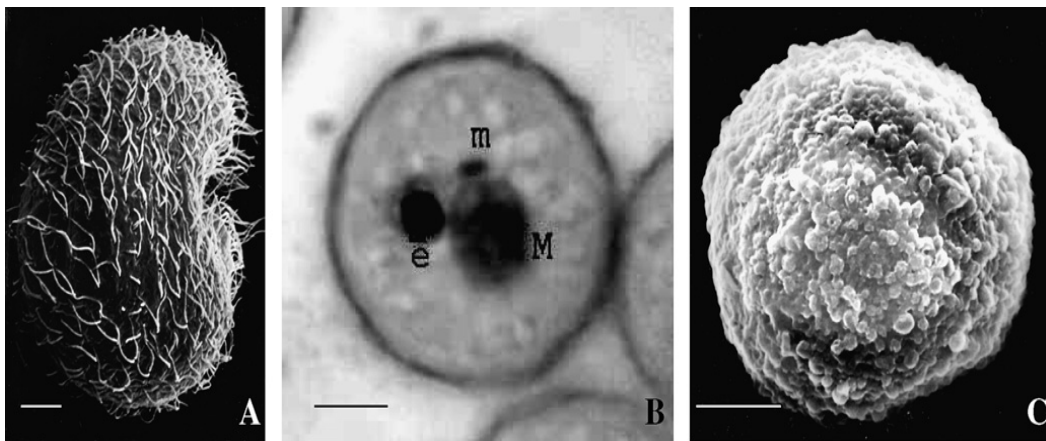


Figura 1.1 *Colpoda inflata*. Micro-fotografía electrónica de una célula vegetativa (A). Micro-fotografía óptica de un quiste de reproducción (B) presentando micronúcleo (m), macronúcleo (M) y una cromatina macronuclear (e). Micro-fotografía electrónica de un quiste de resistencia (C). Barra = $5 \mu\text{m}$ (Trielli, 2006).

Tabla 1.3 Porcentaje de colectas tomadas de diferentes hábitats que contuvieron al protozoario *Colpoda cucullus* (Mueller, 1970; Foissner, 1993, Bamforth, 2001)

Colección	No. de colectas	% de colectas que contienen <i>C. cucullus</i>
Pequeñas plantas	540	88
Corteza de árboles (cerca de 5 cm de diámetro)	210	98
Suelo con vegetación	428	83
Suelo sin vegetación	176	28
Suelo con depresiones alternadas, húmedo y seco	222	96
Zona litoral – Charcas y lagos	28	7

En lo referente a la morfología del microorganismo, el citoplasma de *C. cucullus* es transparente y sus cilios miden 10 μm aproximadamente, se desplaza mediante un movimiento en espiral hacia la izquierda. Datos reportados por algunos autores señalan que el peso de una cantidad de 10^6 células de *C. cucullus* está entre 70-140 mg (Foissner, 1987).

La Figura 1.2 muestra una microfotografía electrónica y una óptica de este microorganismo.

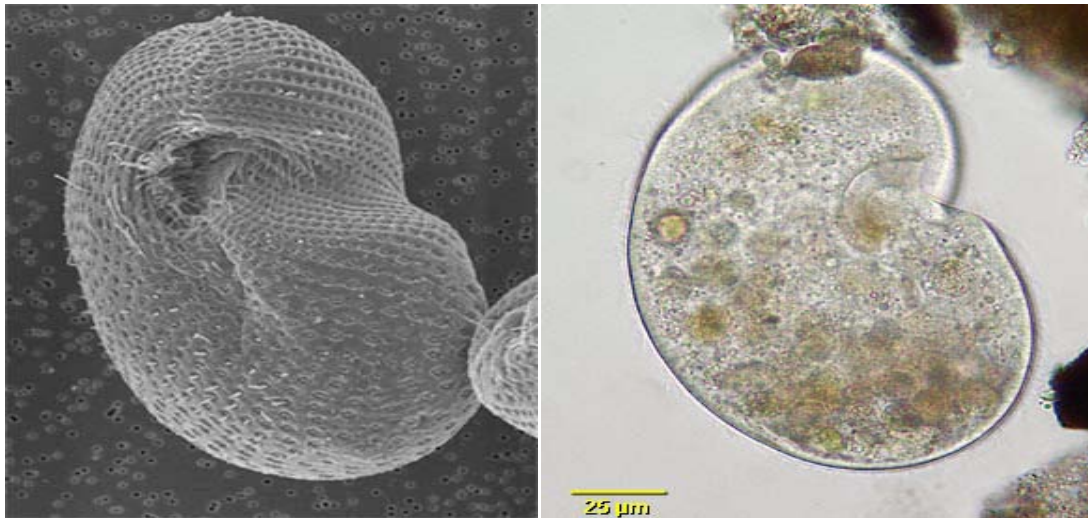


Figura 1.2 *Colpoda cucullus*. A. Micro-fotografía electrónica (Lock, 2008) y B. Micro-fotografía óptica (Holt, 2008) de una célula vegetativa.

1.3. Propiedades de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's)

1.3.1. Estructura Química de los HAP's

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), compuestos que integran una amplia familia de hidrocarburos, solo contienen carbono e hidrógeno. En su estructura, están formados por dos o más anillos aromáticos condensados, en donde algunos átomos de carbono son comunes a dos o tres anillos. Esta estructura también se denomina sistema de anillos fusionados; los anillos pueden estar en línea recta, angulados o racimados (OIT, 2001; Connell, 2005). Poseen gran estabilidad química debida a los sistemas conjugados de dobles enlaces, son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es muy pequeña. Debido a su carácter

aromático, los HAP's absorben luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico (Kalf y Crommentuijn, 1997). La estructura química de algunos de estos compuestos se presenta en la Figura 1.3

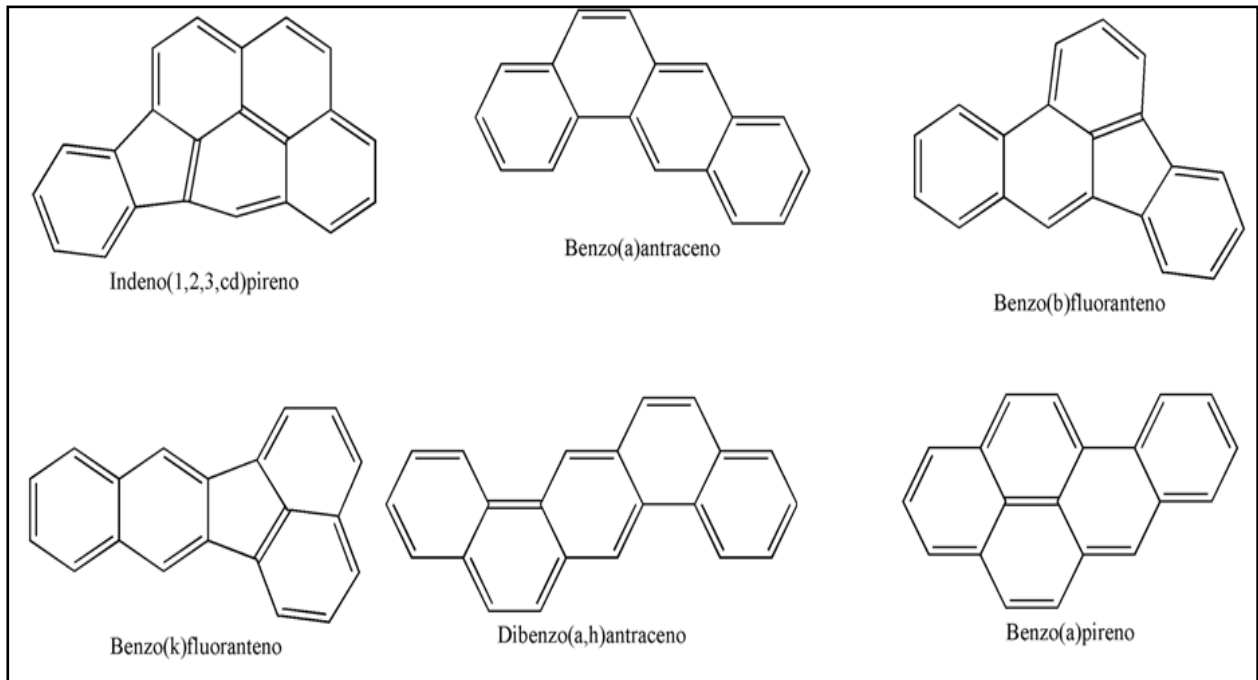


Figura 1.3 Estructura química de algunos HAP's (OIT, 2001)

El número posible de diferentes HAP's es enorme, algunos están presentes comúnmente en la naturaleza, el caso del naftaleno ($C_{10}H_8$, P.M. 128.2) considerado el miembro más simple de esta familia, mientras que el coroneno ($C_{24}H_{12}$, P.M. 300.4) se considera como el compuesto de interés ambiental con mayor peso molecular (Connell, 2005). Sin embargo, en la mayoría de los casos las determinaciones se limitan al análisis de 16 compuestos, considerados por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE), como contaminantes prioritarios debido a sus efectos carcinogénicos (Tabla 1.4) en matrices como agua potable, industrial y de desecho, sedimentos, suelos, partículas atmosféricas, así como en tejidos biológicos (Peña, 2003; Nadal, 2004).

Tabla 1.4 Propiedades de algunos Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (Cram, 2005)

HAP's (# de anillos)	Peso Molecular g/mol	Solubilidad en agua (mg/L)	Presión de vapor (kPa)	Log Kow	Log Koc	Efectos en la salud
Naftaleno (2)	128	31.0	0.012	3.37	NR	Tóxico
Acenaftileno (3)	152	3.5	0.004	NR	3.23-3.76	NR
Acenaftaleno (3)	154	3.9	5.81×10^{-4}	4.00	3.0-4.17	Tóxico
Fluoreno (3)	166	1.98	4.16×10^{-5}	4.18	3.59-4.05	NR
Antraceno (3)	178	0.073	2.26×10^{-6}	4.54	3.88-4.31	Carcinógeno
Fenantreno (3)	178	1.3	9.04×10^{-5}	4.57	4.13-4.31	Carcinógeno
Fluoranteno (3)	202	0.26	0.0012	5.22	4.52-4.90	NR
Pireno (4)	202	0.14	3.33×10^{-7}	5.18	4.56-4.90	Tóxico
Benzo[<i>a</i>]antraceno (4)	228	0.04	2.93×10^{-7}	5.75	5.28-5.58	Carcinógeno
Criseno (4)	228	0.002	8.38×10^{-8}	5.75	5.29-5.59	Carcinógeno
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno (5)	252	0.0012	6.66×10^{-8}	6.09	5.46-6.08	NR
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno (5)	252	0.0006	7.86×10^{-12}	6.03	5.88-6.08	Carcinógeno
Benzo[<i>a</i>]pireno (5)	252	0.0038	7.45×10^{-10}	6.04	5.46-6.42	Carcinógeno
Dibenzo[<i>ah</i>]antraceno (5)	278	0.0005	1.33×10^{-11}	6.75	5.97	Carcinógeno
Benzo[<i>ghi</i>]perileno (6)	276	0.0003	1.39×10^{-11}	6.86	6.31-6.78	NR
Indeno[<i>a,2,3</i>]pireno (6)	276	0.053	1.33×10^{-12}	6.58	7.66	Carcinógeno

Kow – coeficiente de reparto octanol/agua

Koc - Coeficiente de reparto agua/materia orgánica (expresada como fracción de carbono orgánico, oc)

NR = No reportado

1.3.2. Fuentes de producción de los HAP's y usos.

Los HAP's se forman por pirólisis o combustión incompleta de materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno. A temperaturas a la llama mayores a 500 °C, algunos de los enlaces C-C, C-H y de otros tipos pueden producir radicales libres. Dependiendo de la abundancia del oxígeno, algunos fragmentos reaccionarán con él para formar CO₂ y vapor de agua; sin embargo, la mayor parte del tiempo la cantidad de oxígeno no está suficientemente bien dispersada y mezclada con los fragmentos, dando como resultado una mezcla entre estos fragmentos, algunos de los cuales pueden ser radicales libres, los cuales al enfriarse conducen a la formación de fragmentos más pesados, la mayoría de las veces HAP's como se representa de una manera general en la figura 1.4 (Connell, 2005).

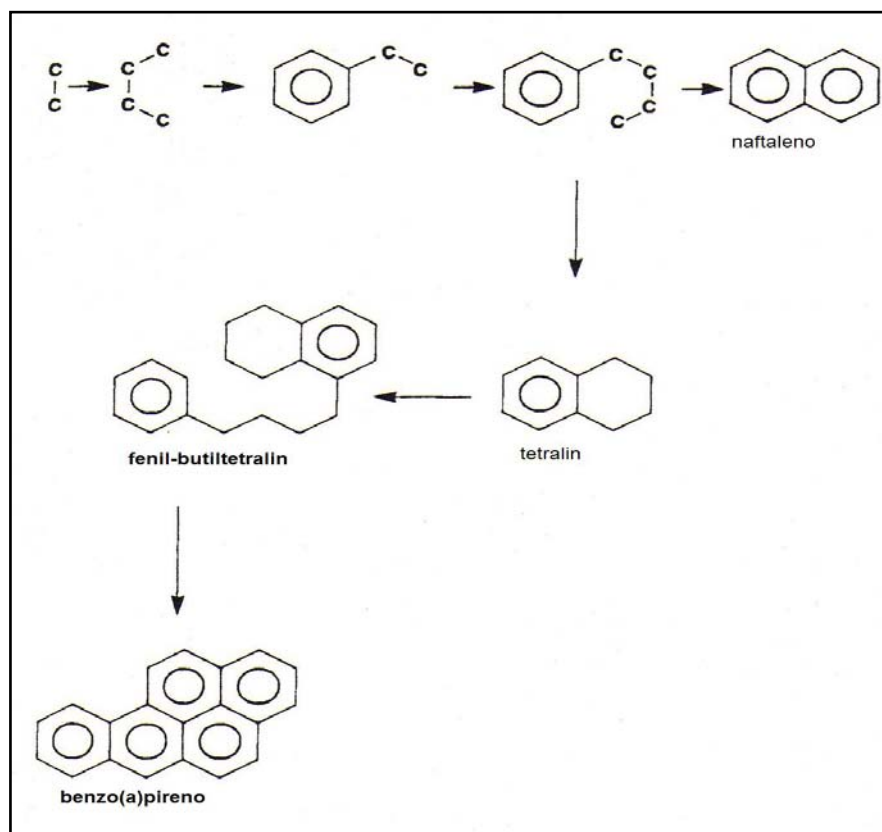


Figura 1.4. Posible mecanismo para la formación de HAP's durante la combustión de materia orgánica (Connell, 2005)

La composición de los productos resultantes de ésta piro-síntesis depende del combustible, la temperatura y el tiempo de estancia en la zona de la llama. Como regla general, a elevadas temperaturas de combustión, se forma menor cantidad de HAP's alquilados. Los compuestos que contienen cadenas laterales, los compuestos insaturados y las estructuras cíclicas suelen favorecer la formación de HAP's. Los combustibles que forman HAP's son metano, otros hidrocarburos, hidratos de carbono, ligninas, péptidos, celulosa, tabaco, polietileno, etc. (OIT, 2001; Connell, 2005).

Debido a sus bajas presiones de vapor, la mayoría de los HAP's se condensan rápidamente sobre partículas de hollín o forman ellos mismos partículas muy pequeñas. Los HAP's liberados a la atmósfera en forma de vapor son adsorbidos por las partículas presentes en ella. Por ello, se produce una diseminación de aerosoles que contienen HAP's, que pueden ser transportados a grandes distancias por los vientos (OIT, 2001). Durante la formación geológica de combustibles fósiles como el petróleo y carbón, el material biológico se rompe debido a la presión y una temperatura moderada (200 °C aproximadamente). Bajo estas condiciones, los HAP's se originan por mecanismos similares a los que ocurren durante la combustión incompleta (Connell, 2005).

Existe una gran cantidad de fuentes naturales productoras de HAP's, sin embargo las que sobresalen son la actividad volcánica y los incendios forestales. Como fuentes antrópicas en la producción de estos compuestos se tiene la quema de combustibles fósiles para la producción de electricidad, los vehículos de combustión interna, plantas incineradoras y la quema de combustibles para uso residencial, además del humo del tabaco y en los alimentos a la parrilla, ahumados y fritos (Connell, 2005; Schwedt, 2001; OIT, 2001).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se utilizan principalmente en la fabricación de colorantes y en síntesis químicas. El antraceno se utiliza en la producción de antraquinona, una importante materia prima para la fabricación de colorantes rápidos. Se emplea también como diluyente para conservantes de la madera y en la producción de fibras sintéticas, plásticos y monocristales. El fenantreno se emplea en la fabricación de colorantes y explosivos, en la investigación clínica y en la síntesis de fármacos. El benzofurano se utiliza en la fabricación de resinas de cumarona-indeno. El fluoranteno es un

componente del asfalto derivado del alquitrán y del petróleo que se utiliza como material de revestimiento para proteger el interior de las tuberías de agua potable de acero y hierro dúctil y los tanques de almacenamiento.

El ánodo de Söderberg utilizado en el proceso electrolítico de producción de aluminio, es la principal causa de exposición a HAP's en la industria del aluminio. Este ánodo está formado por una mezcla de coque y alquitrán de hulla. En los trabajos siderometalúrgicos y en las fundiciones se produce exposición a HAP's liberados por los productos de alquitrán al entrar en contacto con el metal fundido. Los preparados de brea se utilizan en hornos, canales de colada y lingoteras. El asfalto que se utiliza para pavimentar las calles y las carreteras procede principalmente de los residuos de destilación del petróleo crudo. El asfalto de petróleo contiene pocos HAP's superiores. No obstante, en algunos casos este asfalto se mezcla con alquitrán de hulla, lo que aumenta el riesgo de exposición a HAP's cuando se trabaja con el asfalto caliente. En otras actividades en las que se utiliza alquitrán derretido y se rocía sobre una gran superficie, los trabajadores pueden sufrir una intensa exposición a HAP's. Tales operaciones incluyen el recubrimiento de oleoductos, el aislamiento de paredes y techados (OIT, 2001).

1.3.3. Toxicología y metabolismo de los HAP's.

Los HAP's, especialmente los de cuatro o más anillos y sus metabolitos son considerados compuestos con riesgo severo para la salud debido a su toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (Kalf y Crommentuijn, 1997; NTP, 2002). En el año de 1775, un médico inglés, Sir Percival Pott, describió por primera vez un cáncer de origen profesional, el cáncer de escroto de los limpiadores de chimeneas asociado a su prolongada exposición al alquitrán y al hollín en condiciones deficientes de higiene personal. Cien años más tarde se describió el cáncer de piel en los trabajadores expuestos a alquitrán o aceites bituminosos como los aceites lubricantes para motores, los aceites de corte y los aceites que se utilizan en máquinas de descarga eléctrica. A finales de 1910 se describió el desarrollo experimental

de cáncer de pulmón en animales de laboratorio tras la aplicación repetida de alquitrán de hulla.

En 1930 se describieron casos de cáncer de pulmón en los trabajadores de la industria del acero y en la del coque. En 1933 se demostró que un hidrocarburo aromático policíclico aislado del alquitrán de hulla era cancerígeno. El compuesto aislado resultó ser el benzo(a)pireno. Desde entonces se han descrito cientos de HAP's cancerígenos. Los estudios epidemiológicos indican una mayor frecuencia de cáncer de pulmón en los trabajadores de las industrias de coque, aluminio y acero. Aproximadamente un siglo después se han clasificado algunos de los HAP's como cancerígenos laborales (OIT, 2001; EPA, 2008; ATSDR, 1993, 1995).

Como se puede observar en la tabla 1.4, la mayoría de los HAP's tienen un coeficiente de distribución K_{ow} mayor a tres lo que indica baja solubilidad (compuestos lipofílicos), inmovilidad, bajas tasas de biodegradación, tendencia a acumularse y a ser persistente (McElroy, 1989; Ney, 1990, Luttrell, 2007). El riesgo de exposición no se limita a las partículas aspiradas sino también al contacto de la piel con sustancias que contengan HAP's. De manera general, después de treinta minutos de haber inhalado altos niveles de los compuestos, estos se pueden encontrar en hígado, esófago e intestino, e incluso, algunos pueden atravesar fácilmente la placenta y causar toxicidad al feto. Los metabolitos son primeramente removidos del cuerpo por secreciones biliares y posteriormente eliminados mediante las heces. Los HAP's tienen la capacidad de unirse a moléculas como el ADN y la hemoglobina, por lo que también producen daño a los glóbulos rojos (Connell, 2005; RAIS, 2007).

El hecho de que los HAP's cancerígenos reaccionen con otras sustancias no significa necesariamente que se inactiven como tales; por el contrario, muchos HAP's que contienen sustituyentes son carcinógenos más potentes que el correspondiente compuesto progenitor (OIT, 2001).

El largo período de latencia entre la primera exposición y la aparición de los síntomas, junto con muchos otros factores, han hecho que el establecimiento de los valores límite umbral para los HAP's en la atmósfera del lugar de trabajo sea una tarea ardua y difícil.

También existe un largo período de latencia para la formulación de normas. Hasta 1967, prácticamente no existían Valores Límite Umbral (TLVs) para los HAP's, año en el que la Conferencia Americana de Higienistas Industriales del Gobierno (ACGIH) adoptó un TLV de $0,2 \text{ mg/m}^3$ para los alquitranes de hulla volátiles. En 1978 se estableció en Suecia un TLV de $0,1 \text{ mg/m}^3$ para el benzo(a)pireno. En 1997, la Occupational Safety and Health Administration (OSHA) de Estados Unidos estableció un Límite de Exposición Permisible (PEL) para el benzo(a)pireno de $0,2 \text{ mg/m}^3$. El Límite de Exposición Recomendado (REL) por el National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) de Estados Unidos es de $0,1 \text{ mg/m}^3$.

En la siguiente lista se presenta una clasificación sobre el grado de exposición a los HAP's en distintos tipos de lugares de trabajo, teniendo como base, las mediciones de benzo[a]pireno:

- *Exposición muy alta a benzo(a)pireno (más de 10 mg/m^3)*—trabajos en fábricas de gas y coque; plantas de aluminio; fábricas de electrodos de grafito; manipulación de alquitranes y breas calentados.
- *Exposición moderada ($0,1$ a 10 mg/m^3)*—trabajos en fábricas de gas y coque; siderurgias; fábricas de electrodos de grafito; plantas de aluminio; fundiciones.
- *Exposición baja (menos de $0,1 \text{ mg/m}^3$)*—fundiciones; producción de asfaltos; plantas de producción de aluminio con electrodos precocidos; talleres de reparación de automóviles y garajes; minas de hierro y construcción de túneles

Otro de los HAP's cancerígenos es el *benzo(a)antraceno*, el cual está presente en el alquitrán de hulla en una concentración de hasta $12,5 \text{ g/kg}$; en la madera y el humo del tabaco en cantidades de $12\text{-}140 \text{ ng}$ en el humo de un cigarrillo; en aceites minerales, en el aire exterior, en una concentración de $0,6$ a 361 ng/m^3 y en las fábricas de gas en una concentración de $0,7$ a 14 mg/m^3 . El benzo(a)antraceno es un cancerígeno débil, pero algunos de sus derivados lo son mucho más, como los *6-*, *7-*, *8-* y *12-metilbenz(a)antracenos* y algunos de sus derivados dimetilados, como el *7,12-dimetilbenz(a)antraceno*. La introducción de un anillo de cinco miembros entre las posiciones 7 y 8 del

benzo(a)antraceno forma colantreno (benzo[j]aceantrileno), que conjuntamente con su derivado 3-metilado, es un cancerígeno extremadamente potente. El *dibenzo(a,h)antraceno* fue el primer HAP puro cuya actividad carcinogénica quedó demostrada (OIT,2001).

El *fluoranteno* está presente en el alquitrán de hulla, el humo del tabaco y los HAP's atmosféricos. No es una sustancia cancerígena, pero sus isómeros benzo(b)-, benzo(j)- y benzo(k)-fluoranteno sí lo son.

El *pireno* está presente en el alquitrán mineral, el humo del tabaco y los HAP's atmosféricos. También está presente en los productos derivados del petróleo en una concentración de 0,1 a 12 mg/mL. El pireno no tiene actividad cancerígena, pero sus derivados benzo(a)pireno y dibenzopireno son cancerígenos muy potentes. En el aire exterior se han medido concentraciones de *benzo(a)pireno* de 0,1 ng/m³ o menores en zonas no contaminadas y valores hasta varios miles de veces superiores en atmósferas urbanas contaminadas. El *benzo(a)pireno* se encuentra en asfaltos, alquitrán de hulla, alquitrán de madera, gases de escape de los automóviles, humo del tabaco, aceites minerales, aceites de motor usados y de equipos eléctricos. El *benzo(a)pireno* y muchos de sus derivados alquilados son carcinógenos muy potentes (OIT, 2001).

En la tabla 1.5 se presentan los 16 HAP's considerados como potenciales agentes genotóxicos y carcinógenos por el Comité Europeo Científico de Alimentos (European Scientific Committee on Food).

Tabla 1.5 HAP's considerados como sustancias potencialmente cancerígenas y genotóxicas (Stolyhwo, 2005)

Benzo[<i>g,h,i</i>]perileno	Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno	Dibenzo[<i>a,l</i>]pireno
Benzo[<i>a</i>]pireno	Dibenzo[<i>a,c</i>]pireno	Indeno[<i>1,2,3-c.d</i>]
Criseno	Dibenzo[<i>a,h</i>]pireno	Pireno
Ciclopenta[<i>c,d</i>]pireno	Dibenzo[<i>a,i</i>]pireno	5-metilcriseno
Benzo[<i>a</i>]antraceno	Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	Benzo[<i>j</i>]fluoranteno
	Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	

1.3.4. Presencia y comportamientos de los HAP's en el ambiente.

El recorrido de los HAP's en el ambiente depende mucho de la forma y del modo en que se incorporan. Pueden ingresar a las aguas superficiales a través de la atmósfera y de descargas o vertidos directos. También se detectan en aguas freáticas, como resultado de la migración directa de aguas superficiales contaminadas o como consecuencia de suelos contaminados. Las concentraciones que se encuentran son muy variables, desde concentraciones muy altas en partículas provenientes de combustiones hasta concentraciones muy bajas que generalmente ocurren en agua de mar (Hammel, 1995; Connell, 2005). Algunas concentraciones típicas en el ambiente de algunos HAP's se presentan en la tabla 1.6.

Tabla 1.6 Ejemplos típicos de concentraciones de algunos HAP's en el medio ambiente (OIT, 2001; Connell, 2005; Stolyhwo, 2005)

Compuesto	Partículas de combustión (mg/Kg)	Aire (Ciudad) (ng/m ³)	Pescado ahumado (µg/Kg)	Lodos de aguas residuales (µg/Kg peso seco)
Fluoranteno	4-400	1-15	300-3000	2-7
Benzo[a]antraceno	2-160	0.1-20	20-200	1-4
Perileno	0.1-138	1	1-4	0.1-2
Benzo[a]pireno	0.2-64	1-1000	4-16	0.5-3
Coroneno	0.1-40	2	1-10	0.1-2

La unión de los grupos aromáticos en estos compuestos le da cierta estabilidad, sin embargo, la naturaleza de sus dobles enlaces conjugados provocan una fuerte absorción a la luz visible y UV, con lo cual se favorece la transformación de estos compuestos disminuyendo la estabilidad en el ambiente. La incorporación de cloro y ozono en el tratamiento de aguas residuales reduce la presencia de HAP's significativamente, de igual forma, la exposición de agua a la luz solar favorece la degradación de estos compuestos. En aguas turbias, el proceso anterior es más lento ya que los HAP's se adsorben en las partículas de materia orgánica. La biodegradación por microorganismos ocurre regularmente por procesos de oxidación, como los ejemplos presentados en la figura 1.5 (Connell, 2005; Hammel, 1986, Xu, 2004).

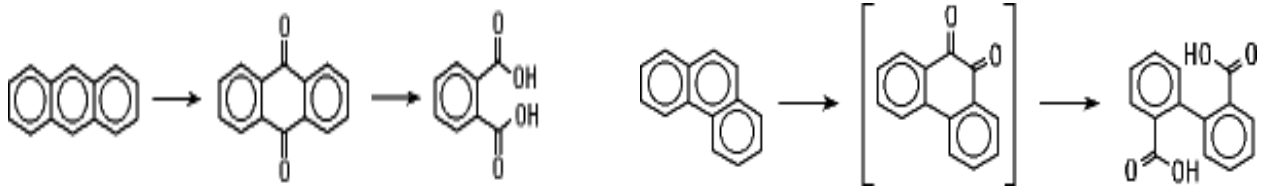


Figura 1.5 Reacciones conocidas del metabolismo del antraceno y del fenantreno por *P. chrysosporium* (Hammel, 1986).

El tiempo de vida media de los HAP's en sistemas sedimento-agua aumenta al incrementarse el tamaño de la molécula. Mientras que el naftaleno presenta una vida media de 2.4-4.4 semanas, el benzo[*a*]pireno presenta valores cercanos a los 6 años en las mismas condiciones (Sierra, 2002; Connell, 2005).

En la siguiente figura se presentan un diagrama general del proceso de biodegradación de los HAP's en suelos.

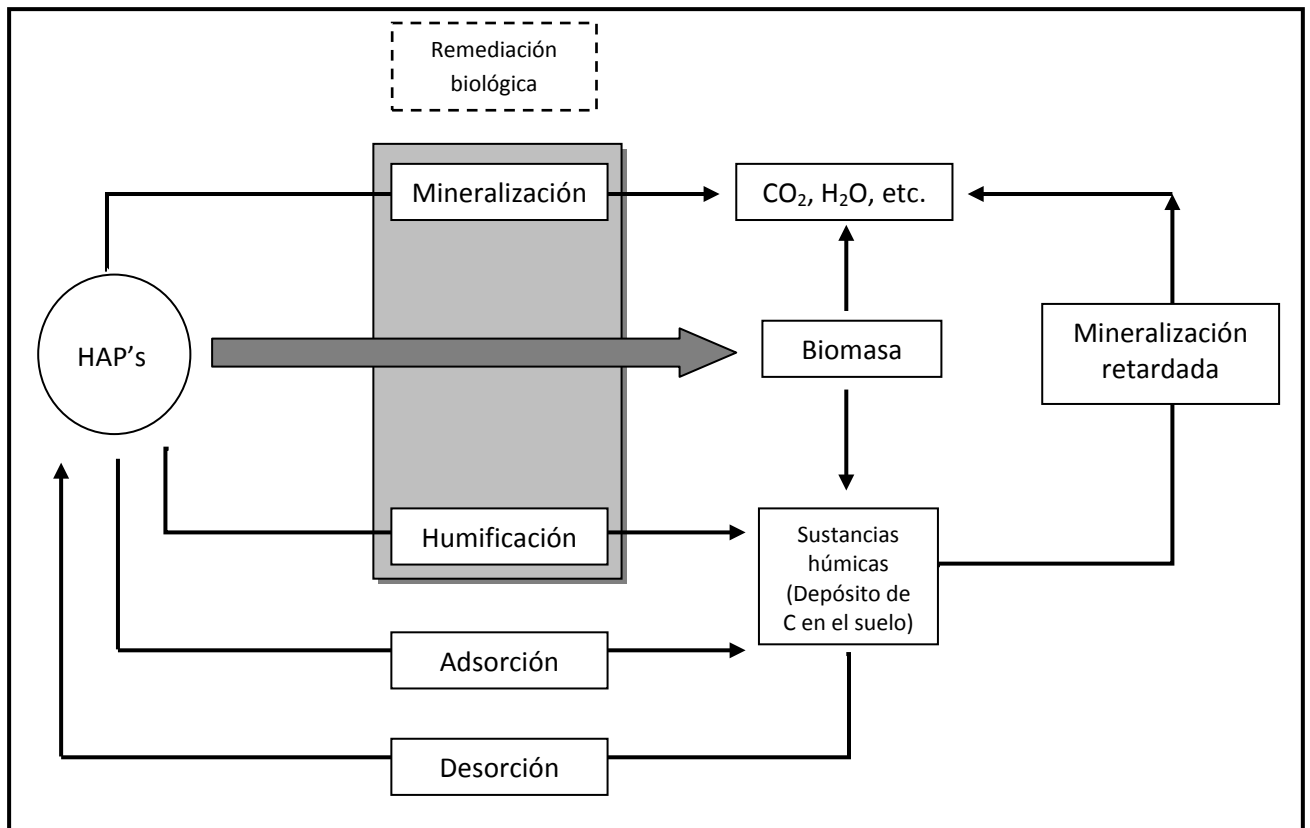


Figura 1.6 Rutas de eliminación de los HAP's durante su descomposición bioquímica en suelo (Schwedt, 2001)

1.3.5. Presencia en México de los HAP's.

En México no se cuenta con un estimado de las emisiones totales de HAP's al ambiente, por lo que todas aquellas fuentes fijas y móviles reportadas en la literatura y que se llevan a cabo en México, emitirán una cierta cantidad de HAP's, que en un futuro se tendrá que cuantificar. En la tabla 1.7 se presentan algunas actividades importantes en México que pueden emitir HAP's.

Las quemas agrícolas y las prácticas de troza, tumba y quema pueden contribuir de manera importante a la carga de HAP's en el ambiente, ya que 2.6 % de la superficie de la república es quemada anualmente como parte de una tecnología para limpiar terrenos y prepararlos para la siembra (CENICA, 2001). No podemos estimar cuánto se genera de HAP's según la tabla 1.7, ya que no se conoce la cantidad de materia orgánica que se quema anualmente en este proceso, ni durante los incendios.

Tabla 1.7 Magnitud de las actividades antropogénicas que pueden generar emisiones que contienen HAP's.

Actividad, proceso o fuente de emisión	Cantidad	Unidad
Superficie incendiada ¹	235,914	ha/año
Superficie quemada en agricultura ¹	5	Millones ha/año
Utilización de leña como combustible ²	23.2 a 34.6	m ³ /año
Producción de energía primaria con: ³		petajoules
Carbón	220	
Petróleo	6799	
Condensados	122	
Gas asociado	1272	
Bagazo de caña	89	
Leña	251	
Producción de energía secundaria con: ³		petajoules
Coque	39	
GLP	322	
Gasolinas/naftas	889	
Queroseno	120	
Diesel	542	
Combustóleo	1135	
Gas natural	1087	
Incineración de: ¹		
Basura	741,243	ton/año
Residuos biológico infecciosos	8	ton/año
Extracción de crudo ⁴	723	Miles barriles diarios

1) CENICA, 2001; 2) Díaz, 2000; 3) SENER, 2004; 4) Delgado y col., 2004.

Con respecto a la producción de energía primaria se utiliza petróleo como fuente principal (70%) y para generar energía secundaria se utiliza sobre todo combustóleo (22.5%), gas natural (21.%) y gasolinas/naftas (17.6%). La leña, aunque no represente un porcentaje importante del total de generación de energía (2.9%), sí lo es como fuente de energía en muchos hogares de zonas rurales y sería importante evaluar la generación de HAP's durante la combustión de la leña, porque generalmente se quema dentro de los hogares, en condiciones de ventilación pésimas y las personas están muy expuestas a las emisiones de humo.

Durante la explotación, extracción y transporte de petróleo muchas veces se originan derrames accidentales ocasionando la contaminación de suelos y aguas superficiales el 97% de estas actividades se lleva a cabo en Tabasco y Campeche (Delgado y col., 2004), zona que registró 666 contingencias con un volumen total derramado de casi 2 millones de litros de crudo y otros productos entre 1993 y 1998 (PARS, 1999).

Gran parte de las investigaciones que se han realizado en México han sido para cuantificar el grado de contaminación en diferentes matrices, en la tabla 1.8 se enlistan algunas de ellas, indicando la matriz en la que fueron medidos los HAP's y su localización. Puede apreciarse que en la mayoría de los trabajos no se analizan compuestos individuales sino la suma de HAP's, que normalmente se refiere a los 16 HAP's definidos por la EPA. Para fines de comparación sería muy importante que el método de extracción y cuantificación fuera el mismo. Mucho de lo que se ha hecho en suelos y sedimentos está relacionado con actividades petroleras, prácticamente no existen datos de concentración de HAP's en diferentes fuentes de emisión y su destino en el ambiente.

La única norma en la que se especifican límites máximos permisibles para HAP's individuales es la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 "que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y especificaciones para su caracterización y restauración" y es muy específica para hidrocarburos del petróleo que provienen de derrames y/o fugas tanto recientes, como pasivos ambientales. Esta norma establece límites según el uso de suelo, tabla 1.9.

Tabla 1.8 Concentraciones de HAP's en diferentes matrices en México.

HAP's	Concentración	Matriz	Localización	Método de análisis	Referencia
ΣHAP's y nitro-HAP's	0.2-1.0 µg/m ³	Materia orgánica PM10	Cd. México	Sonicación/CG-MS	Villalobos-Pietrini y col., 2007
Fen, Ant, Flu, Pir, Ret, BA, BeP, BaP, Per, InP, DA, BghiP, Cor.	0.3-4 ng/ m ³	Aire PM10	Cd. México	Partículas colectadas en filtros-Extracción-GC-MS	Villalobos-Pietrini y col., 2006
ΣHAP's	60-910 ng/m ³	Partículas de aerosoles	Cd. México	EcoChem PAS 2000	Marr y col., 2004
ΣHAP's	4.85-9.40 ng/m ³	Aire PM10	Cd. México	Sonicación/CG-MS	Calderon-Segura y col., 2004
ΣHAP's	92-208 mg/kg 252-478 mg/kg 0.03-20 mg/kg	Suelo con: -Derrames antiguos -Derrames recientes -Nivel de fondo	Planicie aluvial en Tabasco	Soxhlet/CG-FID	Cram y col., 2004
ΣHAP's	77.06-772.24 µg/g	Peces <i>Ariopsis assimilis</i>	Chetumal, Quintana Roo	Soxhlet/CG-FID	Noreña-Barroso y col., 2004
ΣHAP's	19.3-563 ng/g	Hojas de pino	Cd. México, zonas residenciales e industriales	Extracción en columnas abiertas/CG-MS	Hwang y col., 2003
Cri, Nap, BaP, Acy	3.11-4.21 µg/g	Suelo	Morelia, Michoacán	Extracción/CG-FID	Iturbe y col., 2003
ΣHAP's	10.24-22.86 µg/g	Bivalvos <i>Crassostrea palmula</i> , <i>Mytella strigata</i> , <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>Crassostrea iridescens</i>	Océano Pacífico subtropical mexicano	Soxhlet/CG-FID	Botello y col. 2002
ΣHAP's	6.91-53.91 µg/g 2.57-10.97 µg/g	Suelo arcilloso Suelo arenoso	Samaria, Tabasco	Soxhlet/CG-FID	Gutiérrez y Zavala, 2002
ΣHAP's	0.12-3.52 µg/g	Bivalvos <i>Crassostrea corteziensis</i> ,	Océano Pacífico mexicano	Soxhlet/CG-FID	Pérez-Osuna y col., 2002
ΣHAP's	0.02-3.2 µg/g	Sedimentos marinos	Salina Cruz, Oaxaca	CLAR	Botello y col., 1998
ΣHAP's	0.01-0.24 µg/g	Bivalvos <i>Crassostrea virginica</i>	Tabasco	Soxhlet/CG-FID	Gold-Bouchot y col., 1997

CG-FID = Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas; CG-FID= Cromatografía de Gases-Detector de ionización de llama; CLAR= Cromatografía de líquidos de alta resolución; Nap= Naftaleno; Acy= Acenaftileno, Fen= Fenantreno; Cri= Criseno; Pir= Pireno; Ant= Antraceno; Flu= Fluoranteno; Ret= Reteno; BA; Benzo[a]antraceno; BeP= Benzo[e]Perileno; BaP= Benzo[a]pireno; Per= Perileno; InP= Indeno[1,2,3cd]pireno; DA= Dibenzo[a,k]antraceno; Benzo[ghi]Perileno.

Tabla 1.9 Límites máximos permisibles en suelos según la NOM-138- SEMARNAT/SS-2003 y niveles de limpieza en suelos en Estados Unidos (en mg/kg) (a) (Kostecki, 2001)

HAP's	Suelo			
	Agrícola	Residencial	Industrial	E. U. A. ^(a)
Benzo[a]antraceno	2	2	10	0.56-1.4
Dibenzo[a]antraceno	2	2	10	No Reportado
Benzo[b]fluoranteno	2	2	10	0.56-1.4
Benzo[k]fluoranteno	8	8	80	1.5-5.5
Benzo[a]pireno	2	2	10	0.1-0.33
Indeno	2	2	10	1.5-0.33

En cambio, la normatividad referente a aguas residuales (NOM-001 a 003), aprovechamiento y disposición final de lodos (NOM-004) y especificaciones que hacen peligroso a un residuo (NOM-052), no incluyen límites permitidos para HAP's.

En el aire tampoco se mencionan compuestos individuales de HAP's, aunque varias normas regulan la cantidad de emisiones en forma de gas y particulada, por ejemplo, para la industria cementera (NOM-044) ó en la contaminación atmosférica por fuentes fijas y móviles (NOM's 075, 085, 086, 137).

1.3.6. *Propiedades fisicoquímicas*

Los HAP's son solubles en muchos disolventes orgánicos, pero muy poco solubles en agua, tanto menos cuanto mayor sea su peso molecular (Jhonsen, 2005). Sin embargo, los detergentes y compuestos que forman emulsiones en agua ó los HAP's adsorbidos en partículas en suspensión, pueden aumentar el contenido de HAP's en aguas residuales o naturales (Kalf y Crommentuijn, 1997).

Desde el punto de vista químico, los HAP's reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce su saturación. Generalmente se conserva el sistema de anillos. La mayoría de los HAP's se fotoxidan, la cual es una reacción importante para eliminarlos de la atmósfera. La reacción de fotoxidación más frecuente es la formación de endoperóxidos, que pueden convertirse a quinonas (OIT, 2001).

En el presente trabajo se estudiarán benzo[*a*]pireno, benzo[*a*]antraceno y benzo[*b*]fluoranteno, por lo que a continuación se describen sus propiedades fisicoquímicas:

- El benzo[*a*]antraceno, tiene un peso molecular de 228 g/mol y es relativamente insoluble en agua (0.001 mg/L), es ligeramente soluble en ácido acético, etanol caliente, soluble en acetona y muy soluble en benceno. Es sólido a temperatura ambiente, incoloro e inodoro.

- El benzo[*a*]pireno, también llamado 3-4 benzopireno, es un compuesto de alto peso molecular (252 g/mol), formado por 5 anillos bencénicos. Es soluble en benceno, tolueno y xileno (Luttrell, 2007), pero tiene una solubilidad muy baja en agua (0.003 mg/L) y está catalogado como el hidrocarburo más genotóxico de la lista de 16 hidrocarburos según la Agencia de Protección Ambiental (Rivera, 2006). A temperatura ambiente se encuentra en forma de cristales de color amarillo pálido y puede absorberse a través de la piel (IPCS, 2005). Este compuesto puede ser metabólicamente oxidado por cierto número de microorganismos produciendo varios metabolitos (Chen y Aitken, 1999).

- El benzo[*b*]fluoranteno es un sólido cristalino a temperatura ambiente, su peso molecular es de 252 g/mol y su solubilidad en agua es de 0.001 mg/L. Es ligeramente soluble en benceno y acetona (RAIS, 2007, ATSDR, 1995).

1.4. Análisis de HAP's por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

En el análisis de HAP's a partir de muestras ambientales, el pre-tratamiento de la muestra al análisis cromatográfico es largo, en algunos casos el tiempo de extracción de los HAP's puede durar hasta 56 horas (Al-Saad, 1996). En la tabla 1.10 se recopilan los métodos reportados recientemente en diferentes publicaciones para la determinación de HAP's en diferentes tipos de matrices. Se desglosa el tipo de tratamiento para la preparación de muestra, así como los detectores acoplados a la cromatografía de líquidos para el análisis de los extractos y los límites de detección de los métodos.

Se puede observar en dicha tabla que la mayoría de las extracciones se realizan con disolventes para cualquier tipo de muestra. En lo que respecta a las muestras líquidas, se observa que la técnica de elección es la Extracción en Fase Sólida (EFS), utilizando cartuchos con sílice C18 (No. Ref. 3, 4, 9).

La limpieza de los extractos obtenidos depende de la complejidad de la muestra, describiéndose el uso de la extracción líquido-líquido (Refs. 1, 2), la cromatografía en columna (No. Ref. 1, 8 y 10) y la EFS (No. Ref. 4).

Para las muestras sólidas, se utilizan diversas técnicas para la extracción de los compuestos; algunas sencillas como la simple homogenización de la muestra en disolventes de baja polaridad (No. Ref. 4 y 10) hasta técnicas más sofisticadas que requieren equipos específicos como la Extracción Asistida por Microondas (EAM) (No. Ref. 1). Aún cuando pueden ser tan diferentes estos dos modos de extracción, ambas técnicas, tienen los inconvenientes de consumir una gran cantidad de disolventes y aumentar la manipulación de la muestra por la necesidad de realizar varios pasos de limpieza una vez que se tiene el extracto. Además, proporcionan bajos recobros para algunos de los HAP's, en especial, los de menor peso molecular.

Tabla 1.0. Métodos publicados recientemente para la determinación de HAP's usando la técnica de CLAR

No. Ref	Matriz (Cantidad)	Analitos	Extracción	Limpieza	Recobro	Análisis	L. D.	L. C.	Referencia (año)
1	Lodo de aguas residuales (0.5 g)	16 HAP's	EAM con hexano / acetona (1:1 v:v)	ELL con ciclohexano y CC elución con diclorometano /n-pentano (2:3 v:v)	52-104% (DAD) 69-110% (FL)	DAD y DF	13-63 ng/g (DAD) 4-12 ng/g (DF)	44-205 ng/g (DAD) 14-41 ng/g (DF)	Villar (2004)
2	Aerosoles	12 HAP's	ESA con diclorometano	ELL con n-hexano y CC elución con n-hexano / diclorometano (3:1 v:v)	75-129%	DAD y DF	40 pg/m ³	N. R.	Okuda (2006)
3	Orina (20 mL)	3-BaA-OH y 3-BaP-OH	EFS - C-18, elución con éter etílico	Evaporación y concentración en MeOH / buffer de acetato de sodio	102-124%	DF	3-8 ng/L	N. R.	Gündel (2000)
4	a) Agua residual (1 L) b) Lodos (2.5 g)	16 HAP's	a) EFS – C18, elución con mezclas n-hexano, acetona, 2-propanol b) Sonicación con 2-propanol:acetona (50:50 v/v)	(a) Evaporación y concentración en 2-propanol (b) EFS – C18, elución con mezclas n-hexano, acetona, 2-propanol	73-92% (a) 71-89% (b)	DF	0.52-1.2 ng/L (a) 4.1-12.1 ng/g (b)	1.73-4.00 ng/L (a) 17.67-40.33 ng/g (b)	Busetti (2006)
5	Pescado (0.6 – 0.8 g)	6 HAP's	DMFS – C18-NaSO ₄	Co-columna de florisil	> 80%	DF	0.04 – 0.32 ng/g	0.13 – 1.07 ng/g	Pensado (2005)

L.D. = Límite de detección del método, L.C. = Límite de cuantificación del método, DAD= Detector de Arreglo de Diodos. DF= Detector de Fluorescencia, N. R. = No Reportado. EFS = Extracción en Fase Sólida, ELL = Extracción Líquido-Líquido, 3-BaA-OH = 3-hidroxi-benzo[a]antraceno, 3-BaP-OH = 3-hidroxi-benzo[a]pireno, DMFS = Dispersión de Matriz en Fase Sólida; EAM = Extracción Asistida por Microondas; CC = Cromatografía en Columna; ESA = Extracción por Solventes Acelerada.

Tabla 1.0. (continuación) Métodos publicados recientemente para la determinación de HAP's usando la técnica de CLAR										
No. Ref.	Matriz (Cantidad)	Analitos	Extracción	Limpieza	Recobro	Análisis	L. D.	L. C.	Referencia (año)	
6	Suelo (0.5 g)	16 HAP's	DMFS – Florisil, elución con hexano / acetona (1:1)	Co-columna con Sílice y Florisil	94 - 104 %	DF	0.007 – 0.2 ng/g	0.01 - 0.6 ng/g	Pena (2007)	
7	Aguas naturales (300 mL)	15 HAP's	ELL - hexano	Evaporación y concentración a 1 mL con acetoneitrilo	80.9 – 106 %	DF	0.033 – 0.13 ng/L	0.11 – 0.43 ng/L	Brum (2008)	
8	Mezclas de tocoferoles (2.0 g)	17 HAP's	Disolución en <i>n</i> -hexano	CC – Alúmina, evaporación y concentración en acetoneitrilo	15.9 – 77.9 %	DF	0.01 – 0.45 ng/g	0.04 – 1.5 ng/g	Yang (2008)	
9	Muestra artificial del tracto gastrointestinal al (500 mL)	6 Hidrox-HAP's	EFS – C18, elución con metanol	Agregando agua antes de eluir los compuestos del cartucho de EFS	45 – 107 %	EM	0.36–14.09 µg /L	< 50 µg/L	Van de Wiele (2004)	
10	Suelo (5 g)	15 HAP's	Por disolventes con sonicación en diclorometano	CC- Sílica gel, elución con hexano / diclorometano (1:1)	36 – 110 %	DF	0.24 - 2.9 µg/Kg	N. R.	Ping (2007)	

L.D. = Límite de detección del método, L.C. = Límite de cuantificación del método, DAD= Detector de Arreglo de Diodos. DF= Detector de Fluorescencia, N. R. = No Reportado. EFS = Extracción en Fase Sólida, ELL = Extracción Líquido-Líquido, 3-BaA-OH = 3-hidroxi-benzo[a]antraceno, 3-BaP-OH = 3-hidroxi-benzo[a]pireno, DMFS = Dispersión de Matriz en Fase Sólida; EAM = Extracción Asistida por Microondas; CC = Cromatografía en Columna; ESA = Extracción por solventes Acelerada; EM = Espectrometría de Masas.

La técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) se utilizó solamente en dos de los trabajos, utilizando principalmente sílice C18 como fase de dispersión y puede aplicarse tanto para muestras ambientales inertes como biológicas (No. Ref. 5 y 6) dando muy buenos recobros para los compuestos estudiados.

Cabe destacar que en los trabajos donde se utilizaron la EFS y la DMFS como técnicas de extracción, la limpieza de interferentes se realizó al mismo tiempo que la extracción de los analitos, lo cual proporciona una ventaja más con respecto a las otras técnicas.

Finalmente, para el análisis de los compuestos por cromatografía de líquidos, se nota que el más usado, es el detector de fluorescencia, proporcionando límites de detección del orden de ng/g de muestra para muestras sólidas y de ng/L para líquidas.

En la literatura, no se encontraron trabajos sobre la determinación de HAP's en microorganismos. Slater y cols. en el año de 2008, realizaron un monitoreo en la bahía de Hamilton, en Ontario, Canadá, para determinar la concentración de HAP's, junto a bifenilos policlorados (BPC's) y algunos metales pesados en muestras de suelo provenientes de diferentes profundidades, cuyas concentraciones totales de HAP's están entre 10 y 90 µg/g de suelo, el análisis fue hecho utilizando cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-MS). Al mismo tiempo, se midieron las concentraciones de fosfolípidos unidos a las membranas celulares de los microorganismos que habitaban esa zona, mediante la extracción líquida con una mezcla de metanol:diclorometano:amortiguador de fosfatos (2:1:0.8) y posterior fraccionamiento en una columna con sílica gel desactivada usando metanol para eluir los fosfolípidos. Se halló una relación inversamente proporcional entre la concentración de HAP's en suelo y la concentración de fosfolípidos, determinada en microorganismos, con lo cual concluyeron que la microfauna presente en los sitios estudiados, contribuye a la estabilidad de los HAP's en los sedimentos.

En particular, el análisis de HAP's en microorganismos se considera una tarea difícil debido a la baja concentración de los compuestos individuales (algunos en ng/g) y a la cantidad de materia disponible (algunos miligramos) tan limitada. Es por esto que, debido a la poca manipulación de la muestra y la rapidez para hacer cada extracción, la técnica de DMFS resulta un proceso de purificación y al mismo tiempo de pre-concentración, más eficiente, confiable y rápido en comparación con las otras técnicas reportadas.

Por lo tanto, considerando la información obtenida en la literatura se decidió que la mejor técnica para realizar la extracción de los HAP's de los protozoarios es la DMFS y para los cultivos líquidos es la EFS. A continuación se detallan sus características y aplicaciones.

1.5. Extracción en Fase Sólida (EFS).

La EFS es una técnica moderna, rápida y confiable en el análisis de compuestos trazas tanto en el área ambiental como en la biológica. Se empezó a utilizar en 1978 como cartuchos y a principios de los años 80 como pre-columnas para el análisis en línea por cromatografía de líquidos. Sin embargo, cuando surgió la necesidad de hacer ensayos utilizando la menor cantidad posible de disolventes orgánicos, la EFS empezó a desarrollarse rápidamente con mejoras en los tipos, automatización e introducción de nuevas fases estacionarias. La EFS ahora es aceptada por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (US EPA, Environmental Protection Agency) como un método alternativo a la extracción líquido-líquido (ELL) para la preparación de muestras de agua potable y agua residual para el análisis de contaminantes orgánicos (*Hennion, 1999*).

La EFS se utiliza para la extracción de analitos a partir de muestras líquidas, y los materiales para llevar a cabo son muy sencillos. Se tiene un cartucho, empacado con algún tipo de fase o soporte sólido, entre 50 a 2000 mg de fase por cartucho. Los cartuchos están hechos regularmente con materiales inertes como el polipropileno y polietileno. La fase sólida puede ser de diversos materiales y dependerá de las necesidades del ensayo, el diámetro de poro está entre 40 y 60 μm . Cuando el sistema de extracción se maneja por

separado del análisis, de la elución de los disolventes y de la muestra, entonces se puede hacer por simple acción de la gravedad o con el apoyo de varios tipos de accesorios, algunos de los cuales permiten el uso de cartuchos empacados en serie, lo cual favorece el análisis de varias muestras a la vez (figura 1.7). Cuando la EFS se utiliza en línea, puede ser adaptada con los dispositivos adecuados al sistema analítico como una precolumna. Existen aparatos en línea que soportan más de 24 precolumnas al mismo tiempo (Hennion, 1999, Liska 2000).

El proceso de la EFS se puede considerar como una simple cromatografía de líquidos en donde, el soporte sólido es la fase estacionaria y la muestra es la fase móvil en el proceso de extracción y los disolventes de elución en el proceso de elución de los compuestos (Pichon, 2000).

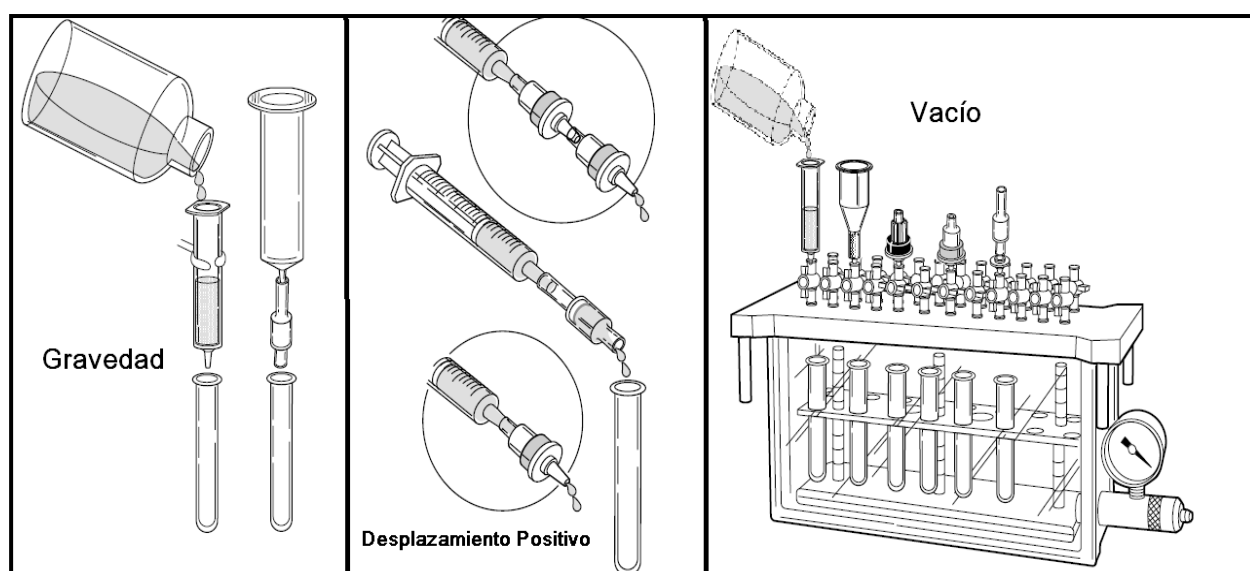


Figura 1.7. Algunas formas de eluir los disolventes en la EFS (Waters, 2001).

Los pasos generales que constituyen un experimento de EFS son los siguientes:

- *Acondicionamiento del cartucho.* Antes de cargar la muestra, es recomendable hacer pasar por el cartucho cierta cantidad del mismo disolvente en que ésta se encuentra. Cuando se trabaja en línea se puede omitir este paso, sin embargo se debe tener cuidado al determinar los recobros. Los materiales en fase inversa se suelen acondicionar con disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo, isopropanol,

tetrahidrofurano, etc.) antes de acondicionar con agua; con esto se pueden obtener resultados reproducibles. Sin este paso, una cantidad alta de disolvente en la muestra sería incapaz de penetrar en los poros y humedecer la superficie del soporte. Si esto sucediera, una menor superficie estaría disponible para la unión de los analitos a separar. Por esta razón es importante evitar que el cartucho se seque antes de cargar en él la muestra.

- *Carga de la muestra.* La muestra se hace pasar por el cartucho comúnmente a velocidades de flujo entre 1 y 20 mL/min dependiendo del tamaño de la muestra. La mayoría de las veces se controla el flujo mediante el uso de cajas de vacío con medidores de presión.
- *Limpieza de interferentes.* Antes de eluir los analitos de interés, se puede agregar una serie de disolventes, puros o mezclas, de menor fuerza eluente para eliminar a todos los componentes de la matriz que puedan causar interferencias en el análisis.
- *Elución de los analitos.* Finalmente los analitos se recuperan del cartucho usando disolventes adecuados. La mayoría de las veces no es necesario hacer otro paso de limpieza, por lo que el extracto se puede analizar en estas condiciones.

Este es el procedimiento más utilizado para llevar a cabo una EFS para el análisis de multiresiduos o cuando se necesite aumentar la concentración del analito debido a su presencia en bajas concentraciones en la muestra. Sin embargo, en los casos en que el o los analitos estén en la muestra en concentraciones altas, se pueden retener los interferentes en el cartucho y permitir que los analitos pasen sin ser retenidos (Waters, 2001).

Un esquema general de un procedimiento por EFS se presenta en la figura 1.8.

1.5.1. Factores que afectan a la EFS (Pichon, 2000; Hennion, 1999).

- *Partículas suspendidas en las muestras.* En ocasiones las muestras ambientales tienen gran cantidad de partículas sólidas por lo que deben ser filtradas antes de trasvasarse al cartucho de EFS para evitar que los filtros se tapen y se impida el flujo constante de la muestra y los disolventes de elución y limpieza.
- Debido a su similitud con la Cromatografía de Líquidos, la elección del tipo de fase estacionaria a utilizar depende del disolvente de la muestra. Una muestra acuosa requerirá el uso de materiales del tipo de cromatografía en fase reversa o intercambio iónico dependiendo de la capacidad de los analitos para ionizarse, mientras que una muestra no acuosa requiere el uso de materiales del tipo de la cromatografía en fase normal.

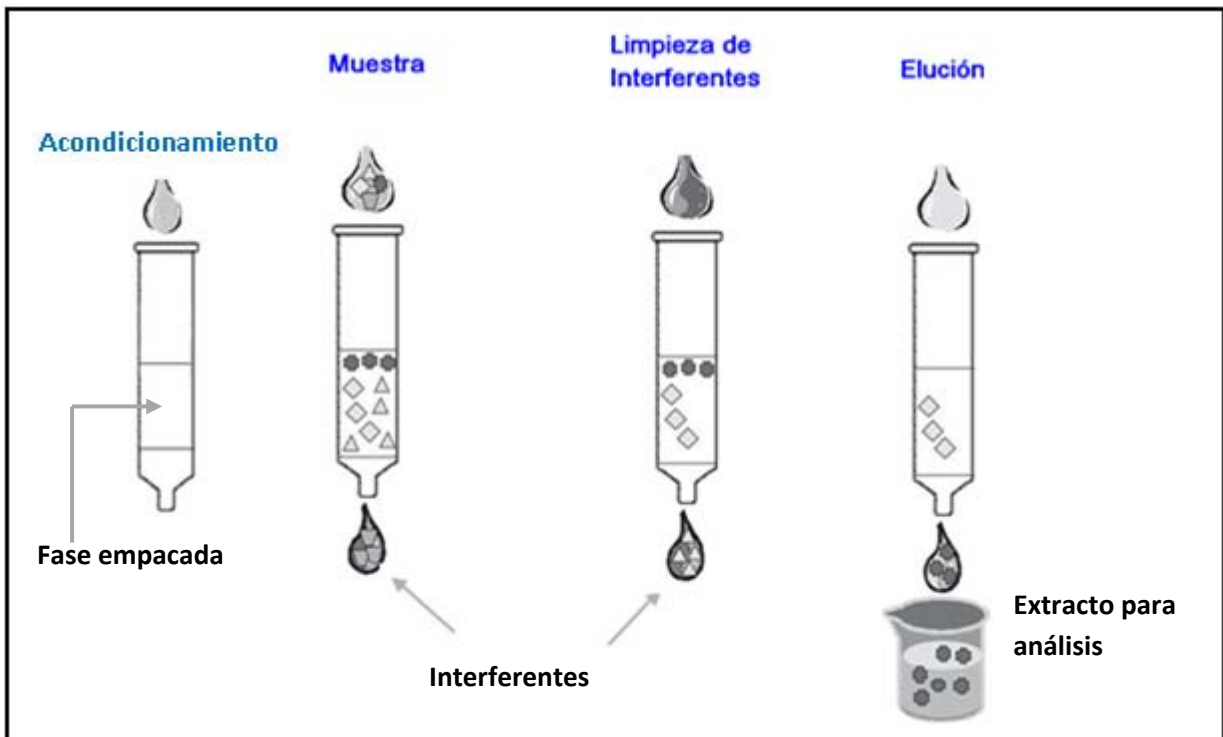


Figura 1.8 Esquema general de un experimento de EFS.

- *Cantidad de fase utilizada.* Determina tanto la cantidad de muestra que va a ser utilizada, como la cantidad de disolvente en que van a ser recuperados los analitos. En general, al aumentar la cantidad de fase estacionaria utilizada, mayor cantidad de analito será retenida y será necesaria una mayor cantidad de disolvente para la elución. Los cartuchos comerciales suelen tener cantidades desde 100 mg hasta los 10 g de fase estacionaria.

1.5.2. Parámetros de la EFS (Pichon, 2000; Hennion, 1999).

Los parámetros de la extracción en fase sólida (EFS) son el volumen de fin de fijación o fuga (V_b) y el rendimiento de extracción.

El *volumen de fuga (V_b)*, representa el volumen máximo de muestra que puede ser aplicada al cartucho de EFS para obtener recobros del 100% al realizar la elución de los compuestos que previamente fueron retenidos en él. Por tanto, si se requieren lograr recobros cuantitativos, se debe trabajar con volúmenes de muestra que no sobrepasen este valor. El valor de V_b dependerá del tipo de adsorbente y la cantidad utilizados, pero principalmente de las características de polaridad de los analitos. Este parámetro puede medirse de diversas formas:

- a) *Determinación directa:* o bien, es cuando una solución con concentración traza de un analito, que produce una señal inicial A_0 en un detector, se aplica a una precolumna empacada con cierta cantidad de fase estacionaria a su vez, conectada directamente a un detector espectrofotométrico. Entonces se monitorea el efluente cuya respuesta en absorbancia genera el perfil de la fuga del analito, presentado en la figura 1.9. Este frente de elución presenta absorbancia nula en un inicio, ya que el analito es retenido por el adsorbente, hasta que este mismo deja de ser retenido, y comienza a eluir al sobrepasar un volumen V_b (volumen de fuga) que corresponde al volumen de disolución fortificada que da una señal correspondiente al 1 % de la señal inicial (A_0). Si se sigue monitoreando el paso de la disolución en el cartucho, la absorbancia aumenta en forma sigmoidea hasta llegar a un valor máximo y constante.

Como se observa en la figura 1.9.A, en condiciones ideales, la curva obtenida tiene una forma bilogarítmica en donde el punto de inflexión, V_r , corresponde al valor del volumen de retención del analito.

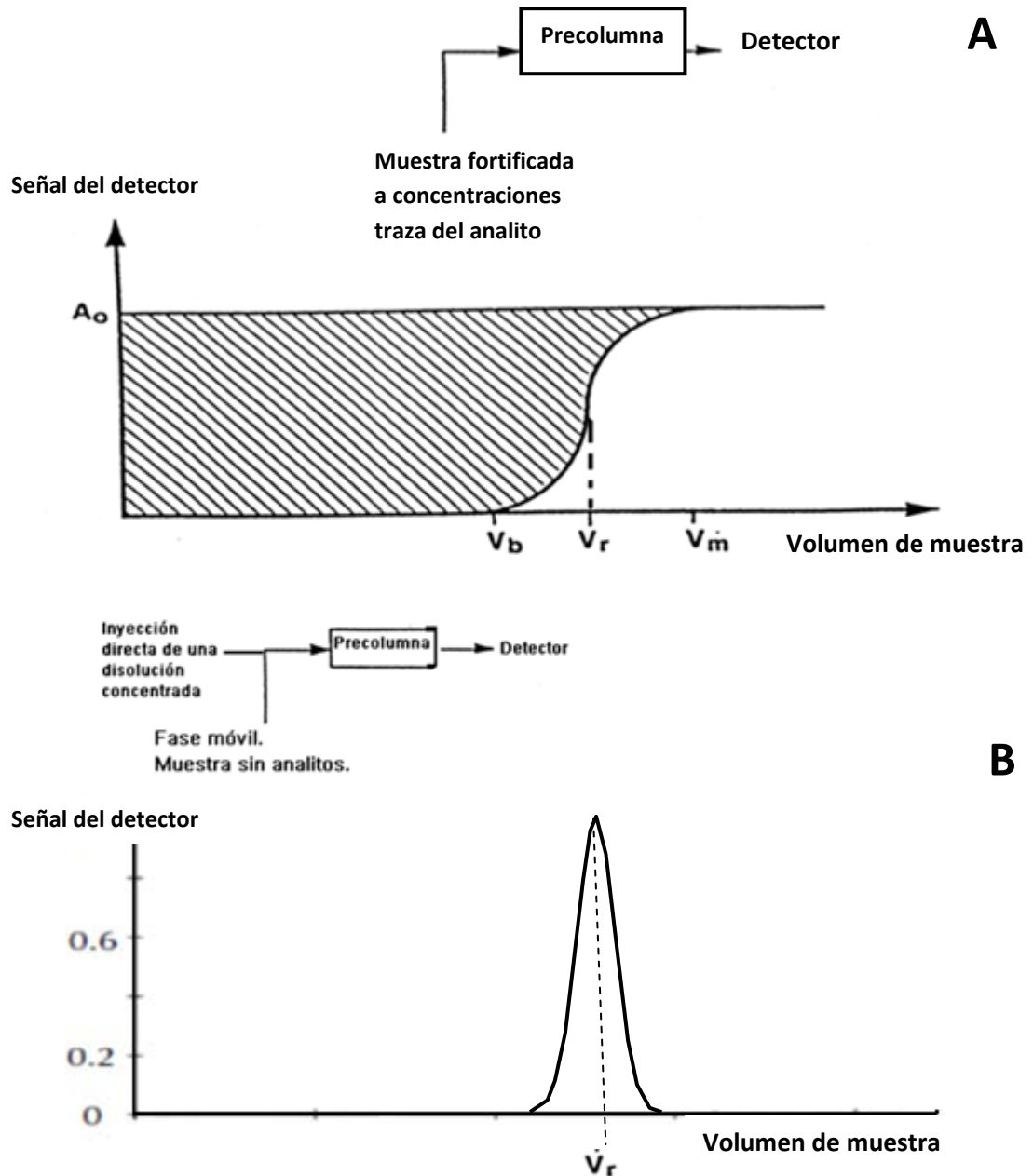


Figura 1.9 Similitud entre la EFS y la cromatografía de líquidos. A) Perfil de fuga obtenido en el monitoreo del efluente de una precolumna o cartucho de EFS. B) Pico de elución del analito aplicado a una precolumna por medio de una inyección directa de una disolución concentrada.

Finalmente, el valor V_m (volumen máximo de preconcentración), representa el volumen al cual la señal del efluente de la precolumna o cartucho de EFS es igual al 99 % de la señal inicial. Por tanto, éste representa el volumen al cual se retiene la cantidad máxima de analito en la precolumna (zona sombreada), por lo cual, la cantidad de analito que siga entrando ya no será retenida más y la señal obtenida para la disolución será igual antes y después de pasar por la precolumna o cartucho de EFS. El inconveniente de este método directo es que a veces es difícil medir con exactitud el 1 % de la señal, debido al ruido del equipo, y también que la determinación completa es muy lenta. Al mismo tiempo, para demostrar la analogía existente entre la cromatografía de líquidos y la extracción en fase sólida, en la misma figura 1.9.B se presenta el pico de elución que se obtendría si una disolución concentrada del mismo soluto se inyectara a la precolumna con una fase móvil constituida por agua pura. El volumen de retención corresponde en este caso, a la cima del pico de elución.

- b) Otra forma de determinar el volumen de fuga, V_b , es preconcentrando en una precolumna diferentes volúmenes de disoluciones fortificadas con uno o más compuestos a cantidades fijas. Al eluir cada uno, se mide el área o la altura que dan los picos de los compuestos. Entonces, como el volumen de la muestra aumenta y no la cantidad, la concentración de los analitos disminuye, pero la cantidad eluida de la precolumna es constante mientras no exista fuga de los analitos. Cuando la fuga ocurre, la señal de los analitos eluidos disminuirá y a este volumen se le denomina V_b .
- c) Un método reciente consiste en fortificar diferentes volúmenes de muestra a una misma concentración y hacerlas pasar por la precolumna o cartucho, eluyendo posteriormente los analitos retenidos. De esta forma, las alturas de los picos, que dan los compuestos eluidos, se relacionan con el volumen de muestra preconcentrado. Como el volumen de muestra irá en aumento, el analito se concentra más y el tamaño o el área de los picos irán en aumento, siempre y cuando no exista fuga de los compuestos. En el momento en que se pierde la relación lineal entre volumen de muestra agregado y el tamaño de los picos, se considera que se ha alcanzado el volumen de fuga, V_b . Estos dos últimos métodos tienen la ventaja de que permiten

determinar el volumen de fuga de varios analitos simultáneamente y de manera más rápida que el método directo (Hennion, 1999).

El rendimiento de extracción o recobro, representa la relación entre la cantidad de analito extraída y la cantidad total inicial aplicada a la precolumna o cartucho. De esta forma, la importancia del volumen de fuga, V_b , indica el volumen máximo de muestra que se puede aplicar a una precolumna o cartucho obteniendo un recobro teórico del 100 %. Lo anterior explica el por qué se hace énfasis en la determinación y predicción de los valores de V_b para los analitos a extraer por EFS. Por otra parte, la cantidad máxima de analito que puede ser extraída, corresponde a la aplicación de un volumen de muestra V_m , sin embargo, se obtendrán recobros menores al 100% si se aplica este volumen, por lo cual, preconcentrar volúmenes mayores a V_m resulta inútil, ya que no se consigue retener y extraer una mayor cantidad de analitos. Así, el recobro dependerá básicamente del volumen de muestra aplicado y del volumen de fuga.

La analogía existente entre la EFS y la CL permite relacionar al *factor de retención* (k') con los volúmenes de fuga o retención de los analitos en el sistema de extracción. Dado que la determinación directa del volumen de fuga es difícil y requiere mucho tiempo en el caso de las muestras acuosas, se han desarrollado modelos para predecir su valor, utilizando el factor de retención en agua pura, k'_w . Al ser la EFS similar a la cromatografía de líquidos, cada compuesto tiene cierta retención en la fase sólida con respecto a la matriz de la muestra. Entre mayor sea el valor de k'_w , mayor será la retención de un compuesto. El volumen de fuga se puede relacionar con el volumen de retención con la siguiente relación fundamental (1):

$$V_b = V_r - 2.3\sigma_v \quad (1)$$

Donde, σ_v es la desviación estándar dependiente de la dispersión axial a través del lecho de partículas en la precolumna o cartucho. Si se conoce el número de platos (N) del cartucho, el volumen muerto (V_0) y el factor de retención (k'), el término σ_v puede calcularse con la relación (2):

$$\sigma_v = \left[\frac{V_o}{\sqrt{N}} \right] (1 + k') \quad (2)$$

El término N puede medirse si se trabaja con precolumnas en línea mediante el registro de la curva de fuga o la inyección directa del analito utilizando como fase móvil el disolvente de la matriz. Su medición para los cartuchos es más difícil por lo que se han hecho estimaciones para las sílices C18 de diámetro de partícula entre 40 y 55 μm , obteniendo un valor promedio de 20 platos teóricos para un flujo de 5 mL/min con 500 mg de adsorbente.

V_o depende de la porosidad del adsorbente (ε) y el volumen geométrico de la precolumna (V_c) con la relación (3):

$$V_o = \varepsilon V_c \quad (3)$$

La porosidad, ε , tiene un valor promedio para las sílices n-alkil enlazadas entre 0.65 y 0.70. El valor de V_o ha sido estimado para este tipo de fases en cartuchos convencionales como 0.12 mL por cada 100 mg de adsorbente.

Finalmente, si se considera la relación entre el volumen de retención, V_r , y el k' con la ecuación (4):

$$V_r = V_o(1 + k') \quad (4)$$

Al sustituir (2) y (4) en (1), se obtiene la ecuación (5) para estimar el volumen de fuga a partir del valor de k' :

$$V_b = V_o(1 + k') - 2.3 \left[\frac{V_o}{\sqrt{N}} \right] (1 + k')$$

$$V_b = V_o(1 + k') \left[1 - \left[\frac{2.3}{\sqrt{N}} \right] \right] \quad (5)$$

Hennion y cols. (1998) simularon curvas teóricas de fuga y curvas teóricas de recobro, al variar k' (kw' , cuando la fase móvil es agua) y el volumen de muestra aplicado. Dichas gráficas se presentan en la figura 1.10 y en ellas se puede apreciar que mientras mayor sea el valor de kw' , mayor es la cantidad de muestra que se puede hacer pasar por el cartucho y obtener recobros cercanos a 100 %, lo cual representa una ventaja en el análisis ambiental ya que se puede preconcentrar con facilidad un analito que esté en concentraciones muy bajas. De esta forma, el kw' (parámetro cromatográfico) proporciona un valor guía para la elección del adsorbente y la predicción de los recobros. Por esto, para preconcentrar a los analitos se recomienda trabajar con kw' cercanos a 3 para obtener buenos recobros con cantidades de muestra grandes.

Por otra parte, el *coeficiente de reparto octanol/agua* (Kow ó P) es un parámetro considerado equivalente al $k'w$ cuando se determina en sílice C-18 y con fases móviles metanol: agua. Por esta razón, se puede hacer una estimación del kw' a partir de los valores del coeficiente de reparto octanol/agua (Kow o P) del compuesto a extraer. Este coeficiente es un parámetro que se deriva de estudios de distribución del soluto, en particular entre agua y un disolvente no polar inmiscible como el octanol, P , representa la tendencia relativa de un compuesto a solubilizarse en la mayoría de los disolventes no polares y sólo moderadamente en agua. P proporciona una idea de la hidrofobicidad o la polaridad de los compuestos (Hennion, 1999). Siempre y cuando los valores de k' buscados sean mayores a 1.5, se ha observado que el kw' y el $\log Kow$ (ó $\log P$) guardan una relación casi lineal (utilizando diferentes sílices C18 y usando como fases móviles mezclas MeOH-Agua). Por medio de esta relación, se puede obtener kw' , sin embargo, es necesario recalcar que es sólo una aproximación y que su valor puede ser subestimado por un factor de 10 a 50 (Pichon, 2000).

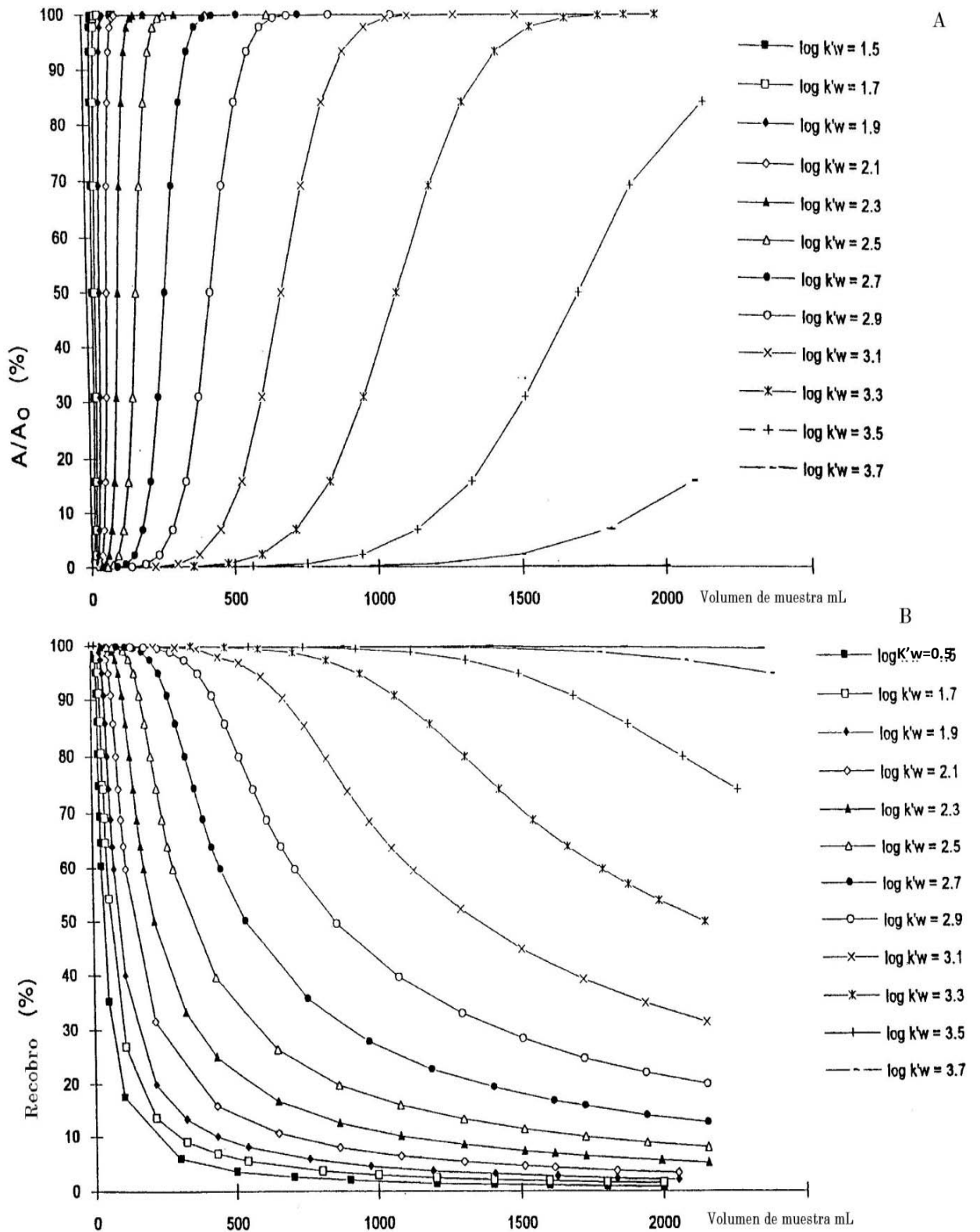


Fig. 1.10. Efecto del coeficiente de retención ($\log k'w'$) del analito en curvas de fuga y recobro teóricas vs volumen de la muestra (Calculados con 450 mg de adsorbente C18 y N = 20) (Hennion, 1999).

1.5.3. Ventajas de la EFS (Waters, 2001; Pichon, 2000; Liska, 2000; Hennion, 1999).

Entre las ventajas que presenta la EFS se pueden enlistar las siguientes:

- *Bajos costos*, por menor consumo de disolventes, reactivos y equipos.
- *Buenos recobros y exactitud*, debidos a la menor manipulación de las muestras.
- *Protocolos de extracción rápidos*, al proporcionar ensayos con menos pasos, lo que evita también problemas de formación de emulsiones.
- *Mayor seguridad para el analista*. Menor exposición a sustancias tóxicas.
- *No hay necesidad de transportar las muestras al laboratorio*, porque los ensayos son tan sencillos que se pueden realizar en el mismo sitio donde se toma la muestra.
- *Menor ruptura de material*, ya que se evita el uso de materiales de vidrio que puedan romperse.
- *Capacidad de concentrar analitos que están a niveles trazas*.

1.5.4. Extracción de HAP's por EFS en muestras acuosas.

La extracción de HAP's en muestras acuosas tiene el inconveniente de que al ser compuestos muy hidrofóbicos, se debería facilitar su extracción mediante el uso de materiales en fase inversa, sin embargo, existen algunos problemas de adsorción a superficies, principalmente para los HAP's de mayor peso molecular, durante la toma de muestras y el almacenaje, los cuales que deben tomarse en cuenta. De esta forma, los recobros obtenidos para la mayoría de los HAP's dependerán de su estructura química en las disoluciones acuosas. Mientras que para los metabolitos de HAP's se alcanzan recobros entre 100 y 124 % (Gündel & Angerer, 2000), para los HAP's sin metabolizar sus recobros son menores al 70 %, para los HAP's más ligeros, y cercanos a 35 % para los más pesados. Los HAP's metabolizados, presentan grupos -OH principalmente, lo cual les proporciona un carácter más polar y aumenta su solubilidad en el medio acuoso, por lo cual al pasar en el cartucho de EFS, se preconcentra una mayor cantidad de analitos. Los HAP's de bajo peso molecular, tienen suficiente solubilidad en agua y logP para que, a concentraciones trazas, se encuentren disueltos en el medio líquido. Sin embargo, compuestos a partir de 4 anillos o

más, sufren una gran adsorción, ya sea en los recipientes donde se almacena la muestra o en aquellos donde se lleva a cabo la EFS.

Para incrementar la solubilidad de los HAP's, un disolvente orgánico, como metanol, acetonitrilo ó 2-propanol, ó algún surfactante suele ser agregado a las muestras. El volumen de disolvente agregado es un punto crítico en los ensayos, ya que si es muy bajo, no será suficiente para solubilizar a los HAP's de pesos moleculares altos, y si el volumen agregado es muy alto, los volúmenes de fuga de los HAP's más ligeros serán disminuidos, provocando pérdidas en el ensayo de extracción (Marcé, 2000). La polaridad del disolvente agregado también es importante, debe ser un disolvente orgánico de polaridad intermedia, es por esto que diversos autores, han utilizado como disolvente modificador el 2-propanol en porcentajes entre 10 y 25 % (Jeanneau, 2007; Nirmaier, 1996; Kiss, 1996; Busetti, 2006) obteniendo recobros superiores al 90 %.

En lo que respecta a la fase sólida utilizada, se han hecho comparaciones entre diversos materiales y la que proporciona los mejores recobros es la sílice C-18 (Nirmaier, 1996; Kiss, 1996, Busetti, 2006, Jeanneau, 2007). Sin embargo, se han estado usando materiales hechos a base de carbón grafitizado, obteniendo bueno recobros (Wang, 2007; Hennion, 2000).

Una vez retenidos los HAP's en el cartucho, los disolventes de elección para eluir los compuestos son de tipo orgánico. Los más utilizados son n-hexano, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, acetona, 2-propanol y acetato de etilo. Entre mayor sea el número de anillos de los HAP's, se requerirá un disolvente menos polar para extraerlo del cartucho con buenos recobros, por lo que, a menudo se eluyen con mezclas de disolventes orgánicos. Sin embargo, se debe considerar que si el extracto se inyectara directamente a un sistema de CLAR en fase inversa, causaría conflictos con la fase móvil utilizada, que es más polar. Por esto, en ocasiones es conveniente evaporar el extracto obtenido y reconstituir el sólido en algún disolvente afín a la fase móvil utilizada, metanol ó 2-propanol en la mayoría de las veces (Marcé, 2000, Busetti, 2006). En su estudio Kiss y cols. (1996) analizaron otro aspecto importante que influye en los recobros, el cual es, secar los cartuchos de extracción antes de agregar el disolvente de elución. En el trabajo se demuestra que existen diferencias significativas entre los recobros obtenidos dejando secar los cartuchos una vez cargada la muestra acuosa y los recobros obtenidos sin dejar que el cartucho estuviera seco al utilizar

dos disolventes orgánicos de diferente polaridad (tetrahidrofurano y diclorometano). En sus resultados muestran que cuando se seca el cartucho se obtienen mejores rendimientos para ambos compuestos. Además, cuando no se seca el cartucho, se obtiene una mayor variación con RSD% >20 en los recobros obtenidos con el diclorometano.

La mayoría de las muestras líquidas analizadas por esta técnica en la búsqueda de HAP's, son muestras acuosas como agua de lluvia, potable, tratada o de desechos industriales. Sin embargo, existen algunos trabajos como el realizado por Gündel y Angerer (2000), en donde se analizan matrices biológicas como orina de trabajadores expuestos a los HAP's. Mediante una EFS en línea separan metabolitos del benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno, para su posterior análisis por CLAR con detección de fluorescencia.

La limpieza dependerá de la complejidad de la muestra, en las referencias encontradas, solo Busetti y cols. (1996) realizaron una secuencia de limpieza al extraer HAP's de muestras de agua residual. La limpieza se realizó con disolventes polares (agua:2-propanol, 90:10 v/v). Cuando se analizan los extractos con CLAR y la detección se realiza por fluorescencia, en muchas ocasiones no es necesario realizar limpieza en los extractos debido a la selectividad del detector. Sin embargo, cuando los análisis se hacen con CG, es necesario agregar un paso de limpieza previo a la extracción de los HAP's. Esta limpieza se realiza en otros casos pasando la muestra previamente por cartuchos empacados con sílice o alúmina.

En el trabajo publicado por Jeanneau y cols. (2007) se describe un estudio del efecto de la materia orgánica presente en las muestras para el análisis de contaminantes orgánicos en agua por la técnica de EFS. El estudio fue hecho para el análisis de HAP's, HAP's oxigenados y *n*-alcanos; se encontró que los contaminantes se enlazaban a la materia orgánica presente en el medio, dando recobros muy bajos en los ensayos realizados. En su trabajo concluyen que este efecto puede ser parcialmente evitado agregando 10 % de isopropanol a las muestra y agitando durante 5 minutos antes de pasarlas por el cartucho de EFS.

1.6. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).

La dispersión en matriz de fase sólida (DMFS) es una técnica utilizada desde 1989 que ha resultado ser muy eficiente para la separación de un amplio rango de fármacos, pesticidas y otros compuestos constituyentes de diversos tipos de muestras complejas ya sean vegetales o animales. Esta técnica ha encontrado una aplicación particular en la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras sólidas, semisólidas o altamente viscosas.

La DMFS se basa en algunos procedimientos físicos y químicos sencillos como son:

- a) *Dispersión de la muestra en un soporte sólido.* Este procedimiento involucra fuerzas que se aplican a la muestra mediante una molienda mecánica en un mortero, que conduce a una ruptura completa de la muestra, interaccionando ésta con una fase sólida enlazada (por ejemplo, C₁₈) o la superficie de algún otro soporte. De esta forma, a través de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas se produce una fase estacionaria única que permite el aislamiento del analito de interés. Se logra buena precisión y exactitud, aún cuando la presión aplicada en la molienda puede ser diferente entre un analista y otro (Barker, 2007). La muestra, por lo general, debe estar seca, aunque cierta cantidad de agua es adsorbida por la sílice y en ese caso, se pueden agregar otras sustancias desecantes antes de homogenizar la muestra, como el sulfato de sodio (Barker, 2000).

- b) *Empaque de la columna.* La mezcla homogenizada se empaqueta en un cartucho para EFS, el cual previamente tiene colocado un filtro en el fondo. Después de que se transfiere la mezcla, se cubre con otro filtro y se comprime con un émbolo de jeringa plano. Debido a la similitud entre el cartucho y una columna cromatográfica, para llevar a cabo la elución de los analitos de interés, es necesario que la muestra tenga un empaquetamiento que sea homogéneo, evitando la aparición de canales a lo largo de la columna formada por la fase dispersa. Por otro lado, el empaquetamiento no debe ser excesivo, de tal forma que permita el paso de los disolventes, ya sea por acción de la gravedad, por la aplicación de presión con un émbolo en la parte superior del cartucho o por acción del vacío cuando se coloca el cartucho en un

dispositivo adecuado que permita regular el flujo del disolvente a través del cartucho (Barker, 2000).

- c) *Elución selectiva de los analitos de interés.* Se adapta particularmente a cada ensayo. Se pueden hacer separaciones múltiples o individuales de los compuestos presentes en la muestra empacada, permitiendo aislar un compuesto único, una determinada clase de compuestos o varias clases de compuestos con la dispersión de una sola muestra. Los disolventes utilizados dependerán de la fase seleccionada para la dispersión y podrán ser puros o mezclas con ácidos, bases, sales u otros disolventes.

En algunos ensayos, se incluye el uso de co-columnas para obtener un fraccionamiento posterior al obtenido en la extracción, permitiendo una mejor limpieza de la muestra. Los adsorbentes de estas co-columnas suelen ser de sílice C18, florisil, alúmina o sílice. Suelen colocarse en el fondo del cartucho de extracción, antes de cargar la fase dispersa o pueden usarse en columnas externas conectadas en serie que colecten las fracciones que eluyen del cartucho de DMFS.

En la figura 1.11 se presenta un esquema general del proceso de DMFS anteriormente descrito.

1.6.1. Factores que afectan a la DMFS (Barker, 2000 y 2007; Kristenson, 2006).

La DMFS, al igual que la EFS, es un proceso cromatográfico, por lo cual se pueden aplicar los mismos principios. Sin embargo, la DMFS es diferente a la EFS por el hecho de que en este sistema cromatográfico los analitos no solamente sufren interacciones con el soporte sólido y la fase móvil, sino también con todos los componentes de la muestra. Estas interacciones no son completamente entendidas hasta el momento, sin embargo se pueden señalar a continuación algunos factores que son importantes para que las interacciones se lleven a cabo:

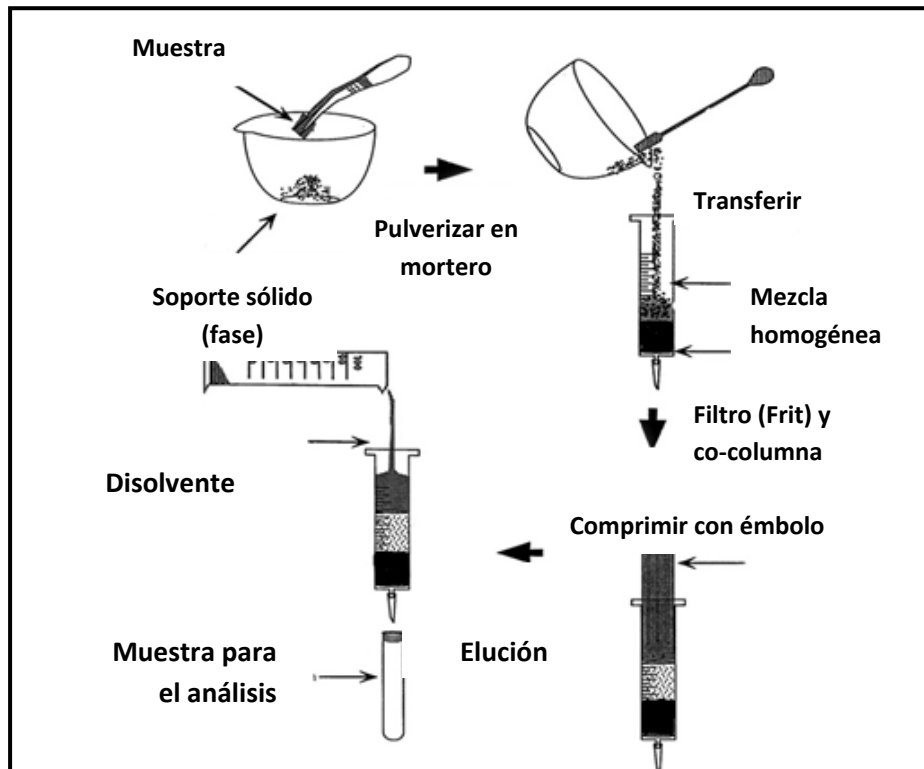


Figura 1.11 Diagrama general del proceso de DMFS (Barker, 2007)

- 1) *El efecto del tamaño promedio de partícula del soporte sólido.* Los tamaños de partícula pequeños (3 a 10 μm) producen largos tiempos de elución y la necesidad de aplicar gran presión o vacío para obtener el flujo adecuado. El uso de sílices con tamaño de partícula entre 40 a 100 μm proporcionan buenos resultados además de que los materiales son más económicos.
- 2) *Naturaleza de la fase enlazada.* Muchos trabajos se han realizado utilizando materiales de fase inversa como C_{18} y C_8 , en la búsqueda de aislar compuestos lipofílicos. Existen pocos trabajos donde se han utilizado fases de cianopropil y materiales relacionados con la fase normal para el aislamiento de compuestos más polares. En general, se considera que la fase orgánica enlazada a la sílice, es la que permite la ruptura completa de los componentes de la muestra mediante interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, dependiendo de la polaridad.

- 3) *Uso de sílices no derivatizadas u otros soportes sólidos.* Los principios no pueden ser los mismos que ocurren con las fases enlazadas como C₁₈. Sin embargo, se ha observado por microscopía electrónica que las sílices no derivatizadas pueden romper la estructura de la muestra durante el proceso de molienda, pero no a las células. En cambio, con las fases C₁₈, esta ruptura es evidente. Entre las fases utilizadas se encuentran sílice, alúmina, florisil, resinas, carbón activado y materiales poliméricos.
- 4) *Proporción entre muestra y soporte sólido.* La proporción más utilizada es 1:4, aunque proporciones con más o menos muestra pueden funcionar correctamente. En particular, cuando la cantidad de muestra disponible es muy pequeña, se ha podido miniaturizar la técnica disminuyendo la cantidad de fase a utilizar y la de disolventes de limpieza y elución. Kristenson y cols. (2001) utilizaron 25 mg de fruta para llevar a cabo sus estudios de análisis de pesticidas usando la misma cantidad de fase C₁₈ y eluyendo los compuestos en tan solo 100 µL de acetato de etilo. Los recobros que obtuvieron fueron mayores a 83 % y C. V. menores a 13 % para los pesticidas estudiados. En una revisión presentada por Kristenson (2006) se mencionan otros métodos realizados para la determinación de diversos compuestos utilizando cantidades de muestras muy variadas, desde frutas y tejidos de animales, hasta heces de rata; todas en cantidades menores a los 100 mg.
- 5) *Modificación de la matriz.* La adición de agentes quelatantes, ácidos, bases, etc. en el momento de la homogenización de la muestra afecta la distribución y elución de los analitos de interés y de los demás componentes de la matriz.
- 6) *La naturaleza de los disolventes de elución y la secuencia de adición a la columna.* La polaridad de los disolventes de elución con respecto a la del soporte sólido permite las dos opciones siguientes:

- a. Que el analito "A" se quede retenido en la columna y los compuestos interferentes sean eluidos en uno o varios pasos de limpieza con disolventes que no sean afines al analito "A", finalmente, el analito es eluido por un disolvente apropiado.

- b. Que los interferentes sean selectivamente retenidos en la columna y el analito "A" sea directamente eluido.

La DMFS permite la separación de analitos de diferente polaridad o de una misma clase utilizando un solo disolvente de elución. La separación se debe enfocar en eluir los analitos de interés con alto grado de especificidad. En ocasiones, el extracto no queda lo suficientemente limpio para llevar a cabo el análisis por lo que es necesaria la utilización de co-columnas u otras técnicas para la limpieza.

- 7) *La naturaleza de la muestra.* La muestra se encuentra dispersa sobre casi toda la superficie del soporte, sin embargo, mientras el soporte es inmóvil, algunos componentes de la muestra se van desplazando a través de la columna mientras se lleva a cabo el proceso de elución, lo cual puede afectar el orden de elución de los analitos de interés. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las polaridades entre los analitos y los componentes de la muestra, suelen ser muy diferentes y basta con realizar una simple EFS para limpiar las interferencias. En pocas ocasiones es necesario adicionar ácidos, bases, sales, agentes quelantes, antioxidantes, etc. cuando se está formando la pasta o en el disolvente de elución para permitir que ocurra la interacción de la fase unida al soporte y el disolvente.

1.6.2. *Ventajas de la DMFS como técnica de extracción (Crouch, 1997; Barker, 2007).*

Algunas ventajas de la DMFS son las siguientes:

- Es aplicable tanto a las muestras fáciles como a las difíciles de romper.
- Tiene flexibilidad para aplicarse a diversas necesidades, ya sea el análisis de un solo analito o análisis multiresiduos.
- Se utilizan cantidades de disolvente muy pequeñas.
- Permite aislamientos rápidos y específicos, mediante la incorporación de co-columnas u otras técnicas de limpieza.
- Es una técnica que puede automatizarse permitiendo obtener mejores resultados, disminuir las cantidades de reactivos y tiempo de análisis, con resultados iguales o mejores que algunos de los “métodos oficiales”.

CAPÍTULO 2

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2. 1 Materiales y equipos.

2.1.1 Sistema Cromatográfico.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución VARIAN Inc., Palo Alto, CA, EUA, con bomba ternaria modelo 9010.
- Detector de fluorescencia VARIAN, modelo 363.
- Tarjeta de interface VARIAN, modelo Star 800.
- Software de control y procesamiento de datos “Star Workstation” VARIAN, versión 6.0 1989-2003
- Columna analítica de acero inoxidable VARIAN, de 150 x 4.60 mm d. i., empacada con sílice fase reversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 µm.
- Precolumna de guarda de acero inoxidable de 13 x 4.5 mm d. i., empacada con sílice fase inversa nucleosil C18 Phenomenex, Torrance, CA, EUA, tamaño de partícula 10 µm.
- Jeringa marca Hamilton, Reno, NV, EUA, de 50 µL.

2.1.2 Materiales y equipo para la obtención de la muestra.

- Frascos de vidrio de 100 mL
- Incubadora marca Quincy Lab Inc., Chicago, IL, EUA, modelo 10-140.
- Cultivo puro de *C. cucullus* en medio de cultivo de infusión de cebada y alimentado con *E. coli*. Donado por el laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química, UNAM.
- Microscopio óptico marca National, Carnation, WA, EUA, modelo B2-220.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Pipeta Pasteur de 5 mL
- Espátula de acero inoxidable.
- Centrifuga marca SIGMA, Osterode am Harz, Germany, modelo 2-5.
- Tubos de plástico para centrifuga de 15 mL de capacidad.

2.1.3 Preparación de la muestra.

- Mortero de ágata de 30 mL.
- Reservorios con filtro para empacar cartuchos para extracción en fase sólida de 6 y de 1.5 mL, VARIAN, EUA.
- Filtros para cartuchos de extracción en fase sólida de 6 mL y de 1 mL, VARIAN, EUA.
- Jeringa de plástico de 25 mL.
- Cámara de vacío con regulador de presión marca Ashcroft, CT, EUA.
- Viales de 1 mL de capacidad.
- Viales de 12 mL de capacidad.

2.1.4 Otros equipos y accesorios utilizados.

- Sistema de filtración por vacío para fase móvil marca Cole Parmer, IL, EUA.
- Membranas de Nylon Cole Parmer de 7 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro.
- Baño de ultrasonido para desgasificación de soluciones y fase móvil Branson, CT, EUA modelo 1210.
- Micropipeta de volumen variable de 2 – 20 μL Transferpette, CT, EUA).
- Micropipeta de volumen variable de 50 – 200 μL (Eppendorf, Alemania).
- Micropipeta de volumen variable de 100 – 1,000 μL (Eppendorf, Alemania).
- Microbalanza analítica Mettler Toledo, OH, EUA, modelo AG245.

2.1.5 Disolventes y reactivos.

- Metanol grado cromatográfico J. T. Baker, D. F., México.
- Acetonitrilo grado cromatográfico J. T. Baker, D. F., México.
- Agua grado cromatográfico.
- Sílice C18, CHROMABOND C18-PAH, Macherey – Nagel, PA, EUA, tamaño de partícula 45 μm .

- Estándares de HAP's CHEMSERVICE, PA, EUA) pureza >99%:
 - Benzo[*a*]antraceno
 - Benzo[*b*]fluoranteno
 - Benzo[*a*]pireno

2.1.6 Preparación de disoluciones estándar de HAP's.

Se preparó una solución patrón de cada uno de los HAP's (benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno y benzo[*a*]pireno) a una concentración de 100 mg L⁻¹ utilizando acetonitrilo como disolvente. Las demás disoluciones de trabajo, fueron preparadas a partir de esta solución por medio de diluciones en acetonitrilo.

Todas las disoluciones fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C.

2.2 Experimentación.

En la figura 2.1 se presenta un esquema general de la experimentación que se realizó, la cual puede dividirse en las 5 etapas principales enlistadas a continuación, la descripción detallada se presenta posteriormente en las secciones correspondientes.

1. Validación de la separación analítica y la detección de los HAP's por CLAR-DF.
2. Optimización en la obtención de la muestra de protozoarios, libre de materia orgánica presente en el medio de cultivo.
3. Desarrollo y validación de la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida, para la extracción de HAP's en las muestras de protozoarios.
4. Optimización de la técnica de Extracción en Fase Sólida, para la extracción de HAP's de las muestras de cultivos líquidos libres de microorganismos y materia orgánica.
5. Aplicación de los métodos de extracción a muestras de cultivos puros de *Colpoda cucullus* expuestos a los HAP's.

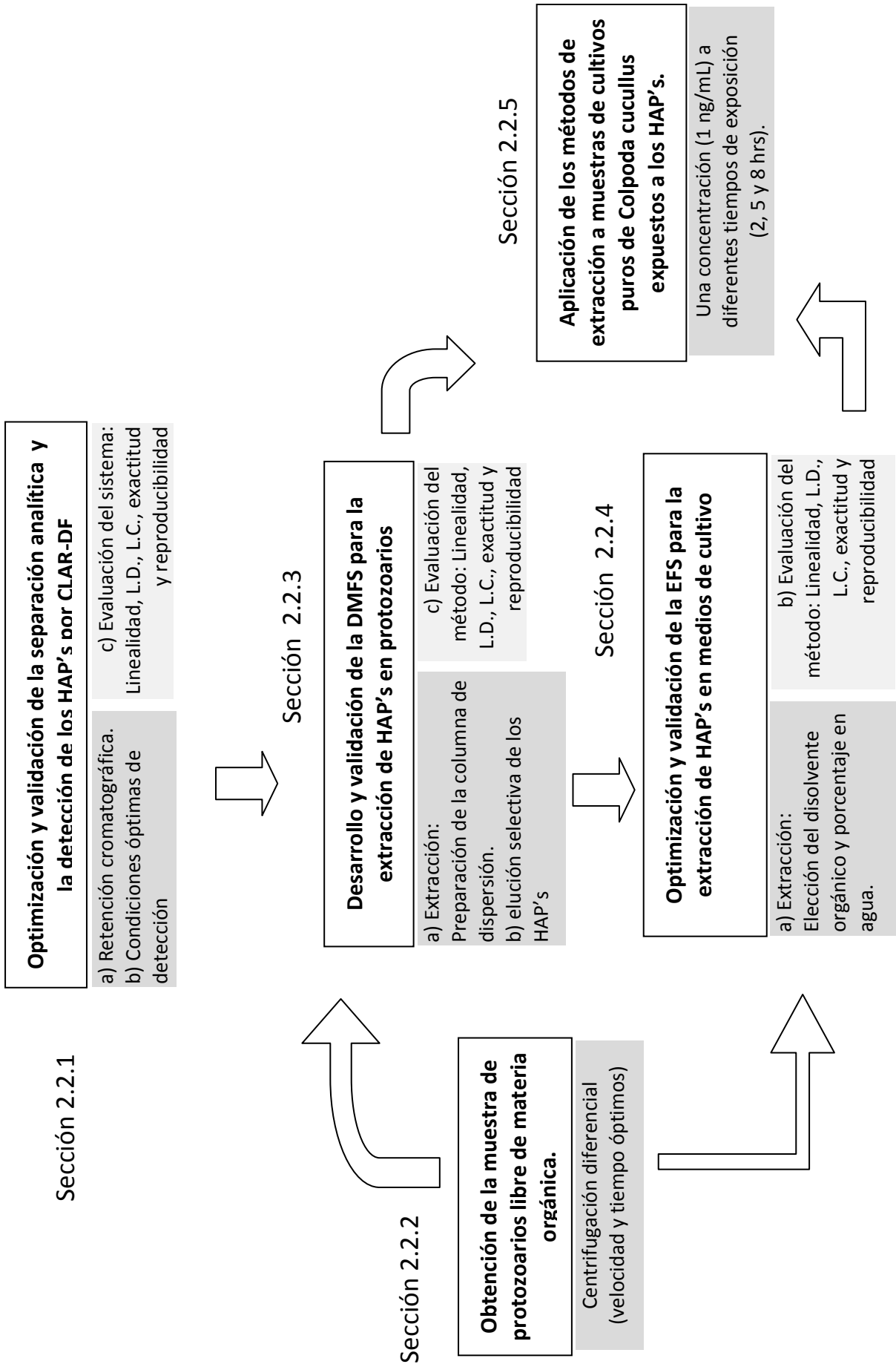


Figura 2.1 Diagrama general de la metodología

2.2.1 Optimización y validación de la separación analítica y la detección de los HAP's por CLAR-DF.

2.2.1.1 Condiciones óptimas para la detección.

Se realizaron inyecciones de la mezcla de los tres HAP's en acetonitrilo a una concentración de 12 ng mL⁻¹ en condiciones isocráticas a 1 mL min⁻¹ con 100 % MeOH como fase móvil. Variando las longitudes de absorción y emisión en el detector de fluorescencia se eligieron las condiciones que presentaban una mejor respuesta en las señales del cromatograma para los tres compuestos.

2.2.1.2 Condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los HAP's.

Se empleó una disolución de 12 ng mL⁻¹ de cada uno de los HAP's y se realizaron inyecciones al sistema cromatográfico de fase inversa, en el cual, la fase estacionaria fue una sílice C18. La fase móvil estuvo constituida por una serie de mezclas metanol:agua en diferentes porcentajes (100 % metanol, 95:5, 90:10, 85:15) para cada ensayo y siempre a un flujo de 1 mL/min se obtuvieron los cromatogramas correspondientes para cada compuesto y se determinaron los tiempos de retención y el tiempo muerto utilizando nitrato de sodio 1 M. Con estos datos se calculó el factor de retención (k') para cada ensayo con la fórmula (1) y se verificó la dependencia del logaritmo de k' en función del porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil de manera gráfica.

$$k' = \frac{tr - tm}{tm} \quad \text{---- (1)}$$

donde, tr = tiempo de retención del compuesto y tm = tiempo muerto

Por otra parte, también se calcularon la selectividad (α) y la resolución (R_s) para cada pico, con el fin de observar si la separación entre los compuestos era suficientemente buena. Los cálculos se realizaron con la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \text{----- (2)}$$

donde k'_1 y k'_2 son los factores de retención del primer y segundo compuestos en eluir, respectivamente.

$$RS = \frac{2(t_{r2}-t_{r1})}{W_{b1}+W_{b2}} \quad \text{----- (3)}$$

donde t_{r1} y t_{r2} son los tiempos de retención del primer y segundo compuestos en eluir, respectivamente, y W_{b1} y W_{b2} son las anchuras a la base de cada pico cromatográfico.

2.2.1.3 Validación del sistema cromatográfico.

2.2.1.3.1 Linealidad.

Se evaluó la linealidad del sistema inyectando por triplicado 5 disoluciones con diferentes concentraciones de los tres HAP's en acetonitrilo, en un intervalo de concentraciones amplio, 0.9, 2.0, 6.0, 12.0 y 20.0 ng/mL. A partir de la curva obtenida entre las áreas de los picos cromatográficos y la concentración de los analitos, se obtuvo la recta de calibración y mediante el ajuste de mínimos cuadrados, se evaluó la linealidad del sistema con el coeficiente de correlación (r^2).

2.2.1.3.2 Límites de detección y cuantificación.

Se determinó el límite de detección experimental (LDE) inyectando disoluciones estándar de cada compuesto cada vez más diluidas, hasta que las señales de los picos fueran parecidas a 3 veces la señal del ruido de fondo. También, se determinó el límite de detección teórico (LDT) y el límite de cuantificación (L. C.) del sistema con base en la curva de calibración y con la desviación estándar de regresión, para cada compuesto. Para esto, se hicieron inyecciones, por triplicado, de disoluciones estándar de concentraciones cercanas al LDE. Las concentraciones

estuvieron en el intervalo de 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6 ng mL⁻¹. Finalmente, los límites fueron estimados estadísticamente utilizando las fórmulas (García, 2002):

$$LD = (3.3 \cdot S_{y/x})/b_1 \quad \text{----- (4)}$$

$$LC = (10 \cdot S_{y/x})/b_1 \quad \text{----- (5)}$$

Donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de regresión y b_1 es la pendiente de la curva de calibración. En el Anexo I se presenta un ejemplo detallado con los datos y cálculos necesarios para obtener estos valores.

2.2.1.3.2 Precisión.

La precisión del sistema se evaluó con la repetibilidad al calcular el coeficiente de variación (C. V. %) obtenido con 5 inyecciones en un mismo día, utilizando una disolución de HAP's de concentración 10 ng/mL. También se evaluó la reproducibilidad en 3 diferentes días, utilizando dos mezclas de los HAP's de concentraciones 0.9 y 10 ng/mL, respectivamente.

2.2.2. **Obtención de la muestra de protozoarios libre de materia orgánica.**

Con el fin de separar los microorganismos de la mayor cantidad de materia orgánica presente en el medio de cultivo, se utilizó la centrifugación a diferentes velocidades y tiempos. Por observación en el microscopio óptico se determinó cuales eran las condiciones que permitían obtener el mayor número de protozoarios libres de materia orgánica. Las condiciones finales se establecieron con 60 mL de cultivo puro de *Colpoda cucullus* y se realizaron 4 ensayos con dos centrifugaciones a las condiciones presentadas en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Ensayos para optimizar la obtención de la muestra de protozoarios por centrifugaciones.

Ensayo	Condiciones de centrifugación		
I	8 minutos a 3500 rpm		
II	2 minutos a 1500 rpm	Reposo por 5 minutos	
III	2 minutos a 1100 rpm	Reposo por 5 minutos	
IV	2 minutos a 1100 rpm	Reposo por 5 minutos	8 minutos a 3500 rpm

2.2.3. Desarrollo y validación de la DMFS para la extracción de HAP's en protozoarios

2.2.3.1 Preparación de la columna de dispersión.

El acondicionamiento de la fase C18 utilizada en todos los ensayos se hizo agregando, por cada 100 mg de fase, 2 mL de agua, 2 mL de una mezcla agua-acetonitrilo (70:30 v/v) y 2 mL de acetonitrilo. Debido a la cantidad de muestra utilizada, que es del orden de mg, la cantidad de fase utilizada en todos los ensayos fue de 100 mg y la de muestra fue de 5 mg. La fase y la muestra fueron homogenizadas en un mortero para ser finalmente empacadas entre dos filtros (*frits*) en un cartucho de 1 mL.

2.2.3.2 Optimización de la elución de los HAP's. DMFS con estándar.

Al ser similar el sistema de extracción a una cromatografía de líquidos en fase inversa se propuso una secuencia de elución que utilizara mezclas de acetonitrilo: agua de fuerza eluyente creciente. De esta manera, se esperaba que los analitos no fueran eluidos con las mezclas de acetonitrilo: agua, pero sí los interferentes más polares provenientes de la muestra. La elución de los analitos se esperaba con el acetonitrilo. Para verificar estas suposiciones, se evaluaron los recobros de los analitos después de la aplicación de cada una de las mezclas y el acetonitrilo.

Para preparar la columna de dispersión se fortificaron 100 mg de fase acondicionada C18-PAH a una concentración de 16 ng/g de fase de cada compuesto; una vez evaporado el disolvente, se homogeneizó en un mortero y finalmente se empacó en un cartucho de 1 mL.

En columnas de dispersión preparadas independientemente se aplicaron las secuencias de mezclas acetonitrilo: agua en los 3 ensayos mostrados en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Ensayos para optimizar la extracción de los HAP's

Ensayo	Secuencia de aplicación de disolventes	Fracciones de 1 mL agregadas a los cartuchos	Análisis por CLAR
1	Acetonitrilo 100 %	4 fracciones	✓
2	a) Agua b) Agua:Acetonitrilo (50:50) c) Acetonitrilo 100 %	a) 3 fracciones b) 2 fracciones c) 2 fracciones	a) ✓ b) ✓ c) ✓
3	a) Agua b) Agua:Acetonitrilo (70:30) c) Acetonitrilo 100 %	a) 3 fracciones b) 3 fracciones c) 2 fracciones	a) ✗ b) ✓ c) ✓

✗no realizado; ✓realizado

Los ensayos se hicieron por triplicado y todas las fracciones de 1 mL indicadas se inyectaron al sistema cromatográfico comparando con una disolución estándar de una mezcla de HAP's en acetonitrilo de concentración 1.6 ng/mL de cada compuesto para la determinación del recobro.

El ensayo 1 fue importante para observar el frente de elución de los analitos y determinar el volumen de acetonitrilo necesario para extraerlos del cartucho.

Con el ensayo 2 se agregaron pasos previos a la elución de los compuestos para limpiar interferentes que pudieran eluir junto a los analitos.

Con el ensayo 3 se disminuyó la fuerza eluyente de una de los disolventes de limpieza para favorecer la retención de los analitos en el cartucho y lograr una eliminación más selectiva de interferentes en las muestras, lo cual proporcionaría mejores recobros y mejor separación cromatográfica. Finalmente, se calcularon los recobros globales de los ensayos.

2.2.3.3 Optimización de la elución selectiva de los HAP's. DMFS con estándares y muestras de protozoarios.

Los ensayos se realizaron fortificando 5 mg de muestra a una concentración de 0.32 ng/mg de muestra de cada compuesto; una vez evaporado el disolvente, se agregaron 100 mg de fase C18-PAH acondicionada, se homogeneizó en un mortero y finalmente se empacó en un cartucho de 1 mL. En columnas de dispersión preparadas independientemente se aplicaron las secuencias de acetonitrilo: agua en 2 ensayos descritos en la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Ensayos para optimizar la elución selectiva de los HAP's

Ensayo	Secuencia de aplicación de disolventes	Fracciones de 1 mL agregadas a los cartuchos	Análisis por CLAR
1	Acetonitrilo 100 %	4 fracciones	✓
2	a) Agua	a) 3 fracciones	a) ✗
	b) Agua:Acetonitrilo (70:30)	b) 3 fracciones	b) ✗
	c) Acetonitrilo 100 %	c) 2 fracciones	c) ✓

✗no realizado; ✓realizado

Con el ensayo 1 se pretendió observar si al trabajar con la muestra se obtenían interferentes en los extractos que dificultaran el análisis cromatográfico; mientras que con el ensayo 2 se pretendió observar si la secuencia de limpieza que proporcionó mejores recobros en los ensayos sin muestra, descritos en la sección anterior, resultaba ser eficiente para la limpieza de los interferentes.

Los ensayos se hicieron por triplicado y solo los extractos en acetonitrilo fueron inyectados al sistema cromatográfico comparando con una disolución estándar de una mezcla de HAP's en acetonitrilo de concentración 1.6 ng/mL de cada compuesto. Se compararon los cromatogramas obtenidos cuando se realiza la secuencia de limpieza y cuando no se lleva a cabo.

2.2.3.4 Validación del método por DMFS-CLAR. Ensayos sin muestra.

Para la evaluación de la linealidad, se efectuaron por triplicado 5 ensayos con 100 mg de fase C18-PAH fortificada con la disolución estándar de mezcla de HAP's a niveles de 4, 7, 12 y 50 y 100 ng/g de fase para los 3 compuestos. Una vez evaporado el disolvente se homogeneizó en un mortero y finalmente se empacó en un cartucho de 1 mL. Antes de eluir los HAP's con acetonitrilo se agregaron 3 mL de agua y 3 mL de una mezcla agua-acetonitrilo (70:30 v/v), las cuales fueron desechadas. Finalmente, los compuestos se recuperaron con 1 mL de acetonitrilo y se inyectaron 20 µL de los extractos al sistema cromatográfico.

La recta correspondiente a la cantidad recuperada vs la cantidad agregada de cada compuesto fue graficada y se determinó el coeficiente de correlación (r^2).

La pendiente de la misma recta determinó la exactitud para el sistema DMFS-CLAR; de esta forma, para una pendiente de 1 se tendrá un recobro global de 100 %. Los recobros individuales se calcularon con la fórmula (6), comparando el área obtenida en cada punto de la curva con el área obtenida al inyectar disoluciones estándar a las mismas concentraciones de cada punto.

$$\text{Recobro (\%)} = \frac{\text{Área del pico del compuesto en el extracto}}{\text{Área del pico del compuesto en la disolución estándar}} \times 100 \quad \dots\dots(6)$$

Para medir la precisión se hicieron 5 extracciones en 5 diferentes días con un nivel de fortificación de HAP's de 80 ng/g de fase, utilizando el mismo procedimiento de extracción y se evaluó el C. V. % obtenido.

2.2.3.5 Validación del método por DMFS-CLAR. Ensayos con protozoarios.

Se efectuaron por triplicado 5 ensayos utilizando 100 mg de fase C18-PAH y 5 mg de muestra fortificada a niveles de 0.10, 0.18, 0.30, 0.60 y 2.00 ng/mg de muestra para los 3 compuestos. Se realizó el mismo procedimiento de extracción y de inyección en el sistema cromatográfico que en el ensayo 2 de la sección 2.2.3.3.2.

Para evitar la acumulación de los HAP's en el material donde se dispersa la fase sólida con la muestra que produjera variación en los resultados fue necesario aplicar un lavado, previo a cada dispersión, con dos mililitros de acetonitrilo para remover la cantidad de HAP's adheridos al mortero y pistilo.

Así, se determinó el coeficiente de correlación (r^2) de la recta correspondiente a la cantidad recuperada vs la cantidad agregada de cada compuesto. Los recobros se determinaron con la pendiente de la misma recta para cada compuesto. Los recobros individuales se calcularon con la fórmula (6). Los límites de detección y de cuantificación del método fueron calculados estadísticamente con base en la curva de calibración de Respuesta (área del pico)= f (concentración) y la desviación estándar de regresión obtenida (ver fórmulas 4 y 5, pág. 55).

La precisión se determinó con 5 extracciones en 5 diferentes días con un nivel de fortificación de HAP's de 2 ng/mg de muestra utilizando el mismo procedimiento de extracción y se evaluó el C. V. %.

2.2.4 Optimización y validación del método de extracción de HAP's en medios de cultivos líquidos por la técnica de EFS.

2.2.4.1 Ensayos de retención y de elución.

Se realizaron pruebas por triplicado con la aplicación de 15 mL de agua pura fortificadas con la mezcla de HAP's en acetonitrilo para tener una concentración de 0.8 ng/mL de muestra. Se adicionó 15 % (v/v) de alguno de los modificadores orgánicos (etanol o isopropanol) recomendados para mejorar la solubilidad de los HAP's (Busetti, 2006) y se dejó equilibrar por 5 minutos. Cada muestra fortificada de 15 mL se hizo pasar a un flujo de 10 mL/min por diferentes cartuchos empacados con 250 mg de fase C18-PAH, previamente acondicionada con 4 mL de acetonitrilo, 5 mL de mezcla agua: acetonitrilo (70:30 v/v) y 5 mL de agua. Posteriormente, se dejó secar el cartucho al vacío durante 5 minutos y después se aplicaron a los cartuchos 5 mL de agua y 5 mL de una mezcla agua-acetonitrilo (70:30 v/v) para la limpieza de interferentes. Se recolectaron las 5 fracciones de 1 mL de agua y las 5 fracciones de 1 mL de

la mezcla acetonitrilo: agua. Los compuestos se eluyeron con un volumen total de 5 mL de acetonitrilo, recolectados también en fracciones de 1 mL. Todas las fracciones recolectadas fueron inyectadas al sistema CLAR-DF para verificar que no existiera fuga de los analitos y para observar el perfil de elución de los compuestos con acetonitrilo. Se compararon los recobros globales obtenidos.

Para la comparación de los resultados de los ensayos con los 2 modificadores orgánicos probados se realizó una prueba t mediante el “software” Excel, aplicando la función **Prueba.T**, la cual nos proporciona la probabilidad de que dos conjuntos de datos sean diferentes entre sí con una confianza del 95 %, esto con el fin de observar si uno de los disolventes aportaba mejores recobros con diferencias significativas.

Como hipótesis nula (H_0) se propone que los recobros promedio son iguales al utilizar los dos disolventes y como hipótesis alterna (H_1) se considera que los promedios son diferentes.

Esta prueba se realiza utilizando un nivel de confianza del 95 %. De esta forma, si el resultado de probabilidad obtenido al aplicar la función *PRUEBA.T* es < 0.05 , indica que las medias son significativamente diferentes entre sí, a dicho nivel de confianza, y que un disolvente (etanol o isopropanol) produce mejores recobros que el otro en los ensayos de EFS.

Finalmente, es necesario indicar que se realizó una comparación a “2 colas” ya que la diferencia entre las medias podía ser negativa o positiva.

2.2.4.2 Validación del método por EFS con muestras de agua.

En estos ensayos se utilizaron como muestra 15 mL de agua HPLC a los que se agregó 15 % de isopropanol como modificador orgánico.

Se agregaron volúmenes suficientes de disolución estándar de HAP's para tener 5 diferentes concentraciones 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.20 ng/mL de cada compuesto en la mezcla agua-isopropanol. Se realizó el mismo procedimiento de extracción que en el punto anterior.

Se determinó el coeficiente de correlación (r^2) de la recta correspondiente a la cantidad recuperada vs la cantidad agregada de cada compuesto. Los recobros se determinaron con la pendiente de la misma recta para cada compuesto. Los recobros individuales se calcularon con la fórmula (6). Los límites de detección y de cuantificación del método fueron calculados estadísticamente con base en la curva de calibración de Respuesta (área del pico)= f (concentración) y la desviación estándar de regresión obtenida (ver fórmulas 4 y 5, pág. 55).

La precisión se evaluó mediante la realización de 5 extracciones en 5 diferentes días con un nivel de concentración en la muestra de 0.9 ng/mL utilizando el mismo procedimiento de extracción y evaluando el C.V.% obtenido.

2.2.4.3 Validación del método por EFS con muestras de medios de cultivo líquidos sin microorganismos.

En estos ensayos se utilizaron muestras de 15 mL de un medio de cultivo líquido al cual le fueron separados los protozoarios y la materia orgánica. Este medio de cultivo se obtuvo como se indica en la sección 2.2.2 de este trabajo después de un período de incubación con los microorganismos de 24 hrs. A la muestra se le agregaron los HAP's en concentraciones variables y después 15 % (v/v) de isopropanol como modificador orgánico, dejando equilibrar la muestra durante 5 min tras agregar el isopropanol, para evitar una mayor adsorción de los HAP's en los recipientes y la volatilización del disolvente orgánico agregado.

Los volúmenes de disolución estándar agregados fueron suficientes para tener 5 diferentes concentraciones 0.21, 0.33, 0.67, 0.87 y 1.00 ng/mL de cada compuesto en la mezcla cultivo líquido acuoso-isopropanol. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento de extracción que en la sección anterior.

La linealidad se determinó con los coeficientes de correlación obtenidos con las curvas correspondientes a la cantidad recuperada vs la cantidad agregada para cada compuesto. El recobro se evaluó con la pendiente de la recta anterior en el intervalo de concentraciones estudiado. Los límites de detección y de cuantificación del método fueron calculados

estadísticamente con base en la curva de calibración de respuesta (área del pico) = f(concentración) y la desviación estándar de regresión obtenida.

La reproducibilidad fue evaluada realizando 5 extracciones en 5 diferentes días con un nivel de concentración en la muestra de 1.0 ng/mL utilizando el mismo procedimiento de extracción y evaluando el C.V. % obtenido.

2.2.5 Aplicación del método a muestras de cultivo expuestas a los HAP's.

2.2.5.1 Pruebas testigo en los cultivos de C. cucullus.

Se inocularon con microorganismos 60 mL de cultivo con infusión de cebada y se dejaron en incubación a 28 °C por 24 h. Después de esto, se procedió a observar el intervalo de tiempo al cual el número de microorganismos permanecía constante verificando por medio de observaciones utilizando un microscopio óptico. Se realizó así un conteo de microorganismos existentes en alícuotas de 100 µL de cultivo a diferentes intervalos de tiempo, hasta que el número de microorganismos comenzó a decaer. De esta forma, los intervalos de tiempo utilizados fueron los siguientes: 2, 4, 6, 8, 10 y 24 h. El objetivo de este ensayo fue conocer la tasa de crecimiento y/o el mantenimiento de la población, para determinar el tiempo máximo al cual el cultivo presenta un número estable de células. Con estos datos se determinó el tiempo máximo de exposición a los contaminantes, con el fin de recuperar una mayor cantidad de HAP's en las células de protozoarios.

Por otro lado, se hicieron cultivos testigo adicionados con los volúmenes de acetonitrilo que se utilizarían en los experimentos de exposición a la mezcla de HAP's; esto con la finalidad de verificar que el disolvente orgánico no inhibiera el crecimiento de los protozoarios en el medio de cultivo inoculado. La muestra fue preparada en las mismas condiciones que en el inciso anterior cada uno con el mismo número inicial de microorganismos. La alícuota agregada fue de 15 µL de acetonitrilo y se observó el número de células con las mismas alícuotas de cultivo y los mismos intervalos de tiempo.

2.2.5.2 Ensayos de exposición de protozoarios a los HAP's.

Se utilizaron microorganismos inoculados en infusión de cebada y se colocaron en incubación a 28 °C durante 24 h. Después de este tiempo, se logró tener cultivos con un promedio de 700 células de protozoarios por cada mL de cultivo.

En experimentos diferentes, cultivos de 60 mL fueron expuestos a los contaminantes durante periodos de 2, 5 y 8 h, agregando al medio de cultivo la cantidad suficiente de HAP's para tener una concentración de 1.0 ng/mL de cultivo y siempre a una temperatura controlada de 28 °C, aunque sin alimentación subsecuente.

Después de cada tiempo de exposición, se procedió a separar de los protozoarios, a la materia orgánica y al medio de cultivo líquido con las condiciones de centrifugación establecidas en la sección 2.2.2 del presente trabajo.

Con la metodología de Dispersión de Matriz en Fase Sólida desarrollada se extrajo la cantidad de HAP's adsorbidos en los protozoarios y con el método de Extracción en Fase Sólida optimizado se extrajo la cantidad de HAP's remanente en el medio de cultivo. Los ensayos se realizaron por triplicado. Finalmente, para completar el balance entre las cantidades recuperadas y poder calcular el recobro global de los ensayos, se determinó la cantidad adsorbida en la materia orgánica separada del cultivo mediante la metodología de Dispersión de Matriz en Fase Sólida - CLAR desarrollada.

Para calcular el recobro obtenido en cada constituyente del cultivo separado (cultivo, protozoarios y materia orgánica) y, por lo tanto, el recobro global, se realizó la comparación con un testigo de la cantidad total de HAP's, el cual consistió en cultivos *sin microorganismos* que recibieron el mismo tratamiento que los cultivos en los ensayos con protozoarios a cada tiempo de exposición. La extracción en estos testigos se realizó por EFS.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Optimización y validación de la separación analítica y la detección de los HAP's por CLAR-DF.

3.1.1 Condiciones óptimas para la detección.

Se ajustó el detector de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y de emisión (λ_{em}) para los tres compuestos. Las longitudes de onda óptimas para los tres compuestos fueron las que proporcionaron la mejor respuesta en las señales y se presentan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas en el análisis de los compuestos.

Compuesto	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Benzo[a]antraceno	284	405
Benzo[b]fluoranteno	254	430
Benzo[a]pireno	263	410

Todos los análisis de extractos y soluciones estándar se realizaron con estas condiciones en el detector de fluorescencia.

3.1.2 Condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los HAP's.

Para conocer el orden de elución de los compuestos se midieron los tiempos de retención (t_r) individuales de cada compuesto utilizando diferentes proporciones de metanol: agua en la fase móvil. Con estos datos y el valor de t_0 se calculó el factor de retención (k') para cada compuesto. En la tabla 3.2 se presentan los datos completos de t_r y de k' obtenidos para los tres HAP's.

Tabla 3.2 Orden de elución de los HAP's en estudio en la columna C18. Fase móvil a un flujo de 1 mL min⁻¹ y composición de MeOH variable para cada ensayo.

Compuesto	Porcentaje de MeOH en mezcla MeOH/agua			
	100	95	90	85
Benzo[a]antraceno	4.12	6.59	10.28	17.40
Benzo[b]fluoranteno	6.16	9.55	15.52	28.17
Benzo[a]pireno	7.21	11.63	18.54	34.74

Compuesto	Porcentaje de MeOH en mezcla MeOH/agua			
	100	95	90	85
Benzo[a]antraceno	0.34	0.61	0.84	1.09
Benzo[b]fluoranteno	0.57	0.80	1.04	1.32
Benzo[a]pireno	0.66	0.90	1.12	1.41

(*) Para obtener el valor de k' , se usó un valor de $t_m = 1.3$ minutos

La figura 3.1 presenta la variación de k' con el contenido de metanol en la fase móvil, en donde se se aprecia que las curvas correspondientes a cada compuesto siempre son paralelas entre sí, lo cual indica que es posible tener separados los tres compuestos haciendo la separación isocráticamente en los diferentes porcentajes de metanol utilizados.

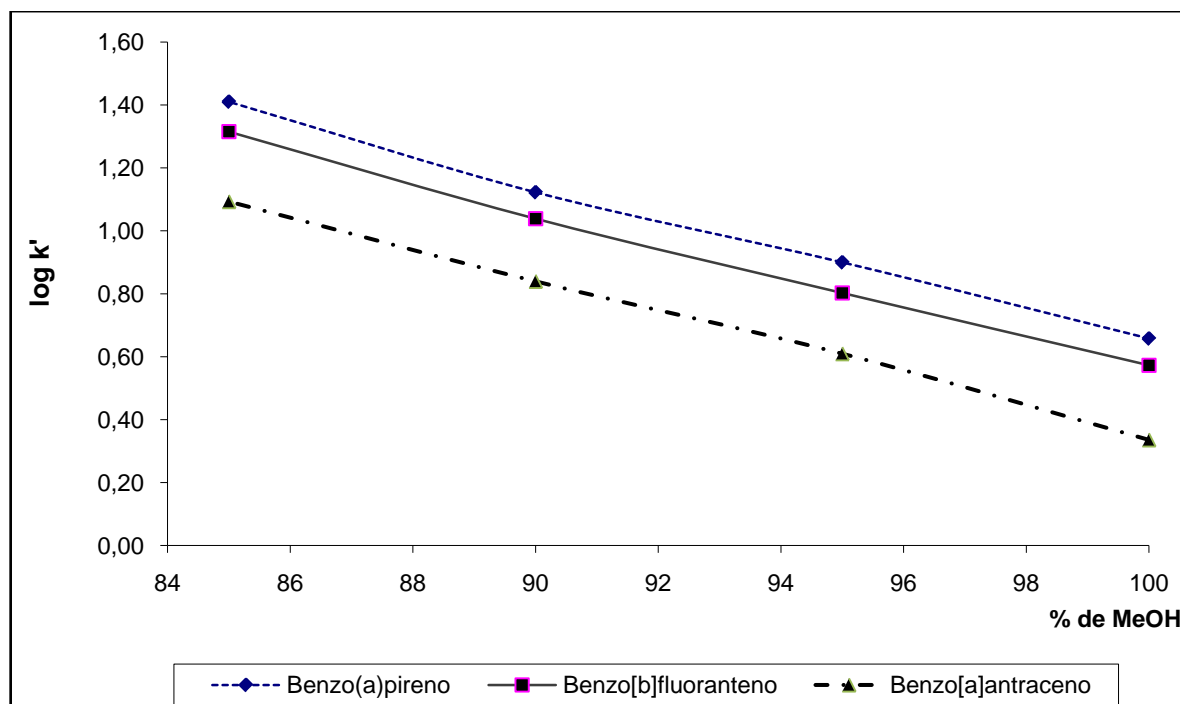


Figura 3.1. Variación de factor de capacidad (k') de los HAP's en estudio, en función del porcentaje de metanol en la fase móvil. Columna VARIAN 150 x 4.60 mm, empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μ m. Flujo de 1 mL min⁻¹. Concentración de cada uno de los HAP's 10 ng mL⁻¹. Volumen de inyección 20 μ L.

De los datos obtenidos se observa que el primer compuesto en eluir es el benzo[*a*]antraceno, seguido por el benzo[*b*]fluoranteno y el benzo[*a*]pireno. Existe una buena diferencia entre el compuesto menos retenido, benzo[*a*]antraceno y el siguiente en salir, que es el benzo[*b*]fluoranteno, debido a que, mientras el primer compuesto está formado por 4 anillos, el segundo posee 5 y una condición menos polar, aumentando su retención en la columna. Comparando los tiempos de retención de los últimos dos compuestos, se puede notar que al aumentar la proporción de agua en la fase móvil, su separación mejora, sin embargo, el tiempo de análisis aumenta considerablemente. Al ser los dos compuestos (benzo[*b*]fluoranteno y benzo[*a*]pireno) HAP's de 5 anillos, sus coeficientes de reparto tienen valores muy parecidos, por lo cual eluyen de la columna C18 en tiempos de retención cercanos, aunque suficientemente diferentes para tener una buena resolución. Cuando se realiza la separación con 100 % de MeOH, el tiempo de retención del primer compuesto es suficientemente bueno para permitir la elución de interferentes más polares que pudieran provenir de las muestras sometidas al proceso de extracción. También se obtienen resoluciones satisfactorias y un tiempo de corrida máximo de 8 minutos.

La separación realizada con 100 % de metanol como fase móvil proporciona valores de resolución satisfactorios, lo que indica una separación aceptable de los compuestos ($Rs_{1-2} = 5.95$; $Rs_{2-3} = 2.07$).

Por lo anterior, todos los análisis, se realizaron utilizando como fase móvil 100 % de metanol a un flujo de 1 mL min^{-1} . Esto proporcionó la ventaja de hacer un análisis rápido, menor a 10 minutos para cada corrida y por consiguiente, tener un menor consumo de disolvente ya que, una vez que se enciende el equipo y se ha equilibrado a las condiciones de análisis, no es necesario establecer tiempos de equilibrio entre las inyecciones.

En la figura 3.2 se presenta un cromatograma obtenido con las condiciones de análisis óptimas.

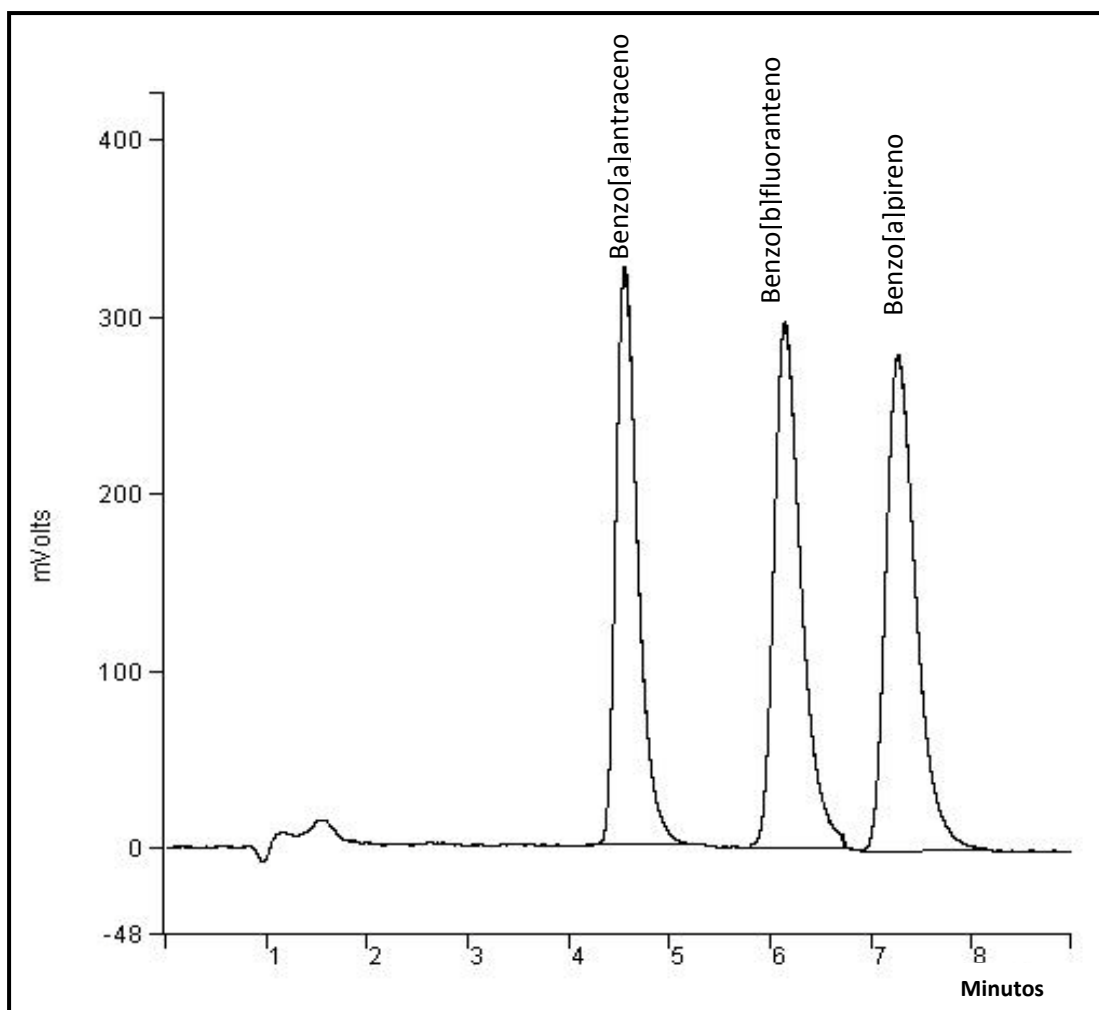


Figura 3.2. Cromatograma obtenido de una disolución estándar de la mezcla de HAP's a una concentración de 12 ng/mL para cada compuesto. Columna VARIAN 150 x 4.60 mm, empacada con fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μm . Flujo de 1 mL min^{-1} con fase móvil MeOH 100 %. Volumen de inyección 20 μL .

3.1.3 Linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación del sistema cromatográfico.

En la figura 3.3 se presentan las curvas de calibración obtenidas para los tres compuestos en el intervalo de concentraciones 0.9-20 ng mL^{-1} . Se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0.99 lo cual indica una respuesta lineal del detector de fluorescencia con respecto a la concentración de los analitos.

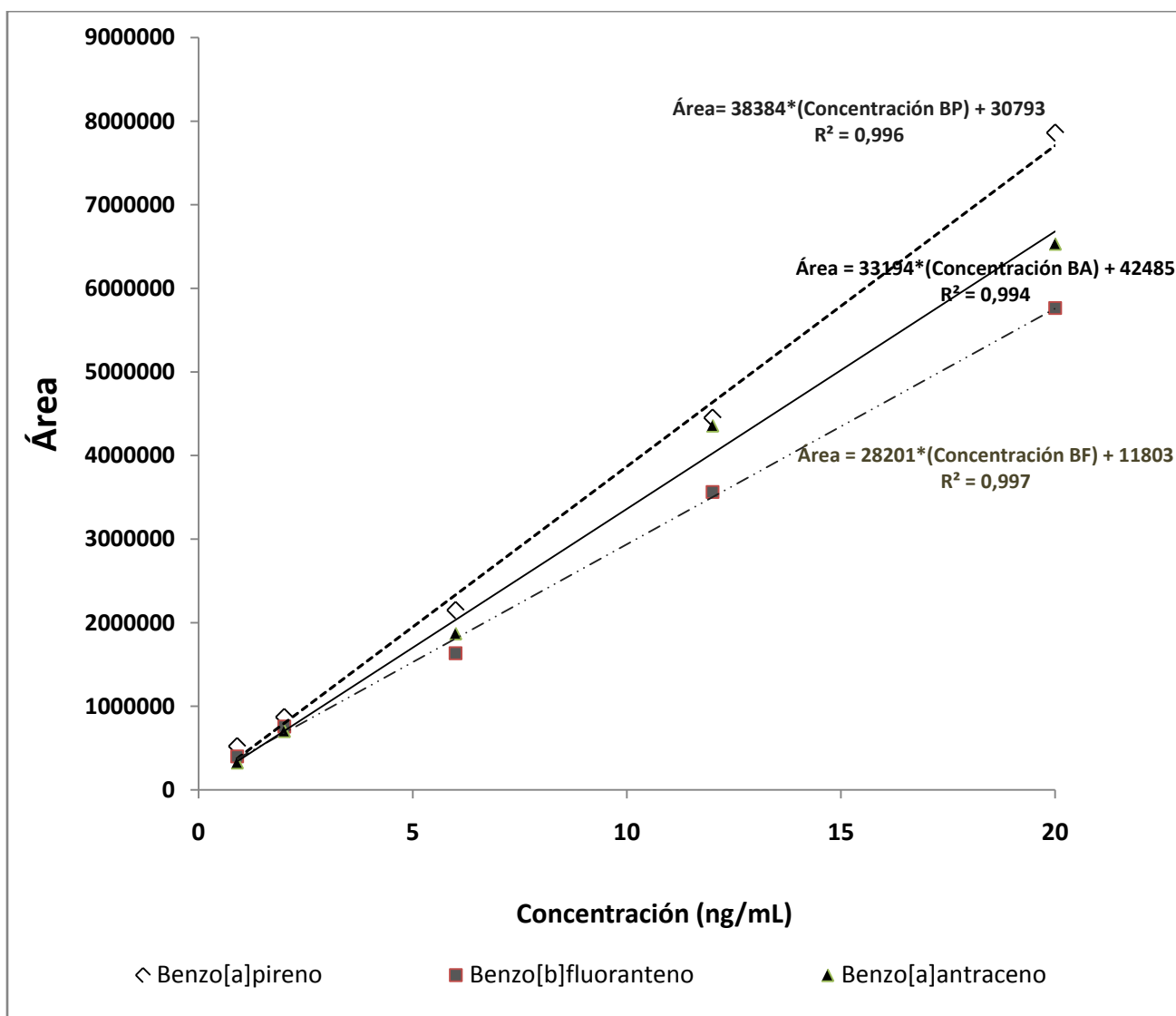


Figura 3.3 Curva de calibración obtenida para los tres HAP's en estudio en el intervalo de concentraciones de 0.9-20 ng mL⁻¹. BA = Benzo[a]antraceno; BF = Benzo[b]fluoranteno, BP = Benzo[a]pireno

En la tabla 3.3 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la precisión del sistema.

Tabla 3.3 Resultados de la precisión del sistema cromatográfico. Coeficientes de variación % del área para 5 inyecciones a dos niveles de concentración.

Compuesto	Benzo[a]antraceno		Benzo[b]fluoranteno		Benzo[a]pireno	
Concentración (ng mL ⁻¹)	0.9	10	0.9	10	0.9	10
C. V. %	2.75	1.78	2.75	1.45	1.45	0.77

Observando los resultados de la tabla 3.3, se puede decir que la variabilidad máxima del sistema es menor al 3% en concentraciones bajas y disminuye cuando se trabaja a concentraciones más altas, ya que están más alejadas del límite de detección del instrumento. Los resultados de repetibilidad se presentan en la tabla 3.4. Se obtuvieron buenos CV % menores a 1.66.

En la medición del límite de detección experimental (LDE) se obtuvo un valor entre 0.1-0.2 ng mL⁻¹ de cada compuesto ya que este resultó el intervalo de concentración en que se daba una señal mayor a 3 veces el ruido de fondo. Los resultados de esta evaluación se presentan en la tabla 3.4, junto a los límites de detección teóricos y límites de cuantificación, obtenidos de acuerdo con la metodología estadística descrita en la sección 2.2.1.3.

Tabla 3.4 Repetitividad, límites de detección y cuantificación del sistema cromatográfico (inyección de 20 µL)

Compuesto	C. V. % **	L.D.E. ng/mL	L.D.T. ± D. E. ng/mL	L. C. ng/mL
Benzo[a]antraceno	1.66	0.10	0.08±0.03	0.27
Benzo[b]fluoranteno	1.34	0.10	0.05±0.02	0.18
Benzo[a]pireno	0.80	0.10	0.04±0.02	0.15

** 5 inyecciones de una disolución de concentración 10 ng mL⁻¹ en un mismo día. L.D.E. = Límite de detección experimental; L.D.T= Límite de detección teórico; L.C. Límite de cuantificación. Intervalo de concentraciones de la curva de calibración 0.2 – 1.6 ng mL⁻¹. D. E. = Desviación estándar.

Los límites de detección calculados, se obtuvieron con una curva de calibración que abarca concentraciones de los compuestos cercanas al límite de detección del instrumento, con el fin de obtener un valor más preciso.

Después de ajustar la curva con el método de mínimos cuadrados, los límites se calcularon utilizando la desviación estándar de regresión y la pendiente de la curva. Un ejemplo de estos cálculos y las fórmulas se presentan en el Anexo I.

Los límites calculados resultaron menores a los valores experimentales, sin embargo, los cuales valores muy cercanos.

Por otro lado, los límites de cuantificación calculados muestran que es posible medir con exactitud concentraciones mayores a 0.27, 0.18 y 0.15 ng/mL de los tres compuestos benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno y benzo[a]pireno, respectivamente.

3.2 Obtención de la muestra de protozoarios libre de materia orgánica.

De los diferentes ensayos con velocidades y tiempos de centrifugación realizados se observó que a velocidades mayores a las 3000 rpm y durante 8 minutos se sedimentaban los protozoarios junto con la materia orgánica. Al disminuir el tiempo de centrifugación a 2 minutos, la velocidad a 1500 rpm y dejando 5 minutos de reposo, la sedimentación de la materia orgánica fue efectiva, sin embargo, aparecía en el sedimento una gran cantidad de microorganismos y a su vez, un número reducido de los mismos en el sobrenadante. De esta forma, se disminuyó la velocidad de centrifugación a 1100 rpm con lo cual se favoreció la presencia de las células de protozoarios en el sobrenadante y la sedimentación de la mayor cantidad de materia orgánica posible.

Así, el protocolo final para la obtención de la muestra de protozoarios es presentado en la figura 3.4.

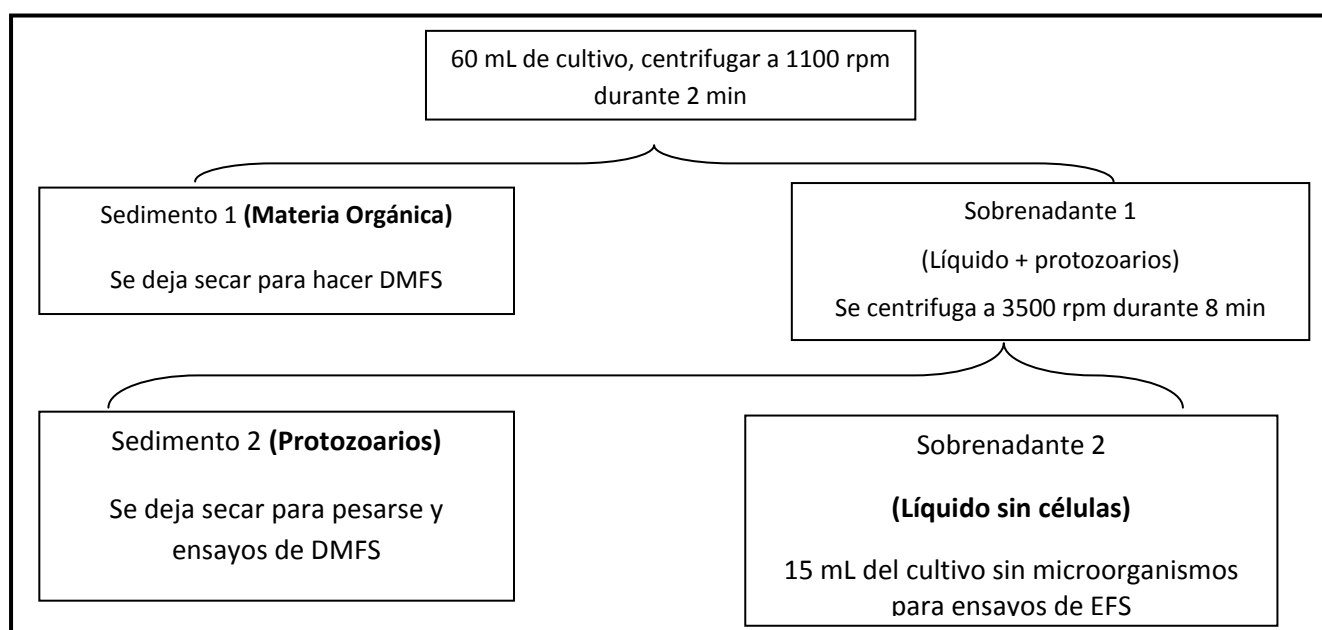


Figura 3.4. Diagrama del método de obtención de la muestra de protozoarios.

En la figura 3.5.A se presenta una muestra de cultivo de *C. cucullus* centrifugada a una velocidad alta. Se aprecia que la mayoría de las células de protozoarios quedan embebidas en la materia orgánica presente en el medio de cultivo. Debido a que los HAP's suelen adsorberse en la materia orgánica cuando están en disoluciones acuosas (Jeanneau, 2007), fue necesario separar esta materia orgánica de las células de protozoarios para poder diferenciar la cantidad de HAP's que se adsorbían o bioacumulaban en ellas.

Considerando lo anterior, la metodología propuesta en la figura 3.4 permitió obtener células de protozoarios con la menor cantidad de materia orgánica posible. Previamente se probaron otros métodos de separación, como la filtración, pero se tenía el inconveniente de que las células quedaban atrapadas en los filtros y no era posible recuperarlas. Por lo tanto, la centrifugación resultó ser la mejor opción para aislar a los microorganismos de la materia orgánica. De no haber hecho esta operación, la materia orgánica se hubiera juntado con las células de protozoarios quedando interferentes masivos en el análisis por CLAR-DF.

De esta forma, al realizar una primera centrifugación a una velocidad baja y dejando sedimentar unos minutos el cultivo, se logró separar gran cantidad de materia orgánica. En el sobrenadante quedó la mayor cantidad de células de protozoarios y al separar este sobrenadante para realizar la segunda centrifugación, ahora a una velocidad más alta, fue posible concentrar las células en un sedimento lo más libre posible de materia orgánica.

Este sedimento se dejó secar a temperatura ambiente para realizar los ensayos de DMFS, mientras que el cultivo líquido, que quedó libre de protozoarios y de materia orgánica, se utilizó para los experimentos de EFS.

En la figura 3.6 se presenta la fotografía de una muestra que se limpió mediante centrifugaciones a las condiciones establecidas. En esta última foto, se observa un mayor número de células libres de materia orgánica en comparación a la figura 3.5.

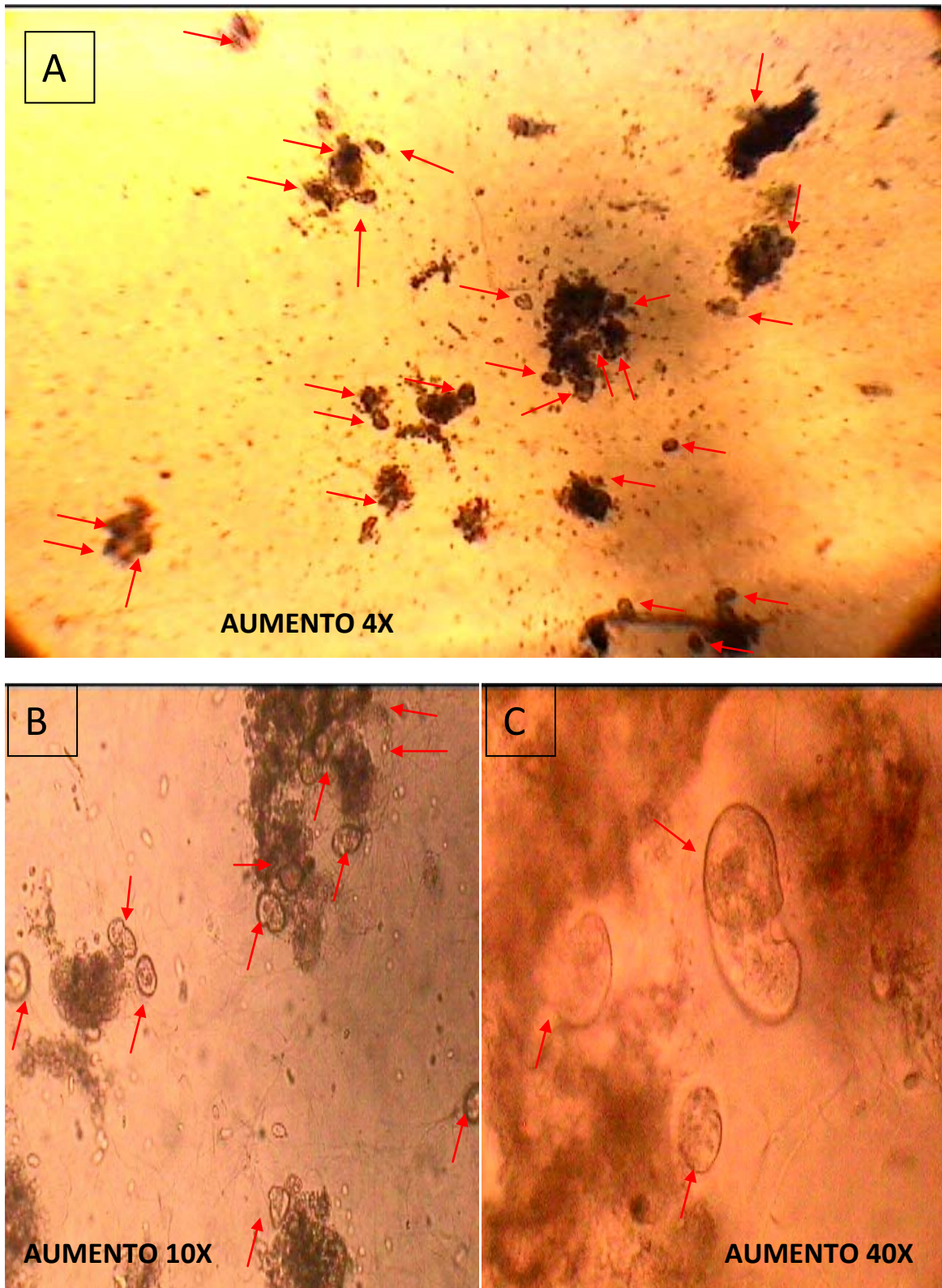


Figura 3.5 Observación al microscopio óptico de una muestra de cultivo de *C. cucullus* centrifugada a 3500 rpm durante 8 minutos. Las flechas señalan a las células.

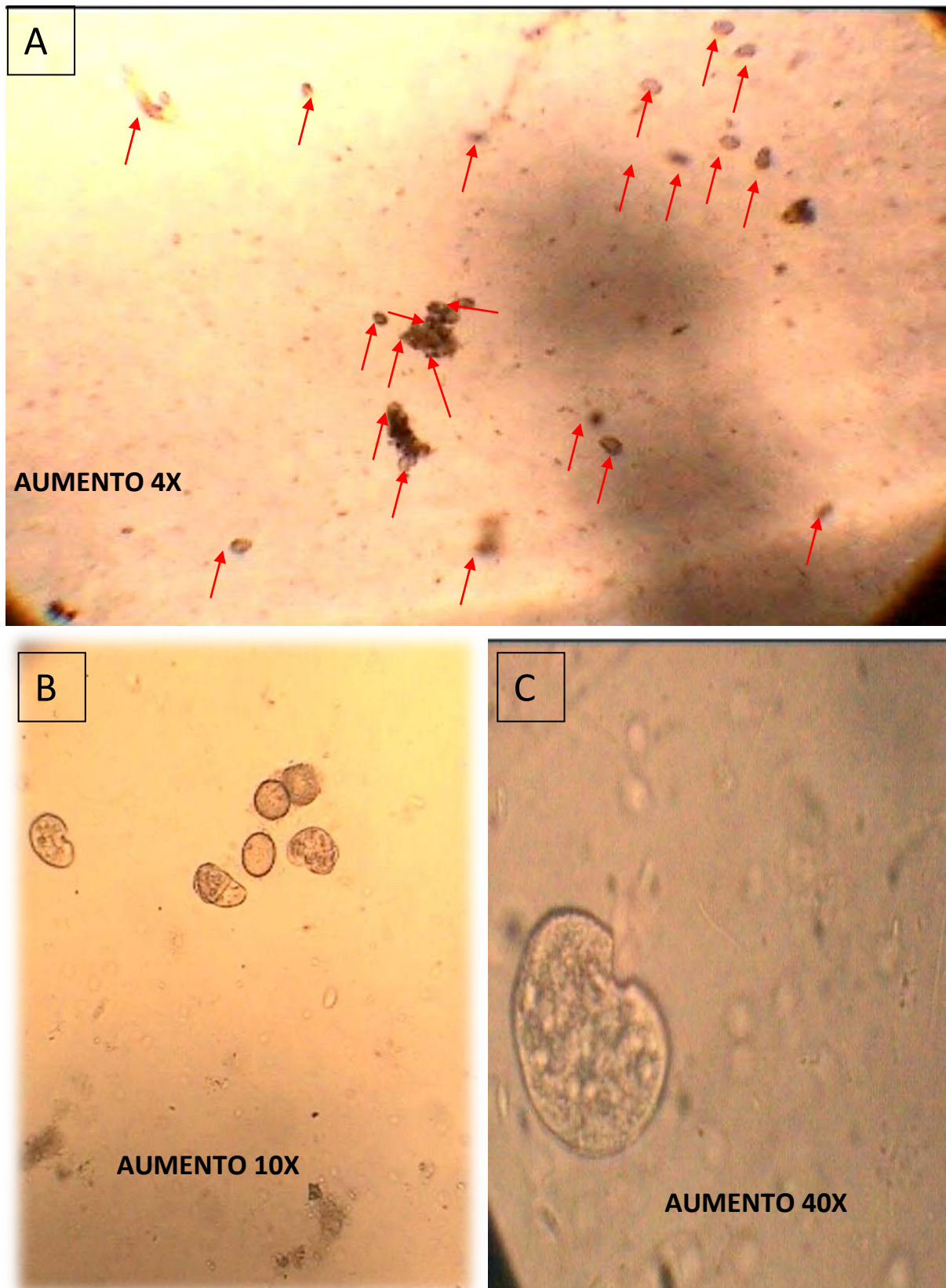


Figura 3.6 Observación al microscopio óptico de una muestra de cultivo de *C. cucullus* sometido al procedimiento descrito en la figura 3.4. Sedimento 2. Las flechas indican las células.

3.3. Desarrollo y validación de la DMFS para la extracción de HAP's en protozoarios.

3.3.1 Optimización de la elución de los HAP's. DMFS con estándar.

Conociendo el orden de elución de los compuestos en el sistema cromatográfico y haciendo analogía de su comportamiento con el sistema de extracción, se planteó en primer lugar, la optimización del volumen de disolvente orgánico para extraer los compuestos del cartucho empacado con 100 mg de fase C18-PAH. El disolvente utilizado fue acetonitrilo grado HPLC y los resultados promedio de los tres ensayos planteados se presentan en las tablas 3.5-3.7.

Tabla 3.5 Ensayo 1. Elución de los compuestos con 100% de acetonitrilo. Fortificación a 16 ng g⁻¹ de fase. Cartuchos empacados con 0.1 g de fase.

Compuesto	Recobro (%) promedio ± D.E.				
	n=3				Global
	Fracciones de 1 mL de acetonitrilo				
1	2	3	4		
Benzo[<i>a</i>]antraceno	99.5 ± 3.08	**	**	**	99.5
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	103.0 ± 4.31	**	**	**	103.0
Benzo[<i>a</i>]pireno	92.8 ± 4.34	**	**	**	92.8

** No cuantificables, < L.D. D. E. = Desviación estándar

Como se aprecia en la tabla 3.5, al usar acetonitrilo como disolvente de elución de los compuestos, es suficiente utilizar sólo 1 mL de acetonitrilo ya que los recobros mayores al 92 %. Esto proporciona la ventaja de que los HAP's quedan suficientemente recuperados y concentrados en 1 mL, lo cual facilita el análisis de los extractos en el sistema cromatográfico sin tener que evaporar el disolvente.

Los resultados del ensayo 2 se presentan en la tabla 3.6 en donde se observa que debido al carácter apolar de los tres analitos, no se observa fuga de los compuestos en el cartucho al agregar el agua. Sin embargo, en las fracciones de agua: acetonitrilo (50:50) utilizadas, sí se aprecia fuga de los tres compuestos. Por lo tanto, no se seleccionó esta mezcla como disolución

de limpieza para la columna de dispersión puesto que se obtendrían bajos rendimientos al eluir los compuestos con acetonitrilo. Los recobros obtenidos en acetonitrilo 100% son menores al 79%.

Tabla 3.6 Ensayo 2. Elución de los compuestos con mezclas agua: acetonitrilo de polaridad decreciente. Fortificación a 16 ng g^{-1} de fase. Cantidad de fase utilizada 0.1 g.

Compuesto	Recobro (%) promedio \pm D.E. n= 3								C.V.%
	Fracciones de 1 mL de agua			Fracciones de 1 mL de agua:acetonitrilo (50:50 v/v)		Fracciones de 1 mL de acetonitrilo		Recobro Global \pm D.E.	
	1	2	3	1	2	1	2		
Benzo[a]antraceno	**	**	**	17.1 \pm 1.67	14.3 \pm 1.43	62.5 \pm 2.67	0	93.7 \pm 3.08	3.3
Benzo[b]fluoranteno	**	**	**	7.8 \pm 2.06	15.3 \pm 1.83	79.1 \pm 2.78	0	102.2 \pm 4.31	4.2
Benzo[a]pireno	**	**	**	11.6 \pm 0.68	10.0 \pm 3.37	72.4 \pm 7.08	0	94.0 \pm 4.34	4.6

** No cuantificables, < L.D. D. E. = Desviación estándar

Por lo anterior, con el fin de aumentar la cuantitatividad en la recuperación de HAP's en la fracción de acetonitrilo, se decidió probar otra disolución de limpieza que estuviera constituida por una mezcla de agua: acetonitrilo de mayor polaridad, lo cual se logró aumentando la proporción de agua (de 50 a 70 %) en la mezcla agua: acetonitrilo, para evitar la fuga de los HAP's del cartucho al momento de agregar los disolventes de limpieza. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.7.

Con esta secuencia de elución, se lograron mejores recobros en el extracto de acetonitrilo, con respecto a la secuencia de elución del ensayo 2 y no se presentaron los analitos en las fracciones agua: acetonitrilo (70:30). Por lo tanto, se decidió probar dichas condiciones en caso de observarse que eran suficientes para eliminar posibles interferentes provenientes de la muestra del sedimento de protozoarios. Dichos resultados se discuten en la sección siguiente.

Tabla 3.7 Ensayo 3. Optimización de la limpieza de interferentes. Fortificación a 16 ng g⁻¹ de fase. Cantidad de fase utilizada 0.1 g.

Compuesto	Recobro (%) promedio ± D. E. n= 3								Global ± D. E.	C.V.%
	Fracciones de 1 mL de agua			Fracciones de 1 mL de agua:acetonitrilo (70:30 v/v)			Fracciones de 1 mL de acetonitrilo			
	1	2	3	1	2	3	1	2		
Benzo[a]antraceno	**	**	**	**	**	**	97.5 ±4.52	0	97.5 ±4.52	4.6
Benzo[b]fluoranteno	**	**	**	**	**	**	101.4 ± 2.63	0	101.4 ± 2.63	2.6
Benzo[a]pireno	**	**	**	**	**	**	90.8 ± 2.78	0	90.8 ± 2.78	3.1

** No cuantificables, < L.D. D. E. = Desviación estándar

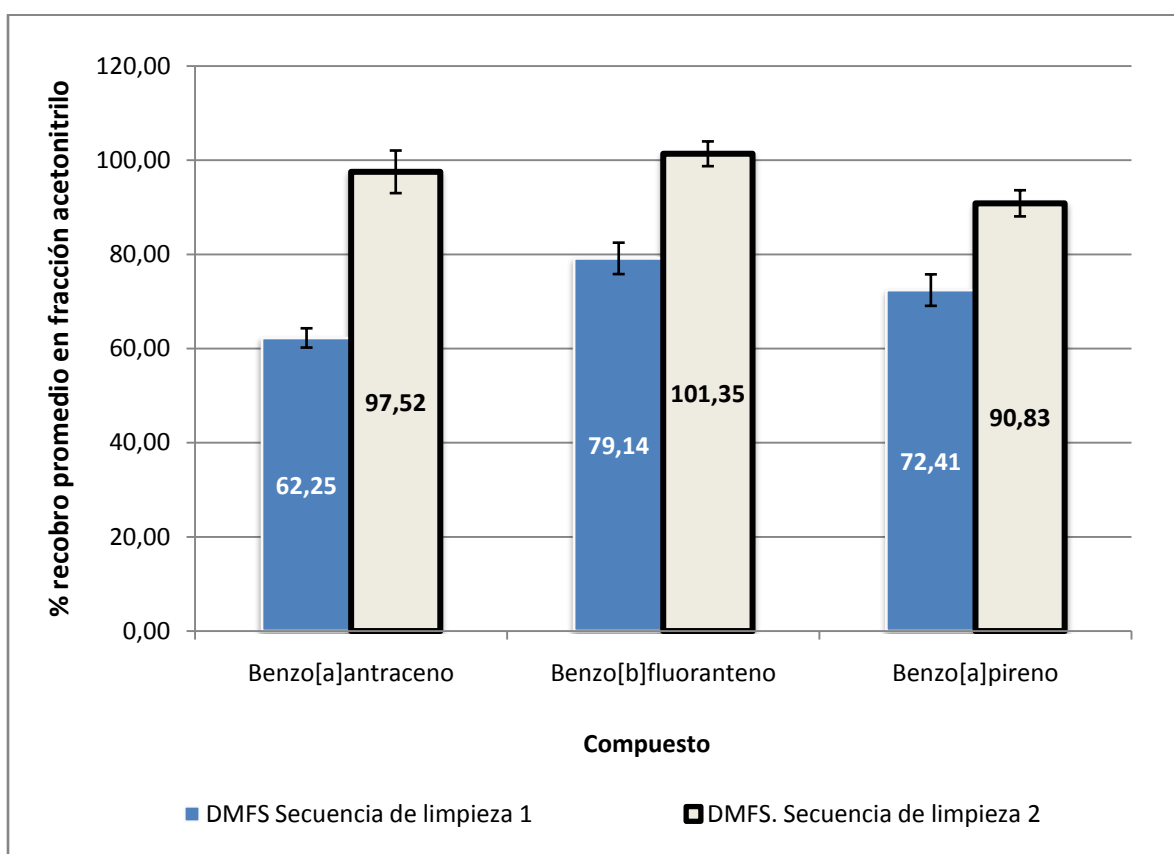


Figura 3.7. Comparación de los recobros promedio ± D. E. obtenidos en la fracción de acetonitrilo, después de utilizar las dos secuencias de limpieza en la DMFS sin muestra.

3.3.2 Optimización de la elución selectiva de los HAP's. DMFS con estándares y muestras de protozoarios.

Al inyectar los extractos en acetonitrilo correspondientes al ensayo 1 provenientes de una muestra fortificada y sin realizar la limpieza de interferentes en la secuencia de elución, se observó el cromatograma de la figura 3.7.A.

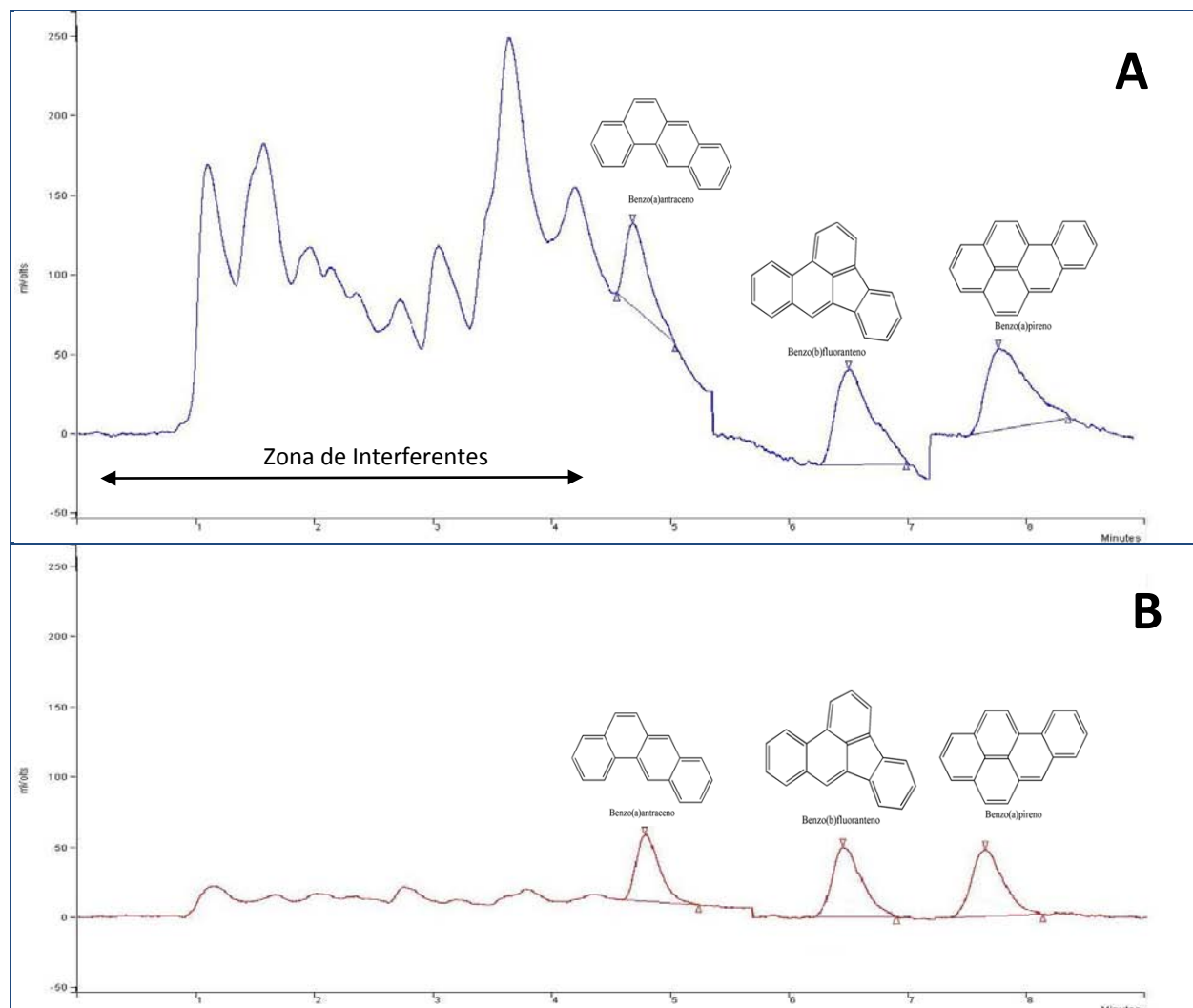


Figura 3.8. Cromatogramas de extractos obtenido por DMFS con muestras de protozoarios fortificadas con 0.32 ng/mg de cada compuesto. **A)** DMFS sin limpieza, **B)** DMFS con limpieza

Los interferentes observados resultaron ser más polares que los tres HAP's, ya que tenían una menor retención en el sistema cromatográfico. Estos interferentes dificultaban la integración del primero de los HAP's en eluir, que es el benzo[a]antraceno, por lo cual se

propuso el ensayo 2, agregando la secuencia de limpieza con 3 mL de mezcla acetonitrilo: agua (30:70) antes de eluir los compuestos en acetonitrilo puro, con lo cual se logró realizar una limpieza muy eficiente, ya que se lograron eliminar los picos provenientes de los interferentes como se ilustra en la figura 3.7.B.

Una vez que se observó que la secuencia de limpieza era efectiva, se procedió a adoptarla y verificar la linealidad de la técnica de DMFS, realizando la fortificación del adsorbente con disoluciones estándar en un primer lugar.

3.3.3 Validación del método por DMFS-CLAR. Ensayos sin muestra.

Con los ensayos de DMFS sin muestra se observó buena linealidad del método con coeficientes de correlación lineal mayores a 0.99 para los tres compuestos. A partir de las pendientes correspondientes de las rectas **ng agregados vs ng recuperados** se obtuvieron buenos recobros promedio, mayores a 90.8 %. La precisión del método también resultó muy buena con coeficientes de variación menores a 2 %.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente.

Tabla 3.8 Resultados de la validación de la técnica de DMFS sin muestra

Compuesto	Precisión (C.V. %) ^A	Ecuación de la recta ng recuperados (y) vs ng agregados (x) ^B	Coefficiente de correlación (r^2)
Benzo[<i>a</i>]antraceno	1.64	$y = 0.948x - 0.046$	0.9996
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	0.79	$y = 1.037x + 0.007$	0.9997
Benzo[<i>a</i>]pireno	1,76	$y = 0.908x - 0.028$	0.9998

^ANivel de fortificación = 80 ng/g de fase, n = 5 repeticiones; ^B Intervalo de concentraciones 4-100 ng/g de fase. Cantidad de fase utilizada = 0.1 g

Con esto se aprecia un buen desempeño del método para la extracción de los HAP's, con lo cual se procedió a la validación del método de extracción de HAP's por DMFS con muestras de protozoarios fortificadas con estándares de los compuestos de interés.

3.3.4 Validación del método por DMFS-CLAR. Ensayos con protozoarios.

Los resultados de la validación del método de extracción por DMFS se presentan en la tabla 3.9.

Tabla 3.9 Resultados de la validación del método de extracción de HAP's por DMFS en muestras de protozoarios y análisis por CLAR

Compuesto	Precisión (C.V. %) ^A	Ecuación de la recta ng recuperados (y) vs ng agregados (x) ^B	Coefficiente de correlación (r ²)	L. D. ^B ng/mg	L. C. ^B ng/mg
Benzo[a]antraceno	3.30	y = 0.908x + 0.034	0.9987	0.05	0.15
Benzo[b]fluoranteno	3.97	y = 0.957x + 0.125	0.9956	0.04	0.12
Benzo[a]pireno	2.55	y = 0.841x + 0.026	0.9936	0.06	0.20

^ANivel de fortificación = 2 ng/mg muestra, 5 repeticiones; ^B Intervalo de concentraciones 0.1-2 ng/mg muestra.

En ella se aprecia una buena linealidad del método, con coeficientes de regresión mayores a 0.99.

Con las ecuaciones de las curvas de **ng agregados vs ng recuperados**, para cada compuesto, se obtuvo el recobro promedio del método dentro del intervalo de concentraciones utilizado, que corresponde al valor obtenido para la pendiente de cada curva. Se obtuvieron buenos recobros, aunque, fueron menores a los obtenidos en la validación sin muestra. Los recobros promedio fueron mayores al 90 % para benzo[a]antraceno y benzo[b]fluoranteno, mientras que para el benzo[a]pireno fueron de 84 %.

El hecho de trabajar con un intervalo de concentraciones más amplio, afectó un poco los límites de detección y cuantificación estadísticos. Se obtuvieron L. D. y L. C. menores a 0.2 ng/mg de muestra (ver tabla 3.9) lo que permite la cuantificación de cantidades muy pequeñas de los tres compuestos adsorbidos en los protozoarios expuestos a los contaminantes. Así, para

muestras de 5 mg de protozoarios, se podrían determinar con buena precisión, cantidades adsorbidas en los protozoarios cercanas a 0.75, 0.60 y 1.00 ng para benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno y benzo[*a*]pireno, respectivamente.

Como se explicará más adelante en este trabajo, en la sección de aplicación del método, estos niveles resultaron suficientes para cuantificar las cantidades de HAP's encontradas en las muestras de protozoarios expuestos.

3.4. Optimización y validación del método de extracción de HAP's en medios de cultivos líquidos por la técnica de EFS.

3.4.1 Ensayos de retención y elución.

En esta sección se determinaron los recobros de los HAP's a partir de la extracción de 15 mL de muestra adicionada con 15 % (v/v) de dos diferentes modificadores orgánicos.

Los rendimientos obtenidos a partir de la EFS en muestras de 15 mL de agua fortificadas con HAP's resultaron ser bajos, menores al 50 %, pero al agregar los disolventes etanol e isopropanol en porcentajes de 15 %, se mejoró el rendimiento de la extracción de los HAP's por EFS, dándose los resultados que se presentan en la figura 3.9. No se probaron porcentajes mayores de estos disolventes para evitar la fuga de los compuestos al momento de cargarlos en el cartucho de EFS.

En la figura 3.9 se aprecia en el recobro el efecto positivo que tienen los disolventes agregados. El efecto es mayor para los HAP's de 5 anillos (benzo[*a*]pireno y benzo[*b*]fluoranteno) en donde sus recobros casi se duplican con respecto a los ensayos en donde no se agrega a las muestras ninguno de los disolventes. Sin embargo, aún con la adición de los disolventes en este porcentaje, no se alcanza un recobro del 100 % debido a la alta hidrofobicidad de los compuestos, cierta cantidad de los HAP's queda adsorbida a los materiales donde se encuentra la muestra antes de pasar por el cartucho de EFS.

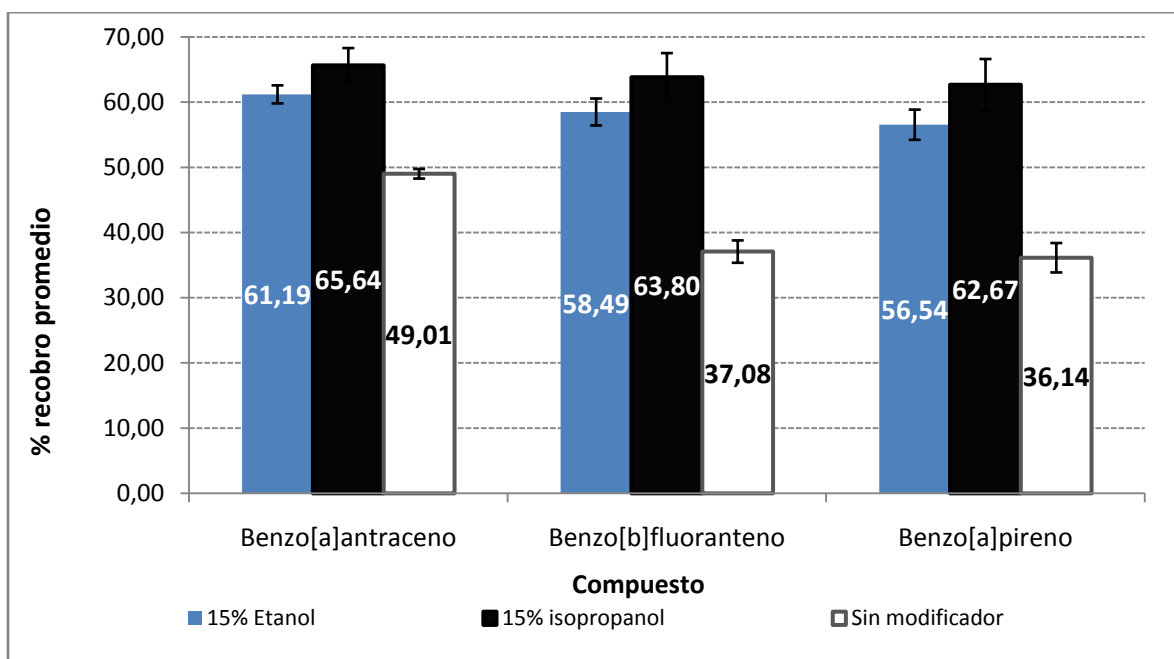


Figura 3.9 Resultados promedio \pm D. E. de la optimización de la extracción de los HAP's en agua por EFS con la adición de modificadores orgánicos. Fortificación a 0.8 ng/mL de cada compuesto, n=3.

Debido a que se tuvo una variación relativamente alta, con C.V. % cercanos a 6.6 en algunos casos, se decidió comparar las dos medias resultantes de los ensayos con modificador agregado (etanol o isopropanol) mediante una prueba de *t de Student*. Para esto, se utilizó la función **PRUEBA.T** del software Excel. Esta función da la probabilidad de que dos medias de dos poblaciones, distintas y con el mismo número de muestras, sean iguales.

Los resultados obtenidos mostraron diferencia significativa entre los promedio obtenidos para cada compuesto, utilizando los dos disolventes, por lo que el disolvente que resultó más eficiente para la EFS fue el isopropanol, dando los mejores recobros. Este disolvente se utilizó para la validación del método por EFS en muestras de cultivos sin protozoarios.

Los recobros correspondientes a todos los ensayos realizados junto con los recobros globales y coeficientes de variación se presentan en la tabla 3.10.

Cabe mencionar que al analizar las fracciones de 100% agua y acetonitrilo:agua 30:70, no se observó fuga de los compuestos.

Tabla 3.10 Resultados completos de la optimización de la EFS en agua. Fortificación a 0.8 ng/mL de cada compuesto.

Compuesto		Recobros %			
		15 % Etanol	15 % isopropanol	Sin modificador	
Benzo[a]antraceno		60.99	63.43	48.75	
		60.94	63.34	49.85	
		61.65	68.85	48.45	
		59.76	68.13	47.87	
		59.10	64.46	48.28	
		p*	0.0013		
		Recobro % Promedio	61.19	65.64	49.01
		D. E.	1.03	2.65	0.74
	C. V. %	1.71	4.04	1.50	
Benzo[b]fluoranteno		15 % Etanol	15 % isopropanol	Sin modificador	
		Recobros %			
		54.72	59.94	36.38	
		54.76	60.04	39.03	
		57.10	66.45	35.82	
		54.76	68.13	47.87	
		57.1	64.46	48.28	
		p*	0.0017		
	Recobro % Promedio	58.49	63.80	37.08	
	D. E.	3.34	3.72	1.72	
	C. V. %	5.71	5.83	4.63	
Benzo[a]pireno		15 % Etanol	15 % isopropanol	Sin modificador	
		Recobros %			
		54.66	61.16	35.59	
		54.16	55.52	38.61	
		60.79	62.09	34.20	
		59.76	68.13	47.87	
		59.1	64.46	48.28	
		p*	0.0446		
	Recobro % Promedio	56.54	62.67	36.14	
	D. E.	3.69	3.94	2.26	
	C. V. %	6.53	6.29	6.24	

*Un valor de $p < 0.05$, indica diferencia significativa entre las medias con un nivel de confianza del 95 %.
Volumen de muestra = 15 mL.

En la figura 3.10, se presentan los patrones de elución del cartucho de EFS para los tres compuestos, al agregar los modificadores orgánicos en el agua. Se observa claramente que el isopropanol proporcionó los mejores resultados.

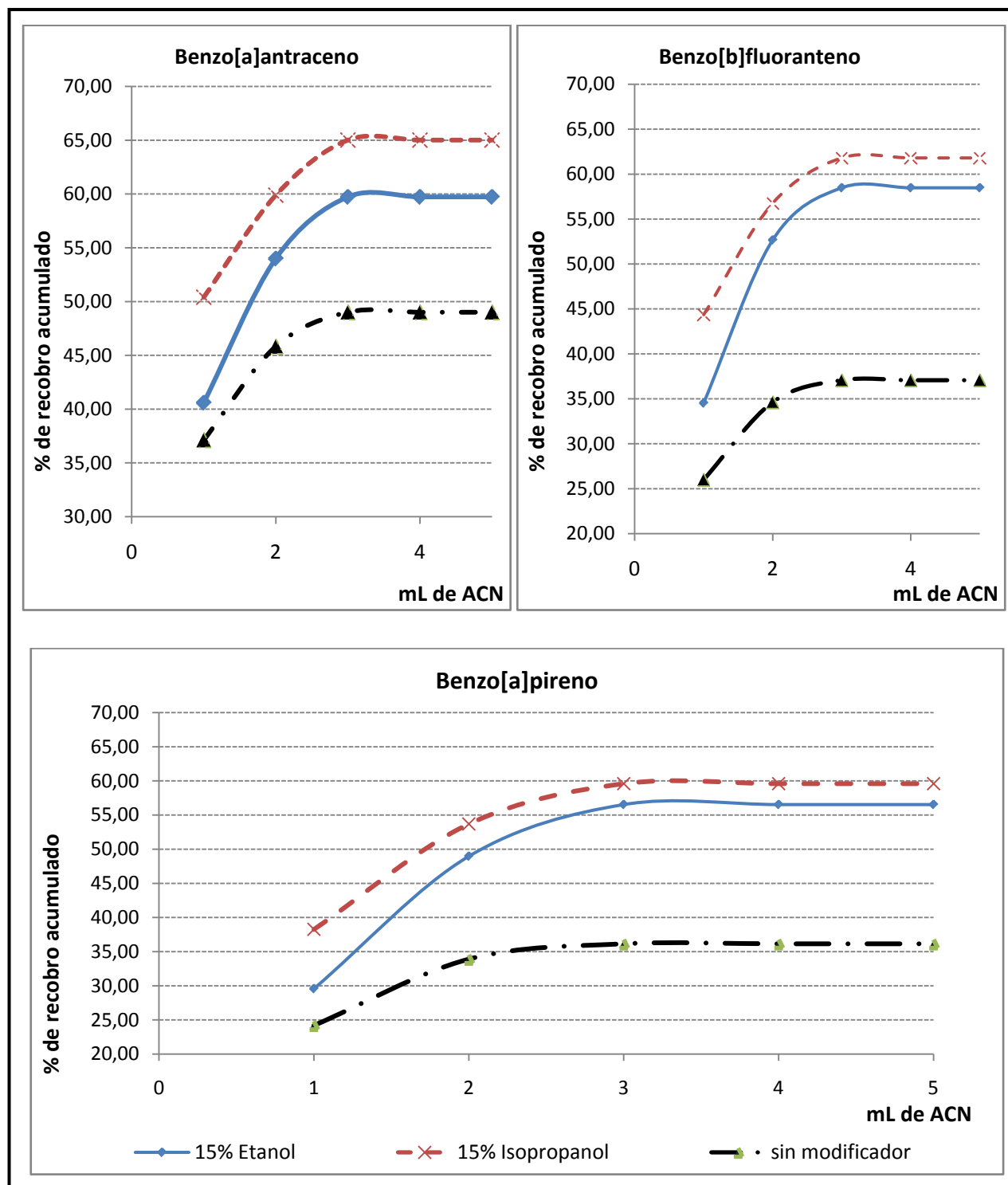


Figura 3.10 Patrones de elución para los tres HAP's en estudio. Elución con acetonitrilo 100 %. Cartucho de EFS con 250 mg de fase C18-PAH. Fortificación a 0.8 ng/mL de cada compuesto. Volumen de muestra = 15 mL.

También, en todos los casos se aprecia que la totalidad de los compuestos que pueden ser eluidos del cartucho de EFS se efectúa al utilizar 3 mL de acetonitrilo. Así, un volumen un poco mayor (4 mL) se utilizó para los siguientes ensayos de validación con muestras de cultivos líquidos sin protozoarios.

Las concentraciones a las cuales quedaron los HAP's en los extractos con acetonitrilo fueron suficientes para analizarlas con el detector de fluorescencia sin necesidad de concentrar aún más el extracto obtenido, ya que al pasar los compuestos de un volumen de 15 mL en las muestras a uno de 4 mL en el extracto se obtiene un factor de concentración de 3.75, que mejora la señal de los picos cromatográficos al inyectar extractos más concentrados que las muestras.

3.4.2 Limpieza de interferentes.

Considerando los resultados obtenidos para la DMFS, se propuso para la EFS con cultivos líquidos una secuencia de limpieza similar, antes de eluir a los compuestos del cartucho de EFS. Los disolventes de limpieza utilizados fueron primero agua y después agua: acetonitrilo (70:30 v/v), ambos en volúmenes de 5 mL. Finalmente los compuestos se eluyeron del cartucho con 4 mL de acetonitrilo. De estos ensayos se recuperaron fracciones de 1 mL de cada uno de los disolventes aplicados, cada fracción fue analizada para determinar el contenido de HAP's y el recobro.

Los análisis de las fracciones indicaron que en los disolventes de limpieza (agua y mezcla agua: acetonitrilo) no se encontraron cantidades medibles de los compuestos, mientras que en las fracciones de acetonitrilo se recuperó la mayor cantidad posible de los mismos. Además, en los cromatogramas correspondientes a los HAP's recuperados en acetonitrilo no se observaron interferentes que impidieran realizar un buen análisis, como en el caso de la DMFS, con lo cual se determinó que la secuencia de limpieza propuesta era eficiente para los ensayos. En la figura 3.11 se presenta el cromatograma obtenido al inyectar un extracto en acetonitrilo con las condiciones establecidas para este método de EFS.

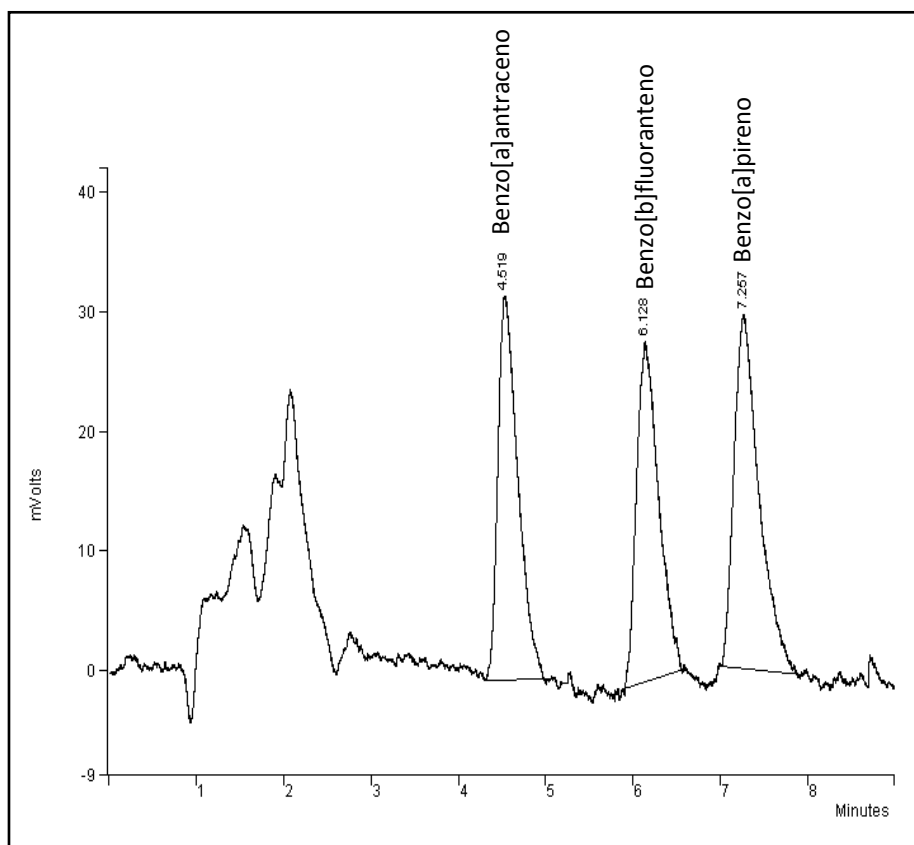


Figura 3.11. Cromatograma de un extracto obtenido por EFS a partir de una muestra de cultivo libre de protozoarios con una concentración de 0.8 ng/mL de cultivo para los tres HAP's en estudio.

Los recobros promedio para cada una de las fracciones analizadas se presentan en la tabla 3.11.

Tabla 3.11 Optimización de la limpieza de interferentes en EFS. Fortificación a 0.8 ng mL⁻¹ de muestra. Volumen de muestra utilizado= 15 mL de cultivo sin protozoarios adicionado con 15% de isopropanol.

Compuesto	Recobro (%) promedio ± D. E. n= 3														C.V.%	
	Fracciones de 1 mL de agua					Fracciones de 1 mL de agua:acetonitrilo (70:30 v/v)					Fracciones de 1 mL de acetonitrilo					Global
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4		
BA	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	52.40	13.43	8.78	0.15	74.76	4.04
BF	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	47.35	15.14	7.57	0.80	70.86	5.83
BP	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	41.00	18.75	8.46	0.89	69.10	6.29

BA = Benzo[a]anthraceno, BF = Benzo[b]fluoranteno, BP = Benzo[a]pireno. ** No cuantificables, < L.D.
D. E. = Desviación estándar

Al realizar los ensayos de recobro utilizando muestras de cultivos sin protozoarios, se observó un pequeño incremento en los rendimientos de la EFS con respecto a los resultados obtenidos al utilizar solo agua como muestra. Este aumento, se confirma más adelante en los resultados de la validación de la técnica de EFS con muestra.

El aumento puede explicarse de una manera muy aproximada, utilizando el estudio publicado por Jeanneau y cols. (2007), en donde se reporta que puede suceder que la presencia de materia orgánica soluble en el medio de cultivo provoque la adsorción de cierta cantidad de HAP's. De esta forma, en el medio de cultivo hay una fracción de los HAP's solubles, otra unida a la materia orgánica soluble y una más que se une al recipiente que contiene a la muestra. Mientras que en los ensayos con agua, solo se tienen dos fracciones, una soluble y otra unida al vidrio de los recipientes. Al agregar el isopropanol a la muestras (agua o cultivo), se mejora la solubilidad de los HAP's por lo cual cierta cantidad de los HAP's se desprende del material de vidrio aumentando la cantidad de HAP's solubles. Sin embargo, en la muestra de cultivo, esta cantidad soluble será mayor porque habrá que sumar la cantidad de HAP's adherida a la materia orgánica soluble y por lo tanto, una mayor cantidad de los HAP's pasarán por el cartucho de extracción cuando se utilicen muestras de cultivos, aumentando el rendimiento de la extracción en estas muestras.

3.4.3 Validación del método por EFS para la extracción de HAP's en agua.

Se obtuvo una buena linealidad de la técnica con coeficientes de correlación mayores a 0.99 dentro del rango de concentraciones utilizado. Cabe señalar que se utilizó como punto máximo de la curva, el valor de solubilidad máxima en agua, del compuesto más insoluble, el benzo[b]fluoranteno. Para calcular con mayor precisión los límites de detección y cuantificación de los compuestos para el método por EFS-CLAR, se decidió trabajar a concentraciones menores a este valor de solubilidad.

En la tabla 3.12 se observa que los valores obtenidos para los límites de cuantificación resultaron ser bajos para los tres compuestos, permitiéndonos trabajar con precisión en concentraciones mayores a 0.13 ng/mL de muestra.

Si se utiliza el factor de concentración para calcular las concentraciones al L. C. del benzo[*a*]pireno, en el extracto de 4 mL obtenido en esta técnica de EFS:

$$\text{Concentración en extracto en el L.C.} = \frac{0.13 \text{ ng}}{\text{mL muestra}} * \frac{15 \text{ mL muestra}}{4 \text{ mL extracto}} = 0.49 \text{ ng/mL}$$

Dicho valor resulta ser más alto que el encontrado para el mismo compuesto en la validación del sistema (0.15 ng/mL, mostrado en la tabla 3.4).

Lo anterior puede explicarse por el hecho de que la técnica de EFS no alcanza recobros del 100%, lo cual hace que la pendiente de la respuesta = f(concentración del analito) sea menor. Sin embargo, con el factor de concentración de la muestra, las cantidades de los analitos que se obtienen en los extractos del método por EFS, son lo suficientemente altas para cuantificar con exactitud su contenido sin necesidad de concentrarlos por evaporación.

Además, se observa en la tabla 3.12 una buena repetibilidad del método con coeficientes de variación menores a 3.50 %. En la misma tabla se presentan las ecuaciones de las rectas ng agregados vs ng recuperados, y sus respectivos coeficientes de correlación lineal.

Tabla 3.12. Resultados de la validación del método por EFS-CLAR en muestras de agua grado cromatográfico.

Compuesto	Precisión (C.V. %) ^A	Ecuación de la recta ng recuperados (y) vs ng agregados (x) ^B	Coefficientes de correlación	L. D. ng/mL	L. C. ng/mL
Benzo[<i>a</i>]antraceno	2.93	y = 0.694 x + 0.018	0.9964	0.02	0.08
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	2.71	y = 0.684 x + 0.049	0.9970	0.02	0.06
Benzo[<i>a</i>]pireno	3.50	y = 0.698 x + 0.010	0.9960	0.04	0.13

^A 5 repeticiones a una concentración de 0.9 ng/mL de muestra; ^B Intervalo de concentraciones 0.1 – 1.2 ng/mL con tres repeticiones de cada concentración

3.4.4 Validación del método por EFS con muestras de medios de cultivo líquidos sin microorganismos.

En la tabla 3.13 se presentan los resultados obtenidos en la validación de la EFS con cultivos líquidos libres de protozoarios.

Tabla 3.13. Resultados de la validación del método por EFS-CLAR en medios de cultivo libres de protozoarios.

Compuesto	Precisión (C.V. %) ^A	Ecuación de la recta ng recuperados (y) vs ng agregados (x) ^B	Coefficientes de correlación	L. D. ng/mL	L. C. ng/mL
Benzo[a]antraceno	6.00	$y = 0.744x + 0.049$	0.9914	0.04	0.12
Benzo[b]fluoranteno	6.30	$y = 0.727x + 0.040$	0.9834	0.03	0.10
Benzo[a]pireno	7.75	$y = 0.700x + 0.021$	0.9912	0.04	0.14

^A 5 repeticiones a una concentración de 0.5 ng/mL; ^B Intervalo de concentraciones 0.15 – 1.20 ng/mL con tres repeticiones de cada concentración

En este caso, se observa mayor variabilidad en los resultados con respecto a las muestras de agua grado cromatográfico. Sin embargo, se considera buena la repetibilidad del método por EFS, dado que los coeficientes de variación para los tres compuestos son menores a 7.75 %, aún cuando se obtuvieron con una muestra tan compleja como el medio de cultivo líquido.

Los recobros obtenidos fueron mayores al 70 % y la linealidad del método fue buena, con coeficientes de correlación mayores a 0.99 para dos de los compuestos, Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno y de 0.98 para el Benzo[b]fluoranteno.

La linealidad en el intervalo estudiado y los límites de cuantificación calculados estadísticamente demuestran que el método permite trabajar en un amplio intervalo de concentraciones por debajo de la solubilidad de los compuestos en agua. Estos valores resultaron ser ligeramente más elevados que en los ensayos anteriores con agua, debido a que hay mayor variación en cada uno de los ensayos, reflejados en C. V. mayores y r^2 menores a 0.99 en algunos casos, lo que aumenta el valor calculado estadísticamente.

De esta forma, el diagrama completo de trabajo se presenta en la figura 3.12. En este diagrama se incluye el protocolo de extracción por DMFS de los HAP's en los microorganismos y el protocolo de extracción por EFS de los HAP's en los medios de cultivo líquidos.

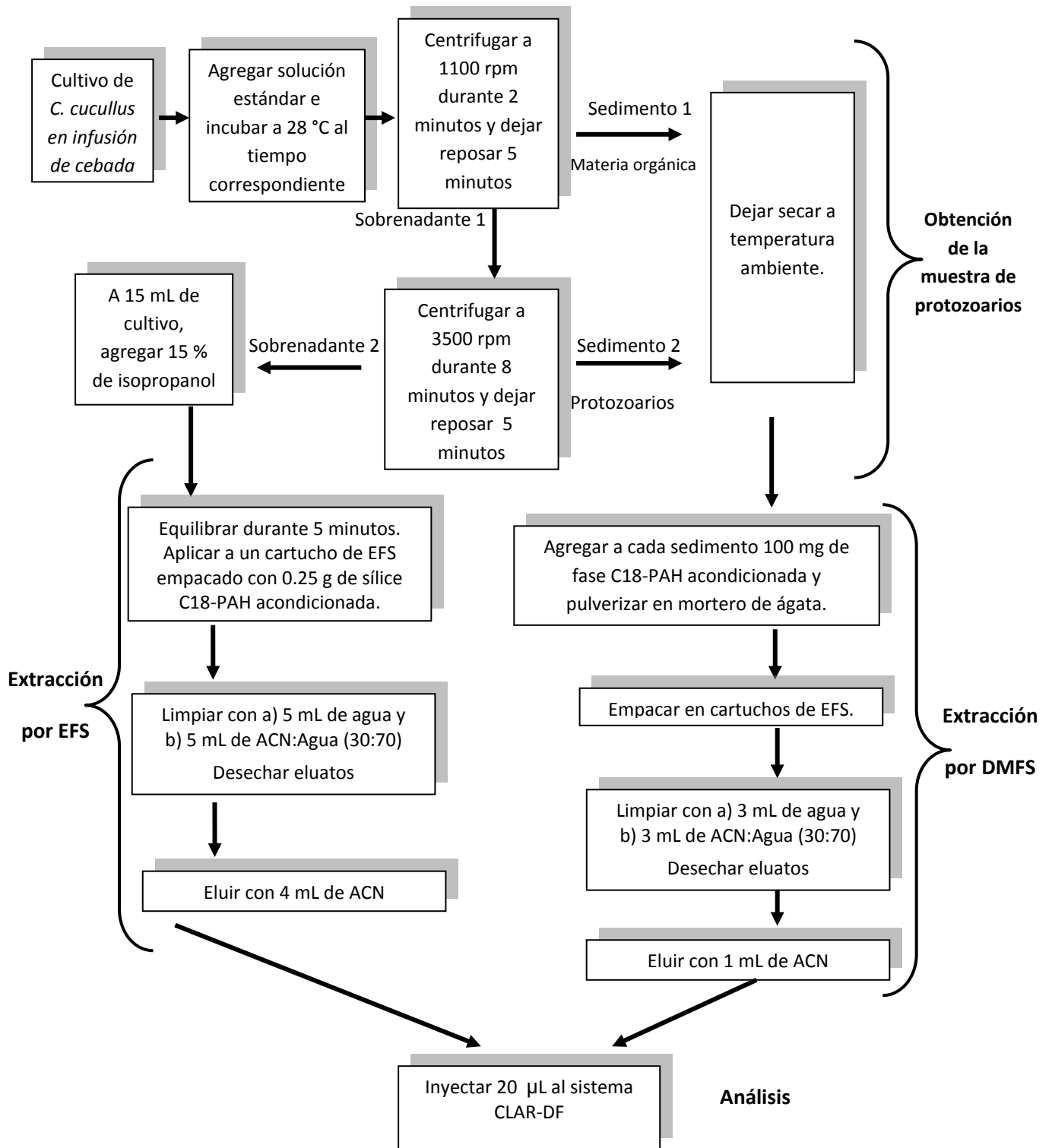


Figura 3.12 Protocolo completo para la determinación de los tres HAP's en cultivos de protozoarios utilizando técnicas de extracción con adsorbentes y cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia.

3.5. Aplicación del método a muestras de cultivos expuestos a los HAP's

3.5.1 Pruebas testigo en los cultivos de *C. cucullus*.

Después de 24 h de la inoculación del cultivo, se obtuvo un número de células de *C. cucullus* entre 70-80 por cada 100 μL de cultivo. A partir de este tiempo, se agregó la alícuota de ACN a los cultivos correspondientes y en las siguientes 24 h se realizó un conteo de protozoarios a diferentes tiempos en cultivos con y sin alícuota de acetonitrilo. Los resultados se presentan en la figura 3.13, en esta figura, se aprecia que la adición de la alícuota de acetonitrilo, no afecta el crecimiento de los protozoarios en el medio de cultivo ya que, el conteo promedio arrojó números de células muy parecidos para ambas muestras a lo largo del intervalo de tiempo en el cual se realizaron las observaciones al microscopio. Entre las 6 y 9 h, se mantiene un número de células relativamente estable ya que se observa que después de las 9 h comienza a disminuir considerablemente el número de organismos, llegando hasta casi la mitad del valor inicial al llegar a un periodo de exposición 24 h. Debido a esto, el intervalo de tiempo que se tomó para los ensayos de exposición a los HAP's fue de 2 a 8 h.

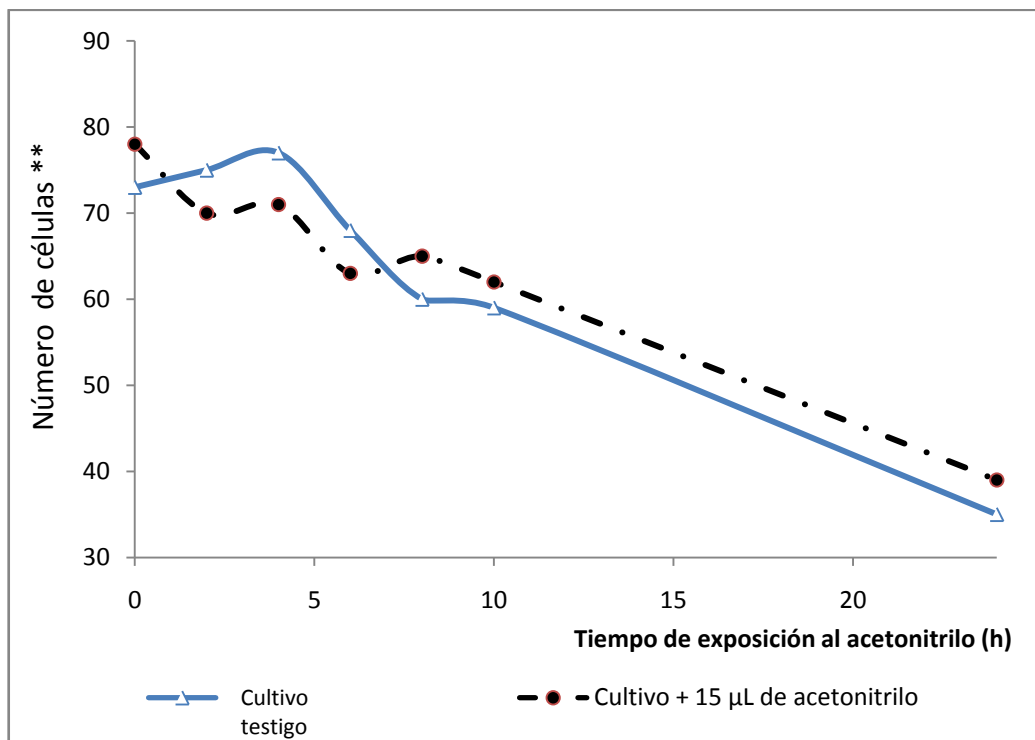


Figura 3.13 Número de células de *C. cucullus* después de 24 hrs de crecimiento en cultivo líquido de infusión de cebada. ** En 100 μL de cultivo.

De esta forma, en los ensayos siguientes se agregó una concentración conocida de HAP's en el medio de cultivo y se varió el tiempo de exposición de los protozoarios a estos contaminantes.

3.5.2 Ensayos de exposición de protozoarios a los HAP's.

El objetivo de estos ensayos consistió simplemente en corroborar si el tiempo de exposición a los contaminantes se refleja en la cantidad acumulada en los microorganismos. Además, se trató de verificar si las extracciones eran discriminantes para cada uno de los componentes del cultivo, como son los microorganismos, la materia orgánica insoluble y el medio de cultivo líquido, llegándose a cumplir con el balance de materia. Así, con las condiciones establecidas en los métodos de extracción, se analizaron los diferentes componentes del cultivo de *C. cucullus*.

Debido a la alta adsorción que presentan los analitos estudiados en los recipientes que contenían las muestras, especialmente porque se encuentran en medios acuosos; se realizaron cultivos testigo de adsorción, sin microorganismos. Estos consistieron en incubar a las mismas condiciones el medio conteniendo la misma cantidad de HAP's agregada. Las cantidades de compuestos recuperadas por la EFS representaron el total de los HAP's disponibles en el medio de cultivo líquido para ser adsorbidos por los protozoarios y por tanto, se consideraron como el valor máximo a alcanzar al sumar las cantidades obtenidas de cada fracción analizada en los ensayos de exposición. Dicho de otra forma, este valor se consideró como el recobro de 100 % en cada tiempo de exposición.

A continuación, se presentan las cantidades y concentraciones recuperadas para cada cultivo testigo en un volumen de 60 mL de cultivo a cada tiempo de exposición.

Tabla 3.14 Cantidades de HAP's recuperadas por EFS en los cultivos control de adsorción a los diferentes tiempos de exposición.

Tiempo exposición	2 h		5 h		8 h	
Compuesto	Cantidad (ng)	Concentración (ng/mL)	Cantidad (ng)	Concentración (ng/mL)	Cantidad (ng)	Concentración (ng/mL)
BaA	24.5	0.41	16.3	0.27	18.3	0.30
BbF	21.4	0.36	19.9	0.33	21.2	0.35
BaP	21.6	0.36	19.3	0.32	18.8	0.31

La concentración de cada compuesto a cada intervalo, se calculó con base en un volumen de 60 mL de cultivo líquido. Cantidad agregada = 1 ng/mL de cultivo.

Se observa una gran adsorción de los compuestos al ser agregados al medio de cultivo, ya que, inicialmente se agregaron los compuestos en concentraciones de 1 ng/mL de cultivo y se tiene una muestra de 60 mL de cultivo, se tendrían que recuperar 60 ng para tener un recobro del 100%. Sin embargo, la cantidad recuperada fluctúa entre un 30 y 40 % del valor esperado. Si bien, el recobro alcanzado con la técnica de EFS demostró ser cercano al 70 % para los compuestos, los valores recuperados en estos ensayos están muy por debajo de los valores determinados anteriormente. Esto se puede atribuir a que en estos experimentos, los HAP's permanecieron en el medio acuoso durante un mayor intervalo de tiempo, a diferencia de los ensayos realizados en la validación del método, en donde la permanencia de los compuestos en el medio acuoso era de 5 a 10 minutos, antes de agregar el isopropanol y realizar la EFS, por lo que la pérdida se refirió solamente al del sistema de extracción y no a la adsorción al vidrio.

Afortunadamente, aún con la adsorción alta al vidrio de los HAP's, las concentraciones remanentes después de los intervalos de tiempo seleccionados, son superiores al límite de cuantificación encontrado para cada compuesto, al utilizar el método de EFS-CLAR. Esto nos da la seguridad de que fue posible calcular las concentraciones de estas muestras con confiabilidad.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos de los ensayos de exposición. Se presentarán las cantidades encontradas en los protozoarios, los medios de cultivo líquidos y la materia orgánica, en ese orden.

La cantidad de HAP's recuperada en la fracción de protozoarios se presenta en la tabla 3.15.

Tabla 3.15 Cantidades de HAP's recuperadas en las muestras de protozoarios sometidas a diferentes tiempos de exposición.

Compuesto	Tiempo de exposición (horas)	Cantidad total recuperada (ng)			Cantidad Promedio (ng)	Desv. Est.	C. V. %	% Promedio recuperado
		Ensayo						
		1	2	3				
BaA	2	2.61	2.91	3.12	2.88	0.26	8.88	11.76
	5	3.66	3.73	4.34	3.91	0.38	9.62	24.06
	8	1.86	1.87	2.08	1.94	0.12	6.25	10.60
BbF	2	3.53	3.90	4.25	3.90	0.36	9.22	18.17
	5	6.82	7.04	7.77	7.21	0.50	6.91	36.29
	8	3.70	3.74	3.32	3.59	0.23	6.42	16.94
BaP	2	2.68	2.99	3.24	2.97	0.28	9.39	13.73
	5	5.76	6.41	6.78	6.32	0.52	8.17	32.77
	8	2.26	2.54	2.49	2.43	0.15	6.28	12.92

BaA = Benzo[a]antraceno; BbF = Benzo[b]fluoranteno; BaP = Benzo[a]pireno
 Cantidad de muestra = 5 mg promedio

En los resultados anteriores, se aprecia que la metodología desarrollada para la extracción de los compuestos, permitió cuantificar con buena precisión, las cantidades encontradas en las células de protozoarios expuestos a los HAP's.

Analizando los datos de las cantidades recuperadas con respecto a los límites de cuantificación del método de DMFS-CLAR, se observa que todas caen por arriba de los límites reportados en la tabla 3.9. Así, por ejemplo, considerando la cantidad promedio encontrada para el benzo[a]antraceno en el ensayo de 8 h, que fue la cantidad menor de todas (1.94 ng), se calcula que corresponde a 0.39 ng/mg de muestra, valor mayor al L. C. encontrado en la validación del método de extracción por DMFS-CLAR (0.12 ng/mg). Lo mismo ocurre para el resto de resultados con cantidades recuperadas con valores mayores.

Los cromatogramas obtenidos al inyectar los extractos, presentaron buena resolución de los picos y buena respuesta, como se observa en la figura 3.14.

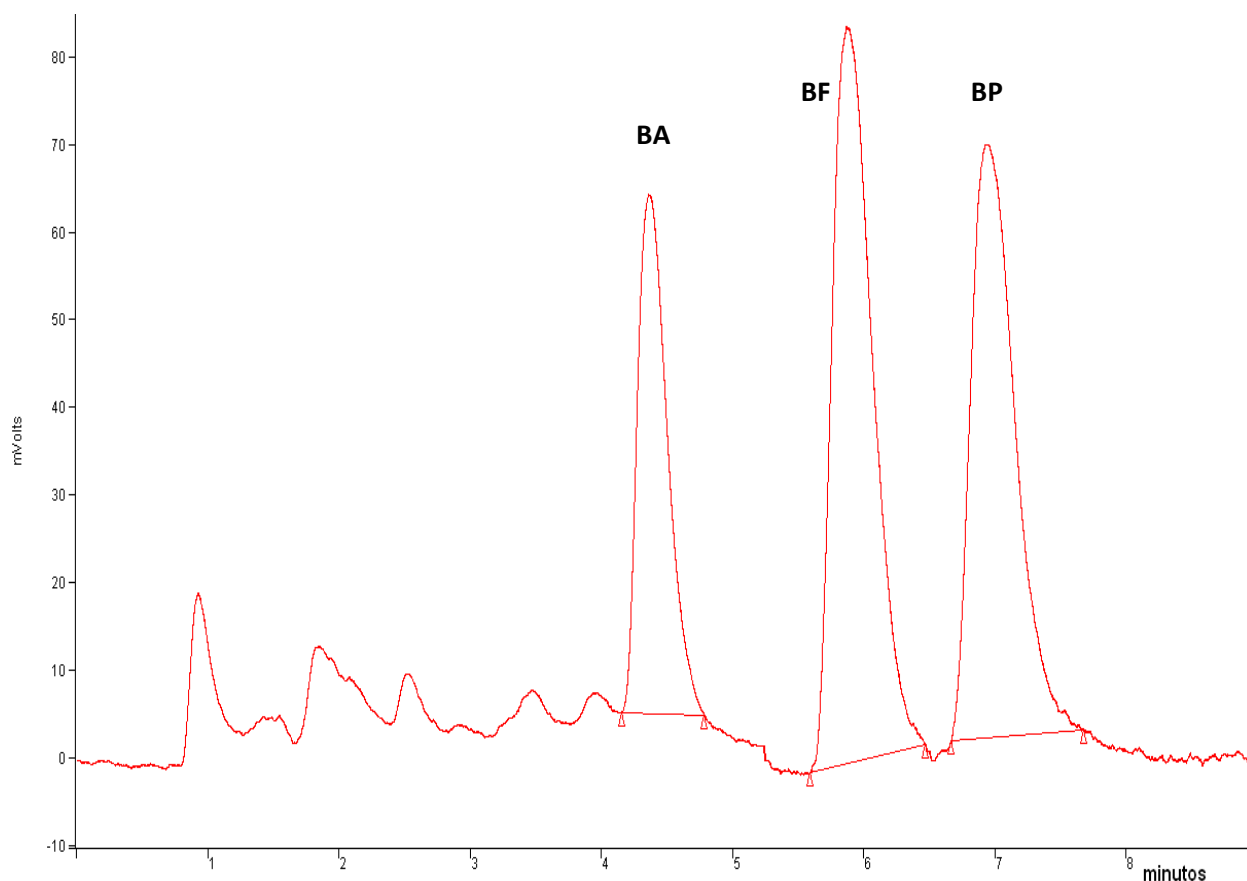


Figura 3.14 Cromatograma obtenido al inyectar un extracto de una muestra de protozoarios expuestos a una concentración de cada HAP de 1 ng/mL durante un intervalo de tiempo de 5 h BA = Benzo[a]antraceno; BF = Benzo[b]fluoranteno; BP = Benzo[a]pireno. Concentración de los compuestos en el extracto BA = 3.6 ng/mL; BF = 6.8 ng/mL y BP = 5.7 ng/mL

Continuando con la interpretación de los datos de la tabla 3.15, se observa para cada compuesto, que la mayor cantidad adsorbida de HAP's en las células de protozoarios se encontró al exponer los cultivos durante un periodo de 5 horas.

Se hizo un análisis ANOVA de 1 vía, para demostrar la diferencia significativa entre los recobros en protozoarios para los diferentes tiempos de exposición y se encontró diferencia significativa entre los porcentajes recuperados a las 5 h, con respecto a los otros dos tiempos estudiados. Estos resultados se representan en la figura 3.10 y fueron obtenidos con ayuda del software GRAPHPAD PRIM 4 DEMO.

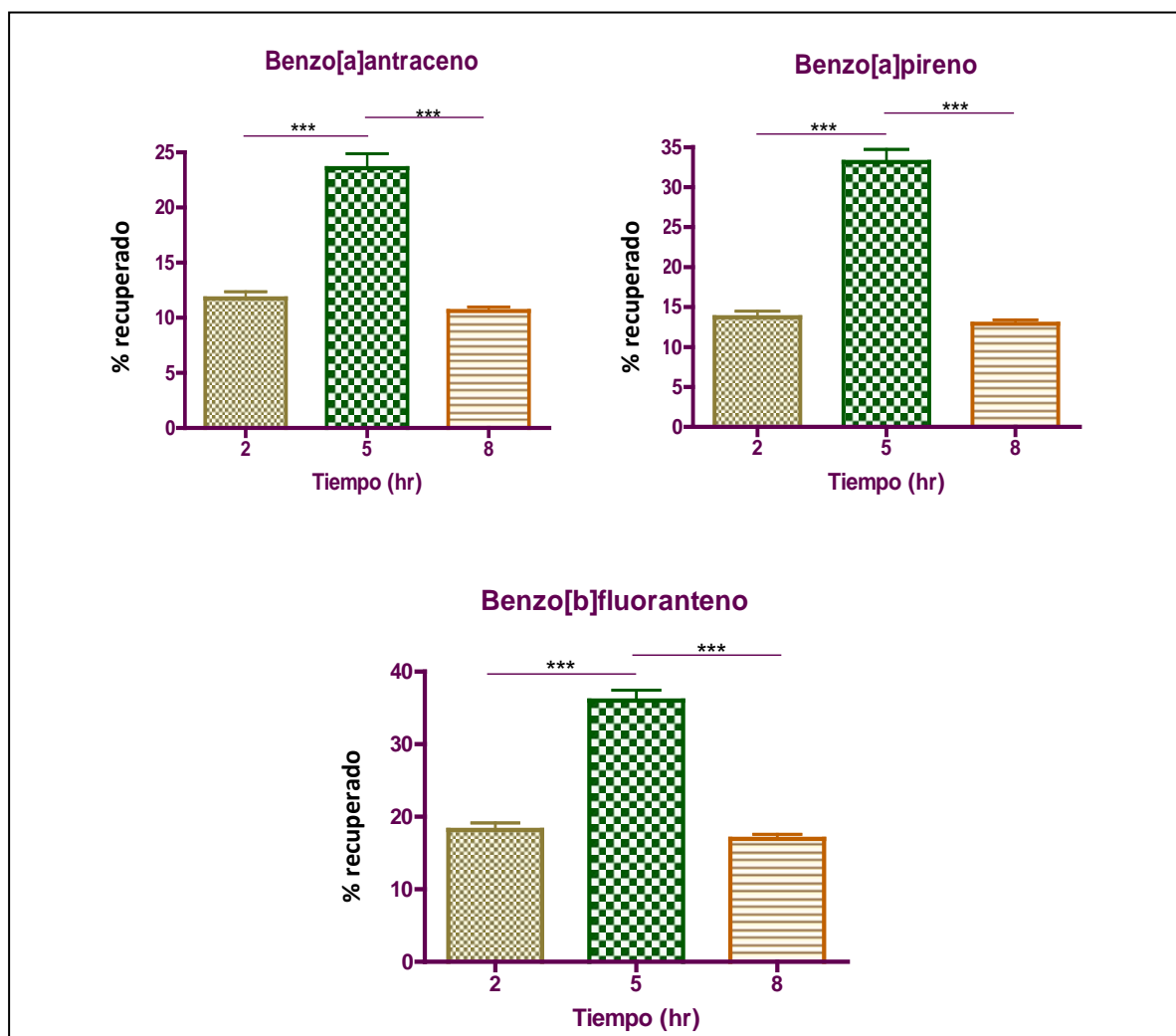


Figura 3.15 Análisis estadístico entre las cantidades de los HAP's recuperadas en las muestras de protozoarios en cada ensayo de exposición. ***Existe diferencia significativa entre los grupos comparados con una $p < 0.05$

El compuesto que presentó mayor cantidad adsorbida a las células de protozoarios fue el benzo[b]fluoranteno, esto concuerda con la solubilidad relativa de los tres compuestos. El benzo[a]antraceno es el compuesto más soluble (0.04 mg/L y $Kow=5.75$), por tanto, de los tres HAP's, es el que tiende a permanecer en mayor proporción en el medio acuoso. El benzo[a]pireno es el que le sigue en solubilidad (0.0038 mg/L y $\text{Log } Kow=6.04$) y por último está el benzo[b]fluoranteno (0.0012 mg/L y $\text{Log } Kow=6.09$) que es el compuesto que tiene una menor polaridad. Estos dos compuestos tiene valores muy cercanos de solubilidad y $\text{Log } Kow$, por lo cual, sus recobros son similares. Sin embargo, se realizó una prueba *t de Student* con un valor de $\alpha=0.05$, para observar diferencias significativas en los recobros de estos dos compuestos en cada uno de los intervalos de tiempo estudiados. Los recobros en los ensayos

de 2 y 8 h mostraron una diferencia significativa entre los recobros para benzo[*a*]pireno y benzo[*b*]fluoranteno, siendo este último el que tiene un mayor recobro. Sin embargo, en el ensayo a 5 h muestra que los recobros promedio son iguales. Los resultados de este análisis estadístico se muestran en el Anexo III.

En lo que respecta a la interpretación biológica se pueden hacer algunas deducciones. De esta forma, la disminución de la cantidad de HAP's presente en las células entre las 5 y 8 h, puede deberse a la disminución en el número de protozoarios. Aunque en efecto, se peso una cantidad constante de biomasa (5 mg) es posible que esta no estuviera conformada completamente por *C. cucullus*, dado que al disminuir su población, también se observó microscópicamente que empezaban a predominar otro tipo de microorganismos, después de las 8 h.

Entonces, el hecho de haber muestreado la misma cantidad de biomasa en el tiempo de 8 h, y que ésta corresponda a *C. cucullus* (disminuyendo en número de individuos) y a otros microorganismos (tendiendo a predominar en número), podría ser indicio de que solamente *C. cucullus*, es el microorganismo que adsorbe a los contaminantes. Esta hipótesis puede ser un poco intrépida considerando solo estos resultados pero, evidentemente, debe ser corroborada por los especialistas en microbiología cuando realicen bioensayos más estrictos en donde se mantenga controlada la población de *C. cucullus*, por más tiempo en los cultivos. Esta hipótesis sobre la adsorción selectiva de *C. cucullus*, también puede apoyarse en que durante el intervalo de tiempo de 2 a 5 h, en donde la población del protozario sí se mantiene constante y predominante, se observa un aumento en la adsorción dependiente del tiempo.

Sin embargo, volviendo a la interpretación en química analítica, la cual es el verdadero objetivo del presente trabajo, se puede observar que la variación en los resultados demostró una buena precisión, con C. V: entre 6.25 y 9.62 %. Considerando que de acuerdo con el nivel en el que las muestras se encuentran fortificadas, menor de 10 ppb, se llegan a aceptar C.V. (o RSD) cercanos a 21 % (Taverniers & cols., 2004).

En la tabla 3.16, se presentan los resultados obtenidos al analizar los medios de cultivo líquidos libres de protozoarios por la metodología de EFS desarrollada. En esta tabla se observa que las cantidades mínimas recuperadas (a partir de 11.08 ng para el benzo[*a*]antraceno) corresponden a una concentración, en los 60 mL de muestra, de 0.18 ng/mL, el cual es un valor

cercano, pero por arriba del L.C. para el mismo compuesto, obtenido en la validación de la extracción por EFS en medios de cultivo fortificados (0.14 ng/mL, ver tabla 3.13). Para el resto de los resultados presentados en la tabla, se obtiene casos similares, lo cual, muestra que las condiciones de extracción establecidas nos permiten obtener con buena precisión estos resultados.

Tabla 3.16 Cantidades de HAP's recuperadas en las muestras de cultivo líquido libre de protozoarios sometidos a diferentes tiempos de exposición.

Compuesto	Tiempo de exposición (horas)	Cantidad recuperada (ng)			Cantidad Promedio (ng)	Desv. Est.	C. V. %	% Promedio recuperado
		1	2	3				
BA	2	19.96	22.96	21.63	21.52	1.51	6.99	87.79
	5	11.08	11.14	12.53	11.58	0.82	7.11	71.25
	8	16.33	16.59	14.58	15.84	1.09	6.89	86.71
BF	2	16.40	18.77	17.25	17.47	1.20	6.86	81.49
	5	10.71	10.78	12.23	11.24	0.85	7.60	56.55
	8	17.42	16.48	18.03	17.31	0.78	4.52	81.73
BP	2	16.93	17.54	17.59	17.36	0.37	2.13	80.19
	5	10.62	12.24	11.20	11.35	0.82	7.23	58.89
	8	16.37	15.27	14.65	15.43	0.87	5.66	82.00

BA = Benzo[a]antraceno; BF =Benzo[b]fluoranteno; BP = Benzo[a]pireno

Es importante remarcar en esta tabla 3.16 que, a diferencia de la tabla anterior 3.17, con los resultados con protozoarios, se observa que la menor cantidad de HAP's presente en estos ensayos, se encuentra al tiempo de exposición de 5 horas.

Esto se puede explicar considerando que a las 5 horas de exposición, existe una mayor adsorción en las células de protozoarios, lo cual por consecuencia disminuye la cantidad de HAP's en el medio de cultivo. Por otra parte, puede suponerse que ocurre lo contrario al observar los resultados a las 8 horas de exposición. A este intervalo de tiempo, la cantidad de HAP's aumenta, lo cual se puede relacionar con una disminución en el número de protozoarios presentes en el medio de cultivo. Podría suceder que al morir, las células se rompan y liberen de nueva cuenta al medio acuoso la cantidad de HAP's que habían adsorbido, provocando, a este intervalo de 8 horas de exposición, el aumento en la cantidad de HAP's recuperados en el cultivo líquido y como se discutió en páginas anteriores, una disminución en las cantidades de HAP's recuperadas en los protozoarios. Sin embargo, como se apuntó anteriormente, estas hipótesis biológicas esperan ser corroboradas por los especialistas.

En las figuras 3.18 a 3.20 presentadas más adelante en este trabajo, se visualiza mejor la variación de los HAP's disponibles en el medio de cultivo líquido a los diferentes tiempos de exposición estudiados en comparación de los HAP's adsorbidos en los protozoarios.

En lo que respecta a la precisión de estos resultados presentados en la tabla 3.16, se aprecia una variación aceptable en los resultados obtenidos, con C.V. entre 2.13-7.6 %.

Los cromatogramas obtenidos al inyectar estos extractos, presentaron buena resolución de los picos y buena respuesta, como se observa en la figura 3.16.

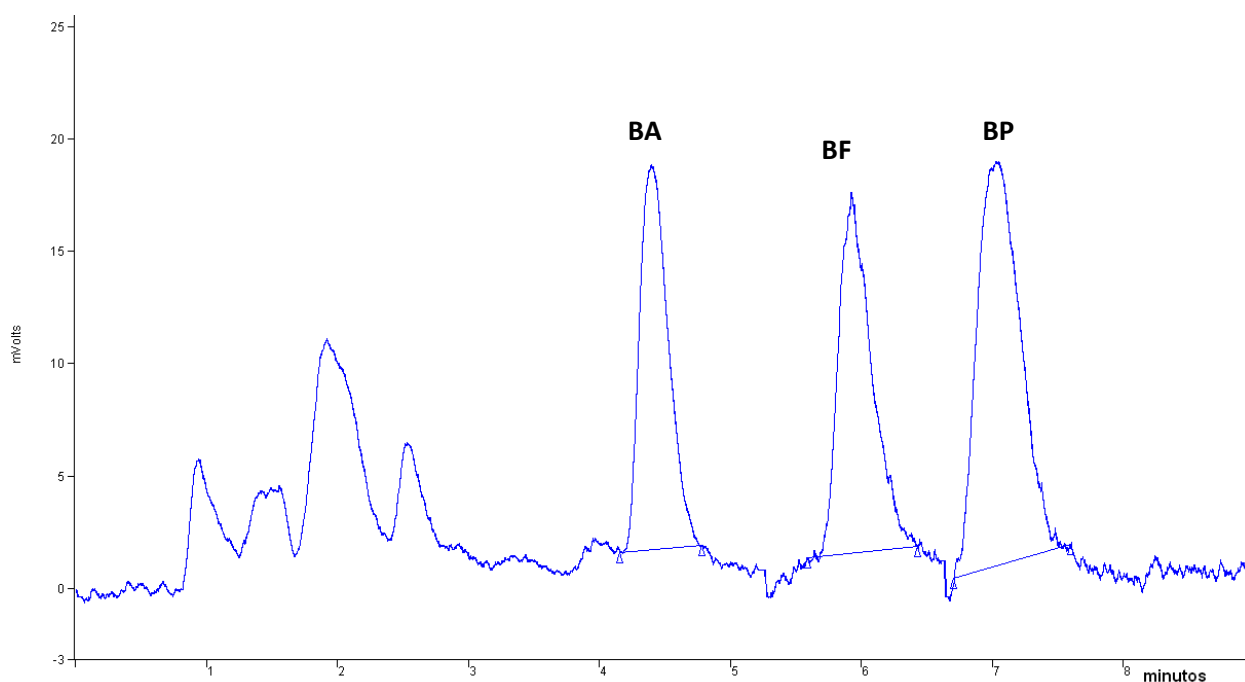


Figura 3.16 Cromatograma obtenido al inyectar un extracto de una muestra de cultivo líquido libre de protozoarios, expuestos a una concentración de cada HAP de 1 ng/mL durante un tiempo de 5 h BA = Benzo[a]antraceno; BF =Benzo[b]fluoranteno; BP = Benzo[a]pireno. Concentración de los compuestos en el extracto, BA = 0.68 ng/mL; BF = 0.73 ng/mL y BP =0.65 ng/mL

Por otro lado, para efectuar la cuantificación de la cantidad de HAP's que se adsorbió en la materia orgánica presente en el medio de cultivo, se decidió realizar extracciones por DMFS a las muestras de materia orgánica aisladas por medio de la centrifugación selectiva del método de preparación descrito en la sección 3.2. La extracción se realizó utilizando las mismas condiciones para el análisis de HAP's en protozoarios. Sin embargo, como se aprecia en la figura 3.17, la limpieza no es suficiente por lo que aparecen interferencias cercanas al tiempo de retención del benzo[a]antraceno.

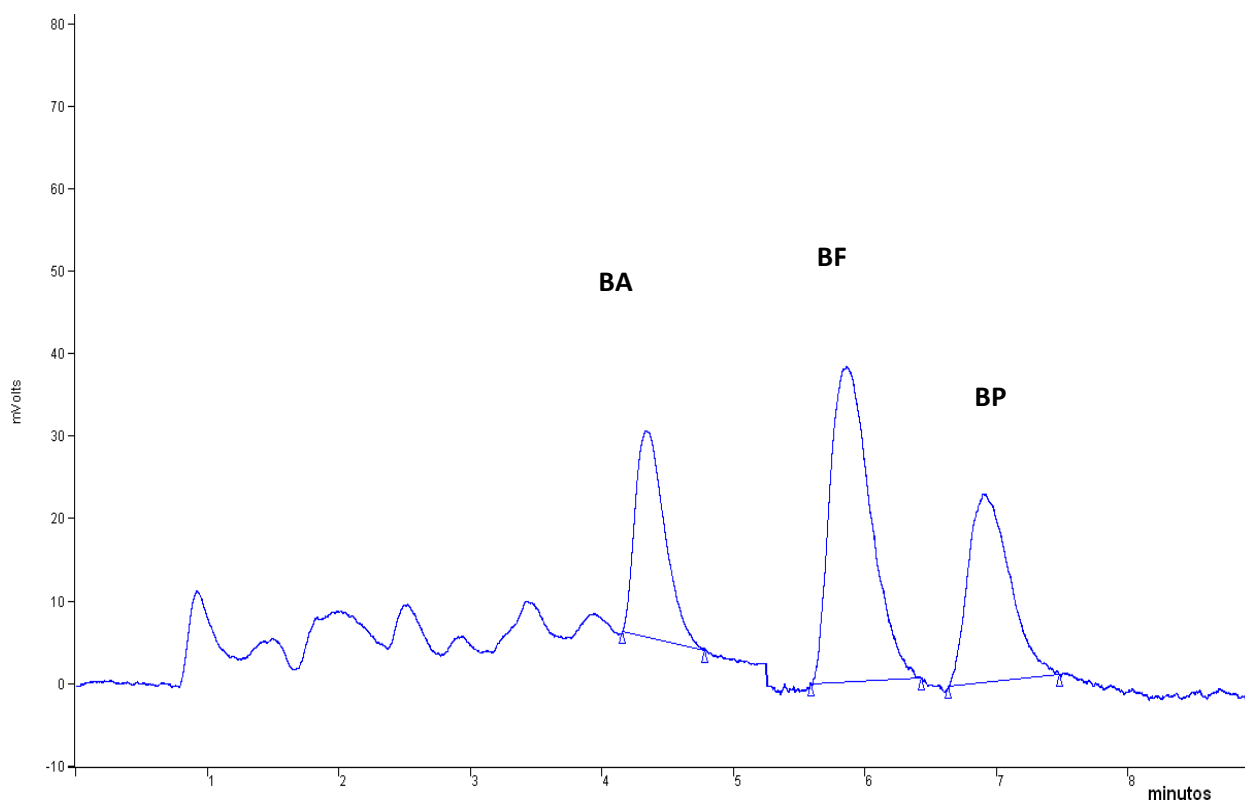


Figura 3.17 Cromatograma obtenido al inyectar un extracto de una muestra de materia orgánica insoluble, de un cultivo expuesto a una concentración de cada HAP de 1 ng/mL durante un tiempo de 5 h BA = Benzo[*a*]antraceno; BF = Benzo[*b*]fluoranteno; BP = Benzo[*a*]pireno. Concentración de los compuestos en el extracto, BA = 1.1 ng/mL; BF = 1.7 ng/mL y BP = 1.4 ng/mL

A pesar de esto, el método de DMFS-CLAR es tan robusto que permitió cuantificar la cantidad de HAP's presente en la materia orgánica separada del cultivo. Los resultados se muestran en la tabla 3.17 en donde se observan coeficientes de variación aceptables para los tiempos de 2 y 5 Hrs muestran que existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos para estos análisis a las 8 h. Esta gran variación puede deberse a que las cantidades recuperadas son muy pequeñas en comparación a las otras fracciones analizadas, lo cual acarrea mayor error. Además, la cantidad de materia orgánica puede variar de un cultivo a otro. Así, debido a lo difícil que es pesar o estimar la cantidad de materia orgánica aislada, los resultados solo se expresan en cantidades de HAP's recuperadas.

Entonces, haciendo la consideración de que la alta variabilidad encontrada en esta última fracción analizada, podría acarrear error en la estimación global de los ensayos de 8 h Se sumaron las cantidades recuperadas en las tres fracciones (protozoarios, medio de cultivo y materia orgánica) a cada tiempo de exposición, para compararlas con la cantidad recuperada

en los medios de cultivo testigo sin microorganismos y hacer un balance de materia. De esta manera, se calculó el porcentaje de cada fracción para los tres HAP's y la suma que representa el rendimiento global del ensayo de exposición realizado.

Tabla 3.17 Cantidades de HAP's recuperadas en las muestras de materia orgánica a los diferentes tiempos de exposición.

Compuesto	Tiempo de exposición (horas)	Cantidad recuperada (ng)			Cantidad Promedio (ng)	Desv. Est.	C. V. %	% Promedio recuperado
		1	2	3				
BA	2	0.75	0.73	0.64	0.71	0.06	8.23	2.88
	5	1.00	1.17	1.13	1.10	0.09	8.21	6.75
	8	0.40	0.88	0.45	0.58	0.26	45.52	3.16
BF	2	1.26	1.11	1.13	1.16	0.08	7.15	5.43
	5	1.71	1.65	1.36	1.57	0.19	11.96	7.91
	8	0.98	0.42	1.00	0.80	0.33	40.86	3.78
BP	2	0.66	0.75	0.72	0.71	0.05	6.40	3.29
	5	1.24	1.50	1.42	1.39	0.13	9.53	7.19
	8	0.55	0.25	0.51	0.43	0.16	37.92	2.31

BA = Benzo[a]antraceno; BF =Benzo[b]fluoranteno; BP = Benzo[a]pireno

Los resultados globales se presentan a continuación en las figuras 3.18 a 3.20.

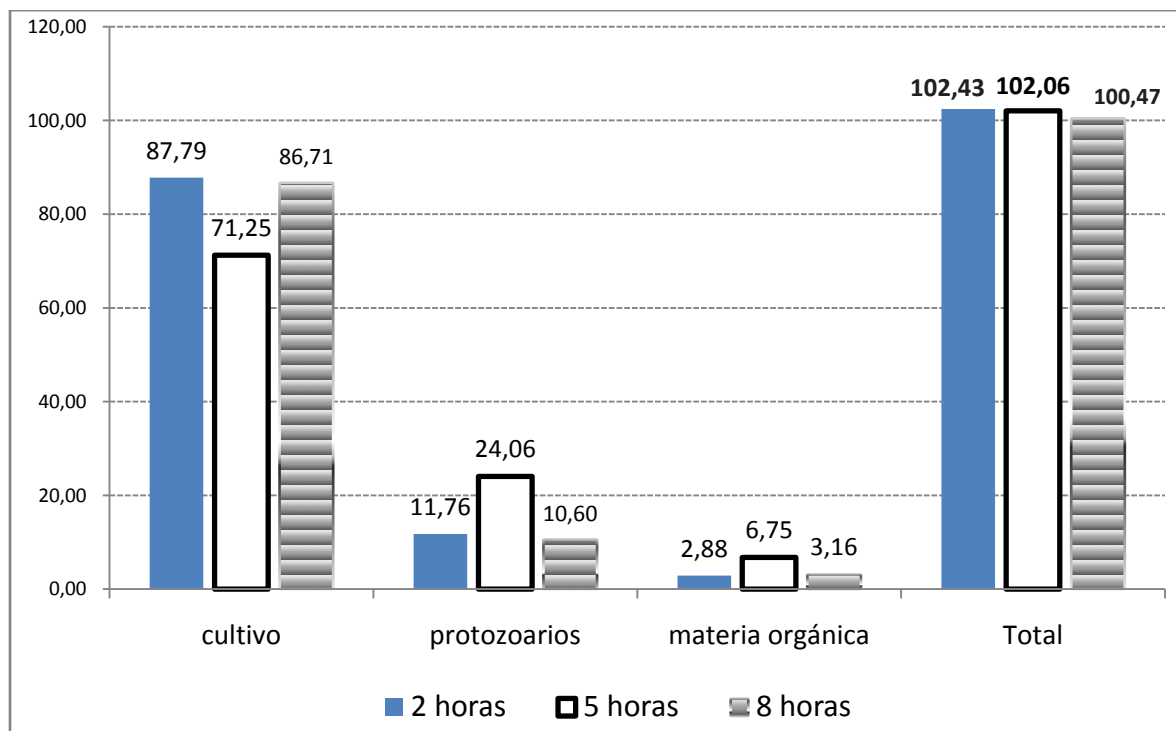


Figura 3.18 Recobros para el benzo[a]antraceno en cada una de las fracciones analizadas en los ensayos de exposición a los HAP's.

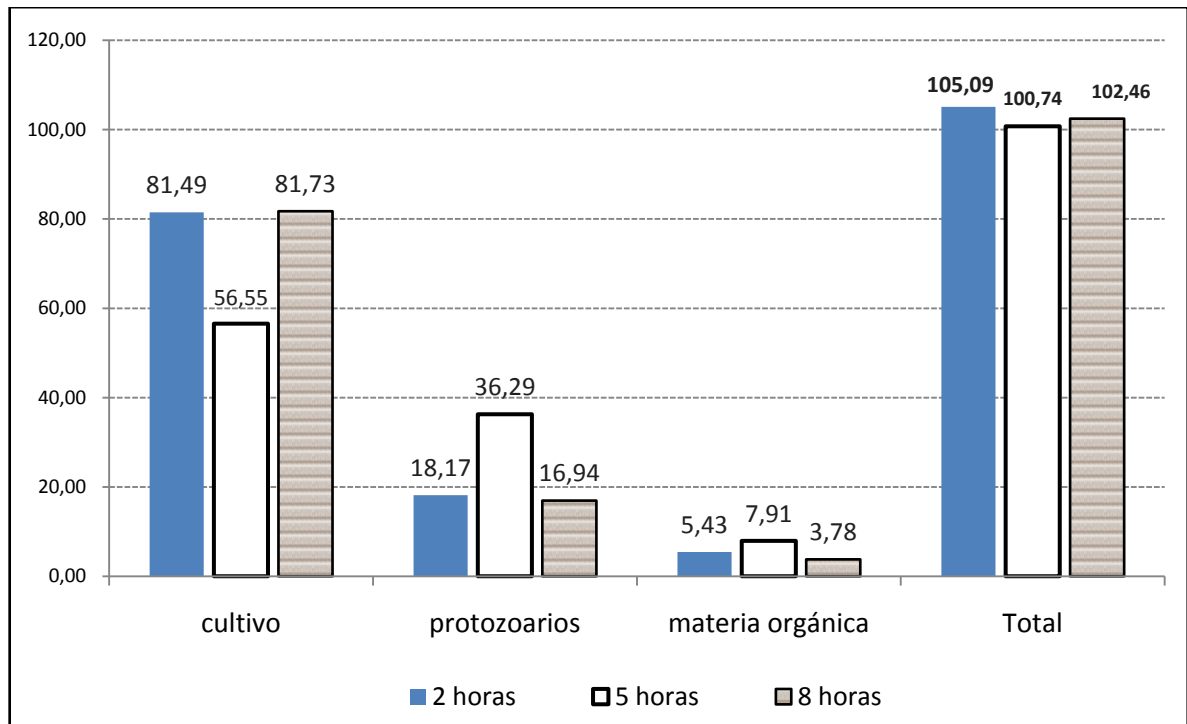


Figura 3.19 Recobros para el benzo[b]fluoranteno en cada una de las fracciones analizadas en los ensayos de exposición a los HAP's.

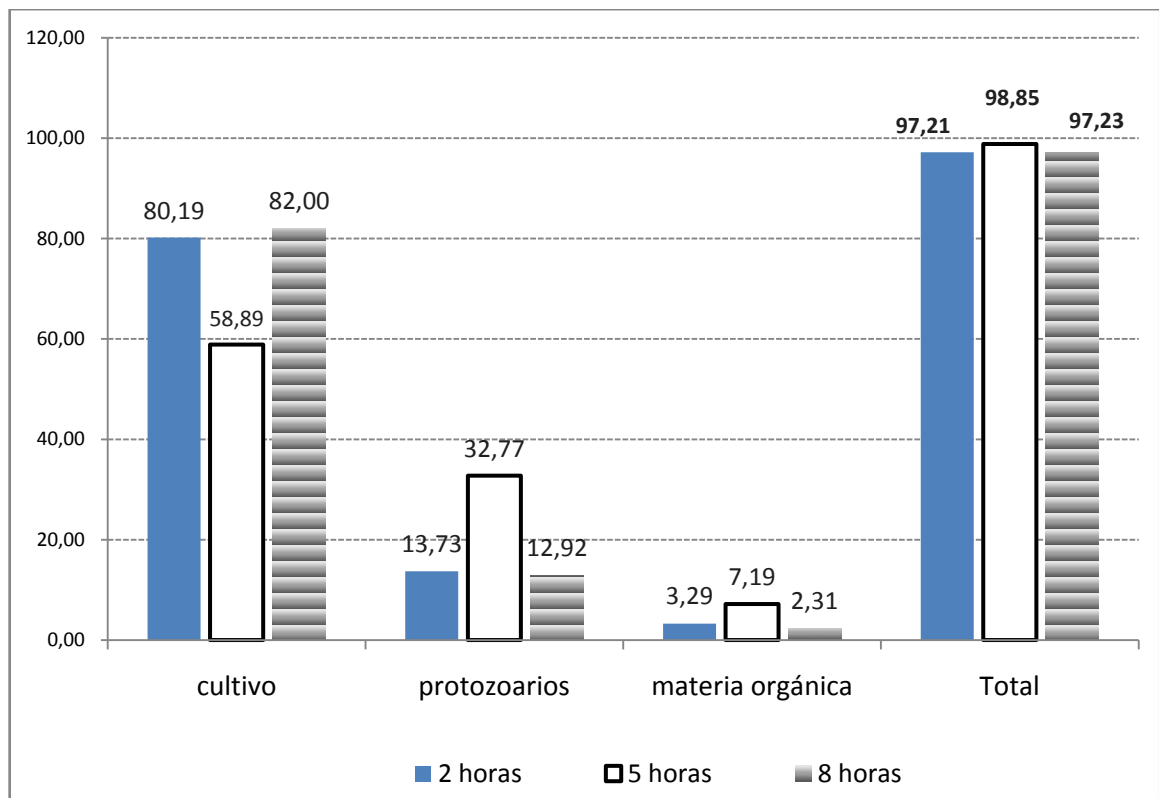


Figura 3.20 Recobros para el benzo[a]pireno en cada una de las fracciones analizadas en los ensayos de exposición a los HAP's.

En las figuras anteriores se observa de una forma más clara, que la mayor bioacumulación de HAP's en los protozoarios ocurrió a las 5 Hrs de exposición a los contaminantes. También se puede apreciar que los métodos analíticos utilizados resultan adecuados para el análisis de HAP's en protozoarios, medio de cultivo y materia orgánica, puesto que permiten cuantificar con buena exactitud las cantidades presentes en ellos obteniendo recobros globales o totales cercanos al 100% del valor esperado. Los límites de cuantificación bajos obtenidos con el método de DMFS permitieron medir cantidades muy bajas de los compuestos con buena exactitud y precisión obteniendo C.V. menores al 10 %, a excepción de las muestras de materia orgánica con cantidades muy bajas de HAP's. Los valores de concentración obtenidos en cada uno de los extractos inyectados al sistema cromatográfico caen dentro de los intervalos de linealidad estudiados para los dos métodos, EFS y DMFS.

CONCLUSIONES

En base a la técnica de DMFS, se desarrolló un método lineal, preciso y exacto para realizar la extracción de los compuestos benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno y benzo[*a*]pireno en protozoarios del tipo *Colpoda cucullus*. Para los mismos compuestos se optimizó y validó un sistema de extracción basado en la técnica de EFS para los mismos compuestos en cultivos líquidos.

Para los tres compuestos en estudio, se obtuvieron límites de detección y cuantificación muy bajos con el método de DMFS-CLAR y también con el método de EFS-CLAR optimizado y validado para la extracción y determinación de HAP's en los cultivos líquidos. Estos métodos permitieron discriminar las cantidades presentes de los compuestos de interés en las 3 diferentes matrices analizadas que conforman el cultivo: protozoarios, medio líquido y materia orgánica. Los balances de materia corroboraron que se recuperaron en estas tres matrices la cantidad de HAP's total esperada en un bioensayo simple.

La mayor cantidad de HAP's adsorbidos por los protozoarios se obtuvo a un intervalo de tiempo de exposición de 5 h, con porcentajes de acumulación entre 24 y 36 %.

Las metodologías analíticas aquí obtenidas, servirán como herramienta muy útil en bioensayos para estudiar la capacidad que tiene el microorganismo *Colpoda cucullus* como bioindicador de la contaminación por HAP's.

RECOMENDACIONES

Existen aspectos en los que se debe mejorar la metodología, por ejemplo:

- Optimizar la obtención de una mayor cantidad de muestra de protozoarios o miniaturizar los métodos.
- Aumentar la preconcentración de los cultivos líquidos en los cartuchos de EFS, ya que esto permitiría trabajar a concentraciones de HAP's en los medios de cultivo más bajas.

A nivel biológico:

- Aumentar el tiempo de mantenimiento de los microorganismos en el cultivo con el fin de realizar ensayos de exposición más largos y apreciar mejor la relación entre el tiempo de exposición y la cantidad bioacumulada de los compuestos.

REFERENCIAS

- Aksu, Z.** 2005. *Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review*. Process Biochemistry 40, 997–1026.
- Altug, G. y Güler, N.** 2002. *Determination of the Levels of Indicator Bacteria, *Salmonella spp.* and Heavy Metals in Sea Snails (*Rapana venosa*) from the Northern Marmara Sea, Turkey*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2, 141-144.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** 1993. *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), (update; draft for public comment)*. GA, USA. 273 pp.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** 1995. *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (update)*. GA, USA. 458 pp.
- Bamforth, S.** 2001. *Proportions of active ciliate taxa in soils*. Biology and fertility of soils, 33 (3), 197-203.
- Barker, S.** 2000, *Matrix solid-phase dispersion. Review*. Journal of Chromatography A 885, 115–127.
- Barker, S.** 2007, *Matrix solid phase dispersion (MSPD). Review*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 70, 151–162.
- Bending, G., Rodríguez-Cruz, S., Lincoln, S.** 2007. *Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories*. Chemosphere 69, 82–88.
- Botello, A., Villanueva, S., Díaz, G. and Escobar-Briones, E.** 1998. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Salina Cruz harbor and coastal areas, Oaxaca, Mexico*. Marine Pollution Bulletin. 36 (7), 554-558. Pergamon, UK.
- Botello A.V., García-Ruelas, C. and Ponce-Vélez, G.** 2002. *PAH levels in bivalve mollusk from the Mexican Subtropical Pacific*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 69, 486-493.
- Brum, D., Casella, R., Pereira Netto, A.** 2008. *Multivariate optimization of a liquid–liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection*. Talanta 74, 1392–1399.
- Busetti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., Traverso, P.** 2006. *Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant*. Journal of Chromatography A 1102, 104–115.
- Calderón-Segura, E., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R. Butterworth, F. M., Amador-Muñoz, O.** 2004. *The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in México City*. Mutation Research 558, 7-17.
- Cameán, A., Moreno, I., Ruíz, M. Picó, Y.** 2004. *Determination of microcystins in natural blooms and cyanobacterial strain cultures by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry*. Annals Bioanalytical Chemistry 380, 537–544.

- Campbell, C., Warren, A., Cameron, C., Hope, S.** 1997. *Direct toxicity assessment of two soils amended with sewage sludge contaminated with heavy metals using a protozoan (Colpoda steinii) bioassay*. Chemosphere, Vol. 34, No. 3, 501-514.
- Carrilho, E., Nóbrega, J., Gilbert, T.** 2003. *The use of silica-immobilized brown alga (*Pilayella littoralis*) for metal preconcentration and determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry*. Talanta 60, 1131-1140.
- Castro-Ortíz, P., Luna-Pabello, V., Villalobos-Pietrini, R.** 2007. *Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 23 (1) 35-45.
- CENICA, Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental.** 2001. *Informe de la situación y los conocimientos actuales sobre las principales fuentes y emisiones de dioxinas en México*. Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental, UAM-Iztapalapa, México, D.F. Documento presentado en Resources Futures International, Canadá. Editores: García, A., Rosas, A. Velasco, E., Gómez, J. y Ramos, G.
- Chen, S. y Aitken, M.** 1999. *Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15*, Environmental Science & Technology, 33, 435–439.
- Connell, D. W.** 2005. *Basic concepts of Environmental Chemistry*. CRC Taylor & Francis Group, USA, pags. 191-203.
- Corliss, J., Esser, S.** 1974. *Comments on the role of the cyst in the life cycle and survival of free-living protozoa*. Transactions of the American Microscopical Society 93, 578–593.
- Cram, S., Siebe, C., Ortíz, R. and Herre, A.** 2004. *Mobility and persistence of petroleum hydrocarbons in peat soils of Southeastern Mexico*. Soil and Sediment Contamination. 13 (5). CRC-Lewis, Florida, USA.
- Crouch, M., Barker, S.** 1997. *Analysis of toxic wastes in tissues from aquatic species: Applications of matrix solid-phase dispersion*. Journal of Chromatography A 774, Issues 1-2, 11, Pages 287-309
- Cunningham, C., Ivshina, I, Lozinsky, V., Kuyukina, M., Philp, J.** 2004. *Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol*. International Biodeterioration & Biodegradation 54, 167 – 174
- Díaz, J.** 2000. *Consumo de leña en el sector residencial de México*. Tesis de Maestría en Ingeniería, UNAM. 113 pp.
- Díaz, S., Martín-González, A., Gutiérrez, J.** 2006. *Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa*. Environment International 32: 711–717.
- Díaz-González G., Botello, A. and Ponce-Velez, G.** 1994. *Contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) disueltos en la laguna Mecoacán, Tabasco, México*. Hidrobiológico. 4: 21-27. UAM-Iztapalapa, México, D.F.

REFERENCIAS

- Delgado, J., Hernández, M., Jazcilevich, A., Cram, S., Siebe, C., Ruiz N. y Angeles, G.** 2004. *The environment. In: Randall, L. (Ed) Changing structure of Mexico: political, Social, and economic prospects.* Clark & Sharpe Inc. Armonk, NY, USA.
- Ekelund, F., Ronn, R., Christensen, S.** 1994. *The effect of three different pesticides on soil protozoan activity.* Pesticide Science 42, 71–78.
- EPA, Environmental Protection Agency.** 1996. *Integrated Risk Information system (IRIS) electronic database. Public domain information available from the government.* EPA Criteria and Assessment Office, OH, USA.
- EPA, Environmental Protection Agency,** 2008. *Groundwater & Drinking Water. Consumer Factsheet on: Benzo(a)pyrene.* USA.
- Disponible en: <http://www.epa.gov/OGWDW/dwh/c-soc/benzopyr.html>
- Fernandez-Leborans, G., Novillo, A.** 1995. *The Effects of Cadmium on the Successional Stages of a Freshwater Protozoa Community.* Ecotoxicology and Environmental Safety, volume 31, issue 1, pages 29-36.
- Foissner, W.** 1987. *Soil protozoa: Fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicadors, and guide to literature.* Progress in Protozoology 2, 69-212.
- Foissner, W.** 1993. *Colpodea (ciliophora).* Ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- Foissner, W.** 1997. *Protozoa as bioindicadors in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides, and biodiversity.* Agriculture, Ecosystems & Environment 62, 93–103.
- García, A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., Alcántara, A., Chárvel, A., Mota, R., Garzón, A.** 2002. *Métodos Analíticos, Guía de Validación.* Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.
- Gentry, T., Wolf, D.** 2003. *Pyrene and Phenanthrene Influence on Soil Microbial Populations.* Bioremediation Journal 7, issue 1, 53–68.
- Gold-Bouchot G., Zavala-Coral, M., Zapata Pérez, O. and Ceja Moreno, V.** 1997. *Hydrocarbon concentration in oysters (*Crassostrea virginica*) and recent sediments from three coastal lagoons in Tabasco, México.* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 59: 430-437.
- González-Barreiro, O. Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A.** 2006. *Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms.* Environmental Pollution 144: 266-271
- Grzegorz Nacz-Jawecki, Józef Sawicki.** 2002. [The toxicity of tri-substituted benzenes to the protozoan ciliate Spirostomum ambiguum.](#) Chemosphere, volume 46, issue 2, pages. 333-337
- Gündel, J., Angerer, J.** 2000. *High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenz[a]anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers.* Journal of Chromatography B, 738, 47–55

REFERENCIAS

- Gutierrez, J., Martin-Gonzales, A., Diaz, S., Ortega, R.** 2003. *Ciliates as potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution*. European Journal of Protistology 39, 461–467.
- Gutiérrez M. C. y Zavala, J.** 2002. *Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos*. Terra 20, 101-111. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Chapingo, Edo. de México, México.
- Hammel, K. Kalyanaraman, B. Kent, T.** 1986. *Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo (p)- dioxins by Phanerochaete chrysosporium Ligninase*. Journal of Biological Chemistry, vol. 261, issue 36, 16948-16952.
- Hammel, K.** 1995. *Mechanisms for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Ligninolytic Fungi*. Environmental Health Perspectives, vol. 103.
- Hennion, M.** 1998. *Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples. Tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters*. Journal of Chromatography A, 823, 147–161
- Hennion, M.** 1999. *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. Review*. Journal of Chromatography A, 856, 3–54.
- Hennion, M.** 2000. *Graphitized carbons for solid-phase extraction. Review*. Journal of Chromatography A, 885, 73–95.
- Holt, J.** 2008. *Introduction to the ciliate*. Systematic Biology. The Science of Biodiversity. Disponible en: <http://comenius.susqu.edu/bi/202/CHROMALVEOLATA/ALVEOLATAE/ciliata.htm>
- Hussain, M., Amanchi, N., Solanki, V., Bhagavathi, M.** 2008. *Low cost microbioassay test for assessing cytopathological and physiological responses of ciliate model Paramecium caudatum to carbofuran pesticide*. Pesticide Biochemistry and Physiology 9, 66–70
- Hwang H. M., Wade, T.L., Sericano, J.** 2003. *Concentrations and source characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in Pine Needles from Korea, México and United States*. Atmospheric Environment. 37, 2259-2267.
- IPCS, International Programme on Chemical Safety and the European Commission.** 2005. *BENZO(a)PYRENE, ICSC: 0104*. Disponible en: <http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/ icsc01/icsc0104.htm>
- Cram, S., Ortíz, R., Páez R.** 2005. *Listado adicional al Convenio de Estocolmo: Sustancias de uso industrial. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos*. Instituto Nacional de Ecología, INE, México. Disponible en: <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/447/cap5.html>

- Iturbe, R., Flores, R.M. and Torres, L.G.** 2003. *Soil and water contamination levels in an out-of-service oil distribution and storage station in Michoacan, Mexico.* Water, Air and Soil Pollution. 146, 261-281.
- Jeanneau, L.** 2007. *Influence of natural organic matter on the solid-phase extraction of organic micropollutants Application to the water-extract from highly contaminated river sediment.* Journal of Chromatography A, 1173, 1–9
- Jian, J.** 2006. *Development of a new biotic index to assess freshwater pollution.* Environmental Pollution, volume 139, issue 2. Pages 306-317
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H.** 2005. *Principles of microbial PAH-degradation in soil.* Environmental Pollution, 133, 71–84.
- Kalf, D.F., Crommentuijn, T.,** 1997. *Environment quality objectives for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons.* Ecotoxicology and Environmental Safety, 36, 89–97.
- Kiss, G., Varga-Puchony, Z., Hlavay, J.** 1996. *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, volume 725, issue 2, 23, 261-272
- Kostecki, P.T., Calabrese, E., and Simmons, K.** 2001. *Survey of States 2000 Soils Cleanup Standards for petroleum contamination.* Soil and Sediment Contamination 10, 117-196. CRC-Lewis, Florida, USA.
- Kristenson, M. Haverkate, E., Slooten, C., Ramos, L., Vreuls, R., Brinkman, U.** 2001. *Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic–mass spectrometric analysis.* Journal of Chromatography A, 917, issues 1-2, 11. 277-286.
- Kristenson, M. Ramos, L., Brinkman, U.** 2006. *Recent advances in matrix solid-phase dispersion.* Trends in Analytical Chemistry, vol. 25, No. 2. 96-111.
- Li, X. Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., Gong, Z.** 2008. *Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases.* Journal of Hazardous Materials 150, 21–26
- Liska, I.** 2000. *Fifty years of solid-phase extraction in water analysis–historical development and overview.* Journal of Chromatography A, 885, 3–16.
- Lock, F.** 2008. *Invasive Species Introduction.* Animal and Plant Science. The University of Sheffield. U.K.
Disponibile en:
<http://www.shef.ac.uk/aps/mbiolsci/fiona/colpoda.jpg>
- Luttrell, W., and Thomas, C.** 2007. *Toxic tips: Benzo(a)pyrene.* Journal of Chemical Health and Safety, 14 (6) 21-22

REFERENCIAS

- Madoni, P., Romeo, M.** 2006. *Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists.* Environmental Pollution 141, 1-7.
- Maeda, H., Akematsu, T., Fukui, R., Matsuoka, T.** 2005. *Studies on the resting cyst of ciliated protozoan Colpoda cucullus: resistance to temperature and additional inducing factors for en-or excystment.* Journal of Protozoology Research, 15, 7-13.
- Mano, D., Buff, K., Clausen, E., Langenbach, T.** 1996. *Bioaccumulation and enhanced persistence of the acaricide dicofol by Azospirillum lipoferum.* Chemosphere, 33 (8) 1609-1619.
- Marcel, R., Borrul, F.** 2000. *Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. Review.* Journal of Chromatography A, 885, 273–290
- Marr L., Grogan, L., Wohrnschimmel, H., Molina, L. and Molina, M.** 2004. *Vehicle traffic as a source of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in the Mexico City metropolitan area.* Environmental Science and Technology. 38, 2584 – 2592.
- Martín-González, A. Díaz, S., Borniquel, S., Gallego, A., Gutiérrez, J.** 2006. *Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants.* Research in Microbiology, volume 157, issue 2. Pages 108-118
- McElroy, A.E., Farrington, J.W., Teal, J.M.** 1989. *Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Varanasi, U. (Ed.), Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment, CRC Press Inc., FL, USA.*
- Mendil, D., Tuzen, M., Usta, C., Soylak, M.** 2008. *Bacillus thuringiensis var. israelensis immobilized on Chromosorb 101: A new solid phase extractant for preconcentration of heavy metal ions in environmental samples.* Journal of Hazardous Materials 150, 357–363
- Mueller, J., Mueller, P.** 1970. *Colpoda cucullus: A Terrestrial Aquatic.* American Midland Naturalist, vol. 84, No. 1. pp. 1-12.
- Nadal, M., Schuhmacher, M. and Domingo, J. L.** 2004. *Levels of PAHs in soil and vegetation samples from Tarragona Country, Spain.* Environmental Pollution. 132, 1 – 11.
- National Toxicological Program (NTP).** 2002. *Tenth Report on Carcinogens. Report of the NTP on Carcinogens.* National Academy Press, Washington, D. C.
- Ney, R.** 1990. *Fate and transport of organic chemicals in the environment.* Government Institutes, Maryland, USA.
- Nirmaier, H., Fischer, E., Meyer, A., Henze, G.** 1996. *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using high-performance liquid chromatography with amperometric detection.* Journal of Chromatography A, 730, Issues 1-2, 12. Pages. 169-175
- Noble, A.** 1993. *Partition coefficients (n-octanol—water) for pesticides.* Journal of Chromatography A, 642, Issues 1-2, 16. Pages 3-14.

- Noreña-Barroso E., Zapata-Perez, O. and Gold-Bouchot, G.** 1998. *Hydrocarbon and organochlorine residue concentrations in sediments from Bay of Chetumal, México.* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 61, 80-81.
- Noreña-Barroso, Simá-Álvarez, E.R. Gold-Bouchot, G. and Zapata-Pérez, O.** 2004. *Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis asimilis* from the Bay of Chetumal, México.* Marine Pollution Bulletin. 48, 263-269.
- Novotný, C. Dias, n., Kapanen, A., Malachová, K., Vándrovcová, M., Itävaara, M., Lima, N.** 2006. *Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes.* Chemosphere 63, 1436–1442
- Okuda, T., Naoi, D., Tenmoku, M., Tanaka, S., .** 2006 *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aerosol in Beijing, China, measured by aminopropylsilane chemically-bonded stationary-phase column chromatography and HPLC/fluorescence detection.* Chemosphere 65, 427–435
- Organización Internacional del Trabajo (OIT).** 2001. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, vol. IV, Parte XVIII, Capítulo 104 Guía de productos químicos, No. 6 Hidrocarburos aromáticos - Hidrocarburos aromáticos halogenados - Hidrocarburos poliaromáticos - Isocianatos - Cetonas, 104.310-104.319. España.
- Disponible en: <http://www.insht.es>
- Páez-Osuna F., Ruiz-Fernández, A.C., Botello, A., Ponce-Vélez, G., Osuna-López, M., Frías-Espericueta, M.G., López-López, G. and Zazueta-Padilla, H.M.** 2002. *Concentration of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHS in mangrove oysters from Pacific Coast of México: an overview.* Marine Pollution Bulletin. 44,1296-1313.
- PARS (Proyecto Ambiental de la Región Sur).** 1999. *Diagnóstico de los efectos ambientales de la industria petrolera asociados a la región sur de PEP.* Subproyecto Monitoreo edafoecológico, Siebe, C. y Cram, S. Informe final. PEMEX-Batelle/UNAM/IMP.
- Pena, M., Casais, M., Mejuto, M., Cela, R.** 2005. *Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction.* Journal of Chromatography A, 1165, 32–38.
- Pensado, L., Casais, M., Mejuto, M., Cela, R.** 2005. *Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples.* Journal of Chromatography A 1077, 103–109.
- Peña, A., Morales, J., Labastida, C., Capella, S.** 2003. *Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos.* Revista. Internacional de Contaminación Ambiental. 19, 1, 13-23.
- Pichon, V.** 2000. *Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. Review.* Journal of Chromatography A, 885, 195–215 .

- Pupin, M. A., Figueiredo Toledo, M. C.** 1996. *Benzo(a)pyrene in olive oils on the Brazilian market*. Food Chemistry, Vol. 55, No. 2, pp. 185-188 .
- RAIS, Risk Assessment Information System,** 2007. *Toxicity Profiles*, U. S. A.
- Disponible en: http://rais.ornl.gov/tox/rap_toxp.shtml
- Rentz, J., et al.** 2008. *Benzo[a]pyrene degradation by Sphingomonas yanoikuyae JAR02*, Environmental Pollution, Volume 151, Issue 3, 669-677.
- Rivera, M., et al.** 2006. *Fitorremediación de suelos con benzo[a]pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [Echinochloa Polystachya (H. B. K.) HITCHC*, Universidad y Ciencia, Vol. 22, Núm. 001, México.
- SENER, Secretaría de Energía.** *Estadísticas de energía (06.Agosto.2004)*. México. www.energia.gob.mx
- Sienra, M. Préndez, M. Romero, R.** 2002. *Metodología para la extracción, fraccionamiento y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en material particulado urbano*. Boletín de la Sociedad Chilena de Química. vol.47 n.4.
- Schröter, D., Wolters, V. and De Ruiter, P.** 2003. *C and N mineralisation in the decomposer food webs of a European forest transect*. Oikos 102, 294–308.
- Schwedt, G.** 2001. *The essential guide to Environmental Chemistry*, John Wiley & sons Ltd., West Sussex, U. K., pages 190-194.
- Slater, G. Cowie, B., Harper, N., Droppo, I.** 2008. *Variation in PAH inputs and microbial community in surface sediments of Hamilton Harbour: Implications to remediation and monitoring*. Environmental Pollution, volume 153, issue 1, pages 60-70
- Stolyhwo, A., Sikorski, Z. E.** 2005. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – a critical review*. Food Chemistry 91, 303–311
- Taverniers, I. De Loose, M., Van Bockstaele, E.** 2004. *Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 8, pages 535-552.
- Trielli, F., Chessa, M., Amaroli, A., Ognibene, M., Delmonte Corrado, M.** 2006. *Effects of organophosphate compounds on a soil protist, Colpoda inflata (Ciliophora, Colpodidae)*, Chemosphere 65, 1731–1737.
- Trielli, F., Amaroli, A., Sifredi, F., Marchi, B., Falugi, C., Delmonte Corrado, M.** 2007. *Effects of xenobiotic compounds on the cell activities of Euplotes crassus, a single-cell eukaryotic test organism for the study of the pollution of marine sediments*. Aquatic Toxicology 83, 272–283.
- Uyzal, K., Emre, Y., Köse, E.** 2008. *The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey)*. Microchemical Journal 90, 67–70

- Van de Wiele, T., Peru, K., Verstraete, W., Siciliano, S., Headley, J.** 2004. *Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons, formed in a simulator of the human gastrointestinal tract.* Journal of Chromatography B, 806, 245–253
- Villalobos-Pietrini, R., Hernández-Mena, L., Amador-Muñoz, O., Munive-Colín, Z., Bravo-Cabrera, J., Gómez-Arroyo, S., Frías-Villegas, A., Waliszweski, S., Ramírez-Pullido, J., Ortiz-Muñoz, R.** 2007. *Biodirected mutagenic chemical assay of PM₁₀ extractable organic matter in Southwest Mexico City.* Mutation Research, 634, 192-204.
- Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Waliszweski, S., Hernández-Mena, L., Munive-Colín, Z., Gómez-Arroyo, S., Bravo-Cabrera, J., Frías-Villegas, A.** 2006. *Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles ≤ 10 μm in southwest Mexico City.* Atmospheric Environment, 40, 5845-5857.
- Villar, P., Callejón, M., Alonso, E., Jiménez, J., Guiraúm, A.** 2004. *Optimization and validation of a new method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge by liquid chromatography after microwave assisted extraction.* Analytica Chimica Acta 524, 295–304.
- Wang, W., Huang, Y., Shu, W., Cao, J.** 2007. *Multiwalled carbon nanotubes as adsorbents of solid-phase extraction for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental waters coupled with high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 1173, 27–36
- Waters.** 1995. *A sample preparation primer and guide to solid-phase extraction. Methods development.* 2001, PDF edition from: Solid Phase Extraction applications guide and bibliography. A resource for sample preparation methods development. Sixth Edition. Editors: McDonald, P. Bouvier, E. Library of Congress, USA.
- Disponible en: <http://www.waters.com>
- Xu, R. Oobbard, J.** 2004. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil- contaminated beach sediments treated with nutrient amendments.* Journal of Environmental Quality. 33, 861-867.
- Yang, Y., Dong, X., Jin, M., Ren, Q.** 2008. *Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in natural tocopherols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.* Food Chemistry 110, 226–232.

ANEXO I

Cálculo de la linealidad del sistema, límites de detección y cuantificación en base a la curva de calibración y a la desviación estándar de regresión.

Datos de la curva de calibración del sistema, para el benzo[a]antraceno.

Benzo[a]antraceno						
	CONCENTRACION (x)	AREA (y)		x ²	y ²	xy
	ng/mL					
	0.20	64434		0.04	4151740356	12886.8
	0.20	66397		0.04	4408561609	13279.4
	0.20	62286		0.04	3879545796	12457.2
	0.40	144896		0.16	2.0995E+10	57958.4
	0.40	143016		0.16	2.0454E+10	57206.4
	0.40	143918		0.16	2.0712E+10	57567.2
	0.80	324126.00		0.64	1.0506E+11	259300.8
	0.80	319369.00		0.64	1.02E+11	255495.2
	0.80	317649.00		0.64	1.009E+11	254119.2
	1.20	464822		1.44	2.1606E+11	557786.4
	1.20	453119		1.44	2.0532E+11	543742.8
	1.20	479082		1.44	2.2952E+11	574898.4
	1.60	617839		2.56	3.8173E+11	988542.4
	1.60	603373		2.56	3.6406E+11	965396.8
	1.60	615187		2.56	3.7846E+11	984299.2

Pendiente.

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$m = \frac{15(5594936.60) - (12.60)(4819513.00)}{15(14.52) - (12.60)^2} = 392.92319$$

Ordenada al origen.

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

$$b = \frac{4819513 - 392923.19(12.60)}{15} = -8754.61$$

Coefficiente de correlación.

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

$$r^2 = \frac{[15(5594936.60) - (12.600)(4819513)]^2}{[15(14.52) - (12.60)^2] - [15(2157690709383.00) - (4819513)^2]} = 0.9975$$

Desviación estándar de regresión.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{2157690709383 - 392.92(5594936.600) - (-8754.61)(4819513)}{15 - 2}} = 10753.68$$

Límite de Detección.

$$L. D. = \frac{3.3 * S_{y/x}}{m} = \frac{3.3 * 10753.68}{392.92} = 0.082 \text{ ng/mL}$$

Límite de Cuantificación.

$$L. D. = \frac{10 * S_{y/x}}{m} = \frac{10 * 10753.68}{392.92} = 0.274 \text{ ng/mL}$$

ANEXO II

Análisis estadístico entre las cantidades de los HAP's recuperadas en las muestras de protozoarios en cada uno de los ensayos de exposición.

Benzo[a]antraceno

Tiempo de exposición a los HAP's	2 Hrs	5 Hrs	8 Hrs
Recobro %	10,65	22,06	10,18
	11,88	22,47	10,27
	12,73	26,18	11,37
# de valores	3	3	3
Mínimo	10,7	22,1	10,2
Mediana	11,9	22,5	10,3
Máximo	12,7	26,2	11,4
Promedio	11,8	23,6	10,6
Desviación Estándar	1,05	2,27	0,663
Error Estándar	0,604	1,31	0,383
Intervalo de confianza al 95% valor bajo	9,16	17,9	8,96
Intervalo de confianza al 95% valor alto	14,4	29,2	12,3

Tabla ANOVA	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio
Tratamientos	309	2	154
Residual	13,4	6	2,23
Total	322	8	

Análisis de varianza de una vía	
Valor de P	< 0.0001
¿Diferencia significativa entre las medias? (P < 0.05)	Yes
Número de grupos	3
F	69,35
R ²	0,9585

Prueba de comparación múltiple Tukey's	Diferencia entre las medias	q	¿Diferencia significativa? P < 0.05	Intervalos de las diferencias al 95%
2 Hrs vs 5 Hrs	-11,8	13,7	Sí	-15.6 a -8.08
2 Hrs vs 8 Hrs	1,15	1,33	No	-2.59 a 4.89
5 Hrs vs 8 Hrs	13,0	15,0	Sí	9.22 a 16.7

Benzo[b]fluoranteno

Tiempo de exposición a los HAP's	2 Hrs	5 Hrs	8 Hrs
Recobro %	16,48	38,83	17,46
	18,20	34,07	17,67
	19,83	35,17	15,69
# de valores	3	3	3
Mínimo	16,5	34,1	15,7
Mediana	18,2	35,2	17,5
Máximo	19,8	38,8	17,7
Promedio	18,2	36,0	16,9
Desviación Estándar	1,68	2,49	1,09
Error Estándar	0,967	1,44	0,628
Intervalo de confianza al 95% valor bajo	14,0	29,8	14,2
Intervalo de confianza al 95% valor alto	22,3	42,2	19,6

Tabla ANOVA	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio
Tratamientos	684	2	342
Residual	20,4	6	3,40
Total	705	8	

Análisis de varianza de una vía	
Valor de P	< 0.0001
¿Diferencia significativa entre las medias? (P < 0.05)	Yes
Número de grupos	3
F	100,7
R ²	0,9711

Prueba de comparación múltiple Tukey's	Diferencia entre las medias	q	¿Diferencia significativa? P < 0.05	Intervalos de las diferencias al 95%
2 Hrs vs 5 Hrs	-17,9	16,8	Sí	-22.5 a -13.2
2 Hrs vs 8 Hrs	1,23	1,16	No	-3.39 a 5.85
5 Hrs vs 8 Hrs	19,1	17,9	Sí	14.5 a 23.7

Benzo[a]pireno

Tiempo de exposición a los HAP's	2 Hrs	5 Hrs	8 Hrs
Recobro %	12,40	30,23	12,00
	13,79	33,65	13,52
	14,98	35,58	13,24
# de valores	3	3	3
Mínimo	12,4	30,2	12,0
Mediana	13,8	33,7	13,2
Máximo	15,0	35,6	13,5
Promedio	13,7	33,2	12,9
Desviación Estándar	1,29	2,71	0,809
Error Estándar	0,746	1,56	0,467
Intervalo de confianza al 95% valor bajo	10,5	26,4	10,9
Intervalo de confianza al 95% valor alto	16,9	39,9	14,9

Tabla ANOVA	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio
Tratamientos	788	2	394
Residual	19,3	6	3,22
Total	807	8	

Análisis de varianza de una vía	
Valor de P	< 0.0001
¿Diferencia significativa entre las medias? (P < 0.05)	Sí
Número de grupos	3
F	122
R ²	0,976

Prueba de comparación múltiple Tukey's	Diferencia entre las medias	q	¿Diferencia significativa? P < 0.05	Intervalos de las diferencias al 95%
2 Hrs vs 5 Hrs	-19,4	18,8	Sí	-23.9 a -14.9
2 Hrs vs 8 Hrs	0,803	0,775	No	-3.69 a 5.30
5 Hrs vs 8 Hrs	20,2	19,5	Sí	15.7 a 24.7

ANEXO III

Análisis estadístico entre las cantidades de benzo[a]pireno (BP) y benzo[b]fluoranteno (BF) recuperadas en las muestras de protozoarios en cada uno de los tiempos de exposición.

Prueba t de Student no pareada, con $\alpha=0.05$, comparación a dos colas.

Ensayo con 5 h de exposición

Column A	BF 5 h
vs	vs
Column B	BP 5h
Valor de P	0,2482
Resumen valor de P	ns
¿Son las medias significativamente diferentes? (P < 0.05)	No
¿Valor de P a uno ó dos colas?	Dos colas
t, g.l.	t=1.350 g.l.=4
¿Cuánto es la diferencia?	
Promedio \pm SEM of column A	36.02 \pm 1.439 N=3
Promedio \pm SEM of column B	33.15 \pm 1.564 N=3
Diferencia entre medias	2.870 \pm 2.125
Intervalo de confianza al 95%	-3.030 to 8.770
R ²	0,3131
Prueba de F para comparar varianzas	
F,g.l. n, g.l. d	1.182, 2, 2
Valor de P	0,9166
Resumen del valor de P	ns
¿Son las varianzas significativamente diferentes?	No

Ensayo con 2 h de exposición

Column A	BF 2 Hrs
vs	vs
Column B	BP 2 Hrs
Valor de P	0,0219
Resumen valor de P	*
¿Son las medias significativamente diferentes? (P < 0.05)	Sí
¿Valor de P a uno ó dos colas?	Dos colas
t, g.l.	t=3.641 df=4
¿Cuánto es la diferencia?	
Promedio \pm SEM of column A	18.17 \pm 0.9672 N=3
Promedio \pm SEM of column B	13.72 \pm 0.7455 N=3
Diferencia entre medias	4.447 \pm 1.221
Intervalo de confianza al 95%	1.057 to 7.837
R ²	0,7682
Prueba de F para comparar varianzas	
F,g.l. n, g.l. d	1.683, 2, 2
Valor de P	0,7454
Resumen del valor de P	ns
¿Son las varianzas significativamente diferentes?	No

Ensayo con 8 h de exposición

Column A	BF 8 Hrs
vs	vs
Column B	BP 8 Hrs
Valor de P	0,0068
Resumen valor de P	**
¿Son las medias significativamente diferentes? (P < 0.05)	Sí
¿Valor de P a uno ó dos colas?	Dos colas
t, g.l.	t=5.137 df=4
¿Cuánto es la diferencia?	
Promedio ± SEM of column A	16.94 ± 0.6279 N=3
Promedio ± SEM of column B	12.92 ± 0.4670 N=3
Diferencia entre medias	4.020 ± 0.7826
Intervalo de confianza al 95%	1.848 to 6.192
R ²	0,8684
Prueba de F para comparar varianzas	
F, g.l. n, g.l. d	1.808, 2, 2
Valor de P	0,7123
Resumen del valor de P	ns
¿Son las varianzas significativamente diferentes?	No