



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

### TESIS

**METODOLOGÍA ANALÍTICA CROMATOGRÁFICA PARA LA  
DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DE HIDROCARBUROS  
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN CULTIVOS DE MICROALGAS.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MARISOL VELASCO CRUZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: LILIANA VIRGINIA RAQUEL SALDIVAR Y OSORIO**

**VOCAL: VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO**

**SECRETARIO: MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO**

**1ER. SUPLENTE: ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ**

**2DO. SUPLENTE: SILVIA CITLALLI GAMA GONZÁLEZ**

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 3D anexo, edificio A 3<sup>er</sup> piso, Facultad de Química. Ciudad Universitaria.

Asesora:

Dra. Martha Patricia García Camacho \_\_\_\_\_

Sustentante:

Marisol Velasco Cruz \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo y la beca otorgada: proyectos PAPIME-PE202310 “Predicción de parámetros en la enseñanza teórica y experimental de técnicas de separación en fase sólida para la extracción de compuestos orgánicos” y PAPIIT-IN223111 “Desarrollo de métodos analíticos miniaturizados para la evaluación de microorganismos como bioindicadores de contaminantes orgánicos persistentes”.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Química por la formación académica que me brindo.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por su asesoría que me brindo durante la realización y finalización de este trabajo de tesis.

Al M. en C. José de Jesús Olmos Espejel por su apoyo, enseñanzas y dedicación para poder realizar este trabajo.

*Dedico esta tesis a mis padres y hermanas por que son el motivo de mi vida.*

*A mi madre: Gracias por tu apoyo incondicional, tus cuidados y cariño.*

*A mi padre: Gracias por tu esfuerzo de todos estos años para poder brindarme la mejor educación.*

*A mis hermanas: Nayeli y Edith son ustedes una parte muy importante en mi vida con las que he compartido alegrías, tristezas y una gran amistad.*

*A mis compañeros del laboratorio: Gracias por la amistad que me brindaron durante este tiempo que compartí con ustedes.*

---

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	V
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	4
1.1. Contaminación por HAP's.	4
1.1.1. Fuentes de HAP's.	4
1.1.2. Presencia en el ambiente.	4
1.2. Características generales de los HAP's.	6
1.2.1. Propiedades fisicoquímicas	6
1.2.2. Toxicidad.	8
1.3. Degradación de los HAP's.	11
1.3.1. Biodegradación	11
1.3.2. Rutas de biodegradación de los HAP's.	13
1.3.3. Características generales de los metabolitos de los HAP's.	17
1.4. Características de las microalgas.	19
1.4.1. <i>Selenastrum capricornutum</i> .	19
1.4.2. <i>Scenedesmus acutus</i> .	20
1.5. Contaminantes orgánicos y microorganismos.	21
1.6. Métodos para la extracción de contaminantes orgánicos en muestras ambientales.	25
1.6.1 Principios de la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS).	27
1.6.1.1. Parámetros de la EFS.	29

---

1.6.1.2. Ventajas de EFS para el manejo de muestras líquidas.	32
1.6.1.3. EFS de los HAP's y metabolitos.	32
1.6.2. Principios de la técnica Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).	34
1.6.2.1. Factores que afectan la DMFS.	35
1.6.2.2. Ventajas de la DMFS.	37
1.7. Principios básicos de la cromatografía de líquidos.	38
1.7.1. Cromatografía de reparto en fase inversa.	40
1.7.2. Parámetros que influyen en la separación cromatográfica.	41
1.8. Análisis de HAP's y metabolitos por cromatografía de líquidos de alta resolución.	43
<b>CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>49</b>
2.1. Material y equipo	49
2.1.1. Sistema cromatográfico.	49
2.1.2. Materiales y equipo para la preparación de la muestra.	49
2.1.3. Disolventes, reactivos y disoluciones.	50
2.1.4. Muestras biológicas.	51
2.1.5. Preparación de disoluciones estándar de los metabolitos de HAP's.	51
2.2. Experimentación.	52
2.2.1 Esquema general de la experimentación.	52
2.2.2. Establecimiento de las condiciones de detección y separación analítica de los metabolitos de HAP's por CLAR-DF.	53
2.2.3. Validación del sistema cromatográfico.	54
2.2.4. Preparación de las muestras.	55
2.2.5. Acondicionamiento del adsorbente.	56

---

2.2.6. Optimización y validación del método de extracción en fase sólida (EFS) de los metabolitos de HAP's (BaP) en medios de cultivo líquidos.	56
2.2.6.1. Optimización de la preconcentración de los metabolitos.	56
2.2.6.1.1. Elección de la cantidad de adsorbente.	56
2.2.6.1.2. Elección del porcentaje de isopropanol.	57
2.2.6.1.3. Optimización de la elución de los metabolitos por EFS.	57
2.2.6.1.4. Optimización de la secuencia de limpieza.	58
2.2.6.2. Validación del método de determinación EFS-CLAR-DF.	59
2.2.7. Desarrollo y validación del método de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para la extracción de los metabolitos de HAP's en <i>Selenastrum capricornutum</i> .	60
2.2.7.1. Optimización de la elución selectiva de los metabolitos de HAP's.	60
2.2.7.1.1. DMFS con disoluciones estándar sin muestra.	60
2.2.7.1.2. DMFS con muestra de microalgas.	62
2.2.7.1.3. Ensayos de modificación de la matriz.	62
2.2.7.2. Validación del método de determinación DMFS-CLAR-DF.	63
2.2.7.3. Robustez del método de EFS y DMFS.	64
2.2.8. Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a BaP	65
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
3.1. Establecimiento de las condiciones de detección y separación analítica de los metabolitos de HAP's por CLAR-DF.	66
3.2. Validación sistema cromatográfico.	69
3.3. Optimización y validación del método de Extracción en Fase Sólida (EFS) de los metabolitos de HAP's (BaP) en medios de cultivo líquidos.	71

---

3.3.1. Optimización de la preconcentración de los metabolitos.	71
3.3.1.1. Optimización de la elución de los metabolitos por EFS.	72
3.3.1.2. Optimización de la secuencia de limpieza.	75
3.3.1.3. Aplicación del método de EFS optimizado a muestras de cultivo líquido de microalgas libre de microorganismos.	78
3.3.2. Protocolo completo del método de extracción por EFS.	80
3.3.3. Validación del método de determinación EFS-CLAR-DF.	81
3.3.4. Robustez del método de EFS.	84
3.4. Desarrollo y validación del método Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para la extracción de metabolitos de HAP's en <i>Selenastrum capricornutum</i> .	86
3.4.1. Optimización de la elución selectiva de los metabolitos de HAP's.	86
3.4.1.1. DMFS con disoluciones estándar sin muestra.	86
3.4.1.2. DMFS con muestra de microalgas.	88
3.4.1.3. Ensayos de modificación de matriz.	90
3.4.1.4. Ensayos para establecer las condiciones finales de la DMFS.	91
3.4.2. Protocolo del método de extracción por DMFS.	93
3.4.3. Validación del método de determinación DMFS-CLAR-DF.	94
3.4.4. Robustez del método de DMFS.	98
3.5. Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a BaP.	101
CONCLUSIONES	113
REFERENCIAS	114
ANEXOS	I

## RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son contaminantes carcinogénicos y/o mutágenicos que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, por lo que es importante su monitoreo y remoción. Estudios recientes han demostrado la capacidad que las microalgas tienen de acumular y degradar contaminantes orgánicos como los HAP's. Sin embargo, no se ha realizado suficiente investigación para elucidar las vías y condiciones de degradación, debido a que son pocos los métodos que se han desarrollado para el análisis de este tipo de muestras. *Selenastrum capricornutum* es una microalga de agua dulce que tiene la capacidad de degradar el benzo(a)pireno (BaP) a compuestos más polares entre los que se encuentran los dihidrodioles-BaP y hidroxi-BaP. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar una metodología analítica para la extracción y análisis de los cuatro principales metabolitos del benzo[a]pireno: 9,10-dihidrodiol BaP, 4,5-dihidrodiol-BaP, 9-hidroxi-BaP y 3-hidroxi-BaP en cultivos de microalgas. Se utilizó la Extracción en Fase Sólida (EFS) para el aislamiento de los metabolitos del medio líquido y Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) de la biomasa. Los extractos se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección de Fluorescencia (CLAR-DF). El método de DMFS-CLAR-DF presentó recobros entre 52 y 61%, excelente linealidad con  $R^2 > 0.99$ , una precisión entre 6.6 y 11.8 %, límites de detección (LD) entre 0.08 y 0.09 ng mg<sup>-1</sup> y límites de cuantificación (LC) entre 0.15 y 0.3 ng mg<sup>-1</sup>. El método de EFS-CLAR-DF presentó recobros entre 65 y 81 %, excelente linealidad con  $R^2 > 0.99$ , una precisión entre 1.5 y 2.7 %, límites de detección (LD) entre 0.07 y 0.1 ng mL<sup>-1</sup> y límites de cuantificación (LC) entre 0.3 y 0.4 ng mL<sup>-1</sup>. Los métodos analíticos fueron aplicados a la búsqueda de los metabolitos en cultivos de *Selenastrum capricornutum* expuestos a dos diferentes concentraciones de BaP: 1.2 ng mL<sup>-1</sup> y 5 ng mL<sup>-1</sup>, evidenciándose la formación de los metabolitos 9,10 dihidrodiol BaP, 4,5- dihidrodiol BaP, tanto en medio líquido como en biomasa.

## INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's), son un grupo de compuestos orgánicos formados por carbono e hidrógeno que se configuran en estructuras aromáticas de dos o más anillos bencenicos fusionados. Los HAP's pueden existir en varias disposiciones isoméricas en forma recta, angulados o racimados (*Mastandrea, 2005*). Son compuestos hidrofóbicos y su presencia en el medio ambiente es debido a su baja solubilidad en agua. De acuerdo a sus propiedades y peso molecular se dividen en compuestos de bajo peso molecular y compuestos de alto peso molecular. Los HAP's de bajo peso molecular (dos, tres anillos aromáticos) muestran toxicidad aguda, mientras que los HAP's de alto peso molecular (que contienen 4 o más anillos aromáticos) son carcinogénicos y/o mutagénicos. Dentro de este último grupo, el benzo[*a*]pireno (BaP) es el compuesto más conocido y estudiado. Su presencia en la atmosfera, suelo, sedimentos, plantas y animales hace que la exposición del hombre sea inevitable.

Los HAP's son liberados al medio ambiente por fuentes naturales y antropogénicas, los cuales pueden provenir de la combustión espontánea o provocada (incendios), de las erupciones volcánicas, de la producción industrial de energía, de calefacciones domésticas, del tráfico, de las emisiones de los motores de combustión interna utilizados en el transporte y la conservación de la madera; siendo ésta última la principal fuente de liberación de los HAP's al ambiente (*Rubio-Armendáriz, 2006*). La velocidad de acumulación de estos compuestos es mayor que la capacidad que el planeta tiene para removerlos. Los principales métodos utilizados para la eliminación de HAP's del medio ambiente son: la transformación microbiológica, la degradación, volatilización, la foto-oxidación, oxidación química y bioacumulación. Con respecto a la degradación microbiológica, se han descrito numerosos géneros de bacterias y hongos capaces de degradar HAP's como el antraceno, fenantreno y benzo[*a*]pireno a metabolitos más polares. Por el contrario, un número limitado de estudios ha demostrado la capacidad que las microalgas tienen de acumular y degradar HAP's. *Selenastrum capricornutum* es una microalga verde de agua dulce que metaboliza el

BaP, principalmente en cis-dihidrodiol y en menor proporción en hidroxi-BaP y quinonas a través de la enzima dioxigenasa (*Schoeny, 1988*). Los dihidrodiol que se forman son 4,5-cis- y 7,8-cis-dihidrodiol BaP que representan < 1 % y 13 % del total de los dihidrodiol respectivamente, el 9,10-dihidrodiol BaP representa un 36 % del total de los dihidrodiol y el 11,12 cis- dihidrodiol BaP es el principal metabolito formado, representando un 50 % del total de la fracción (*Lindquist, 1985; Warshawsky, 1995*). Los estudios de degradación de HAP's son escasos en la literatura posiblemente a causa de la falta de una herramienta analítica simplificada para manejar muestras tan complejas como lo son los cultivos de estos microorganismos. En la actualidad existen pocos métodos reportados para la extracción y análisis de contaminantes en microorganismos aún cuando la extracción de HAP's y sus metabolitos de diversas matrices ambientales como agua, suelo, sedimentos, aire y de matrices biológicas como la orina está ampliamente documentada (*Pontin, 2004; Pena, 2007; Pena, 2008; Campo, 2008; Wang 2009*).

El problema principal en el manejo analítico de los cultivos de microalgas es la limitada cantidad de muestra que se puede obtener para realizar la recuperación de trazas de los contaminantes. Existen técnicas alternativas que reemplazan a las metodologías convencionales basadas en la extracción líquido-líquido, entre éstas se encuentra la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) perfectamente adaptada para el manejo de muestras acuosas. Igualmente, una técnica derivada, la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS), la cual se ha demostrado ser óptima para el manejo de muestras sólidas.

Por lo tanto, este trabajo comprendió el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de cuatro metabolitos del BaP en cultivos de microalgas expuestas a este contaminante. Para lo cual, se establecieron las condiciones para la extracción de los compuestos de interés por EFS del medio líquido y por DMFS de la biomasa. El análisis de los extractos se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia (CLAR-FL) altamente sensible. Finalmente, se efectuó una aplicación de los métodos analíticos EFS-CLAR-FL y DMFS-CLAR-FL para la evaluación de la biodegradación del BaP en cultivos provenientes de los ensayos de exposición.

## OBJETIVOS

### GENERAL

- Desarrollar metodología analítica para la determinación de los cuatro principales metabolitos del benzo[*a*]pireno (BaP): 9,10-dihidrodiol BaP, 4,5-dihidrodiol-BaP, 9-hidroxi-BaP y 3-hidroxi-BaP en cultivos de microalgas, en base a técnicas de extracción con adsorbentes (EFS y DMFS) seguidas de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (CLAR-DF).

### PARTICULARES

- Desarrollar y validar un método basado en la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para la extracción de los metabolitos en microalgas.
- Optimizar y validar un método basado en la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) para la extracción de los metabolitos del medio líquido de cultivo de microalgas.
- Aplicar los protocolos completos de extracción y análisis cromatográfico en la biomasa y medio líquido provenientes de cultivos de microalgas expuestas a benzo[*a*]pireno.

## Capítulo 1

### ANTECEDENTES

#### 1.1. Contaminación por HAP's.

##### 1.1.1. Fuentes de HAP's.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son un grupo de compuestos orgánicos persistentes formados por dos o más anillos aromáticos conjugados. Ellos se pueden formar durante la descomposición térmica de las moléculas orgánicas y su posterior recombinación. La combustión incompleta a alta temperatura (500 – 800°C) o el sometimiento de material orgánico a bajas temperaturas (100 – 300 °C) durante largos períodos da como resultado la producción de HAP's (*Haritash, 2009*).

Las fuentes naturales de los HAP's son incendios de bosques, pastizales y matorrales, filtraciones de petróleo, erupciones volcánicas y los derrames de petróleo. Las fuentes antropogénicas de HAP's incluyen: la quema de combustibles fósiles, madera, basura, procesos pirolíticos, alquitrán de hulla, hornos de coque, el uso de lubricantes de aceite, filtros de aceite, la calefacción, el humo del tabaco, los alimentos asados o ahumados, la incineración de residuos sólidos municipales, calentadores domésticos, los vehículos de motor, los automóviles de diesel, autobuses, aceites lubricantes, neumáticos, los aceites de corte y los aceites que se utilizan en máquinas de descarga eléctrica. En los países industrializados las actividades antropogénicas son la principal fuente de HAP's (*Haritash, 2009*).

##### 1.1.2. Presencia en el ambiente.

Los HAP's se encuentran en todo el medio ambiente en el aire, agua, suelo y sedimentos. La movilización de los HAP's en el medio ambiente depende de las propiedades de cada uno de ellos. Los HAP's entran al medio ambiente principalmente a través de las emisiones al aire de los volcanes, los incendios forestales, la quema de madera en los hogares y los gases de los tubos de escape de automóviles y camiones.

También pueden entrar a las aguas de superficie a través de las descargas de las plantas industriales, plantas de tratamiento de aguas residuales ([www.atsdr.cdc.gov/es](http://www.atsdr.cdc.gov/es)). El aire es el principal medio de transporte de HAP's en la atmósfera distribuyéndose a grandes distancias, su concentración es de alrededor de  $\text{ng/m}^3$  de aire. Se ha reportado que la concentración de los HAP's puede variar de una estación del año a otra por ejemplo la concentración de invierno / verano el cociente para el BaP es de 50, por lo que la concentración HAP's en invierno es mayor que en verano. En el aire de las áreas rurales se han encontrado niveles de referencia de algunos HAP's representativos que oscilan entre 0.02 y  $1.2 \text{ ng/m}^3$  y en las áreas urbanas se han detectado niveles entre 0.15 y  $19.3 \text{ ng/m}^3$  ([www.atsdr.cdc.gov/es](http://www.atsdr.cdc.gov/es)).

Los sedimentos son otro lugar donde se encuentran presentes los HAP's, aun cuando su solubilidad en agua es baja, pero debido a su alta hidrofobicidad éstos se acumulan en los sedimentos ello depende de la fuente de donde provengan éstos, van desde la disposición atmosférica hasta la filtración de hidrocarburos del petróleo o la producción y transporte del petróleo, la disposición de aguas residuales o canotaje. La concentración de HAP's en los sedimentos puede variar de  $\mu\text{g/Kg}$  a  $\text{g/Kg}$  dependiendo de la actividad industrial, agua corriente, agua residual y la dependencia cada vez mayor del petróleo y gas (*Juhasz, 2000*).

La mayoría de los HAP's entrando en los ambientes acuáticos permanecen cerca de los sitios de deposición, lo que sugiere que los lagos, ríos, estuarios y ambientes marinos costeros cerca de los centros de las poblaciones humanas son los principales depósitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos acuáticos.

La concentración de HAP's en los suelos de los países industrializados ha revelado una carga creciente de HAP's desde 1893 hasta 1987; siendo su presencia mayor en centros urbanos. Algunos estudios han revelado que la concentración total de HAP's se encuentra entre 100 -  $55,000 \mu\text{g/Kg}$  de suelo, en suelos normales sin contaminación industrial, la concentración de BaP varió de 3.5 a  $3700 \mu\text{g/Kg}$  de suelo, con una concentración media de  $16 \mu\text{g/Kg}$ .

La concentración de HAP's en suelos de países industrializados puede variar dependiendo de la actividad industrial. Por ejemplo, en suelo de un sitio de producción de creosota, la concentración total de HAP's fue  $5863 \text{ mg/Kg}$ , y el BaP no fue

detectado, contrariamente a como ocurrió en una planta de fabricación de gas donde el 10.9 % del total de HAP's del suelo correspondió al BaP (Juhasz, 2000).

El contenido de HAP's presente en las plantas y animales que viven en la tierra o en el agua puede ser muchas veces más alto que las concentraciones de HAP's presentes en el suelo o el agua. Los HAP's en las plantas pueden ser adsorbidos o asimilados por las hojas de las plantas antes de entrar en la cadena alimentaria animal, aunque algunos HAP's adsorbidos pueden ser lavados por la lluvia o químicamente oxidados a otros productos. Algunas plantas que crecen en zonas muy contaminadas, la asimilación puede exceder el metabolismo y la degradación, el resultando es una acumulación de los HAP's en las plantas.

Los HAP's también pueden acumularse en la vegetación y podrían causar indirectamente la exposición humana a través del consumo de los alimentos. Hay plantas que pueden transformar los HAP's a conjugados  $\beta$ -O-glucósido y  $\beta$ -O-glucurónido, para penetrar en la célula. Existen factores que influyen en la acumulación de HAP's en las plantas como son: las propiedades físicas de los HAP's, la estructura y especie de la planta, las condiciones ambientales como la concentración atmosférica de los HAP's, temperatura y condiciones del viento. Se ha estimado que la concentración de HAP's en la vegetación rural es 10 veces menor que la urbana, correlacionada con el gradiente de concentración atmosférica de HAP's (Juhasz, 2000).

## **1.2. Características generales de los HAP's.**

### **1.2.1. Propiedades fisicoquímicas**

Los HAP's son sustancias lipofílicas, éstos son generalmente sólidos blancos o amarillos-pálidos, inestables fotoquímicamente, por lo que se degradan con la luz, tienen baja solubilidad en agua, altos puntos de fusión y ebullición, baja presión de vapor. Con el aumento del peso molecular su solubilidad disminuye, y el coeficiente de reparto octanol/agua ( $K_{ow}$ ) se incrementa. Los HAP's de 2 - 3 anillos tienen valores de coeficientes de reparto octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ) entre 3.3 y 5.2. Los HAP's de 4 - 6 anillos son compuestos muy hidrofóbicos con  $\log K_{ow} \geq 5$  (Bouzige, 1998).

Los sistemas conjugados de orbitales  $\pi$  de los HAP's son los responsables de su estabilidad química. Son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es pequeña. Dependiendo de su carácter aromático los HAP's absorben luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico (Stellman, 2001; Mastandrea, 2005).

Químicamente, los HAP's reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce la saturación, conservándose el sistema de anillos. La mayoría de los HAP's sufre fotooxidación, siendo ésta una forma para eliminarlos de la atmósfera. La reacción de fotooxidación más frecuente es la formación de endoperóxidos, que pueden convertirse a quinonas (Stellman, 2001; Mastandrea, 2005). La tabla 1.1 muestra algunas de las propiedades fisicoquímicas de los principales HAP's.

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAP's

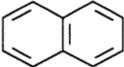
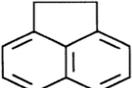
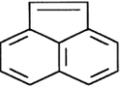
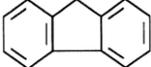
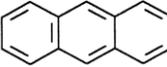
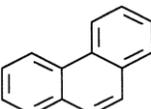
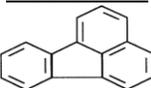
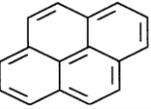
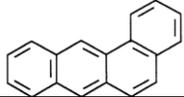
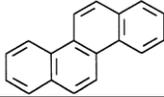
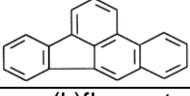
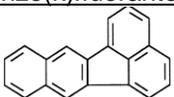
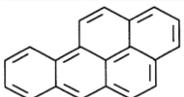
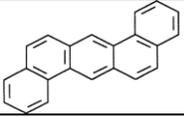
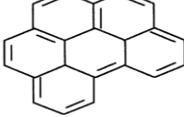
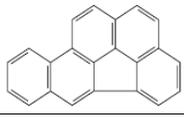
Nombre y estructura	PM (g/ mol)	p.f. (°C)	p. eb. (°C)	Solubilidad en agua (mg/l)	Log $K_{ow}$
Naftaleno 	128	80	128	31	3.30
Acenafteno 	154	95	279	1.93	3.98
Acenaftileno 	152	78	280	3.93	4.07
Fluoreno 	166	166	295	1.98	4.18
Antraceno 	178	218	342	1.25	4.45
Fenantreno 	178	99	336	1.2	4.45
Fluoranteno 	202	107	384	1.25	4.90
Pireno 	202	156	404	1.27	4.88

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAP's. (Continuación)

Nombre y estructura	PM (g/ mol)	p.f. (°C)	p. eb. (°C)	Solubilidad en agua (mg/l)	Log $K_{ow}$
<u>Benzo(a)antraceno</u> 	228	162	400	0.04	5.47
<u>Criseno</u> 	228	252	448	0.002	5.56
<u>Benzo(b)fluoranteno</u> 	252	168	481	0.0012	6.09
<u>Benzo(k)fluoranteno</u> 	252	215	460	0.0006	6.03
<u>Benzo(a)pireno</u> 	252	179	310	0.0038	6.04
<u>Dibenzo(a,h)antraceno</u> 	278	266	524	0.0005	6.75
<u>Benzo(g,h,i)perileno</u> 	276	277	553	0.0003	6.86
<u>Indeno(1,2,3-c,d)pireno</u> 	276	164	530	0.053	6.58

PM= Peso molecular, P.f.= Punto de fusión, P.eb.= Punto de ebullición.

### 1.2.2. Toxicidad.

Más de 100 HAP's se han encontrado en la naturaleza pero sólo 16 son considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (U.S. EPA), posteriormente adoptada por la Unión Europea y Organización Mundial de la Salud (*Barranco, 2003; Leroyer, 2010*).

## Efectos Carcinogénicos

La relación entre exposición a agentes químicos y cáncer comenzó en el siglo XVIII (1775) cuando un cirujano inglés Sir Percibal Pott describió por primera vez que un cáncer escrotal de los limpiadores de chimeneas provenía de los depósitos de hollín del carbón. A principios del siglo XX, se mostró que el contacto continuo con aceites y alquitranes a través de la piel conducían al cáncer de piel en algunos grupos de la población.

En 1930, se describió el cáncer de pulmón en los trabajadores de la industria del acero y del coque. En 1933, Cook, Hewett y Hieger aislaron a partir de dos toneladas de alquitrán de hulla el principal componente cancerígeno, este compuesto fue identificado como BaP (*Mastandrea, 2005; Rubio-Armendáriz, 2006*).

Actualmente se admite que los HAP's son previamente activados en el organismo antes de ejercer su efecto como disruptor endocrino o cancerígeno/mutágeno. Tras la exposición prolongada pueden producir cáncer cutáneo (escroto y cara), cáncer broncogénico en vías respiratorias, cáncer de vejiga. En el sistema hematopoyético pueden originar leucemia y linfoma.

En la especie humana la vía respiratoria es considerada la más importante, particularmente para individuos ocupacionalmente expuestos, de igual manera la vía dérmica puede ser tanto o más importante.

El esquema de la figura 1.1 es propuesto para las etapas previas a la carcinogenicidad por exposición ambiental (*Doubden, 2003*) considera las siguientes etapas: exposición, activación metabólica, formación de aductos entre HAP's y ADN, mutaciones en genes críticos como, por ejemplo, el p53 (gen represor de tumores) y sucesión de mutaciones en otros genes. En general, una mayor concentración de aductos HAP's-ADN se encuentra en personas ocupacionalmente expuestas.

En relación al efecto de los HAP's como posibles disruptores endocrinos, muchos estudios indican que diferentes compuestos químicos presentes en el ambiente, además de los HAP's, como los pesticidas, dioxinas, furanos y bifenilos policlorados, presentan actividad estrogénica in vitro (*Mastandrea, 2005*).

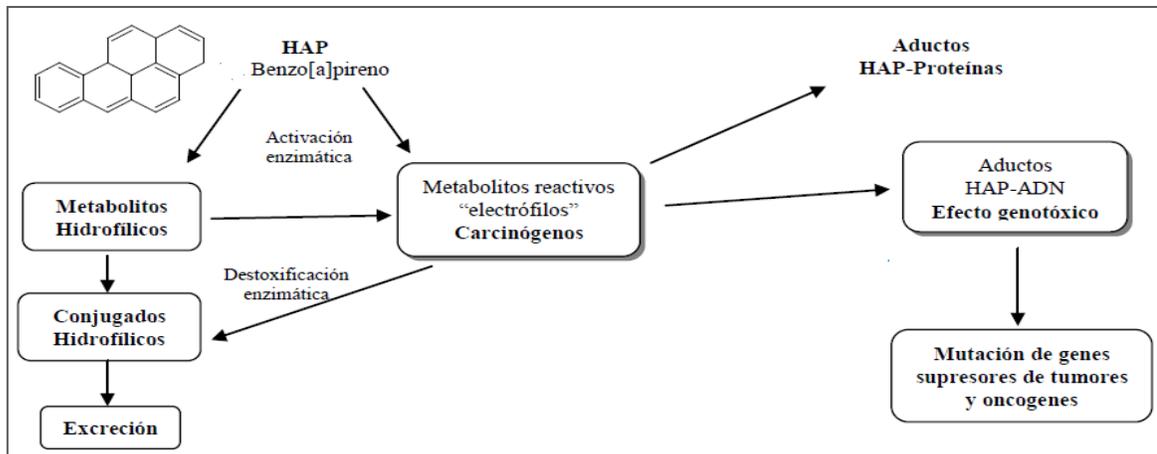


Figura 1.1. Metabolismo de los HAP's, en etapas previas a la carcinogenicidad (Doubden, 2003).

Estudios realizados en animales han demostrado que los HAP's han causado tumores en los animales de laboratorio que han respirado estas sustancias en el aire, que las han consumido o que han entrado en contacto con las mismas a través de la piel durante largos períodos de tiempo. Los estudios realizados en los seres humanos demuestran que las personas expuestas a través de la respiración o el contacto de la piel durante largos períodos de tiempo con mezclas que contienen HAP's y otros compuestos también pueden contraer cáncer. El Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) de los Estados Unidos ha determinado que el benzo[*a*]antraceno, el benzo[*b*]fluoranteno, el benzo[*j*]fluoranteno, el benzo[*k*]fluoranteno, el benzo[*a*]pireno, el dibenzo[*a,h*]antraceno, el criseno y el indeno[1,2,3-*c,d*]pireno son reconocidos carcinógenos de animales. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha determinado que: el benzo[*a*]antraceno y el benzo[*a*]pireno son probables carcinógenos humanos; el benzo[*b*]fluoranteno, el benzo[*j*]fluoranteno, el benzo[*k*]fluoranteno y el indeno[1,2,3-*c,d*]pireno son posibles carcinógenos humanos; y el antraceno, el benzo[*g,h,i*]perileno, el benzo[*e*]pireno, el criseno, el fluoranteno, el fluoreno, el fenantreno y el pireno no son clasificables como carcinógenos en los seres humanos. La EPA ha determinado que el benzo[*a*]antraceno, el benzo[*a*]pireno, el benzo[*b*]fluoranteno, el benzo[*k*]fluoranteno, el criseno, el dibenzo[*a,h*]antraceno y el indeno[1,2,3-*c,d*]pireno son probables carcinógenos humanos y que el acenaftileno, el antraceno, el benzo[*g,h,i*]perileno, el fluoranteno, el fluoreno, el fenantreno y el pireno no son clasificables como carcinógenos en los seres humanos. El

acenafteno no ha sido clasificado según sus efectos cancerígenos por el DHHS, la IARC o la EPA ([www.atsdr.cdc.gov/es](http://www.atsdr.cdc.gov/es)).

También se ha comprobado que la presencia de HAP's en atmósferas determinadas contribuye a modificar la actividad cancerígena. Así, han sido observados numerosos casos de cánceres de piel en industrias con atmósferas con cantidades abundantes de alquitranes, humos y aceites minerales, implicando un aumento en la tasa de mortalidad.

En la siguiente lista se presenta una clasificación de las mediciones de BaP en diferentes lugares de trabajo para clasificarlos según el grado de exposición:

- ❖ Exposición muy alta a BaP ( $> 10 \text{ mg/m}^3$ ): Trabajos en fábricas de gas y coque; plantas de aluminio; fábricas de electrodos de grafito; manipulación de breas y alquitranes calentados.
- ❖ Exposición moderada ( $0.1 \text{ a } 10 \text{ mg/m}^3$ ): Trabajos en fábricas de gas y coque; acerías; fábricas de electrodos de grafito; plantas de aluminio; fundiciones.
- ❖ Exposición baja ( $< 0.1 \text{ mg/m}^3$ ): 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.

### **1.3. Degradación de los HAP's.**

#### **1.3.1. Biodegradación**

Un amplio espectro de microorganismos como bacterias, hongos y microalgas, se ha encontrado tener la capacidad de degradación de HAP's, por lo que la biodegradación por procesos microbianos está considerada como una alternativa para eliminarlos de suelos contaminados y aguas residuales (Ke, 2010). La biodegradación de los HAP's no sólo depende de la estructura química y del peso molecular, sino de factores ambientales y físicos, los físicos como la biodisponibilidad de los compuestos a los microorganismos.

La biorremediación de agua, suelos y sedimentos contaminados por HAP's, es un método alternativo y eficaz para eliminarlos, sin embargo, muchos de estos procesos

están limitados por la naturaleza hidrofóbica y por el peso molecular de los mismos ya que poco se conoce de ello.

La biorremediación por microorganismos ha surgido como un medio atractivo para eliminar los HAP's, ya que éste es más rentable que los procesos abióticos. Los microorganismos, generalmente, eliminan contaminantes a través de adsorción fisicoquímica pasiva y rápida a través de las paredes celulares o en la superficie celular (bioadsorción); similar a lo que ocurre en el fitoplancton y las plantas superiores, donde los contaminantes se acumulan en las células por adsorción activa y son degradados a través de una serie de acciones enzimáticas (*Chan, 2005*).

En la figura 1.2 se muestran los procesos más significativos que ocurren durante la introducción de los HAP's de origen petrogénico y pirogénico a los sistemas acuáticos. Los HAP's de origen pirogénico muestran mayor persistencia y menor susceptibilidad a la degradación microbiana y a la fotooxidación comparados con los HAP's petrogénicos; esto se debe a que desde su formación y emisión al ambiente se asocian a partículas de cenizas, carbono orgánico y hollín (*Doubden, 2003*).

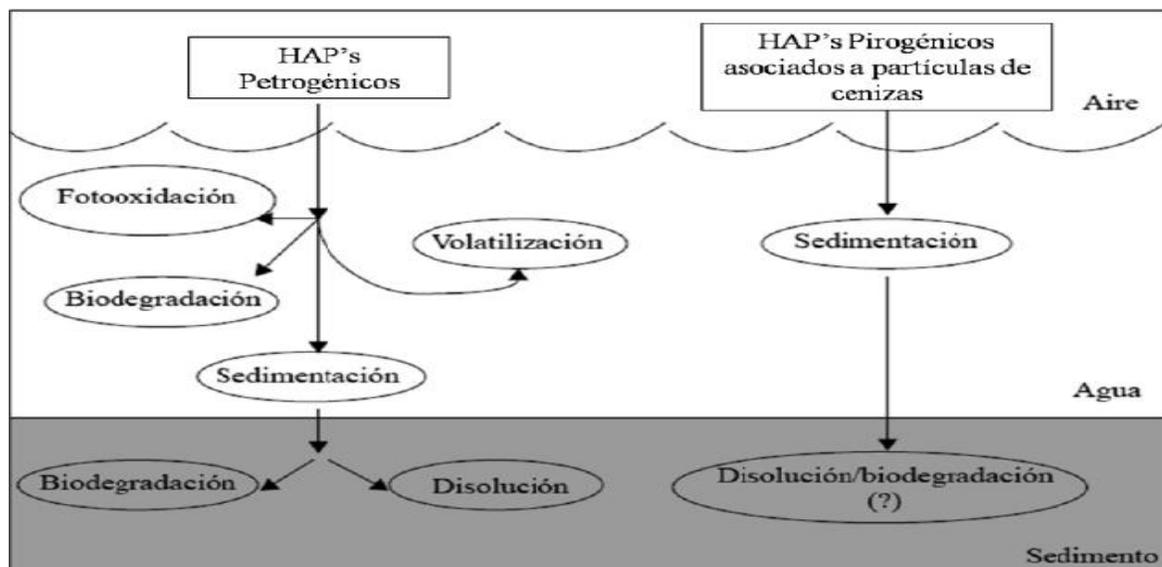


Figura 1.2. Principales procesos que afectan la distribución de los HAP's de origen petrogénico y pirogénico.

Existen diversos microorganismos con la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benceno, naftaleno, fenantreno, antraceno, pireno, benzo[a]pireno, éstos son presentados en la tabla 1.2.

Tabla 1.2. Principales microorganismos degradadores de HAP's (Cerniglia, 1993).

Bacterias	Cianobacterias y algas	Hongos	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	<i>Absidia glauca</i>	<i>Panaeolus subbalteatus</i>
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. (strain CA)	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Anabaena</i> sp. (strain 1F)	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	<i>Amphora</i> sp.	<i>Basidiobolus ranarum</i>	<i>Pestalotia</i> sp.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Aphanocapsa</i> sp.	<i>Bjerkandera adusta</i>	<i>Phanaerochaete chrysosporium</i>
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	<i>Chlorella autotrophica</i>	<i>Bjerkandera</i> sp.	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Chlorella sorokiniana</i>	<i>Candida maltosa</i>	<i>Phlyctochytrium reinboldtae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Chlamydomonas angulosa</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
<i>Beijerinckia</i> sp.	<i>Coccochloris elabens</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Psilocybe cubensis</i>
<i>Corynebacterium renale</i>	<i>Cylindrotheca</i> sp.	<i>Choanephora campincter</i>	<i>Psilocybe strictipes</i>
<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Chrysosporium pannorum</i>	<i>Psilocybe stuntzii</i>
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	<i>Circinella</i> sp.	<i>Psilocybe subaeruginascens</i>
<i>Moraxella</i> sp.	<i>Navicula</i> sp.	<i>Claviceps paspali</i>	<i>Ramaria</i> sp.
<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Nitzschia</i> sp.	<i>Cokeromyces poltrassi</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
<i>Nocardia</i> sp.	<i>Nostoc</i> sp.	<i>Conidiobolus gonimodes</i>	<i>Rhizophlyctis harderi</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Oscillatoria</i> sp. (strain JCM)	<i>Cunninghamella bainieri</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Oscillatoria</i> sp. (strain MEV)	<i>Cunninghamella elegans</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	<i>Porphyridium cruentum</i>	<i>Cunninghamella japonica</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Selenastrum capricornutum</i>	<i>Emerincellopsis</i> sp.	<i>Saprolegnia parasitica</i>
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	<i>Synedra</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Smittium culicis</i>
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	<i>Ulva fasciata</i>	<i>Gilbertella persicaria</i>	<i>Smittium culisetae</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.		<i>Gliocladium</i> sp.	<i>Smittium simuli</i>
<i>Rhodococcus</i> sp.		<i>Helicostylum piriforme</i>	<i>Sordana fimicola</i>
<i>Staphylococcus auriculans</i>		<i>Hyphochytrium catenoides</i>	<i>Syncephalastrum racemosum</i>
<i>Streptomyces griseus</i>		<i>Linderina pennispora</i>	<i>Thamnidium anomalum</i>
<i>Streptomyces</i> sp.		<i>Mortierella verrucosa</i>	<i>Trametes versicolor</i>
<i>Vibrio</i> sp.		<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Trichoderma viride</i>
		<i>Neurospora crassa</i>	<i>Zygorhynchus moelleri</i>
		<i>Panaeolus cambodginensis</i>	

### 1.3.2. Rutas de biodegradación de los HAP's.

Se conoce desde 1980 que las cianobacterias y las algas eucarióticas son especies que tienen la capacidad de biodegradación de HAP's tanto individualmente como en mezclas. Dentro estas microalgas se encuentran *Chlamydomonas* sp., *Chlorella miniata*, *Senedemus acutus*, *Scenedemus platydiscus*, *Scenedemus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum* y *Synechocystis* sp. (Cerniglia, 1993; Ke, 2010).

El grado de degradación de HAP's por microalgas dependerá de cada especie, ya que tienen diferente composición en su pared celular, tamaño de célula y mecanismo de degradación; ésta también se puede ver afectada por la concentración de microalgas, ya que una mayor biomasa proporciona más superficie de contacto de las células, volúmenes, enzimas para la adsorción y degradación de contaminantes; si la biomasa es demasiado alta las células formarían agregados (Chan, 2006; Ke, 2010).

Los HAP's son degradados por foto oxidación y oxidación química. Las microalgas degradan los HAP's a través de la vía de la dioxigenasa. La enzima dioxigenasa, es

también característica del metabolismo de las bacterias, esta enzima no se presenta en los organismos eucariotes como hongos. Los hongos usan la enzima monooxigenasa para oxidar los HAP's.

A continuación se describen más detalladamente las rutas de degradación de HAP's por bacterias, mamíferos y hongos, que han sido las rutas más estudiadas y que son las rutas más probables que siguen las microalgas para llevar a cabo la oxidación de HAP's.

- Los hongos y los mamíferos inician la degradación a través de la introducción de un sólo átomo de oxígeno mediante una monooxigenasa que contiene el citocromo P-450, oxida los HAP's a óxidos de areno, seguido de una isomerización para la formación de un fenol con la subsecuente conjugación con sulfato, ácido glucurónico, glucosa o xilosa, o hidratación enzimática para formar un trans-dihidrodiol ver figura 1.3. En este proceso de transformación se generan metabolitos más solubles, para su posterior eliminación. Los hongos lignolíticos pueden degradar e incluso mineralizar HAP's mediante un conjunto de enzimas implicadas en la utilización de polímeros vegetales como la lignina (*Schoeny, 1988; Cerniglia, 1993*).
  
- Las bacterias inician la oxidación de los HAP's a través del ataque de una dioxigenasa en un anillo aromático, a partir de esta reacción se forman un cis-dihidrodiol, el anillo pierde la aromaticidad. A continuación una deshidrogenasa NAD<sup>+</sup> dependiente, reconstituye el anillo aromático formando un catecol (diol). Los dioles son moléculas a partir de las cuales se produce la ruptura del anillo aromático mediante dioxigenasas estereoselectivas, la ruptura se puede suceder entre los dos grupos hidroxilo, denominados orto-ruptura, o adyacentes a estos grupos, denominándose meta-ruptura, ver figura 1.3. Estudios han demostrado que tanto la dioxigenasa y la monooxigenasa están implicadas en la oxidación bacteriana del pireno (*Cerniglia, 1993; Juhasz, 2000; Haritash, 2009*).

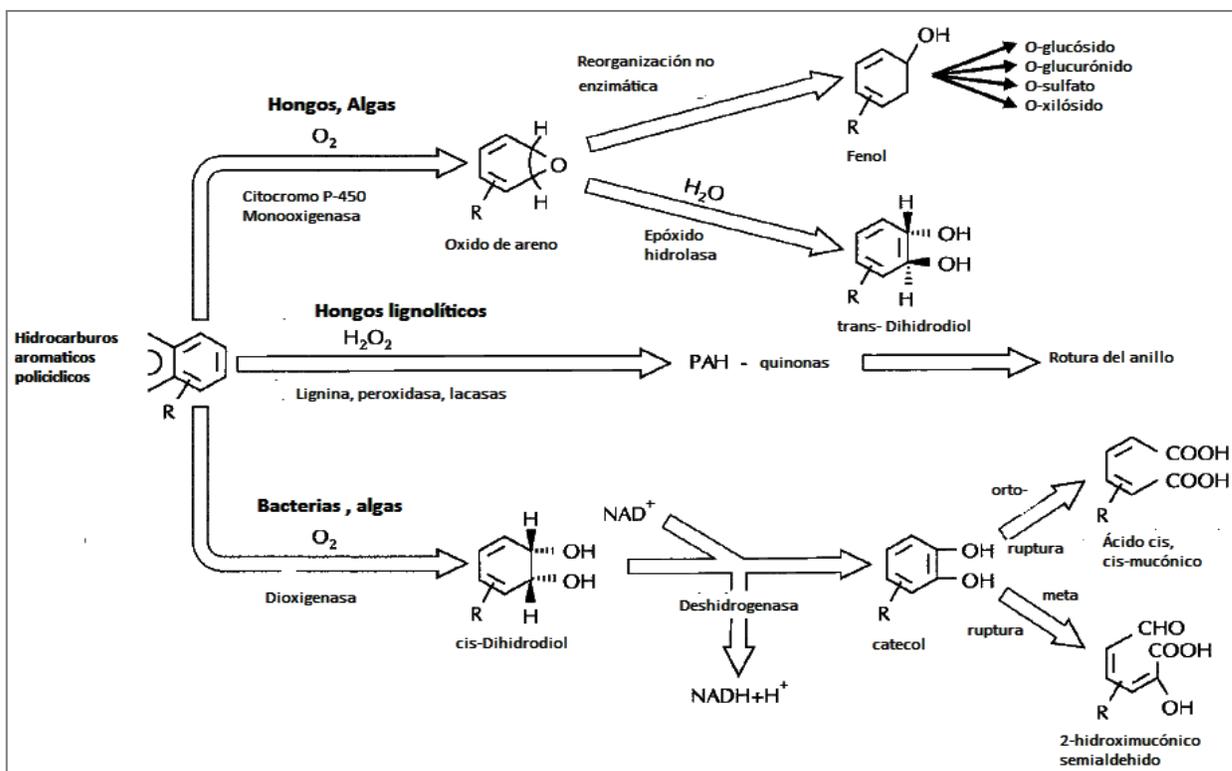


Figura 1.3. Diagrama general de la biodegradación de HAP (Cerniglia, 1993).

### Degradación del BaP por microalgas.

Las especies de microalgas que tienen la capacidad de metabolizar el BaP se presentan en la tabla 1.3, donde se observa que los principales metabolitos formados son 9,10-, 7,8-, 4,5 y 11,12- reportados como dihidrodioles, los 3-OH, 7-OH y 9-OH reportados como fenoles y 1,6-, 3,6-, 6,12- reportados como quinonas. Tres de las microalgas que se reportan en la tabla 1.3 metabolizan al BaP principalmente en dihidrodioles; la microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* y *Ochromonas malhamensis* no metabolizan al BaP en niveles significativos, *Anabaena flos-aquae* una alga verde-azul y *Euglena gracilis* una euglenoide si metabolizan el BaP, pero de forma más lenta de lo que lo hacen las algas verdes como *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum acutus* y *Ankistrodesmus braunii* (Warshawsky, 1995).

**Tabla 1.3.** Especies de microalgas que tienen la capacidad de biotransformar y bioacumular el BaP bajo la luz amarilla con una concentración de 160 µg L<sup>-1</sup>.

Species %	Of total ethyl acetate extractables in media			
	Dihydrodiols	Phenols	Quinones	BaP
<i>Selenastrum capricornutum</i> <sup>a,d</sup>	89.5	1.7	0.9	1.0
<i>Scenedesmus acutus</i> <sup>b</sup>	83.1	3.6	1.6	2.6
<i>Ankistrodesmus braunii</i> <sup>b</sup>	85.2	2.2	0.8	1.0
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <sup>a</sup>	2.1	1.2	1.1	92.2
<i>Ochromonas malhamensis</i> <sup>b</sup>	4.6	1.5	0.5	91.2
<i>Anabaena flos-aquae</i> <sup>c</sup>	10.8	1.2	2.2	81.3
<i>Euglena gracilis</i> <sup>c</sup>	13.1	3.2	2.0	71.9
Medium Only <sup>c</sup>	1.2	2.9	1.6	91.6
% of Total ethyl acetate extractables in pellets				
<i>Selenastrum capricornutum</i> <sup>a,d</sup>	29.3	6.4	3.0	41.7
<i>Scenedesmus acutus</i> <sup>b</sup>	19.4	2.8	1.6	28.9
<i>Ankistrodesmus braunii</i> <sup>b</sup>	34.8	7.0	2.9	33.9
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <sup>a</sup>	0.5	0.4	0.5	96.8
<i>Ochromonas malhamensis</i> <sup>b</sup>	2.1	1.4	0.9	91.2
<i>Anabaena flos-aquae</i> <sup>c</sup>	0.7	0.6	0.7	95.5
<i>Euglena gracilis</i> <sup>c</sup>	1.1	2.1	1.1	93.5

<sup>a</sup>3 Days incubation.  
<sup>b</sup>7 Days incubation.  
<sup>c</sup>9 Days incubation.  
<sup>d</sup>Data average of two experiments except for *Ochromonas* and *Euglena* which represent one experiment each.

En la tabla 1.4 se muestran las cantidades de BaP y de sus metabolitos obtenidos en sedimentos de microalgas (biomasa) y en el medio de cultivo líquido libre de microalgas, después de 2 días de exposición de *Selenastrum capricornutum* a las diferentes concentraciones de BaP, en condiciones de crecimiento fotoautótrofas, bajo luz amarilla. Los principales metabolitos formados fueron 9,10-dihidrodiol, 4,5 y 11,12-dihidrodiol BaP, 7,8 dihidrodiol BaP y 3,6-quinona (Warshawsky, 1995).

**Tabla 1.4.** Cantidad de metabolitos del BaP obtenida en sedimentos (biomasa) y en el medio líquido libre de microalgas después de dos días de incubación bajo la luz amarilla a diferentes concentraciones (Warshawsky, 1995).

Concentration <sup>b</sup> (µg/l)	Metabolitos (ng) presentes en el medio libre de algas							
	9,10-diol		4,5-diol/11,12-diol		7,8-diol		3,6-quinone	
5	33.9 ± 1.1 <sup>c</sup>	(56.5) <sup>d</sup>	4.3 ± 0.5	(7.1)	0.7 ± 0.0	(1.2)	1.0 ± 0.6	(1.6)
10	124.6 ± 1.0	(62.3)	11.2 ± 0.0	(5.6)	3.4 ± 0.2	(1.7)	9.4 ± 0.6	(4.7)
50	198.8 ± 5.2	(49.7)	95.6 ± 22.4	(23.9)	9.2 ± 4.8	(4.1)	6.8 ± 5.2	(1.7)
160	174.0 ± 2.2	(10.9)	198.6 ± 18.2	(12.4)	65.4 ± 4.1	(4.1)	46.7 ± 1.6	(2.9)
400	270.8 ± 21.2	4.6)	187.0 ± 10.0	(3.2)	69.6 ± 10.0	(1.2)	158.1 ± 3.5	(2.7)
1200	263.7 ± 26.5	(1.5)	104.4 ± 17.7	(0.6)	185.8 ± 7.0	(1.1)	295.6 ± 33.6	(1.7)
Metabolitos (ng) presentes en la biomasa de microalgas								
5	1.0 ± 0.1 <sup>c</sup>	(34.5) <sup>d</sup>	0.3 ± 0.0	(10.2)	0.05 ± 0.0	(1.7)	0.5 ± 0.0	(1.5)
10	6.4 ± 2.6	(64.1)	0.6 ± 0.4	(6.0)	0.1 ± 0.05	(0.8)	0.2 ± 0.1	(2.0)
50	10.1 ± 2.3	(42.0)	1.9 ± 0.8	(8.0)	3.8 ± 3.4	(16.0)	0.2 ± 0.1	(0.7)
160	20.0 ± 0.9	(2.6)	12.0 ± 0.1	(1.6)	8.7 ± 1.8	(1.1)	23.7 ± 1.4	(3.1)
400	29.5 ± 5.7	(3.2)	12.8 ± 2.2	(1.4)	16.9 ± 1.8	(1.9)	51.9 ± 0.7	(5.7)
1200	27.4 ± 2.7	(1.8)	13.9 ± 2.1	(0.9)	23.9 ± 1.3	(1.6)	7.5 ± 0.6	(0.5)

<sup>a</sup>16 h light, 8 h dark.  
<sup>b</sup>Duplicate 25-ml cultures for each concentration containing 5 × 10<sup>5</sup> cells/ml at 0 time.  
<sup>c</sup>Mean ± S.E. (n = 4).  
<sup>d</sup>Percent of total activity extracted.

### 1.3.3. Características generales de los metabolitos de los HAP's.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) de 4 o más anillos y sus metabolitos son considerados como los de más grave riesgo para la salud humana debido a su toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. El BaP es clasificado en el grupo 1 por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) de E.U. por ser uno de los más carcinogénicos, este compuesto puede ser metabolizado en diversos tejidos, y sus metabolitos podrían estar también involucrados en la aparición de procesos cancerígenos. El primer paso del metabolismo del BaP es catalizado por el sistema del citocromo P450 (fase I), dando lugar a la formación de epóxidos y grupos fenólicos en diferentes posiciones de la estructura policíclica. Estos metabolitos a su vez pueden producir quinonas, dihidrodioles o ser conjugados por enzimas de la fase II, estos conjugados son más solubles en agua (glutatión, glucoronico y conjugados de sulfato). Los dihidrodioles una vez oxidados por el citocromo P-450, producen dihidroepóxidos, en particular el 7,8-diol-9,10-epóxido BaP, este metabolito puede ser reactivo con grupos nucleofílicos de macromoléculas tales como proteínas y ADN (*Jacques, 2010*). En la figura 1.4 se presentan las estructuras de los metabolitos del BaP, producto de su degradación. Como se observa muchos de estos metabolitos tienen estructuras muy similares y propiedades físicas que complican su análisis e interpretación. En la literatura se encuentran reportadas algunas de las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos del BaP, que se reportan en la tabla 1.5 (*Longfellow, 1993*).

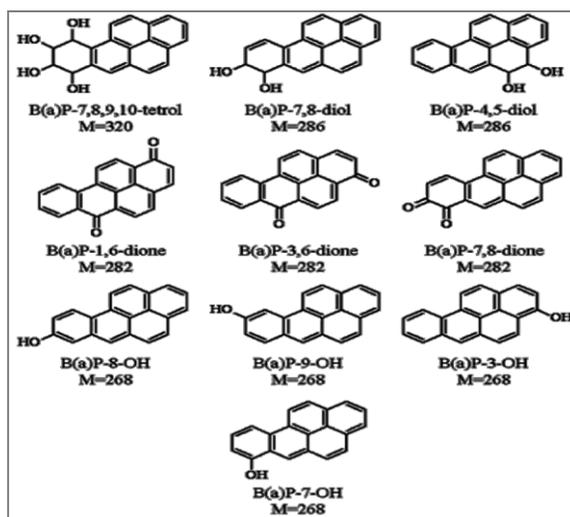


Figura 1.4. Estructura y peso molecular (M) de los metabolitos del BaP (*Jacques, 2010*)

Tabla 1.5. Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos del BaP.

Nombre y estructura	PM (g/ mol)	Estado físico	p.f. °C	Solubilidad en:	Estabilidad
4,5-cis-dihidrodiol BaP	286.3	Polvo blanco	213	Acetona, tetrahidrofurano, metanol y benceno.	Sensible al calor, luz y aire.
7,8-cis-dihidrodiol BaP	283.6	Sólido gris-negro	201 - 203	Acetona, etanol, metanol y tetrahidrofurano	Sensible al calor, luz y aire; inestable si se almacena por largos periodos en solución.
9,10-trans-dihidrodiol BaP	283.6	Sólido blanco	209 - 210	Dimetilsulfóxido, cloroformo, metanol y acetona	Sensible al calor, luz, aire, ácidos y bases.
7,t-8-dihidrodiol-t-9,10-epóxido BaP (anti)	302.3	Sólido blanco	205 - 207	Tetrahidrofurano	Sensible al calor, luz, aire y ácido.
4,5-dihidroepóxido BaP	268.3	Polvo blanco	174 - 177	Tetrahidrofurano y cloroformo	Sensible al calor, luz, aire y ácido; inestable en disolventes próticos.
7,8-dihidroepóxido BaP	268.3	Polvo blanco	>300	Tetrahidrofurano y acetona	Sensible al calor, luz y aire.
1.6- diona BaP	282.3	Agujas doradas-anaranjadas	277 - 278	Cloruro de metileno, acetato de etilo y cloroformo.	Sensible al calor, luz y aire; inestable en tetrahidrofurano.
3,6-diona BaP	282.3	Polvo rojo	282 - 283	Cloruro de metileno, dimetilsulfóxido y cloroformo	Sensible al calor, luz y aire.
7,8-diona BaP	250 - 251	Polvo negro		Xilenos; ligeramente soluble en cloroformo y tolueno.	Sensible al calor, luz y aire; inestable en disolventes próticos.
1-OH BaP	268.3	Polvo blanco	265 - 268	Metanol, tetrahidrofurano, benceno, acetona y acetato de etilo.	Sensible al calor, luz, aire y bases.
3-OH BaP	268.3	Agujas ligeramente amarillas	209 - 210	Cloroformo, acetona, benceno y otros solventes orgánicos.	Sensible al calor, luz y aire.
7-OH BaP	268.3	Agujas amarillas	216 - 217	Metanol y benceno	Sensible al calor, luz, aire y bases.
9-OH BaP	268.3	Sólidos cristalinos amarillos	201 - 202	Benceno, tetrahidrofurano y acetoneitrilo.	Sensible al calor, luz y aire; inestable en soluciones de tetrahidrofurano.
11-OH BaP	268.3	Sólido amarillo	225 - 227	Soluble en metanol y benceno.	Sensible al calor, luz y aire.
12-OH BaP	268.3	Polvo blanco	233 - 235	Soluble en metanol y acetona	Sensible al calor, luz y aire.

PM= Peso molecular, P.f.= Punto de fusión

#### **1.4. Características de las microalgas.**

Las microalgas son conocidas desde la antigüedad por pueblos como los griegos, romanos y chinos, los cuales las utilizaban como alimento o productos terapéuticos. En México, los aztecas las conocían con los nombres de amoxtle, tecuitlatl o tecuitlate. En general se puede decir que se trata de organismos microscópicos fotosintéticos, es decir, capaces de producir oxígeno a partir de la radiación solar, gracias a estructuras llamadas cloroplastos en las que se encuentran diversos pigmentos como clorofilas, ficobilinas, carotenos y xantofilas, capaces de captar la luz solar. Las microalgas juegan un papel importante en el tratamiento de aguas residuales, pueden apoyar en la degradación aeróbica de diversos contaminantes peligrosos (López-Adrian, 2005).

Los cuerpos de agua albergan una gran diversidad de organismos, entre los cuales sobresalen las microalgas. Las microalgas se separan en diversos grupos o divisiones de acuerdo a los pigmentos que les dan un color característico y en menor medida, a su organización estructural y forma.

Las cianofitas (Cyanophyta o Cyanoprokariota) son llamadas cianobacterias o algas verde-azules, éstas tienen dos pigmentos conocidos como ficocianina y ficoeritrina. Estas algas son importantes por su diversidad en el agua dulce y salada.

Otros grupos importantes son las algas verdes o clorofíceas (Chlorophyta), que presentan coloración verde debido a la presencia de la clorofila, carotenoides y xantofilas, y las algas rojas (Rodophytas) cuyos pigmentos fotosintéticos incluyen clorofila y tres tipos de ficobilinas (ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina).

A continuación se describe en detalle las características de las microalgas en estudio.

##### **1.4.1. *Selenastrum capricornutum*.**

El género y la especie *Selenastrum capricornutum* fueron modificados formalmente a *Pseudokirchneriella subcapitata* (Hindak, 1990); sin embargo, para mantener consistencia con la literatura que la refiere, se empleará en el manuscrito como *Selenastrum capricornutum*.

*Selenastrum capricornutum* pertenece a la división de Chlorophycota, clase Chlorophyceae y familia Scenedesmaceae. Es una alga verde (con clorofila) unicelular de agua dulce con forma de media luna (ver figura 1.5). El organismo ha recibido mucha atención debido a su presencia en todas partes, se cultiva fácilmente en condiciones autótrofas. Entonces, se pueden encontrar en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos. *Selenastrum capricornutum* es de gran importancia por su gran eficiencia en la retención HAP's de alto peso molecular (HMW) como FLA, PYR y BaP a partir de soluciones acuosas (Ke, 2010; Chan, 2006).



Figura 1.5. *Selenastrum capricornutum* (<http://www.mokkka.hu/drupal/en/keptar/4192>).

#### 1.4.2. *Scenedesmus acutus*.

La microalga *Scenedesmus acutus* es también conocida como *Scenedesmus. obliquus* (Hegewald 1989). Es una microalga de agua dulce.

El género *Scenedesmus* es un miembro del Phylum Chlorophyta del orden Chlorococcales y la familia Scenedesmaceae. Se producen como colonias planas de 2, 4 u 8 células dispuestas en una fila, aunque puede haber una sola fila de 12 células. Las células son ovales, fusiformes o forma de media luna de acuerdo a la especie. En algunos casos hay 2 formas de las células en la misma colonia (coenobe). Los individuos en el exterior de la fila a menudo son semilunares ver figura 1.6. Cada célula tiene un cloroplasto parietal en forma de placa y por lo general un pirenoide (un gránulo de proteínas y el sitio de la formación del almidón). Las células son de 5-30 mm de largo. El método normal de la reproducción es asexual ([www.microscopy-uk.org.uk](http://www.microscopy-uk.org.uk)).

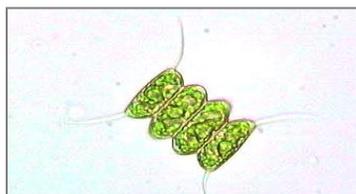


Figura 1.6. *Scenedesmus acutus*

### **1.5. Contaminantes orgánicos y microorganismos.**

Los compuestos orgánicos persistentes como los bifenilos policlorados (PCBs), plaguicidas organoclorados (OCP), dibenzo-p-diocinas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) entre otros, son compuestos que poseen propiedades tóxicas y resistentes a la degradación se bioacumulan a lo largo de la cadena trófica para ser transportados por el aire o el agua; en consecuencia se depositan lejos del lugar de su liberación, acumulándose en ecosistemas terrestres y acuáticos (*Gómez, 2006*).

La capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, algas, hongos y levaduras) para degradar estos contaminantes, ha sido considerada como una alternativa potencial para contribuir a la disminución de sus niveles en el ambiente. La habilidad de los microorganismos para degradar compuestos orgánicos en agua, aguas residuales, sedimentos y ambientes marinos ha sido documentada. La presencia de microorganismos en estos ambientes, así como la probabilidad de favorecer su desarrollo puede ser conveniente cuando se piensa en la biodegradación como una opción para el tratamiento de sitios contaminados (*Carrillo-Pérez, 2004*).

La utilización de la técnica de biorremediación es una herramienta efectiva para el tratamiento de compuestos tóxicos, debido a su bajo costo e impacto limitado al medio ambiente ya que es más rentable que los procesos abióticos, tales como la radiación ultravioleta, oxidación química y adsorción en adsorbentes como carbón activado o filtros de tela (*Chan, 2006*).

La mayoría de los trabajos que se han reportado en la literatura con respecto a microorganismos y contaminantes orgánicos están relacionados con su capacidad para degradar contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, herbicidas, plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados etc. (*Levin, 2003; Gómez, 2006; Kolar, 2007*).

En la tabla 1.6 se presenta una recopilación de trabajos en donde se relacionan los microorganismos que tienen la capacidad de eliminar o biodegradar contaminantes orgánicos, entre los que se encuentran HAP's, DDT, triazinas, PCBs e hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Estos estudios se enfocan en determinar cómo se degradan

estos contaminantes dependiendo del medio en que se encuentran, ya sea mediante la formación de sus correspondientes metabolitos o por la desaparición de los compuestos en el medio de estudio. En el caso de la degradación del Fenantreno, Fluoreno y Pireno, una vez metabolizado por *Selenastrum capricornutum* se determinó la formación de los siguientes metabolitos: 4-monohidroxifenantrenos, 2-hidroxifenantrenos y 3-hidroxilados (No. de ref. 5).

En los demás estudios realizados sólo se determinó la capacidad de las bacterias para degradar HAP's (No. de ref. 3, 6 y 7), DDT (No. de ref. 6), plaguicidas (No. de ref. 9), PBCs (No. de ref. 8) y triazinas, atriazinas y terbutrin (No. de ref. 4). Los hongos son otro grupo de microorganismos que se demostró tienen la capacidad de degradación HAP's (No. de ref. 1 y 2), hidrocarburos totales (No. de ref. 7) y plaguicidas (No. de ref. 9).

Con respecto al análisis de los contaminantes aquí presentados no se realizó como tal en los microorganismos, en la mayoría de los casos éste se llevó a cabo en el medio de cultivo, agua, suelo o sedimento donde se encontraban presentes los microorganismos con los contaminantes; las técnicas de extracción usadas fueron utilizando un disolvente orgánico (acetato de etilo o cloruro de metileno), en estos casos no se reportó como tal una técnica sólo se menciona una simple homogeneización de la muestra con un disolvente (No. de ref. 1, 2 y 8); en otros trabajos se utilizó la extracción con Soxhlet (No. de ref. 3 y 7), la extracción en fase sólida (EFS) con sílice C-18 (No. de ref. 4 y 9) y la microextracción en fase sólida (MEFS) (No. de ref. 5 y 7).

Los extractos obtenidos para determinar los metabolitos formados por la degradación de estos compuestos o para determinar el porcentaje de BaP que no fue degradado, se analizaron por CLAR-DF, CG-DIF o CG-MS.

**Tabla 1.6.** Publicaciones de contaminantes orgánicos en microorganismos.

No. de ref.	Microorganismo	Matriz analizada	Analito	Estudio	Extracción	Técnica de análisis	Ref. Año
1	40 especies de hongos <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Emericella nidulans</i> , <i>Ulocladium chartarum</i> CS, <i>Absidia cylindrospora</i> CS <i>Aspergillus niger</i> NCS	Aguas residuales	Antraceno Fluoranteno (HAP's)	Determinar la capacidad de los hongos para degradar los HAP's en aguas contaminadas.	Acetato de etilo	CLAR-DF	Girau y Col. (2001)
2	<i>Trametes trogii</i> (hongos)	Medio de cultivo (glucosa/asparagina)	Nitrobenceno Antraceno (HAP's)	Capacidad de degradar in vitro concentraciones de 250 – 500 ppm de estos compuestos.	Cloruro de metileno	CG-MS	Levin y col. (2003)
3	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (bacteria)	Suelo contaminado	HAP's	La degradación de HAP por este microorganismo incluidos los HAP's de alto peso molecular como el BaP.	Extracción con Soxhlet (diclorometano)	CG-DIF	Potin y col. (2004)
4	<i>Chlorella vulgaris</i> (microalga) <i>Synechococcus elongatus</i> . (cianobacteria)	Extracto de las microalgas	Triazina, atriazina y terbutrin (Herbicidas)	Determinar la capacidad de bioacumulación de estos organismos de los contaminantes.	EFS C-18 Elución con acetato de etilo:acetoni-trilo.	GC-MS	González-Barreiro (2006)
5	<i>Selenastrum capricornutum</i> (microalga)	Cultivo líquido de las microalgas	Fenantreno Fluoranteno Pireno (HAP's)	Determinar la capacidad de eliminación y degradación de los HAP's y la formación de los siguientes metabolitos: 4-monohidroxifenantrenos 2-hidroxifenantrenos 3-hidroxilados	Elución con Acetato de etilo (para extraer los HAP's no degradados). MEFS (poliacrilamida)	(CG-DIF) CG/MS	Chan y col. (2006)
6	<i>Acinetobacterias</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Ralstonia</i>	Sedimento	DDT y Aldrin (plagicidas organoclorados) Hidrocarburos (crudo, y ACPM)	Determinar la capacidad de degradar dos COP, DDT e hidrocarburos del ACPM por cultivos mixtos formados a partir de bacterias.	-	-	Gómez y col. (2006)

Tabla 1.6. Publicaciones de contaminantes orgánicos en microorganismos. (Continuación)

No. de ref.	Microorganismo	Matriz analizada	Analito	Estudio	Extracción	Técnica de análisis	Ref. Año
7	<i>Rhizopus sp.</i> <i>Penicillium Funiculosum.</i> <i>Aspergillus sydowii.</i>	Suelo	Mezcla compleja de hidrocarburos totales del petróleo que representa el 40% de hidrocarburos alifáticos y 21% de los HAP	Observar el efecto del tratamiento combinado de bioestimulación - bioaumentación para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.	Sólido - líquido con sistema Soxhlet / MEFS	CG	Mancera-López y col. (2007)
8	<i>Rhodococcus erythropolis</i> y <i>Rhodococcus ruber</i>	Sedimento marino	Bifenilos policlorados (PBCs)	Determinar el potencial catabólico de bacterias para la degradación aeróbica de estos compuestos.	Sonicación en baño de ultrasonido (n Hexano).	GC-MS	Kolar y col. (2007)
9	Bacterias promotoras del crecimiento de plantas ( <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Klebsiilense pneumoneae</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Bacillus polymyxa</i> ). Hongos controladores de patógenos <i>Trichoderma viride</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	Medio de cultivo de los microorganismos.	Dicofol (DCF) (plaguicida)	Determinar la capacidad de estas bacterias y hongos para degradar el plaguicida.	EFS BAKERBOND spe™, C-18. Elución con Cloruro de metileno.	CLAR	Osman y col. (2008)

GC-MS= Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas, CG-DIF = Cromatografía de Gases - Detección de Ionización en Flama, CLAR-DF= Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección de Fluorescencia, Dicofol (DCF)= [2,2,2-tricloro-1,1-bis-(4-clorofenil) etano], MEFS = Micoextracción en Fase Sólida, DDT = 1,1,1 - Tricloro - 2.2 bis - [p-clorofenil] etano]

### **1.6. Métodos para la extracción de contaminantes orgánicos en muestras ambientales.**

El análisis de las muestras ambientales se subdivide en dos etapas: el análisis instrumental y la preparación de la muestra. La capacidad de la instrumentación analítica disponible actualmente, hace posible detectar contaminantes en muestras medioambientales en concentraciones de trazas o ultratrazas, aunque el lograrlo depende en la mayoría de las veces de que se tomen precauciones especiales en los procesos de extracción y purificación. La preparación de la muestra es un parámetro crítico para la determinación de contaminantes orgánicos convencionales en muestras ambientales (agua, suelo, sedimentos y biota), éstos incluyen numerosos pasos relevantes para la separación selectiva de los compuestos de interés. Es importante que la preparación de la muestra se efectúe de una forma adecuada antes de que la muestra llegue al detector, ya que en el análisis de matrices complejas como la biota, los analitos de interés se encuentran en bajas concentraciones y deben de ser identificados y/o cuantificados en presencia de otros compuestos estrechamente relacionados y en su mayoría en concentraciones mucho más elevadas. La preparación de la muestra es el eslabón más delicado en el método global de análisis, representando dos tercios del mismo; también es la principal fuente de error y discrepancia entre los laboratorios. La preparación de la muestra adecuada es importante para llevar a cabo con éxito el análisis instrumental final. Las diferentes técnicas aplicadas en los protocolos de preparación de muestras tienen objetivos comunes como: extraer los analitos de la matriz, para llevarlos a niveles de concentración adecuada, eliminar las posibles interferencias (paso de limpieza) y cuando se requiera convertir los analitos en una forma más adecuada para la detección o la separación (*Ahmed, 2003; Fidalgo-Used, 2007*).

Las técnicas de extracción de contaminantes más comunes para matrices sólidas y semisólidas son la extracción Soxhlet (es el método oficial más utilizado), éste se basa en la extracción continua y exhaustiva de compuestos orgánicos polares y no polares a través en un sistema en continuo; las desventajas de esta técnica son los largos periodos de extracción, que pueden llegar a ser desde 3 h hasta 4 días, además de requerir grandes cantidades de disolventes que después deben de evaporarse para

concentrar los analitos. Actualmente la extracción en Soxhlet se sigue empleando en varios análisis; sin embargo, ha sido desplazada por técnicas mucho más eficientes.

Las técnicas modernas de extracción se enfocan a la disminución del tiempo de extracción, en la generación de menor cantidad de residuos y el empleo de pequeños volúmenes de disolventes orgánicos; algunas de estas técnicas de extracción son: La extracción por fluido supercrítico (SFE, por sus siglas en inglés), la extracción por líquidos presurizados (ELP), estas técnicas tienen la desventaja de que requieren de equipos cuyos costos de adquisición, mantenimiento y operación resultan ser más elevados y la ventaja es que permite una extracción rápida y uso de pequeños volúmenes de disolventes. Otras técnicas de extracción como la extracción asistida por microondas (EAM) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU), permiten una reducción drástica en los tiempos de extracción y el costo de los equipos es menor que los de SFE y ELP (*Ahmed, 2003*).

La microextracción en fase sólida (MEFS) es una técnica de extracción relativamente reciente sobre todo para matrices acuosas, ésta se basa en la adsorción de los analitos de la matriz por una fase sólida inmovilizada sobre una fibra de sílice fundida. Una vez alcanzado el equilibrio, los compuestos adsorbidos se desorben térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases o se redissuelven en un disolvente orgánico para analizarlos por HPLC. La ventaja de esta técnica es que la extracción se realiza de manera rápida y puede ser llevada a cabo sin necesidad de utilizar disolventes (*Ahmed, 2003*).

La extracción en fase sólida (EFS) es otra técnica que hoy en día es ampliamente aceptada para la extracción y limpieza de contaminantes en muestras líquidas, la ventaja de esta técnica es el corto tiempo que se utiliza para la preparación de la muestra, el uso de pequeños volúmenes de disolvente mejora la sensibilidad y capacidad de retención (*Ahmed, 2003*).

La dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) es una técnica relativamente reciente para la extracción y limpieza de muestras sólidas y semisólidas; tiene la ventaja de poder utilizar pequeñas cantidades de muestra, de adsorbente y volúmenes de disolventes pequeños, es económica y no requiere de equipos costosos.

En la siguiente sección se explicaran más detalladamente las técnicas de EFS y DMFS que son las que se utilizarán en el presente trabajo.

### **1.6.1. Principios de la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS).**

El principio de la EFS es similar a la extracción líquido-líquido (ELL) porque implica un reparto de solutos entre dos fases. Sin embargo, en lugar de dos fases inmiscibles líquidas, como en la ELL, la EFS implica repartir entre un líquido (matriz de la muestra) y una fase sólida (adsorbente). Este tratamiento de la muestra permite la concentración y purificación de analitos de manera simultánea. La EFS consiste en pasar la muestra líquida a través de una columna, un cartucho, pre-columna o un disco que contiene un adsorbente que retiene a los analitos. Los adsorbentes más utilizados son alúmina, florisil, o sílica unida a octadecil ( $C_{18}$ ), octil ( $C_8$ ). Después que toda la muestra ha sido pasada a través del adsorbente, los analitos son retenidos, posteriormente se recuperan con un disolvente apropiado (*Camel, 2003*).

Las primeras aplicaciones de la EFS empezaron en los años 50, sin embargo, su desarrollo como una alternativa a la extracción líquido-líquido para la preparación de muestras comenzó a utilizarse a mediados de 1970 para la preconcentración de micro-contaminantes orgánicos. La EFS es una técnica aceptada por la Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos de América (US Environmental Protection Agency, EPA) como un método alternativo a la extracción líquido-líquido para la preparación de muestras de agua potable y agua residual para el análisis de contaminantes orgánicos (*Hennion, 1999; Poole, 2000; Camel, 2003*).

Un método por EFS consiste básicamente en cuatro pasos sucesivos, que son los siguientes:

1. En el primer paso el adsorbente sólido debe ser acondicionado con un disolvente adecuado, seguido por el mismo disolvente en el que se encuentra la muestra. Este paso permite la humectación del material de empaque, la solvatación de los grupos funcionales, elimina posibles impurezas contenidas inicialmente en el adsorbente, además de quitar el aire presente en la columna, el volumen vacío se llena con el disolvente. La naturaleza del disolvente acondicionado depende de la naturaleza del adsorbente; para adsorbentes fase inversa (como octadecil-

enlazada a sílice) el metanol, agua o soluciones buffer cuyo pH y fuerza iónica es similar a la muestra.

2. El segundo paso es la aplicación de la muestra a través del adsorbente. Dependiendo del sistema utilizado, el volumen puede variar de 1 mL a 1 L. La muestra se puede aplicar a la columna por gravedad, bombeo, aspiración por vacío o por un sistema automatizado, la muestra se hace pasar a una velocidad de flujo en un rango entre 1 y 20 mL/min. Durante este paso los analitos se concentran en el adsorbente al igual que otros componentes de la matriz.
3. El tercer paso (es opcional) puede ser el lavado el adsorbente con un disolvente adecuado, que tiene una fuerza de elución baja para eliminar componentes de la matriz que se han retenido en el adsorbente, sin desplazar a los analitos de interés. Una etapa de secado también puede ser recomendable para las matrices acuosas, con el fin de eliminar los restos de agua del adsorbente para evitar la presencia de agua en el extracto final que pueda dificultar la posterior concentración del extracto y / o análisis.
4. El paso final consiste en la elución de los analitos de interés por un disolvente apropiado lo suficientemente fuerte para lograr la elución de los analitos. El volumen de disolventes debe ajustarse de forma que la recuperación de los analitos sea cuantitativa y de manera que el volumen de elución sea lo suficientemente pequeño para lograr altos factores de concentración de los analitos (*Camel, 2003*).

En la figura 1.7 se representa el esquema general de los 4 pasos descritos para un método general por EFS.

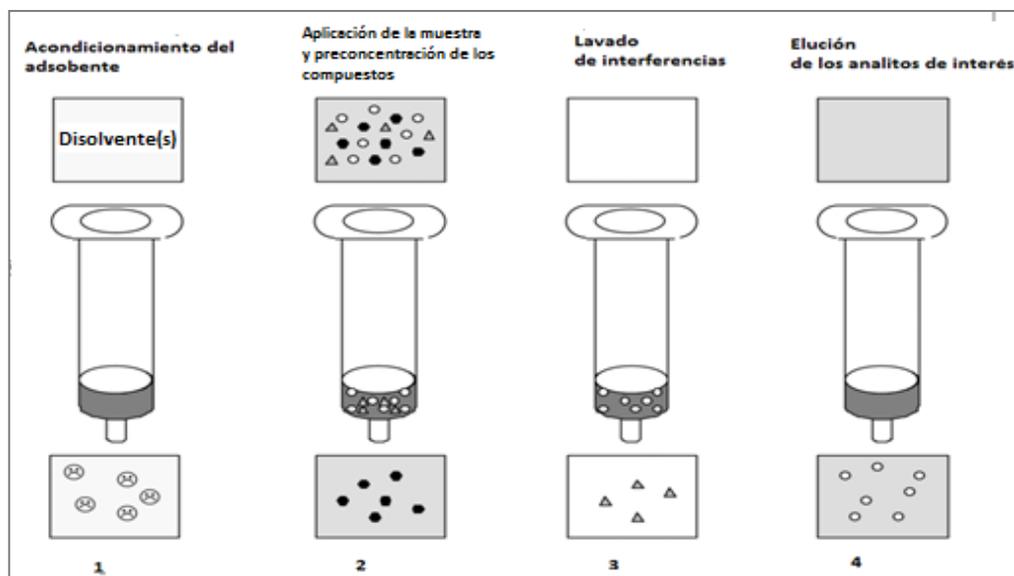


Figura 1.7. Procedimiento de la técnica de EFS (Camel V. 2003)

☹ = impurezas contenidas inicialmente en el adsorbente, ● = impurezas provenientes de la matriz no retenidas en el adsorbente, ▲ = impurezas que se retuvieron en el adsorbente y ○ = Analitos de interés.

### 1.6.1.1. Parámetros de la EFS.

El desarrollo de un método por EFS está relacionado con las propiedades de los analitos de interés, la concentración requerida a nivel de trazas, la naturaleza de la matriz, el tipo de proceso cromatográfico involucrado en la etapa de separación y el modo de detección. Para comprender el proceso de extracción, es necesario comprender también las interacciones entre el analito, la matriz y el adsorbente.

### Volumen de fuga

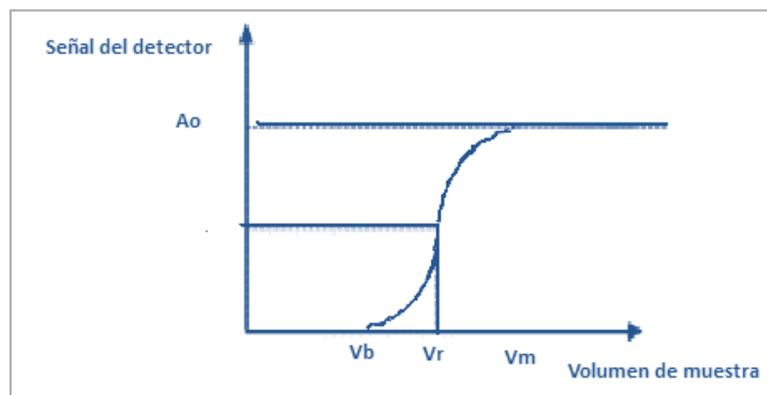


Figura 1.8. Curva típica del frente de elución de un analito a través de una precolumna conectada directamente a un detector espectrofotométrico.  $V_b$  es el volumen de fuga,  $V_r$  es el volumen de retención,  $V_m$  es el volumen de muestra correspondiente al aislamiento de la máxima cantidad de analito,  $A_o$  es la absorbancia del analito en la muestra.

En la figura 1.8 se observa la curva del perfil de fuga de un analito a una concentración traza presente en una muestra acuosa que es aplicada en una precolumna conectada directamente a un detector espectrofotométrico. El analito produce una absorbancia inicial  $A_0$ , antes de que la muestra pase por la precolumna o cartucho. Una vez que la muestra se hace pasar a través del cartucho, se monitorea el efluente; una curva de avance frontal puede ser observada y una absorbancia nula se observa al inicio lo que indica que el analito es retenido en el adsorbente, hasta el momento que éste deja de ser retenido y empieza a eluir del cartucho al sobrepasar un volumen  $V_b$  (volumen de fuga) que corresponde a 1 % de la absorbancia  $A_0$ . Se sigue monitoreando el paso de la disolución en el cartucho, observándose el aumento así de la absorbancia, en forma bilogaritmica hasta llegar a un volumen  $V_m$  (volumen máximo de pre-concentración) definido en un 99% de la absorbancia  $A_0$  donde el efluente tiene la misma señal que la inicial, lo que significa que el efluente tendrá la misma concentración que la muestra antes de ser filtrada a través del cartucho. Bajo condiciones ideales esta curva tiene forma bilogaritmica donde el punto de inflexión de la curva corresponde al volumen de retención  $V_r$  del analito analizado. Si una disolución concentrada del analito se inyecta en el sistema cromatográfico se genera un pico correspondiente a  $V_r$ , bajo las mismas condiciones cromatográficas: precolumna y eluyente agua (*Hennion, 1999; Poole, 2000*).

### **Rendimiento de la extracción.**

La recuperación del analito se define como el cociente entre la cantidad extraída, dependiente del volumen de muestra que se aplica a un cartucho o precolumna de extracción y la cantidad teórica suponiendo que la recuperación fue al 100% y que los analitos fueron retenidos y totalmente eluidos.

### **Modelos para la predicción de los volúmenes de fuga.**

Dado que la determinación experimental del volumen fuga es difícil, se han desarrollado modelos para la predicción de su valor. De acuerdo con la analogía entre la EFS y CL que permite relacionar el factor de retención ( $k'$ ) con los volúmenes de fuga o retención de los analitos en el sistema de extracción (*Hennion, 1999*).

El volumen de fuga  $V_b$  (al nivel del 1%) puede ser relacionado con el volumen de retención  $V_r$  con la siguiente relación (1):

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

Donde,  $\sigma_v$  es la desviación estándar en función de la dispersión axial a lo largo del lecho de partículas en la pre-columna o el cartucho.  $V_b$  es por lo tanto controlada por los parámetros de la retención y la cinética. Si conoce el número de platos teóricos ( $N$ ) de la precolumna o cartucho, el volumen muerto ( $V_o$ ) y el factor de retención de los solutos ( $k'$ ), el término  $\sigma_v$  puede calcularse con la relación (2):

$$\sigma_v = (V_o / \sqrt{N})(1 + k') \quad (2)$$

El término  $N$  puede ser medido directamente con pre-columnas debido a que en línea se permite el registro de la curva de fuga o de los picos de elución por inyección directa en una pre-columna. Es mucho más difícil medir la eficacia de un cartucho de EFS o de un disco de extracción, por lo que se han estudiado las características cinéticas y de retención de un cartucho de EFS con 500 mg de sílice C18, que mide un promedio de 20 platos teóricos para un flujo de 5 mL / min.

Un modelo más general y metodológico descrito para la extracción se basa en el análisis frontal de la forma propuesta por Lovkist y Jonsson. El volumen de avance está relacionado con las propiedades de los cartuchos.

$$\log V_b = \log QV_o + \log (1 + k') \quad (3)$$

Donde  $Q$  es la contribución de las propiedades cinéticas del adsorbente de retención,  $k'$  el factor de retención del analito,  $V_o$  puede calcularse a partir de la porosidad del adsorbente ( $\epsilon$ ) y el volumen geométrico ( $V_c$ ) de la precolumna o adsorbente en el cartucho o disco ( $V_o = \epsilon V_c$ ). Con valores promedio de la densidad y la porosidad de la sílice C18 utilizada en cartuchos,  $V_o$  se estima en  $0.12 \pm 0.01$  mL por cada 100 mg de adsorbente.

Esta definición matemática es similar a la procedente de la combinación de (1) y (2), el resultado se expresa con la siguiente relación:

$$V_b = V_o(1+k')(1 - 2.3/\sqrt{N})$$

### **1.6.1.2. Ventajas de EFS para el manejo de muestras líquidas.**

- No requiere de tiempos muy largos para el pretratamiento de la muestra.
- La gran variedad de condiciones de extracción que pueden ser utilizadas para lograr la separación deseada y pre-concentración mejora la sensibilidad y repetibilidad.
- Se pueden concentrar los analitos a nivel traza.
- Puede ser aplicada en el mismo lugar de muestreo, ya que la técnica es fácil de aplicar sin necesidad de transportar la muestra al laboratorio.
- Esta técnica puede ser usada en métodos automatizados de cromatografía de líquidos de alta resolución y en métodos en línea.

### **1.6.1.3. EFS de los HAP's y metabolitos.**

La aplicación de la técnica de EFS con adsorbentes de fase inversa a HAP's, que son compuestos muy hidrofóbicos, presenta problemas de adsorción que deben de tomarse en cuenta cuando se encuentran en muestras acuosas. En especial con los metabolitos de HAP's, la presencia del grupo hidroxilo (OH) hace que estos compuestos sean más polares, lo que aumenta su solubilidad en medio acuoso, estas son propiedades a tomarse en cuenta desde la toma de la muestra, almacenamiento hasta el desarrollo del método de extracción, ya que la fuerte adsorción a la superficie de los contenedores o a los cartuchos donde se realiza la extracción como consecuencia de su alta hidrofobicidad, da lugar a pérdidas considerables de los HAP's durante el almacenamiento de las muestras. Para aumentar la solubilidad y evitar la adsorción, la adición a la muestra de un disolvente orgánico como el acetonitrilo, 2-propanol o metanol o un tensoactivo es muy importante para evitar pérdidas. La concentración del disolvente orgánico es un parámetro crítico que hay que tener en cuenta, ya que si es bajo puede no ser suficiente para solubilizar los HAP's de alto peso molecular, mientras que si es alto, el volumen de fuga de los HAP más ligeros serán inevitable, provocando pérdidas; por lo tanto, éste es un parámetro que debe ser optimizado (*Marcé, 2000*). *Buseti et al., 2006*, utilizó el 2-propanol en un porcentaje de 5 y 15 %, obteniendo como resultado que con la concentración de 5% aumentaba la recuperación de los HAP's de

bajo peso molecular, mientras que con el porcentaje de 15 % aumentaba el porcentaje de recobro de los HAP's de alto peso molecular.

En la tabla 1.7 (ver página 46) se presenta una recopilación de los trabajos realizados con diferentes tipos de matrices aplicando la técnica EFS en la determinación tanto de HAP's como de sus metabolitos. Se desglosa el tipo de tratamiento para la preparación de la muestra, la cantidad de muestra, el tipo de fase utilizada, el acondicionamiento del cartucho de extracción, la limpieza de la muestra, el eluyente que se aplicó para desorber a los compuestos de interés, los métodos de detección, los recobros y límites de detección y cuantificación.

Como se observa en dicha tabla, la técnica de extracción EFS fue aplicada para la extracción tanto de HAP's como de sus metabolitos (No. de ref. 1, 2, 4, 5, 9 y 10), los cartuchos que se utilizaron fueron empacados con sílice C-18, las matrices analizadas para la extracción de los compuestos fueron orina (No. de ref. 1, 9 y 5), leche (No. de ref. 10) aceite (No. de ref. 2) y extracto proveniente de pescado (No. de ref. 4).

El tratamiento previo realizado a todas las muestras de fluidos biológicos en donde se analizan los metabolitos de HAP's y antes de aplicar la respectiva técnica de extracción, se realizó una hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucoronidasa/arilsulfatasa para obtener los metabolitos libres que se encuentren asociados a glucurónido o conjugados de sulfato. La razón por la que se encuentran asociados es porque en Fase II del metabolismo de HAP's los hidrox-HAP's reaccionan para formar glucurónido o conjugados de sulfato que son los que facilitan su excreción a través de la orina.

El pretratamiento de las muestras antes del análisis cromatográfico, fue importante para la extracción de HAP's y sus metabolitos, ya que se permite una extracción selectiva debido a la complejidad de las matrices, este paso también permitió la concentración de los analitos de interés.

El análisis de los extractos obtenidos en los diferentes estudios fue realizado por CLAR-DF, CL-MS/MS y CG-MS, en la sección 1.8. se describirá más detalladamente este punto.

### 1.6.2. Principios de la técnica Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).

La DMFS fue reportada por primera vez en 1989. Es una técnica que tiene la característica de manejar muestras sólidas, semisólidas y viscosas. (*Kristenson, 2006*).

La DMFS es una técnica que combina aspectos de varias técnicas analíticas, aunque se basa principalmente en la disgregación de la muestra y dispersión de sus componentes sobre y dentro de un soporte sólido, generando así un material cromatográfico que posee un carácter único para la extracción de compuestos de forma selectiva de la muestra dispersada (*Barker, 2007*).

Para llevar a cabo la DMFS se necesitan realizar los siguientes pasos (*Kristenson, 2006*):

1. La muestra se coloca en un mortero de vidrio o ágata y se mezcla junto con un soporte sólido (adsorbente) por lo general C8 y C18. El uso de un mortero es para obtener la disgregación homogénea de la muestra sobre las partículas del adsorbente, además de alterar la estructura de la matriz. La proporción muestra /adsorbente oscila en un rango de 1:1 a 1:4.
2. Cuando la mezcla muestra-adsorbente dispersa está completa, puede ser empacada en una columna vacía o encima de un adsorbente de EFS. La columna es a menudo un cuerpo de una jeringa vacía o un cartucho con un filtro de polipropileno, filtro de celulosa o un tapón de lana de vidrio silanizado en la parte inferior. Un segundo filtro se coloca a menudo en la parte superior de la muestra antes de la compresión con un émbolo de la jeringa, la compresión es para evitar los canales que se puedan formar en el empacado de la columna y no sobre-comprimir o compactar la materia.
3. Elución selectiva de los analitos de interés. En cuanto a la elución, hay dos posibilidades:
  - (I) Los analitos de interés son retenidos en la columna, los compuestos de interferencia se eliminan en un paso de lavado mientras, los analitos de interés son eluidos con otro disolvente, o, (II) los componentes de interferencia de la matriz son retenidos selectivamente en la columna y los analitos objetivo se eluyen directamente.

4. Finalmente, se realiza la limpieza adicional al extracto o éste se analiza directamente. A veces, la columna de MSPD se acopla en línea con una columna del EFS o como en varios usos recientes, el adsorbente de EFS como sílice o florisil se empaca en la parte inferior de la columna (co-columna) de MSPD para remover los componentes de interferencia de la matriz.

En la figura 1.9 se presenta un diagrama general del proceso de DMFS.

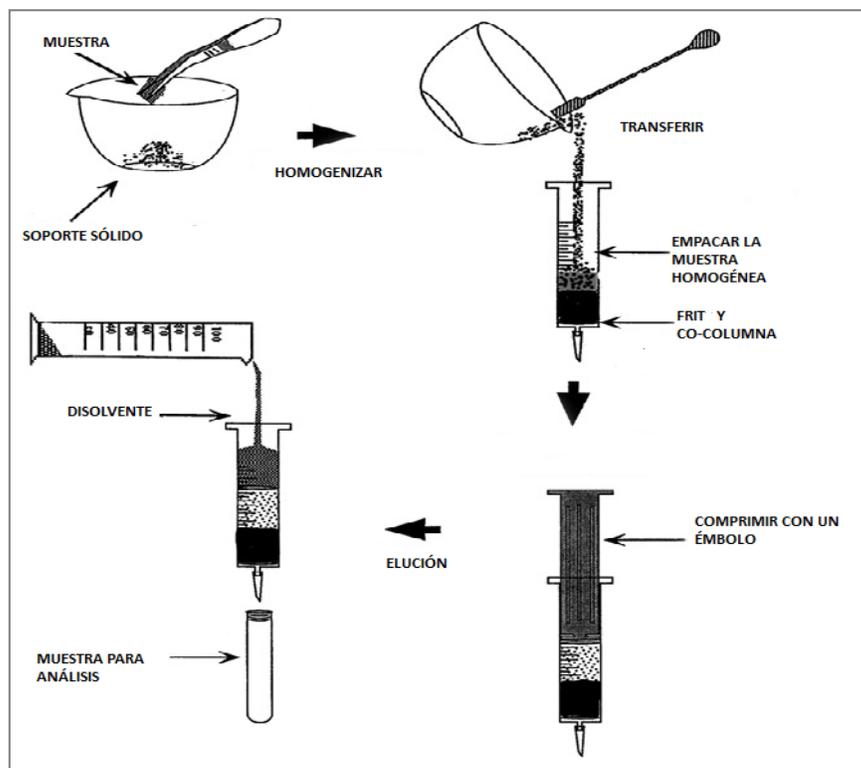


Figura 1.9. Diagrama general del proceso de DMFS (Barker, 2007).

#### 1.6.2.1. Factores que afectan la DMFS

1. **Naturaleza del soporte sólido.** Uno de los aspectos positivos de la utilización de soportes a base de sílice puede ser la presencia de silanoles no derivatizados en la superficie y en los poros del material de soporte. Estos silanoles pueden desempeñar una función importante para obtener una muestra más seca, ya que éstos forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, si la muestra es demasiado húmeda al empacar la muestra puede resultar difícil (Barker, 2000). Recientemente se ha demostrado la sustitución de C18 por sílice amino-propil o amina primaria y secundaria (PSA), adsorbentes para llevar a cabo limpieza de extractos de muestras con grasas complejas.

2. **Efecto del tamaño de partícula del soporte sólido.** Éste es importante, ya que el uso de partículas de diámetros de 3 – 20  $\mu\text{m}$  lleva tiempos de elución prolongados y la necesidad de presión excesiva o vacío para obtener un flujo adecuado. El uso de sílices de tamaño de partícula entre 40 – 100  $\mu\text{m}$  es el adecuado, además los materiales son más económicos (*Barker, 2000; Barker, 2007*).
3. **Naturaleza de la fase enlazada.** En la mayoría de los usos de DMFS se ha utilizado materiales de fase inversa como C18, C8 y C30, en la búsqueda de aislar compuestos lipofílicos. En algunos trabajos se han utilizado fases como 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 (*Barker, 2000; Barker, 2007*).
4. **El uso de sílices no derivatizadas y otros soportes sólidos.** El uso de sólidos no modificados como la arena no se trabajan de la misma forma, sin embargo, los principios base que se aplican como abrasión y disgregación de la muestra durante el proceso de mezcla, dependerá de las características químicas de la superficie de las partículas. Entre las fases utilizadas se encuentran sílice, alúmina, florisil, carbón activado y materiales poliméricos (*Barker, 2000*).
5. **Proporción entre muestra y soporte sólido.** La proporción muestra / adsorbente más común es 1:4, la relación depende de la aplicación y de la cantidad de muestra disponible, pero puede variar de un ensayo a otro (*Barker, 2007*).
6. **Naturaleza del disolvente de elución y la secuencia de adición a la columna.** La polaridad del disolvente de elución o la del soporte sólido tiene un papel importante en la determinación de lo que queda en la columna y lo que se lava. En DMFS también se debe considerar la retención y elución de los componentes de la matriz. Muchos analitos de interés se observa eluyen con los componentes de la matriz en condiciones de polaridad que no son fácilmente predecibles. La secuencia y perfil de elución que se seleccione ayudará a retener ciertos

componentes de la muestra y así se permite la elución de los analitos de interés. Esto no siempre puede llevarse a cabo y el uso de co-columnas u otras técnicas para la limpieza deben aplicarse. Sin embargo, en ocasiones el efluente puede ser lo suficientemente limpio para llevarlo directamente al análisis final.

El uso de pequeños volúmenes de disolvente es un factor a la hora de seleccionarlo entre otros por su capacidad de forma selectiva y cuantitativa de recuperar los analitos.

7. **Modificación de la matriz.** En ocasiones es necesario modificar el estado de ionización de los componentes de la muestra para asegurar que ciertas interacciones que se producen entre el soporte sólido y la muestra se modifiquen. Esto puede lograrse mediante la adición de ácidos, bases, sales, agentes quelantes, antioxidantes, etc., antes de dispersar la muestra o en el momento de la mezcla de la muestra y/o como un aditivo en el disolvente de elución para permitir que ocurra la interacción de la fase unida al soporte y el disolvente, con el fin de aumentar la eficiencia del proceso extracción (*Barker, 2007*).
8. **Estado físico de la matriz.** Debido a que la matriz se convierte en parte de la columna cromatográfica, es de esperarse que habrá variaciones en los resultados y recobros de los analitos al cambiar de una matriz a otra.  
Las muestras sólidas requieren un mayor cuidado para la selección del adsorbente, y disolvente de elución para mejorar el rendimiento de la extracción.

#### **1.6.2.2. Ventajas de la DMFS.**

- Bajos costos de extracción.
- Se pueden usar muestras pequeñas para el análisis de trazas
- No se necesitan de instrumentos costosos.
- Bajo consumo de disolventes orgánicos.
- La automatización y miniaturización con la consecuente reducción de la muestra, absorbente y el consumo de disolvente (*García-López, 2008*).
- Reducción de la manipulación de la muestra y evita la probabilidad de errores.
- En algunos casos la capacidad de integrar la extracción y limpieza en un sólo paso evita la necesidad de manipulación adicional de extractos de la muestra.

### 1.7. Principios básicos de la cromatografía de líquidos.

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación física basada en la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria y una fase móvil, que en este caso es un líquido.

La cromatografía líquida “clásica” se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase estacionaria. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se lleva a cabo haciendo pasar, mediante una bomba, un disolvente a alta presión a través de una columna que contiene partículas de fase estacionaria de un diámetro de 3 a 10  $\mu\text{m}$ . Lo más común es utilizar partículas microporosas de sílice, con una fase líquida enlazada covalentemente, como grupos octadecilo. La fuerza del eluyente es una medida de la capacidad de un disolvente dado para eluir solutos de la columna (*Sogorb-Sánchez, 2004*).

Una precolumna, que contiene la misma fase estacionaria que la columna analítica, y colocada delante de ésta, la protege de contaminantes, como partículas o solutos que se absorben irreversiblemente. Se necesita una bomba de alta calidad para obtener un flujo suave de disolvente. La válvula de inyección permite introducir la muestra de forma rápida y precisa.

La detección de los analitos de interés en cromatografía de líquidos es importante ya que los detectores son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la disolución responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, fluorescencia o intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil. Cualquier tipo de detector que se utilice debe ser sensible a pequeñas concentraciones del analito, dar una respuesta lineal y no ensanchar los picos del cromatograma (*Harris, 2001*).

Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida puede clasificarse en (Skoog, 1994):

❖ **“Cromatografía de adsorción.**

Las fuerzas fase estacionaria – soluto son de adsorción. La fase estacionaria es un sólido (sílice o alúmina) en el que los componentes de la muestra son adsorbidos. La fase móvil puede ser un líquido (cromatografía líquido-sólido) o un gas (cromatografía gas-sólido); los componentes se distribuyen entre dos fases a través de la combinación de los procesos de adsorción y desorción.

❖ **Cromatografía de reparto.**

Es el tipo de cromatografía de líquidos más utilizado. Se puede subdividir en líquido-líquido y cromatografía de fase unida químicamente, aunque el método más utilizado es la cromatografía de reparto de fase unida químicamente. Se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto.

- **Fase normal:** La fase estacionaria es polar (grupos ciano, amino y diol) y la fase móvil no polar (hexano, diclorometano, cloroformo). En esta modalidad los compuestos más polares quedan más retenidos mientras que los menos polares eluyen primero.
- **Fase inversa:** La fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar (agua, metanol, o acetonitrilo). En este caso, los compuestos más polares eluyen primero y las menos polares quedan más retenidos.

❖ **Cromatografía de intercambio iónico**

Las fuerzas fase estacionaria–soluto son iónicas, pues ambos poseen naturaleza iónica. La fase estacionaria se constituye por partículas con grupos iónicos terminales, de carga opuesta a la de los iones de soluto, inicialmente compensados con otros de carga contraria y de carga análoga al soluto. Este, se une a los grupos iónicos del relleno, intercambiándose con su contraión. Posteriormente, la fase móvil, rica en contraiones, eluye el soluto, que ya presenta retención.

**❖ Cromatografía de exclusión.**

La cromatografía de exclusión por tamaños, es una técnica que se aplica particularmente a especies de alto peso molecular. Los rellenos están constituidos por pequeñas partículas poliméricas (de unas 10  $\mu\text{m}$ ) o de sílice que contienen una red uniforme de poros en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente. En los poros, las moléculas son atrapadas efectivamente y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia en los poros depende del tamaño de las moléculas de los analitos, las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de poros del relleno son excluidas y de esta forma, no se retienen y, por lo tanto, son las primeras que eluyen. Las moléculas que tienen diámetros menores que los poros, pueden penetrar a través de los poros y así resultan atrapadas durante más tiempo; éstas son las últimas en eluir.

**❖ Cromatografía de afinidad.**

Se basa en la fijación por enlace covalente de un ligando sobre un soporte inerte, el ligando debe interactuar específicamente con la sustancia que se desea separar. Son frecuentes en este tipo de cromatografía interacciones específicas como las existentes entre un antígeno y su anticuerpo, entre una hormona y su receptor, entre una enzima y su sustrato, etc.”

A continuación se describe con mayor detalle la cromatografía de reparto en fase inversa con grupos enlazados puesto que es la que se utilizó en el presente trabajo.

**1.7.1. Cromatografía de reparto en fase inversa.**

En cromatografía de reparto la fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar. Al ser la fase estacionaria apolar, los solutos más polares eluyen primero, por el contrario los solutos menos polares, presentan mayor afinidad por la fase estacionaria, quedando más retenidos.

En fase inversa por lo general mientras más baja sea la polaridad de la fase móvil, más alta será su fuerza eluyente. Se ha determinado que la fuerza eluyente de diversos disolventes en la cromatografía de fase inversa, tiene un orden aproximadamente inverso al de la fuerza eluotrópica; por lo tanto el eluyente más débil es el agua. Los

disolventes orgánicos más populares son el metanol y el acetonitrilo, pues tiene puntos de bloqueo ultravioleta relativamente bajos, viscosidades también muy bajas y se pueden obtener con suficiente pureza. Los eluyentes de fuerza intermedia se obtienen mezclando uno de estos disolventes con agua, también se usan otros disolventes miscibles en agua y no absorbentes de ultravioleta como el dioxano, tetrahidrofurano, éter etílico y otros alcoholes. De la misma manera también se pueden agregar otros aditivos como sales inorgánicas.

La mayoría de las fases estacionarias de fase inversa, poseen núcleos de sílice, por su gran estabilidad química y sobre todo, su resistencia a altas presiones. Existen numerosos rellenos de fases inversas, con núcleos inertes de sílice recubiertos de cadenas hidrocarbonadas, alquilsilanos como octadecilo (C18), octil (C8) o butil (C4) (*García de Marina Bayo, 2008*). Las fases estacionarias apolares más habituales son las siguientes:

- Fases de octadecilo (C18). Son las más utilizadas en el 80% de las aplicaciones.
- Fases octil (C8). Alternativas a las de octadecilo, pero más polares que éstas.
- Fases alquílicas menores de cadena corta: metilo (C1), etilo (C2), butilo (C4), y hexilo (C6). Presentan interacciones polares apreciables, aunque sus grupos silanol causan pocas interacciones específicas.
- Fases fenilo. Se obtiene al ligar propilfenilsilano sobre los núcleos de sílice inerte. El conjunto resultante posee naturaleza dipolar suave que interacciona con solutos polares mediante dipolo inducido. Se suelen utilizar en separaciones complejas, con numerosos solutos. Los radicales amino interaccionan específicamente con este tipo de rellenos.

### **1.7.2. *Parámetros que influyen en la separación cromatográfica.***

“**Tiempo de retención,  $t_r$** . El tiempo que un soluto permanece en la columna, se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del pico máximo. Es característico del soluto para condiciones de operación constantes.

**Tiempo muerto,  $t_0$ .** El tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. Tiempo que un soluto permanece en fase móvil. Representa el espacio vacío de la columna.

**Número de platos teóricos (N).** Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número de platos teóricos indica la capacidad de una columna de separar los solutos mejor entre sí, por lo que N también se denomina eficiencia cromatográfica. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos. Se calcula con cualquiera de las ecuaciones:

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w_b} \right)^2 = 5.545 \left( \frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 = 2\pi \left( \frac{t_r}{\text{Area}/\text{Altura}} \right)^2$$

**La eficiencia.** Se define en base a dos términos, que son medidas cuantitativas de la eficiencia de una columna: 1º *la altura del plato H* y 2º *el número de platos N*. Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = \frac{L}{H}$$

donde *L* es la longitud (normalmente en centímetros) del relleno de la columna. De la ecuación anterior se deduce que la altura del plato *H* es:

$$H = \frac{L}{N}$$

La eficiencia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos y cuanto menor es la altura del plato. Existen diferencias en las eficacias por diferencias en el tipo de columna y/o el tipo de fases móvil y estacionaria. Las eficacias en términos de número de platos varían de cientos a miles, y las alturas de platos de unas pocas décimas a milésimas de centímetros o menos.

**Resolución.** El grado de separación o resolución de dos bandas adyacentes se define como la distancia entre los picos (o centros) dividida entre el ancho promedio de las bandas. Si la retención y el ancho de la banda se miden en unidades de tiempo, la resolución está dada por:

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Donde los tiempos de retención y los anchos ( $W_A$  y  $W_B$ ) se expresan en las mismas unidades. La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es 1.0, una resolución de 1.5 representa separación a la línea base.

**El factor de capacidad o retención  $k'$ :** es el parámetro más importante de cromatografía en columna. Relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. Para un conjunto dado de parámetros de operación,  $k'$  es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación al tiempo transcurrido en fase móvil. Se calcula con la ecuación:

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad k'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Donde  $K$  es el coeficiente de distribución de la especie A,  $V_S$  es el volumen del soluto en la fase estacionaria y  $V_M$  es el volumen de soluto en la fase móvil.

**Selectividad ( $\alpha$ ).** Se define la habilidad del sistema para separar los picos, por ejemplo la distancia entre dos picos. Una buena selectividad es un factor muy importante, mejorar la selectividad implica alterar la termodinámica del sistema cromatográfico. El factor de selectividad puede ser calculado del cromatograma usando:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad \alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad \alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Donde  $K_B$  es el coeficiente de distribución para la especie más fuertemente retenida B, y  $K_A$  es el coeficiente de distribución para la menos retenida, o que eluye con más rapidez, la especie A" (Skoog, 1994).

### 1.8. Análisis de HAP's y metabolitos por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Las dos técnicas analíticas más utilizadas para el análisis de los HAP's y sus metabolitos son la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-MS) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography) con detección por fluorescencia o por ultravioleta (CLAR-FD / CLAR-UV). Ambas técnicas están propuestas por la EPA

como los métodos oficiales 8100 y 8310 respectivamente, para análisis de HAP's en el medio ambiente. Otras técnicas son la cromatografía de fluidos supercríticos y (SFC) y electroforesis capilar (CE). Los detectores más utilizados para la detección de HAP's y sus metabolitos son de fluorescencia, UV y espectrometría de masas (*Marcé, 2000*).

La cromatografía líquida con detección por fluorescencia es la más utilizada ya que ofrece una mayor sensibilidad y selectividad para la detección de estos compuestos en matrices complejas. Aunque no compite con la cromatografía de gases en términos de alta eficiencia, la gran variedad de fases estacionarias existentes en CL son capaces de proporcionar una selectividad única para la preparación de los isómeros que normalmente son difíciles de separar en cromatografía de gases. La identificación se basa en el tiempo de retención y las propiedades de fluorescencia del compuesto de interés (o que pueden ser derivatizados y dar compuestos fluorescentes). La selección de las longitudes de onda adecuadas permite alcanzar un elevado grado de selectividad para cada HAP individual o para varios HAP's que eluyen en un tiempo próximo. El detector de arreglo de diodos (DAD) también se puede utilizar, pero con menor sensibilidad.

Por otra parte, la cromatografía de líquidos asociada a espectrometría de masas (CLAR-MS) también permite en algunos casos un análisis directo de la muestra. La espectrometría de masas acoplada permite la deducción estructural de los metabolitos detectados (*Marcé, 2000; Soriano-Sanz, 2009*).

En la tabla 1.7 se presenta una recopilación de los métodos que se han utilizado para la determinación de HAP's y sus metabolitos en diferentes tipos de matrices, se desglosa el tratamiento previo realizado a la muestra (limpieza y elución) antes del análisis por cromatografía de líquidos de los compuestos de interés, también se presentan los límites de detección y de cuantificación de los métodos utilizados.

Como se puede observar, una de las técnicas de extracción utilizadas para la extracción de los HAP's y sus metabolitos en muestras líquidas o en los extractos obtenidos a partir de muestras sólidas (No. de ref. 4), es la extracción en fase sólida (EFS), utilizando cartuchos empacados con C18 (No. Ref.1, 2, 4, 5, 9 y 10). Otras técnicas utilizadas para la extracción en muestras líquidas son: la extracción líquido-líquido (ELL) (No. de ref. 7 y 9), la nano-extracción en fase sólida (SPNE por sus siglas

en inglés) (No. de ref. 11) y la extracción líquido iónico basado en microextracción líquido-líquido (IL-DLLME) (No. de ref. 12).

En el caso del análisis de muestras sólidas las técnicas de extracción utilizadas son la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) utilizando florisil como medio de dispersión (No. de ref. 6 y 8) y la extracción líquido presurizado selectiva (ELPS) (No. de ref. 13).

En cuanto a los disolventes usados para la limpieza y elución de los HAP's y sus metabolitos se utilizó agua, mezclas de metanol:agua, N,N-dimetilformamida, metanol, cloruro de metileno, hexano, acetona y éter.

En cuanto a los recobros obtenidos éstos variaron dependiendo de la técnica de extracción utilizada, para la EFS se encontraron en el intervalo de 23 a 127 % (No. Ref.1, 2, 4, 5, 9, 10), con la técnica de DMFS los recobros se encuentran del 76 a 104 % (No. de ref. 6 y 8), cabe mencionar que estos resultados dependen del tipo de matriz analizada y del compuesto determinado.

Finalmente, el análisis de los compuestos en la mayoría de los estudios aquí presentados fue por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia (No. de ref. 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 11, 12 y 13), proporcionando límites de detección y cuantificación del orden de  $\text{ng L}^{-1}$  para muestras líquidas y de  $\text{ng g}^{-1}$ ,  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  y  $\text{pg / inyección}$  para muestras sólidas.

Otras técnicas de análisis usadas fueron la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Tabla 1.7. Publicaciones de métodos analíticos para la determinación de HAP's y sus metabolitos.

No. de ref.	Matriz	Analitos	Tratamiento previo	Extracción	Limpieza y elución	Recobro %	Análisis	L.D.	L.C.	Ref. año
1	Orina (20 mL)	3-OH BaP 3-OH-A	Hidrólisis enzimática + amortiguador de acetato de sodio con ácido ascórbico β-glucoronidasa/ arilsulfatasa Incubación 16 h a 37°C	EFS (C18)	Elución con éter	102 – 124	CLAR-DF	6 – 8 µg/L		Gündel y col. (2000)
2	Aceite comestible (0.5 g)	14 HAP	La muestra se diluyó con 5 mL de Hexano y se extrajo 2 veces con 5mL de DMF-H <sub>2</sub> O (9:1 v/v)	EFS (C18) Acondicionado. 5 mL H <sub>2</sub> O, 5 mL DMF-H <sub>2</sub> O (1:1 v/v)	Limpieza con 10 mL DMF-H <sub>2</sub> O (9:1 v/v) Elución con 4 mL DMF – H <sub>2</sub> O (1:1 v/v).	80	CLAR-DF	NR	1 – 0.3 ng / g	Barranco y col. (2003)
3	Orina (200 mL)	12 isómeros de OHBaP	Hidrólisis enzimática: 2-mercaptoetanol β-glucoronidasa/ Arilsulfatasa. Incubación 8 h a 37°C	Cromatografía en columna fase reversa tipo acrilamida	-	91 – 103 %	CLAR - DF	0.3–8 y 1 pg/ Inyectados	-	Toriba y col. (2003)
4	Bilis de pescado	OH-PAH's	Adición de PI OH.P Hidrólisis enzimática: 2-mercaptoetanol β-glucoronidasa/ Arilsulfatasa. Incubación 20 h a 37°C	EFS (C18) Acondicionado: 2 mL de MeOH y 4 mL de agua	Limpieza con 2 mL de H <sub>2</sub> O 2 mL de H <sub>2</sub> O/MeOH (30:70) Elución con 6 mL de MeOH.	36 - 96	GC/MS	NR	NR	Mazéas y col. (2005)
5	Orina (10 mL)	(1-OHP) (3-OH BaP)	Se ajustó pH a 5 + 2.5 mL de amortiguador de acetatos 0.5 M. Hidrólisis enzimática: β-glucoronidasa/ arilsulfatasa. Incubación a 37°C	EFS (C18) Acondicionado con 5 mL de metanol y 5 mL agua	Limpieza con 10 mL de agua y 30% de MeOH. Elución con 4 mL de MeOH.	60 – 91	CLAR/MS /MS	0.49 µg/L (1-OHP) 1.03 µg/L(3 OHBa P)	NR	Fan y col. (2006)

Tabla 1.7. Publicaciones de métodos analíticos para la determinación de HAP's y sus metabolitos. (Continuación)

No. de ref.	Matriz	Analitos	Tratamiento previo	Extracción	Limpieza y elución	Recobro %	Análisis	L.D.	L.C.	Ref. año
6	Suelo (0.5 g)	16 HAP's	-	DMFS (1g de Florisil)	Limpieza con Co-columna (0.5g de sílice + 0.5g de Florisil) Elución con 6 mL de hexano:acetona (1:1) 25 mL de ACN.	94-104%	CLAR-DF	0.007 – 0.2 ng g <sup>-1</sup>	0.010. 6 ng g <sup>-1</sup>	<i>Pena y col. (2007)</i>
7	Agua natural (300 mL)	15 HAP's	-	ELL con Hexano	-	80.9 – 106 %	CLAR - DF	0.033 – 0.13 ng L <sup>-1</sup>	0.11 – 0.43 ng L <sup>-1</sup>	<i>Brum y col. (2008)</i>
8	Lodos de aguas residuales (0.2 g)	17 HAP's	-	DMFS (2 g Sílice)	co-columna 1g Florisil Elución con 6 mL de DCM:MeOH (90:10 v/v)	76.3 – 103.6 %	CLAR -DF	0.00003 – 0.002 µg g <sup>-1</sup>	0.0001 -0.005 µg g <sup>-1</sup>	<i>Pena y col. (2008)</i>
9	Orina (2mL)	12 OH-HAP's	Hidrólisis enzimática: β-glucoronidasa/ arilsulfatasa Incubación 60 min a 45 °C	ELL con hexano EFS (C18) Acondicionado con 2 mL de MeOH y 2 mL de agua.	Limpieza con MeOH/agua 40:60 Elución con MeOH 4 X 2 mL	23 -127	GC/MS	NR	0.1 – 1.4 µg/L	<i>Campo y col. (2008)</i>
10	Leche (1 g) Para lactantes, para uso médico especiales, leche de continuación.	11 HAP's 1-OH pireno 3-OH BaP's	Extracción asistida por ultrasonido. Hidrólisis enzimática (para los hidroxilados) β-glucoronidasa/ sulfatasa Incubación 2 h a 37 °C	EFS (Sep-Pak sílice C18). Acondicionado: 5 mL de ACN y 10 mL de agua.	Elución con 10 mL de MeOH.	79-102 para los metabolitos  82 -116 (HAPs)	CLAR-DF CL-MS/MS	0.010 0.70 µg/Kg HAP's  0.10-0.15 µg/Kg (OH-HAP's)	0.025 – 1.7 µg/Kg  0.25 0.50 µg/Kg (OH-HAP's)	<i>Rey-Salgueiro y col. (2009)</i>

Tabla 1.7. Publicaciones de métodos analíticos para la determinación de HAP's y sus metabolitos. (Continuación)

No. de ref.	Matriz	Analitos	Tratamiento previo	Extracción	Limpieza y elución	Recobro %	Análisis	L.D.	L.C.	Ref. año
11	Agua (500 µL)	16 HAP's	-	SPNE	-	58.6 – 93.5 %	CLAR-UV CLAR-DF LETRSS	0.8 – 60 ng L <sup>-1</sup>	3 – 200 ng L <sup>-1</sup>	Wang y col. (2009)
12	Agua (grifo, embotellada, fuente, pozo, rio, pluviales, tratamiento y de materias primas) (10 mL)	18 HAP's	-	MELLD-LI [C8MiM] [PF6]	-	90.3 – 103.8 %	CLAR-DF	0.04-2.0 ng L <sup>-1</sup>	0.1 – 7 ng L <sup>-1</sup>	Penay col. (2009)
13	Lodos de agua residuales (0.2 g)	19 HAP's	Sonicación Hexano:acetona (1:1)	ELPS (SPLE) (1g Florisil + 0.5g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	co-columna (2 g sílice+ 1g Florisil) Elución con n-hexano	84.8 – 106.6 %	PTV-LVI-GC-MS/MS HPLC-DF y GC-MS/MS	0.004-0.04 µg g <sup>-1</sup> 0.00004-0.002 µg g <sup>-1</sup>	0.01-0.1 µg g <sup>-1</sup> 0.0001-0.005 µg g <sup>-1</sup>	Penay col. (2010)

ELL= Extracción Líquido-Líquido, EFS = Extracción en Fase Sólida, CLAR-DF = Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección de Fluorescencia, DMFS = Dispersión de Matriz en Fase Sólida, GC-MS/MS = Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas, CL-MS/MS = Cromatografía de Líquidos - Espectrometría de Masas, ELPS= Extracción Líquido Presurizado Selectiva, SPNE = Nano-extracción en Fase Sólida, LETRSS = Tiempo de Excitación Laser con Espectroscopia de Resolución Shpol'skii, L D.=Límite de detección, L.C. Límite de cuantificación, IL-DLLME = Líquido Iónico basado en Microextracción Líquido- Líquido, [C8MiM][PF6] = 1-octil-3-metilimidazol hexafluorofosfato, MeOH = metanol; DMF = N,N-dimetilformamida, ACN = acetonitrilo.

## Capítulo 2

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 2.1. Material y equipo

##### **2.1.1. Sistema cromatográfico.**

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (VARIAN, Palo Alto, CA, EUA), con bomba ternaria modelo 9010.
- Detector de fluorescencia VARIAN, modelo 363.
- Tarjeta de interfase VARIAN, modelo Star 800.
- Software de control y procesamiento de datos “Star Workstation” (VARIAN) versión 6.0. 1993-2003.
- Columna analítica de acero inoxidable HICHROM, SPHERISORB, de 250 X 4.6 mm d.i, empacada con sílice fase inversa RE ELUT C18 con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ .
- Precolumna de guarda de acero inoxidable Hichrom, de 13 X 4.5 mm, empacada con sílice fase inversa nucleosil C18, (Phenomenex, Torrance, CA, EUA) con tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$ .
- Bucle de inyección de 20  $\mu\text{L}$ .
- Jeringa marca Hamilton, Reno, NV, EUA, de 50  $\mu\text{L}$ .

##### **2.1.2. Materiales y equipo para la preparación de la muestra.**

- Reservorio de 6 y 1 mL Varian con filtros para empacar cartuchos para extracción en fase sólida.
- Jeringa de 20 mL, con adaptador.
- Mortero de ágata de 30 mL.
- Agitador Thermo scientific.
- Cámara de vacío con regulador de presión.

- Baño de ultrasonido para desgasificación de la fase móvil (Branson, CT, EUA.) modelo 1510.
- Centrífuga marca SIGMA, Osterode am Harz, Alemania, modelo 2-5.
- Balanza analítica, modelo AG 245 (Mettler Toledo. Suiza).
- Foco de 10 watts luz amarilla.
- Tubos para centrífuga de 15 mL.
- Micropipeta de volumen de 20 – 200  $\mu$ L (Eppendorf, Alemania).
- Micropipeta de volumen de 100 – 1000  $\mu$ L (Eppendorf, Alemania).
- Micropipeta de volumen de 2 – 20  $\mu$ L (Eppendorf, Alemania).
- Viales con tapón de rosca de 1 mL de capacidad.
- Viales con tapón de rosca de 12 mL de capacidad.
- Viales con tapón de rosca de 15 mL de capacidad.
- Matraces Erlenmeyer de 50, 250 mL.

### **2.1.3 Disolventes, reactivos y disoluciones.**

- Metanol grado cromatográfico (J.T. Baker, México).
- Acetonitrilo grado cromatográfico (J.T. Baker, México).
- Isopropanol EM Science, Darmstadt, Alemania.
- Agua grado cromatográfico purificada en sistema de micro filtración Simplicity Millipore (Francia).
- Sílice C18, Supelclean LC18 (SUPELCO, EUA).
- Sílice C18, CHROMABOND C18-PAH, Macherey – Nagel, PA, EUA con tamaño de partícula de 45  $\mu$ m.
- Medio de cultivo peptona proteosa MCD LAB
- Estándares de metabolitos del benzo[*a*]pireno:
  - 9,10-dihidrodiol-benzo[*a*]pireno, NCI Chemical Carcinogen, Reference Standard Repository, Kansas City, Missouri, EUA.
  - 4,5-dihidrodiol-benzo[*a*]pireno, NCI Chemical Carcinogen, Reference Standard Repository, (Kansas City, Missouri, EUA.

- 9-hidroxi-benzo[*a*]pireno, NCI Chemical Carcinogen, Reference Standard Repository, Kansas City, Missouri, EUA.
- 3-hidroxi-benzo[*a*]pireno, NCI Chemical Carcinogen, Reference Standard Repository, Kansas City, Missouri, EUA.

#### **2.1.4. Muestras biológicas.**

Microalgas:

- *Selenastrum capricornutum*, UTEX 1648, The Culture Collection of Algae at the University of Texas Austin TX, EUA.
- *Scenedesmus acutus*, UTEX 72, The Culture Collection of Algae at the University of Texas Austin, TX, EUA.

#### **2.1.5. Preparación de disoluciones estándar de los metabolitos de HAP's.**

Se prepararon las disoluciones madre de cada uno de los metabolitos a las siguientes concentraciones: 9,10-dihidrodiol BaP a 17 mg L<sup>-1</sup>, 4,5-dihidrodiol BaP a 500 µg L<sup>-1</sup>, 3-OH BaP a 7 mg L<sup>-1</sup> y el 9-OH BaP a 20 mg L<sup>-1</sup>, utilizando acetonitrilo como disolvente; estas disoluciones se almacenaron en frascos de vidrio color ámbar, a una temperatura de 4°.

A partir de estas disoluciones madre se preparó una disolución de trabajo constituida por una mezcla de los 4 metabolitos a una concentración de 100 µg L<sup>-1</sup>.

## 2.2. Experimentación.

### 2.2.1. Esquema general de la experimentación.

En la figura 2.1 se describe cada una de las etapas que se llevaron a cabo para desarrollar la metodología analítica.

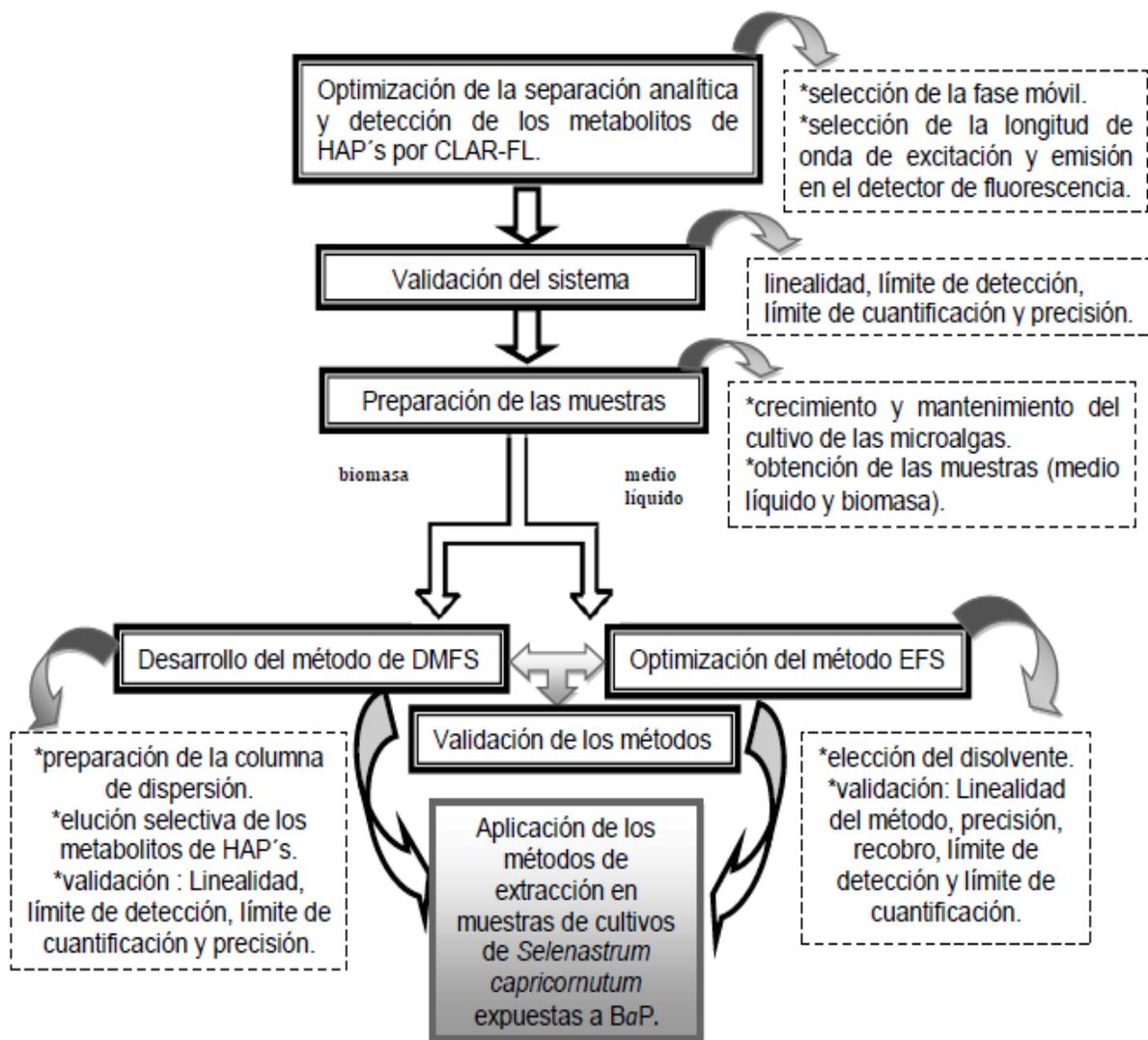


Figura 2.1. Diagrama general de la experimentación.

**2.2.2. Establecimiento de las condiciones de detección y separación analítica de los metabolitos de HAP's por CLAR-DF.**

**Condiciones óptimas detección.**

Se realizaron inyecciones de la mezcla de los 4 metabolitos a una concentración de 10 ng mL<sup>-1</sup>, en condiciones isocráticas a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> con metanol como fase móvil, variando las longitudes de excitación y emisión en el detector de fluorescencia. Se seleccionaron las condiciones en las que se presentó la mejor respuesta de cada uno de los cuatro metabolitos.

**Condiciones óptimas para la separación cromatográfica.**

Se realizaron inyecciones de la disolución de los cuatro metabolitos a una concentración de 4 ng mL<sup>-1</sup> para obtener sus respectivos tiempos de retención variando la composición de la fase móvil metanol:agua. Los diferentes porcentajes de metanol que fueron probados son: 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, 65 % y 60 %, a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Con los tiempos de retención obtenidos y con el tiempo muerto, determinado con nitrato de sodio 1 M, se calculó el factor de retención (*k'*) para cada porcentaje de metanol en la fase móvil, usando la fórmula (1). Posteriormente se determinó la dependencia de *k'* en función del porcentaje de metanol, con el gráfico de log de *k'*= f (% de metanol).

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \dots \dots (1)$$

*t<sub>r</sub>* = tiempo de retención del compuesto

*t<sub>m</sub>* = tiempo muerto

También se calculó la selectividad (*α*) para cada par de picos correspondientes a los metabolitos. Se utilizó para el cálculo la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \dots \dots (2)$$

Donde *k'<sub>1</sub>*=factor de retención del compuesto menos retenido

*k'<sub>2</sub>*=factor de retención del compuesto más retenido

Con los resultados obtenidos se establecieron las condiciones para la separación isocrática.

### **2.2.3. Validación del sistema cromatográfico.**

#### **Linealidad**

Para la determinación de la linealidad del sistema cromatográfico, se inyectó por triplicado una mezcla de los 4 metabolitos a las siguientes concentraciones 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 ng mL<sup>-1</sup>. Con las áreas obtenidas de cada pico a las concentraciones antes mencionadas se construyeron las curvas de calibración de cada metabolito y se llevó a cabo la regresión lineal mediante el ajuste de mínimos cuadrados. La linealidad del sistema se evaluó con el coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) de cada curva.

#### **Precisión**

La reproducibilidad del sistema cromatográfico se determinó en tres días diferentes realizando por triplicado la inyección de una disolución estándar de una mezcla de los 4 metabolitos a una concentración de 0.5 y 5.0 ng mL<sup>-1</sup>.

La repetibilidad del sistema cromatográfico se determinó en un mismo día realizando tres inyecciones de una disolución estándar de la mezcla de los 4 metabolitos a una concentración de 0.5 ng mL<sup>-1</sup>.

Con los resultados obtenidos de la respuesta del detector se calcularon los coeficientes de variación de cada una de las concentraciones con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Donde S = desviación estándar

$\bar{x}$  = media aritmética

#### **Límite de detección y cuantificación**

Para realizar la determinación del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) del sistema cromatográfico, se utilizaron las curvas de calibración de los metabolitos. Se determinó estadísticamente el límite de detección teórico (LDT) y límite de cuantificación (LC), con la desviación estándar de la regresión de cada compuesto, usándose las siguientes fórmulas:

$$LD = (3.3 * S_{y/x}) / b_1 \dots\dots\dots (4)$$

$$LC = (10 * S_{y/x}) / b_1 \dots\dots\dots (5)$$

Donde  $b_1$  = pendiente

$S_{y/x}$  = desviación estándar de la pendiente

El límite de detección experimental (LDE) se determinó, inyectando disoluciones estándar cada vez más diluidas, hasta que la señal de los picos fuesen 3 veces la señal del ruido de fondo.

**2.2.4. Preparación de las muestras.**

Para obtener los cultivos de las microalgas, éstas fueron tomadas de medios de cultivos sólidos con un asa bacteriológica e inoculada en 15 mL de medio de cultivo líquido Proteosa-Peptona cuya composición se especifica en la tabla 2.1. Este medio se esterilizó previamente a 121°C por 20 minutos.

Para determinar la fase de crecimiento y cantidad de microalgas presenté en el matraz de medio de cultivo, se midió la cantidad de células con la absorbancia. Para lo anterior se tomaron 5 mL del cultivo, se le midió la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 685 nm que es donde la clorofila adsorbe. La cantidad células se ajustó a una absorbancia de aproximadamente 1.0 nm para efectuar los ensayos.

Estos cultivos se incubaron durante 10 días, bajo condiciones de iluminación constante, a temperatura ambiente y en agitación constante. Después de transcurrido este tiempo fue separado el medio de cultivo líquido de las microalgas (biomasa) por medio de centrifugación a 3900 rpm durante 20 minutos.

**Tabla 2.1** Componentes para la preparación de un litro de medio proteosa-peptona.

Componentes	Concentración	Cantidad en 1 L de agua
Proteosa-Peptona	-	1 g
NaNO <sub>3</sub>	2.9 mM	10 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 mM	10 mL
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3 mM	10 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.4 mM	10 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.3 mM	10 mL
NaCl	0.4 mM	10 mL

Cada litro de medio de cultivo contiene 10 mL de las disoluciones de las sales.  
<http://web.biosci.utexas.edu/utex/default.aspx>

### **2.2.5. Acondicionamiento del adsorbente.**

La sílice C-18 PAH CHROMABOND antes de ser usada con las técnicas de EFS y DMFS fue previamente acondicionada para eliminar interferentes, solvatar las moléculas del adsorbente y de esta forma favorecer su interacción con los analitos que se quieren retener.

Para el acondicionamiento, se utilizaron cartuchos de EFS de 6 mL los cuales fueron empacados con 3 g de C-18 PAH CHROMABOND, a los que se le adicionaron 10 mL de agua, después 10 mL de metanol, se dejaron secar al vacío por 1 hora aproximadamente, una vez secos se guardó en frascos color ámbar y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso en el desarrollo de los métodos de extracción.

### **2.2.6. Optimización y validación del método de extracción en fase sólida (EFS) de los metabolitos de HAP's (BaP) en medios de cultivo líquidos.**

#### **2.2.6.1. Optimización de la preconcentración de los metabolitos.**

Para la optimización de un método de extracción de los metabolitos del benzo[a]pireno del medio de cultivo líquido se realizaron ensayos para seleccionar la cantidad de adsorbente C-18 PAH, el porcentaje de isopropanol agregado a la muestra líquida, el porcentaje y volumen de acetonitrilo para la elución de los compuestos de interés y la limpieza de interferentes.

#### **Cálculo del porcentaje de recobro.**

El análisis de cada uno de los datos obtenidos de los metabolitos se realizó a partir del cálculo del % de recobro, para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Recobro} = \frac{\text{Área del pico del analito en el extracto}}{\text{Área del pico del analito en la disolución estándar}} \times 100$$

#### **2.2.6.1.1. Elección de la cantidad de adsorbente.**

Se realizaron ensayos para la selección de la cantidad de adsorbente que se utilizó en el cartucho de EFS, de tal forma que en esa cantidad de adsorbente se retuvieran los metabolitos al aplicar los 15 mL de muestra usados en los ensayos; para ello primero se probó 250 mg de sílice C-18 PAH CHROMABOND y después 300 mg de la misma sílice

previamente acondicionada. Se seleccionó la cantidad de adsorbente más adecuada que evitará la fuga de los analitos y permitiera preconcentrar los 15 mL de muestra.

### 2.2.6.1.2. Elección del porcentaje de isopropanol.

Con la finalidad de aumentar el recobro de los metabolitos se adicionó a la muestra isopropanol como modificador orgánico, que de acuerdo con la bibliografía, es recomendado para mejorar la solubilidad de los HAP's y evitar que se adhieran a las paredes del vidrio que se utiliza para el manejo de la muestra. Para ello se realizaron dos ensayos usando 15 mL de agua millipore como muestra adicionándole 15 % y 20 % de isopropanol, ambos ensayos realizados por separado, fortificando a una concentración de  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada uno de los metabolitos, usando cartuchos de EFS empacados con 300 mg de C18-PAH CHROMABOND, eluyendo los metabolitos del cartucho con acetonitrilo al 100%. Finalmente se determinó el recobro de cada uno de los metabolitos, determinándose así el porcentaje de isopropanol más adecuado.

### 2.2.6.1.3. Optimización de la elución de los metabolitos por EFS.

Para seleccionar el porcentaje de acetonitrilo:agua apropiado para eluir selectivamente a los metabolitos del cartucho de extracción, se probaron las secuencias de elución presentadas en la tabla 2.2. Se aplicaron 15 mL de agua grado cromatográfico con 20% de isopropanol, fortificada con  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada metabolito, en cartuchos empacados con 300 mg de fase C18-PAH CHROMABOND (previamente acondicionada).

**Tabla 2.2.** Ensayos de optimización de la elución de los metabolitos de HAP's de un cartucho de EFS con 300 mg de C-18 PAH CHROMABOND.

ENSAYO	ELUYENTES	VOLUMEN
1	a) Agua	5 mL
	b) acetonitrilo al 100%	4 fracciones de 1 mL
2	a) Agua	5 mL
	b) acetonitrilo:Agua (60:40)	4 fracciones de 1 mL
	c) acetonitrilo al 100%	4 fracciones de 1 mL
3	a) Agua	5 mL
	b) acetonitrilo:agua (55:45)	4 fracciones de 1 mL
	c) acetonitrilo al 100%	4 fracciones de 1 mL
4	a) Agua	5 mL
	b) acetonitrilo:agua (50:50)	4 fracciones de 1 mL
	c) acetonitrilo al 100%	4 fracciones de 1 mL

Se analizó cada una de las fracciones de acetonitrilo y mezclas hidroorgánicas por CLAR-DF y se determinó el recobro comparando con el área de los picos obtenidos de la inyección de una disolución estándar de los metabolitos de  $15 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Se determinaron los frentes de elución de los metabolitos en cada uno de los eluyentes (salvo en el agua pura) y con ayuda de los mismos se estableció el volumen necesario para extraer a los metabolitos de los cartuchos. Se remarca que es el eluyente b de cada uno de los ensayos el que fue evaluado para el frente de elución de los analitos. La aplicación posterior de acetonitrilo al 100% (eluyente c) se utilizó para recuperar la cantidad de analitos no eluidos en b, y completar el cálculo de los recobros globales.

Cabe destacar que con los ensayos 2, 3 y 4 se planteó estudiar la elución selectiva de los metabolitos primero en una muestra constituida de agua purificada, pero una vez que se seleccionó la mejor secuencia, la que proporcionó los mejores recobros, ésta fue aplicada por triplicado a muestras reales de cultivo líquido de microalgas libre de microorganismos para evaluar el efecto de la matriz y precisión en el recobro.

#### 2.2.6.1.4. Optimización de la secuencia de limpieza.

Para establecer los disolventes para la limpieza de interferentes, se utilizaron cartuchos empacados con 300 mg de C-18 PAH CHROMABOND (previamente acondicionada). A cada cartucho se le aplicó una muestra de 15 mL de agua purificada con 20% de isopropanol, fortificada con una disolución estándar de los 4 analitos a una concentración de  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ . Posteriormente, al cartucho se le aplicaron las mezclas de acetonitrilo:agua presentadas en los 3 ensayos indicados en la tabla 2.3, para la limpieza de interferentes. Cada ensayo se realizó en diferentes cartuchos de EFS.

Tabla 2.3. Ensayos de la elección de la secuencia de limpieza con mezclas de acetonitrilo:agua.

ENSAYO	ELUYENTES	VOLUMEN
1	a) Agua	5 mL
	b) Acetonitrilo:Agua (10:90)	4 fracciones de 1 mL
	c) Acetonitrilo al 100%	2 mL
2	a) Agua	5 mL
	b) Acetonitrilo:Agua (20:80)	4 fracciones de 1 mL
	c) Acetonitrilo al 100%	2 mL
3	a) Agua	5 mL
	b) Acetonitrilo:Agua (30:70)	4 fracciones de 1 mL
	c) Acetonitrilo al 100%	2 mL

Se analizó cada una de las fracciones de acetonitrilo y mezclas hidroorgánicas por CLAR-DF y se determinó el recobro comparando con el área de los picos obtenidos de la inyección de una disolución estándar de los metabolitos a una concentración de 15 ng mL<sup>-1</sup> para fracciones de 1 mL y de 7.5 ng mL<sup>-1</sup> para fracciones de 2 mL.

En la tabla 2.3 se observa que en los ensayos 1, 2 y 3 se fue aumentando progresivamente la fuerza del eluyente b, con el fin de eliminar interferentes de mayor polaridad que los analitos, ya que estos últimos se recuperan en c posteriormente.

#### **2.2.6.2. Validación del método de determinación EFS-CLAR-DF.**

Para realizar la validación del método por EFS, se utilizaron muestras de 15 mL de medio de cultivo de microalgas libre de microorganismos, a las que se adicionó 20 % de isopropanol como modificador orgánico y se fortificó con mezcla de los 4 metabolitos para tener 5 concentraciones diferentes de 0.1, 0.2, 0.4, 0.7 y 1.0 ng mL<sup>-1</sup> de cada compuesto.

Cada muestra fue obtenida como se describe en la sección 2.2.4 y aplicada con 20 % de isopropanol a un cartucho con 300 mg de sílice C-18 PAH CHROMABOND al cual se le aplicó la secuencia de elución siguiente:

- a) 5.0 mL de agua. (desechar)
- b) 4.0 mL de acetonitrilo:agua (10:90) v/v. (desechar)
- c) 1.0 mL de acetonitrilo:agua (30:70) v/v. (desechar)
- d) 3.0 mL de acetonitrilo:agua (55:45) v/v. Fracción A: a análisis.
- e) 2.0 mL de acetonitrilo al 100 %. Fracción B: a análisis.

Los eluatos d y e se analizaron por CLAR-DF y se les identificó como fracción A y B respectivamente.

#### **Linealidad y exactitud.**

Con las áreas obtenidas de cada uno de los picos en función de la concentración, se trazaron las gráficas de respuesta en función de la concentración. Mediante el ajuste de mínimos cuadrados se determinó el coeficiente de correlación para conocer la linealidad del método.

Para la determinación de la exactitud del método se trazaron las curvas de la cantidad agregada en función de la cantidad recuperada de cada compuesto. El recobro global fue determinado con la pendiente de la recta en el intervalo de concentraciones estudiado.

### **Precisión del método.**

Para la determinación de la precisión del método se utilizó el mismo procedimiento de EFS, fortificando las muestras de medio líquido con los 4 metabolitos a una concentración de  $0.4 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Para evaluar la repetibilidad se realizaron 3 extracciones el mismo día bajo las mismas condiciones. Para la evaluación de la reproducibilidad se realizaron 3 extracciones en 3 diferentes días. Tanto para la reproducibilidad como la repetibilidad se calculó el coeficiente de variación (C.V.) parámetro de evaluación.

### **Límite de detección y límite de cuantificación.**

Para realizar la determinación del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) del método de EFS, se utilizó la curva de calibración de la linealidad del método: área del pico = f (concentración). Los límites de detección y cuantificación teóricos se calcularon con la desviación estándar de la regresión, utilizando las fórmulas 4 y 5.

El límite de detección experimental se determinó fortificando muestras a niveles de concentraciones cada vez menores, las cuales fueron sometidas al procedimiento de extracción. Se consideró el LD con la concentración en que la señal de los picos de los cromatogramas fuesen 3 veces mayor a la señal del ruido de fondo.

## ***2.2.7. Desarrollo y validación del método de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para la extracción de los metabolitos de HAP's en Selenastrum capricornutum.***

### ***2.2.7.1. Optimización de la elución selectiva de los metabolitos de HAP's.***

#### ***2.2.7.1.1. DMFS con disoluciones estándar sin muestra.***

Para efectuar ensayos preliminares sin muestra se preparó una columna de dispersión adaptando el esquema general propuesto por Barker (2000), utilizado 100 mg de sílice

C-18 PAH CHROMABOND, la cual fue fortificada a una concentración de 20 ng g<sup>-1</sup> de adsorbente de cada metabolito (2 ng totales). Posteriormente, se dejó equilibrar hasta evaporar el disolvente de la disolución estándar, se homogeneizó en un mortero de ágata y se empacó en un cartucho de 1 mL.

Ante la similitud del sistema de extracción, con la cromatografía de fase inversa y considerando los ensayos de EFS realizados anteriormente, se propuso una secuencia de elución selectiva de los metabolitos aplicando a los cartuchos de dispersión mezclas de acetonitrilo:agua de fuerza eluyente creciente. Para lograr las condiciones óptimas de elución se probaron primero eluyentes débiles para la eliminación de interferencias y eluyentes más fuertes para la posterior recuperación de los analitos. Se preparó una columna de dispersión por cada ensayo, aplicando las secuencias de elución, mostradas en la tabla 2.4.

**Tabla 2.4.** Ensayos preliminares de optimización de la elución selectiva de los metabolitos de un cartucho de DMFS con 100 mg de sílice C-18 PAH CHROMABOND.

ENSAYO	ELUYENTES	VOLUMEN
1	a) agua	5.0 mL
	b) acetonitrilo:agua (20:80)	5 fracciones de 1 mL
	c) acetonitrilo al 100%	2 fracciones de 0.5 mL
2	a) agua	5.0 mL
	b) acetonitrilo:agua (30:70)	3 fracciones de 1 mL
	c) acetonitrilo al 100%	2 fracciones de 0.5 mL
3	a) agua	5.0 mL
	b) acetonitrilo:agua (40:60)	3 fracciones de 1 mL
	c) acetonitrilo al 100%	2 fracciones de 0.5 mL

Se analizaron cada uno de los eluyentes b y c por CLAR-DF y se determinó el recobro de cada compuesto comparando con el área de los picos obtenidos con una disolución estándar de los metabolitos de 2 ng mL<sup>-1</sup> para fracciones de 1 mL y de 4 ng mL<sup>-1</sup> para fracciones de 0.5 mL.

Como se observa en la tabla 2.4 en todos los ensayos se aplicaron 5.0 mL de agua previamente a la aplicación de los eluyentes formados con mezclas acetonitrilo: agua de fuerza creciente (aumentó del porcentaje de disolvente orgánico), esto con el fin de seleccionar algunas de estas mezclas como eluyente de interferencias (clean-up) o eluyente de los analitos.

La aplicación posterior de acetonitrilo puro (c) permitió recuperar a los analitos que no fueron desorbidos con los eluyentes del tipo (b).

#### **2.2.7.1.2. DMFS con muestra de microalgas.**

Considerando que se trabajaría con muestras de microalgas (biomasa), la cual es una matriz constituida por una mezcla compleja de compuestos, incluyendo pigmentos de polaridad muy similar a los compuestos de interés, se realizó un ensayo usando 5 mg de muestra de microalgas, correspondiente a la cantidad de biomasa presente en 15 mL de medio de cultivo. Los 5 mg de muestra fueron fortificados a una concentración de  $0.4 \text{ ng mg}^{-1}$  de muestra (2 ng totales), se dejó evaporar el disolvente y se agregaron 100 mg de adsorbente C18-PAH CHROMABOND homogeneizando y dispersando, con ayuda de un mortero de ágata de acuerdo al procedimiento de Barker, 2000. Posteriormente, se empacó en un cartucho de 1 mL y se aplicó la siguiente secuencia de elución optimizada de los ensayos preliminares sin muestra:

- a) 5 mL de agua grado cromatográfico. (desechar)
- b) 5 mL de acetonitrilo:agua (20:80) v/v. (desechar)
- c) 3 fracciones de 1 mL de acetonitrilo: agua (40: 60) v/v.
- d) 2 fracciones de 0.5 mL de acetonitrilo al 100%.

Los extractos obtenidos con los eluyentes c y d se analizaron por CLAR-DF y se determinó el recobro de cada compuesto comparando con el área de los picos obtenidos con una disolución estándar de los metabolitos de  $2 \text{ ng mL}^{-1}$  para fracciones de 1 mL y de  $4 \text{ ng mL}^{-1}$  para fracciones de 0.5 mL.

#### **2.2.7.1.3. Ensayos de modificación de la matriz.**

Con el propósito de aumentar el recobro de los compuestos 3-OH BaP y 9-OH BaP, se probaron disoluciones de tensoactivos como el lauril sulfato de sodio (LSNa) 1 M y el heptasulfonato de sodio (HSNa) 1 M; también ácidos como el ácido nítrico 1 M y 0.1 M, ácido sulfúrico 1 M, ácido acético 1 M y ácido ascórbico 0.8 M, 0.6 M y 0.4 M (antioxidante).

Se utilizó 5 mg de muestra fortificada a una concentración de  $0.4 \text{ ng mg}^{-1}$ . En seguida se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de la disolución del modificador (tensoactivo o ácido), se dejó evaporar el disolvente, se agregó 100 mg de C-18 PAH CHROMABOND y se

homogeneizó y dispersó en un mortero de ágata. Posteriormente, se empacó en un cartucho de 1 mL y se aplicó la secuencia de elución siguiente:

- a) 5.0 mL de agua grado cromatográfico. (desechar)
- b) 5.0 mL de acetonitrilo:agua (20:80) v/v. (desechar)
- c) 2.0 mL de acetonitrilo:agua (40: 60) v/v. Fracción A: a análisis.
- d) 0.5 mL de acetonitrilo al 100%. Fracción B: a análisis.

Los extractos obtenidos con los eluatos c y d se analizaron por CLAR-DF. Se prepararon columnas de dispersión independientes por cada modificador probado.

Se determinó el recobro de cada compuesto comparando el área de los picos obtenidos con una disolución estándar de los metabolitos de  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  para la fracción de 2 mL y de  $4 \text{ ng mL}^{-1}$  para la fracción de 0.5 mL.

#### ***2.2.7.2. Validación del método de determinación DMFS-CLAR-DF.***

##### **Linealidad y exactitud.**

Para evaluar la linealidad del método desarrollado se realizaron 5 ensayos por triplicado, usando 100 mg de C-18 PAH CHROMABOND, más 20  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico y 5 mg muestra fortificada a 5 niveles de concentraciones de cada compuesto: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y  $1.2 \text{ ng mg}^{-1}$ . Se aplicó la siguiente secuencia de elución selectiva de los compuestos del cartucho de DMFS.

- a) 10.0 mL de agua (millipore) a desechar.
- b) 5.0 mL de acetonitrilo:agua (20:80) v/v a desechar.
- c) 1.5 mL de acetonitrilo:agua (40:60) v/v. Fracción A: a análisis.
- d) 1.0 mL de acetonitrilo: agua (90:10) v/v. Fracción B: a análisis.

Los eluatos d y e se analizaron por CLAR-DF y se les identificó como fracción A y B respectivamente. Se trazaron las gráficas de áreas de los picos cromatográficos en función de las concentraciones de los analitos, para que mediante el ajuste de mínimos cuadrados se calcularan los coeficientes de correlación que determinaron la linealidad del método.

Para la determinación de la exactitud del método se trazaron las curvas de la cantidad agregada en función de la cantidad recuperada de cada compuesto. El recobro global fue determinado con la pendiente de la recta en el intervalo de concentraciones estudiado.

### **Precisión del método**

La repetibilidad del método se determinó realizando 3 extracciones el mismo día, fortificando con los 4 metabolitos a una concentración de  $0.1 \text{ ng mg}^{-1}$  de muestra.

La reproducibilidad del método se evaluó con 3 extracciones en tres días diferentes, fortificando con los 4 metabolitos a dos niveles de concentraciones  $0.55$  y  $0.1 \text{ ng mg}^{-1}$  de muestra. Ambas, tanto la repetibilidad como reproducibilidad se evaluaron con el coeficiente de variación (C.V.).

### **Límite de detección y límite de cuantificación del método.**

Los límites de detección y cuantificación estadísticos se calcularon con la desviación estándar de la regresión, usando las fórmulas 4 y 5 (pág. 56).

Los límites de detección experimentales se determinaron fortificando a niveles de concentraciones cada vez menores hasta que la señal de los picos fue 3 veces mayor a la señal del ruido de fondo.

#### **2.2.7.3. Robustez del método de EFS y DMFS.**

Para evaluar la robustez del método de EFS y DMFS, se empleó el parámetro de la reproducibilidad de los métodos de EFS optimizado y DMFS desarrollado, utilizando medio de cultivo líquido y microalgas (biomasa) provenientes de dos diferentes especies de microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*.

De cada uno de los métodos se obtuvieron los recobros y los coeficientes de variación, los que actuaron como parámetros a evaluación.

Para comparar los recobros de los ensayos con las muestras provenientes de las dos especies de microalgas, se aplicó la prueba de t-student, esta prueba proporcionó la probabilidad de que dos conjuntos de datos sean diferentes entre sí, ello con el fin de

determinar si este método se puede aplicar a otra especie de microalga. La t-student se evaluó utilizando un nivel de confianza de 95 % y 99 %.

#### **2.2.8. Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a BaP**

Con la finalidad de estudiar cualitativamente la degradación del BaP por *Selenastrum capricornutum*, se realizaron dos ensayos a dos diferentes concentraciones de exposición. La primera se efectuó a  $1.2 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP durante intervalos de tiempo de 3, 8 y 24 h, la segunda a  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ , expuestas durante intervalos de tiempo de 3, 6 y 8 h. El volumen de medio líquido recuperado de cada ensayo fue de 15 mL y fue destinado para su determinación por el método de EFS-CLAR-DF. Esta exposición se realizó bajo condiciones de iluminación amarilla.

La degradación del BaP por *Selenastrum capricornutum* también fue estudiada aplicando el método DMFS-CLAR-DF desarrollado para la biomasa conformada por microalgas. Para esto, antes de aplicar los métodos se separó el medio líquido de la biomasa por medio de centrifugación durante 20 min a 3900 rpm. Cada uno de estos ensayos fue realizado por duplicado.

Bajo las mismas condiciones de concentración y tiempos de exposición se analizaron muestras control, una de ellas fue medio de cultivo sin microorganismos pero con BaP, con el fin de evaluar el efecto de desorción y poder cuantificar, la otra fue una muestra de cultivo de microalgas no expuesta a BaP, éstas recibieron el mismo tratamiento y fueron denominadas como blanco (sólo el medio en que se cultivaron las microalgas, más BaP) y control (microalgas no expuestas al BaP). Al mismo tiempo se evaluó la desaparición del benzo[a]pireno en el medio líquido y en las microalgas (biomasa), así como la posible aparición de los metabolitos en el medio líquido y biomasa.

Cada uno de los extractos obtenidos se analizó por CLAR-DF

## Capítulo 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Establecimiento de las condiciones de detección y separación analítica de los metabolitos de HAP's por CLAR-DF.

##### Condiciones óptimas de detección.

Con el detector de fluorescencia se seleccionó la longitud de onda óptima de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y de emisión ( $\lambda_{em}$ ) para cada uno de los metabolitos.

Las longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) que se probaron fueron 263 y 284 y las longitudes de onda de emisión fueron 410 y 430, de acuerdo a los espectros mostrados en el anexo III.

Las longitudes de onda que presentaron la mejor respuesta fueron seleccionadas y se presentan en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Longitudes de onda de excitación y emisión óptimas de cada uno de los metabolitos de HAP's estudiados.

Compuesto	$\lambda_{ex}$ nm	$\lambda_{em}$ nm
9,10-dihidrodiol benzo[a]pireno	263	430
4,5-dihidrodiol benzo[a]pireno	263	430
9-OH-benzo[a]pireno	263	430
3-OH-benzo[a]pireno	263	430

##### Condiciones óptimas para la separación cromatográfica.

En la tabla 3.2 se muestran los tiempos de retención de los metabolitos a los diferentes porcentajes de metanol:agua en la fase móvil. Con estos resultados se determinó el factor de capacidad ( $K'$ ) de cada compuesto.

Los compuestos se encuentran ordenados en la tabla 1.2 según su orden de elución.

**Tabla 3.2.** Tiempos de retención,  $k'$  y log de  $k'$  de cada compuesto en estudio en la columna C-18, a diferentes porcentajes de metanol:agua en la fase móvil.

Porcentaje de metanol en mezcla metanol: agua	9,10-dihidrodiol BaP			4,5- dihidrodiol BaP			9-OH-BaP			3-OH-BaP		
	$t_r$ (min)	$k'$	Log $k'$	$t_r$ (min)	$k'$	Log $k'$	$t_r$ (min)	$k'$	Log $k'$	$t_r$ (min)	$k'$	Log $k'$
95	3.10	1.34	0.14	3.94	2.03	0.31	6.47	3.98	0.59	7.17	4.52	0.65
90	3.17	1.44	0.16	4.03	2.1	0.32	7.95	5.115	0.71	9.14	6.03	0.78
85	3.50	1.69	0.23	5.05	2.88	0.46	12.71	8.77	0.94	15.23	10.72	1.03
80	3.91	2.01	0.30	6.52	4.02	0.60	20.65	14.88	1.17	25.70	18.77	1.27
70	5.07	2.90	0.46	9.87	6.59	0.82	ND	ND	ND	ND	ND	ND
65	6.43	3.95	0.59	14.8	10.39	1.02	ND	ND	ND	ND	ND	ND
60	9.75	6.5	0.81	27.0	19.77	1.29	ND	ND	ND	ND	ND	ND

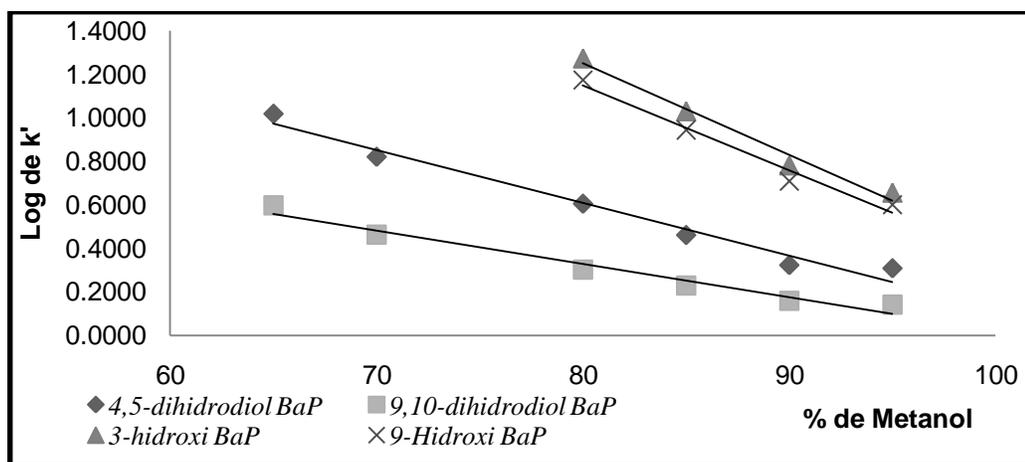
ND= No se determinó.

En la tabla 3.3 se muestra el valor del factor de selectividad de los metabolitos y como se observa éste es mayor a 1 indicando buena selectividad para separar los picos de interés en la columna.

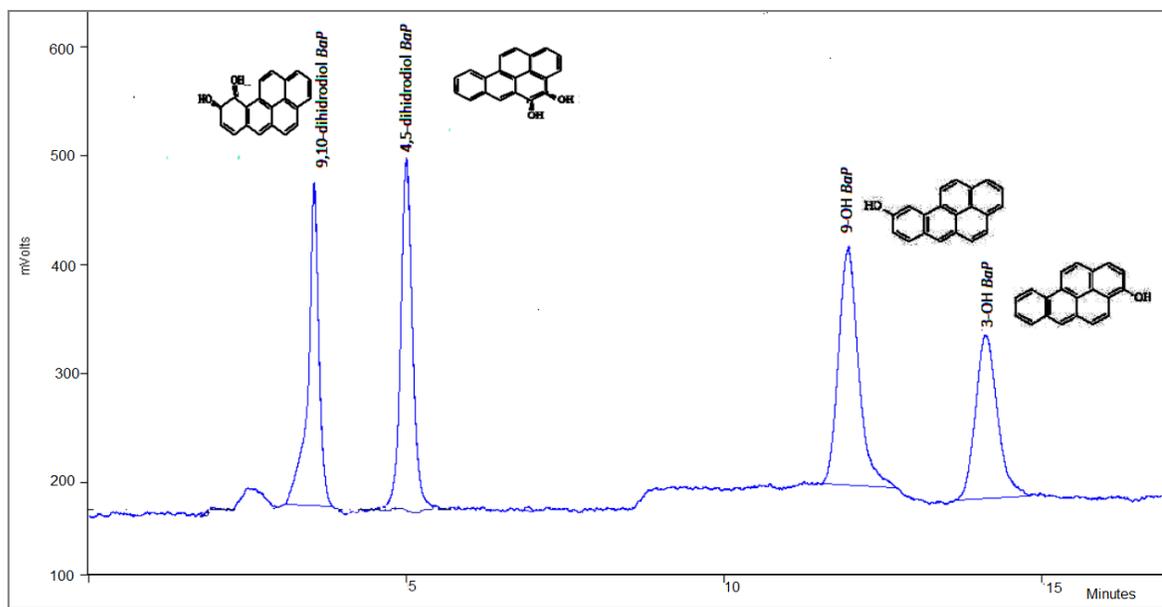
**Tabla 3.3.** Selectividad ( $\alpha$ ) de los metabolitos a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> con una fase móvil de 85% de metanol.

Par de compuestos	$\alpha$
9,10-dihidrodiol-BaP - 4,5-didrodiol-BaP	1.7
4,5-dihidrodiol-BaP - 9-OH-BaP	3.4
9-OH-BaP - 3-OH-BaP	1.2

En la figura 3.1 se presentan las curvas de la dependencia del factor de capacidad ( $k'$ ) de cada compuesto en función del porcentaje de metanol en la fase móvil. Como se observa, las curvas se muestran casi paralelas entre sí, lo que indica una buena separación entre los compuestos a estos porcentajes de metanol:agua.



**Figura 3.1** Variación del factor de capacidad ( $k'$ ) de cada metabolito de HAP's (BaP), en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.



**Figura 3.2.** Cromatograma de una disolución estándar de los cuatro metabolitos de HAP's a una concentración de 4 ng mL<sup>-1</sup>. Columna analítica HICHROM, SHERISORB de 250 x 4.6 mm d.i, empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 µm. Flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Volumen de inyección 20 µL. Fase móvil: 85% de metanol y 15 % de agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{em}$ ) 430 nm.

Realizando una comparación de los tiempos de retención entre los dihidrodiolos BaP y los hidroxilados BaP que se presentan en la tabla 3.2, se observa que al ir aumentando el porcentaje de agua en la fase móvil hay una mejor separación entre los compuestos, aunque el tiempo de análisis se incrementa mucho más drásticamente para el 9-OH BaP y el 3-OH BaP. Por esa razón, se estableció el valor de  $k'$  sólo hasta un 80% de metanol en la fase móvil.

El tiempo de retención ( $t_r$ ) del primer compuesto en eluir es de 3.5 min, lo que permite su separación de los interferentes más polares que comúnmente pueden salir al principio del cromatograma.

Considerando lo anterior, la separación analítica de los compuestos se realizó con una fase móvil de 85% de metanol a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, la cual permitió una buena resolución de todos los compuestos en un tiempo de análisis de 16 minutos. El cromatograma que se obtuvo bajo estas condiciones se muestra en figura 3.2, en donde se observa que el primer compuesto en eluir es el 9,10-dihidrodiol BaP, el segundo es el 4,5-dihidrodiol BaP, el tercero es el 9-OH BaP y el último es el 3-OH BaP. Los dihidrodiolos son los compuestos de mayor polaridad en comparación con los hidroxilados-BaP, por lo tanto son los menos retenidos en la columna.

### 3.2. Validación sistema cromatográfico.

#### Linealidad

La figura 3.3 presenta las curvas de calibración promedio de cada compuesto con sus ecuaciones y coeficientes de correlación obtenidos de graficar la respuesta del detector (área de cada pico) en función de la concentración, a cinco diferentes niveles de concentración (n=3).

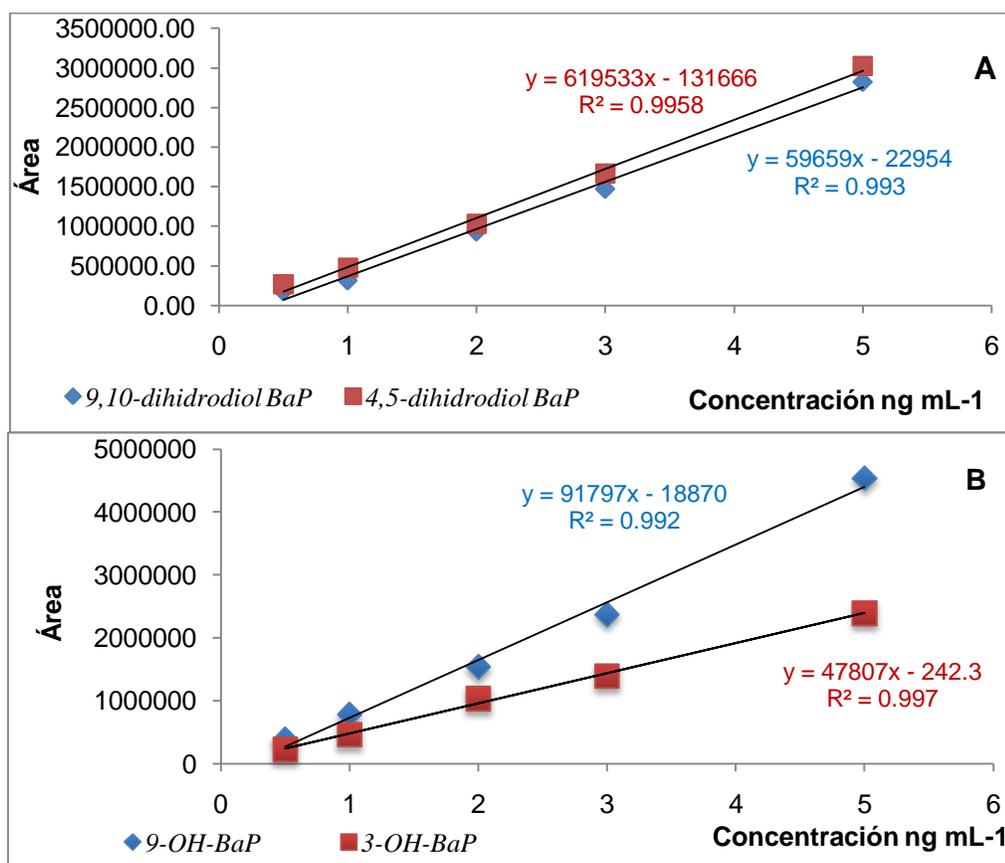


Figura 3.3. Curvas de calibración en un intervalo de concentraciones de 0.5 a 5.0. ng mL<sup>-1</sup>. **A)** 9,10-dihidrodiol benzo[a]pireno y 4,5-dihidrodiol benzo[a]pireno; **B)** 9-OH benzo[a]pireno y 3-OH benzo[a]pireno.

Con los resultados obtenidos de las curvas de calibración se puede decir que en el intervalo de 0.5 a 5.0 ng mL<sup>-1</sup> se obtiene una respuesta lineal con coeficientes de correlación (R<sup>2</sup>) por arriba de 0.99 tanto para los dihidrodiol como para los hidroxil derivados del benzo[a]pireno, con ello podemos decir que la linealidad es apropiada en este intervalo de concentraciones.

## Precisión

En la tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos de la precisión del sistema cromatográfico, representados con los coeficientes de variación obtenidos a partir de las áreas de tres inyecciones realizadas en el mismo día y en diferentes días a dos diferentes concentraciones.

**Tabla 3.4.** Precisión del sistema. Repetibilidad y reproducibilidad a dos niveles de concentración (n=3) de cada uno de los compuestos.

Compuesto	9,10-dihidrodiol BaP		4,5-dihidrodiol BaP		9-OHBaP		3-OH-BaP	
	% C.V. (mismo día)	% C.V. (días diferentes)	% C.V. (mismo día)	% C.V. (días diferentes)	% C.V. (mismo día)	% C.V. (días diferentes)	% C.V. (mismo día)	% C.V. (días diferentes)
0.5	0.80	0.90	1.03	1.25	0.8	1.19	0.89	1.46
5.0	0.69	0.73	0.55	0.6	0.5	0.55	0.95	1.09

Como se observa en la tabla 3.4 se obtuvieron coeficientes de variación menores a 1.1 % a una concentración de 5 ng mL<sup>-1</sup> y coeficientes de variación menores a 1.5 % para concentraciones de 0.5 ng mL<sup>-1</sup> para la reproducibilidad del sistema.

La repetibilidad del sistema en un mismo día presenta coeficientes de variación menores a 1% a concentraciones de 0.5 y 5.0 ng mL<sup>-1</sup>.

## Límite de detección y límite de cuantificación.

En la tabla 3.5 se muestran los límites de detección y de cuantificación estadísticos, así como los límites de detección experimentales de cada uno de los analitos. Los límites teóricos fueron estimados con las curvas de calibración, en un intervalo de concentraciones de 0.5 ng mL<sup>-1</sup> a 5 ng mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 3.5.** Límites de detección y cuantificación del sistema cromatográfico.

Compuesto	Límite de detección (ng mL <sup>-1</sup> )		Límite de cuantificación (ng mL <sup>-1</sup> ), teórico.
	Teórico	Experimental	
9,10-dihidrodiol BaP	0.4	0.3	1.4
4,5-dihidrodiol BaP	0.4	0.3	1.2
9-OH-BaP	0.5	0.4	1.6
3-OH-BaP	0.4	0.5	1.1

Intervalo de concentraciones de la curva de calibración 0.5-5.0 ng mL<sup>-1</sup> de cada uno de los analitos.

Se observa en la tabla 3.5 que los límites de detección experimentales son un poco menores que los teóricos, estimados por métodos estadísticos para todos los metabolitos, salvo para el 3-OH BaP.

Los límites de cuantificación estimados (teóricos) muestran que se encuentran por arriba de  $1.1 \text{ ng mL}^{-1}$  para cada metabolito.

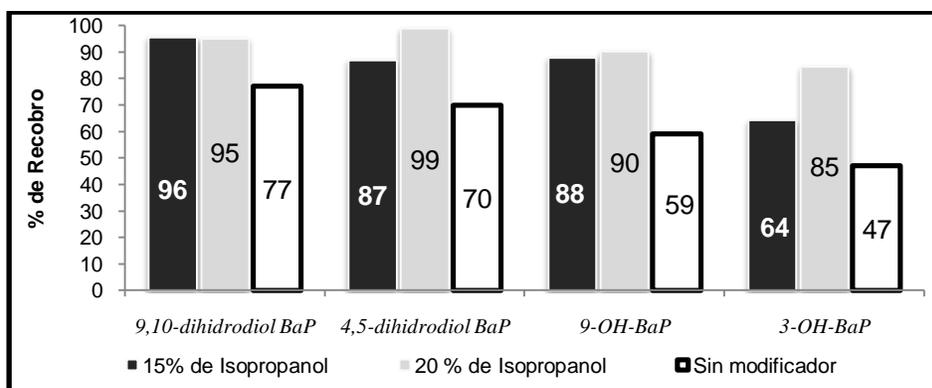
### **3.3. Optimización y validación del método de Extracción en Fase Sólida (EFS) de los metabolitos de HAP's (BaP) en medios de cultivo líquidos.**

#### **3.3.1. Optimización de la preconcentración de los metabolitos.**

La optimización del método de extracción en fase sólida (EFS) se efectuó con 15 mL de muestra. Primero, se determinó la cantidad de adsorbente necesaria para retener a los compuestos de interés. En un primer ensayo con 250 mg de fase C-18 PAH CHROMABOND, se observó que ésta cantidad no fue la adecuada, ya que se presentó fuga de los compuestos de interés, por lo cual se aumentó la cantidad de fase en la columna de extracción a 300 mg de C18-PAH, la cual fue óptima para los posteriores ensayos, ya que evitó la fuga de los analitos al preconcentrar los 15 mL de la muestra.

Posteriormente, con el fin de aumentar el recobro de los metabolitos que se encontraban entre un 77 % y 47 % (sin modificador) y evitar que éstos se adsorbieran a las paredes de vidrio que contienen la muestra, para ello se adicionó un modificador orgánico como el isopropanol en un porcentaje de 15 % y 20 %. Se observó que el recobro del 3-OH-BaP era bajo (64 %) con 15 % de isopropanol pero, cuando se aumentó la cantidad de isopropanol a un 20 % se consiguió aumentar su recobro a 85%, lo que demostró que efectivamente el isopropanol mejoró el recobro.

En la figura 3.4 se pueden comparar los recobros obtenidos para los 4 metabolitos con los dos porcentajes de isopropanol probados y de cuando no se adiciona un modificador. Se observó que con la adición del modificador se aumentó el porcentaje de recobro de los metabolitos, aún cuando no se alcanzan recobros del 100 %, si mejoran éstos.



**Figura 3.4.** Recobros EFS con 300 mg de C-18 PAH CHROMABOND a dos porcentajes de isopropanol, adicionados a 15 mL de agua millipore. La concentración de cada uno de los metabolitos es de 15 ng mL<sup>-1</sup>. Elución con acetoniitrilo al 100%.

### 3.3.1.1. Optimización de la elución de los metabolitos por EFS.

En las siguientes tablas 3.6 - 3.9 se muestran los recobros de los metabolitos obtenidos al aplicar acetoniitrilo y diferentes mezclas de acetoniitrilo:agua al cartucho de extracción después de la concentración de 15 mL de agua purificada, fortificada a 1 ng mL<sup>-1</sup>. La finalidad de estos ensayos fue encontrar el volumen y porcentaje de acetoniitrilo que se utilizaría para la elución de los metabolitos.

**Tabla 3.6.** Ensayo 1. Elución de los metabolitos con acetoniitrilo al 100% del cartucho de EFS empacado con 300 mg de C-18 PAH CHROMABOND, utilizando 15 mL muestra (agua millipore) más 20% de isopropanol, fortificada a 1 ng mL<sup>-1</sup> de cada metabolito.

COMPUESTO	Recobro %					Recobro Global %
	5 mL de agua. (eluyente a)	4 x 1 mL acetoniitrilo al 100%. (eluyente b)				
		1	2	3	4	
9,10-dihidrodiol-BaP	NI	89	6	ND	ND	95
4,5-dihidrodiol-BaP	NI	91	8	ND	ND	99
9-OH-BaP	NI	71	17	ND	ND	88
3-OH-BaP	NI	63	21	ND	ND	84

NI= no se inyectó  
ND= no se detectó

**Tabla 3.7.** Ensayo 2. Elución de los metabolitos con la mezcla acetoniitrilo:agua 60:40 v/v del cartucho de EFS empacado con 300 mg de C-18 PAH CHROMABOND, utilizando 15 mL muestra (agua millipore) más 20% de isopropanol, fortificada con 1 ng mL<sup>-1</sup> de cada metabolito.

COMPUESTO	Recobro %									Recobro Global %
	5 mL de agua (eluyente a)	4 x 1 mL acetoniitrilo:agua (60:40). (eluyente b)				4 x 1 mL acetoniitrilo al 100% (eluyente c)				
		1	1	2	3	4	1	2	3	
9,10-dihidrodiol-BaP	NI	89	5.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	89
4,5-dihidrodiol-BaP	NI	61	32	1	ND	ND	ND	ND	ND	94
9-OH-BaP	NI	ND	8	24	19	10	ND	ND	ND	61
3-OH-BaP	NI	ND	5	17	21	9	ND	ND	ND	52

NI= no se inyectó  
ND= no se detectó

**Tabla 3.8.** Ensayo 3. Elución de los metabolitos con la mezcla acetonitrilo:agua 55:45 v/v del cartucho de EFS empacado con 300 mg de C-18 PAH CHROMABOND, utilizando 15 mL muestra (agua millipore) más 20% de isopropanol, fortificada a 1 ng mL<sup>-1</sup> de cada metabolito.

COMPUESTO	Recobro %									Recobro Global %
	5 mL de agua (eluyente a)	4 x 1 mL acetonitrilo:agua (55:45). (eluyente b)				4 x 1 mL acetonitrilo al 100% (eluyente c)				
	1	1	2	3	4	1	2	3	4	
9,10-dihidrodiol-BaP	NI	67	18	6	ND	ND	ND	ND	ND	91
4,5-dihidrodiol-BaP	NI	59	23	11	ND	ND	ND	ND	ND	93
9-OH-BaP	NI	ND	ND	2	13	51	13	ND	ND	79
3-OH-BaP	NI	ND	ND	ND	8	47	9	ND	ND	64

NI= no se inyectó  
ND= no se detectó

**Tabla 3.9.** Ensayo 4. Elución de los metabolitos con la mezcla acetonitrilo:agua 50:50 v/v del cartucho de EFS empacado con 300 mg de C-18 PAH CHROMABOND, utilizando 15 mL muestra (agua millipore) más 20 % de isopropanol, fortificada con 1 ng mL<sup>-1</sup> de cada compuesto.

COMPUESTO	Recobro %									Recobro Global %
	5 mL de agua. (eluyente a)	4 x 1 mL acetonitrilo:agua (50:50). (eluyente b)				4 x 1 mL acetonitrilo al 100%. (eluyente c)				
	1	1	2	3	4	1	2	3	4	
9,10-dihidrodiol-BaP	NI	59	24	1	ND	ND	ND	ND	ND	94
4,5-dihidrodiol-BaP	NI	35	47	12	3	ND	ND	ND	ND	97
9-OH-BaP	NI	ND	ND	ND	9	48	8	ND	ND	65
3-OH-BaP	NI	ND	ND	ND	7	29	11	ND	ND	47

NI= no se inyectó  
ND= no se detectó

Como se observa en la tabla 3.6, que contiene los resultados correspondientes al primer ensayo para determinar si los metabolitos eran eluidos del cartucho con acetonitrilo al 100%. Los 4 compuestos eluyeron completamente con 2 mL de acetonitrilo. Posteriormente, se realizaron ensayos con mezclas de acetonitrilo:agua de fuerza eluyente menor para intentar recuperar en el extracto a los compuestos de interés, sin interferentes apolares (ensayos 2-4).

Los ensayos con 60 % de acetonitrilo presentaron desorción completa de los dihidrodioles y los hidrox-BaP en un 51% y 43% del 9-OH-BaP y 3-OH-BaP respectivamente. También se observó que conforme más agua contiene la disolución de elución b, se disminuye el recobro de los compuestos hidroxilados. Es decir que con la disolución de acetonitrilo:agua 60:40 se podrían recuperar juntos a todos los compuestos, pero se obtienen recobros muy bajos para los hidrox metabolitos comparados con la elución directa con acetonitrilo al 100 % del ensayo 1.

Los ensayos con 55 % de acetonitrilo (tabla 3.8) mostraron desorción completa de los dihidrodioles en 3 mL y el comienzo de la elución del 9-OH-BaP en el tercer mililitro y del 3-OH-BaP en el cuarto.

En el ensayo 4 se probó la elución con la mezcla acetonitrilo:agua 50:50 v/v, y como se observa en la tabla 3.9, los dihidrodioles, si eluyeron completamente, pero los hidrox-BaP eluyeron en porcentajes muy bajos del cartucho (comienzo de la elución en el cuarto mililitro). Los hidrox-BaP sólo se recuperaron completamente hasta que se aplicó acetonitrilo al 100 % al cartucho.

Por lo tanto, se optó por eluir a los metabolitos en dos fracciones, una primera fracción donde se encontraban el 9,10-dihidrodiol BaP y 4,5 dihidrodiol BaP, y la segunda fracción donde estuvieran presentes el 3-OH BaP y 9-OH BaP. La primera fracción fue eluida con 3 mL de una disolución de 55 % acetonitrilo y la segunda fracción con 2 mL de 100 % acetonitrilo para eluir a los hidrox-BaP por separado de los dihidrodioles-BaP.

En las figuras 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8 se observan las gráficas correspondientes a los recobros acumulados de los metabolitos en función del volumen de eluyente con diferentes mezclas de acetonitrilo:agua, al igual que con acetonitrilo al 100%. Los datos se tomaron de las tablas anteriores y las gráficas representan los frentes de elución de los metabolitos en el respectivo eluyente.

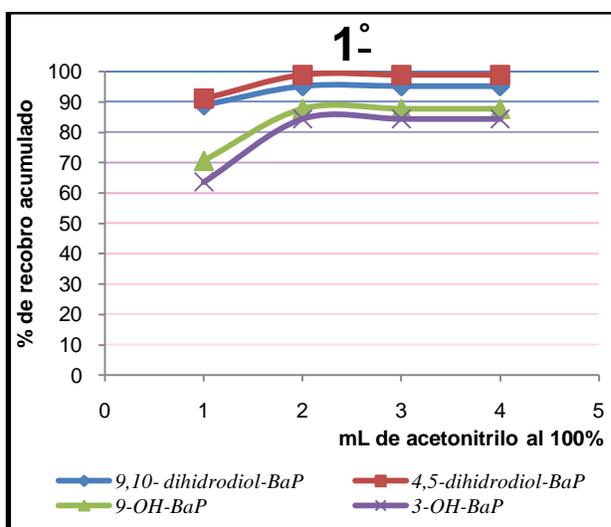


Figura 3.5. Frentes de elución de los 4 metabolitos eluidos con acetonitrilo al 100% del cartucho de EFS.

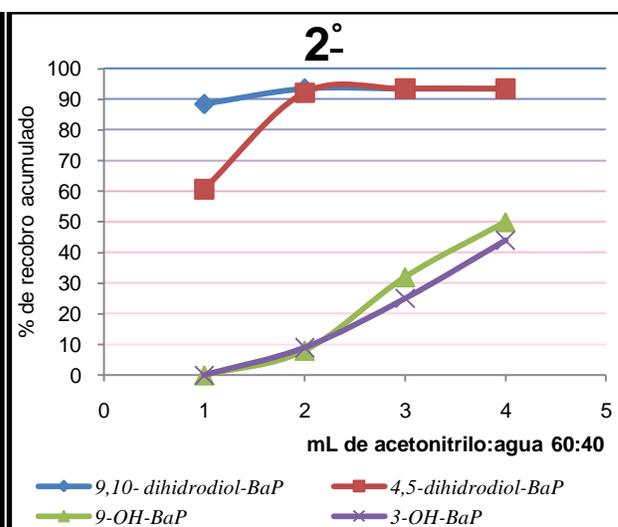


Figura 3.6. Frentes de elución de los 4 metabolitos eluidos con acetonitrilo:agua 60:40 del cartucho de EFS.

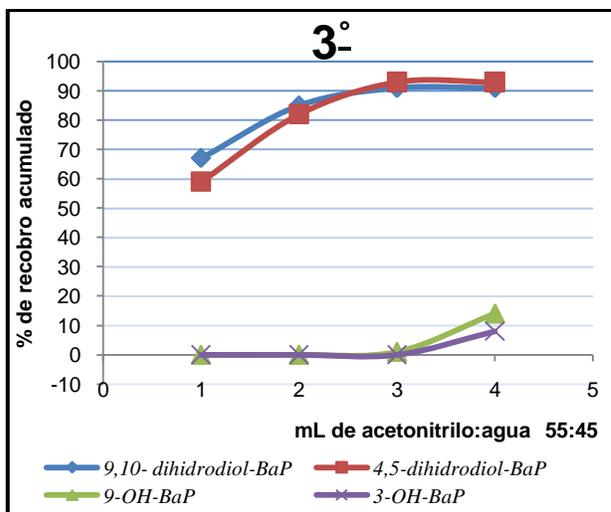


Figura 3.7. Frentes de elución de los 4 metabolitos eluidos con acetoniitrilo:agua 55:45 del cartucho de EFS.

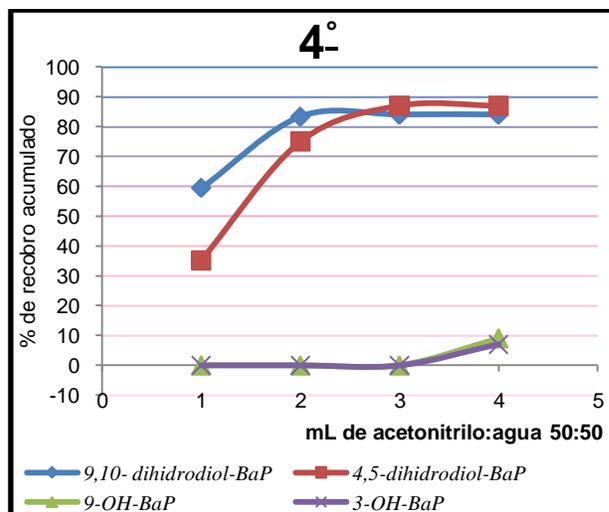


Figura 3.8. Frentes de elución de los 4 metabolitos eluidos con acetoniitrilo:agua 50:50 del cartucho de EFS.

Analizando detalladamente la figura 3.5 se observa que con sólo 2 mL de acetoniitrilo al 100 % eluyen completamente todos los metabolitos del cartucho. Cuando se disminuye la fuerza del eluyente a acetoniitrilo:agua 60:40 v/v (ver figura 3.6) los dihidrodiol-BaP alcanzan a eluir con 2 mL, pero los hidroxi-BaP eluyen más lentamente; con 4 mL eluyen del cartucho entre un 40 % y 50 %; por lo tanto, se necesitaría un mayor volumen para una elución completa.

En la figura 3.7 en donde se disminuye aún más la fuerza del eluyente a acetoniitrilo:agua 55:45 v/v los dihidrodiol-BaP alcanzan su recobro máximo con 3 mL y el recobro global no se observa afectado, en cambio los hidroxi-BaP su elución es muy lenta y con 4 mL la elución apenas empieza en un 10 %. Un comportamiento similar se observa con el acetoniitrilo:agua 50:50 v/v (ver figura 3.8), para los hidroxi-BaP sus recobros globales si se ven afectados cuando son eluidos después con el acetoniitrilo al 100%, lo que no sucede cuando se eluyen directamente con acetoniitrilo puro. Lo anterior se puede observar en las tablas 3.6 a 3.9.

### 3.3.1.2. Optimización de la secuencia de limpieza.

Debido a que se observó que cuando se analizaban los extractos obtenidos se presentaban cromatográficamente interferencias que dificultaban la cuantificación de los analitos de interés, además de un aumento en la presión del equipo, se decidió

optimizar una limpieza antes de eluir a los analitos de interés. Para ello, después de realizar la preconcentración de la muestra acuosa se aplicaron al cartucho de EFS diferentes disolventes de fuerza eluyente débil (10 %, 20 % y 30 % de acetonitrilo), que sirvieran como disoluciones de limpieza de interferentes, pero sin eluir a los analitos de interés. Entonces, se plantearon 3 ensayos, cuyos resultados se presentan en las tablas 3.10, 3.11, 3.12.

**Tabla 3.10.** Ensayo 1. Elución con mezcla acetonitrilo:agua 10:90 v/v. 15 mL de muestra (agua millipore) con 20 % de isopropanol. Fortificación a una concentración de 1 ng mL<sup>-1</sup> de cada compuesto.

COMPUESTO	Recobro %						Recobro global %
	5 mL de agua (eluyente a)	4 X 1 mL de acetonitrilo:agua (10:90) (eluyente b)				2 mL acetonitrilo al 100 % (eluyente c)	
	1	1	2	3	4	1	
9,10-dihidrodiol-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	89	89
4,5-dihidrodiol-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	92	92
9-OH-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	81	81
3-OH-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	78	78

ND= no se detectó  
NA= no se analizó

En el ensayo 1 (ver tabla 3.10) en donde se aplicó como eluyente b una mezcla de acetonitrilo:agua 10:90 v/v, no se presentó la fuga de los compuestos de interés en ninguna de las fracciones. Éstos eluyeron después, al aplicarse el acetonitrilo al 100 %, que es lo que se esperaba. Por lo tanto, la mezcla acetonitrilo:agua (10:90) v/v demostró que podría servir como fase de limpieza de interferentes de mayor polaridad a nuestros compuestos de interés.

**Tabla 3.11.** Ensayo 2. Elución con mezcla acetonitrilo:agua 20:80 v/v. 15 mL de muestra (agua millipore) con 20% de isopropanol. Fortificación a una concentración de 1 ng mL<sup>-1</sup> de cada compuesto.

COMPUESTO	Recobro %						Recobro global %
	5 mL de agua (eluyente a)	4 x 1 mL de acetonitrilo:agua (20:80) (eluyente b)				2 mL de acetonitrilo al 100 % (eluyente c)	
	1	1	2	3	4	1	
9,10-dihidrodiol-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	84	84
4,5-dihidrodiol-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	91	91
9-OH-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	71	71
3-OH-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	66	66

ND= no se detectó  
NA= no se analizó

En el ensayo 2 (ver tabla 3.11) se aumentó la fuerza del eluyente b y también se observó que al igual que en ensayo 1, éste también podría ser utilizado como fracción de limpieza, al no causar la fuga de los compuestos de interés.

**Tabla 3.12.** Ensayo 3. Optimización de la secuencia de limpieza de interferentes de EFS 15 mL de muestra (agua millipore) con 20 % de isopropanol. Fortificación a una concentración de 1 ng mL<sup>-1</sup> de cada compuesto.

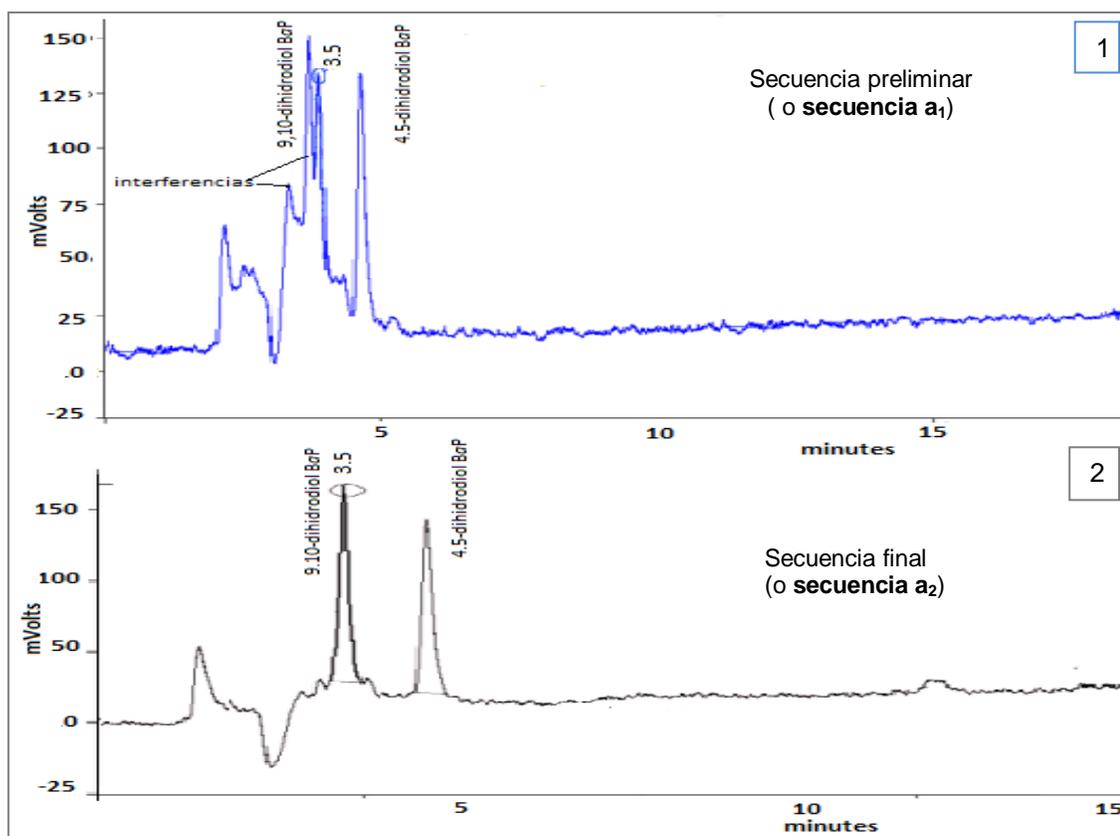
<b>COMPUESTO</b>	<b>Recobro %</b>						<b>Recobro global %</b>
	<b>5 mL de agua</b> (eluyente a)	<b>4 x 1 mL de acetoni-trilo:agua (30:70)</b> (eluyente b)				<b>2 mL de acetoni-trilo al 100 %</b> (eluyente c)	
	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	
9,10-dihidrodiol-BaP	NA	3.0	13	19	22	43	100
4,5-dihidrodiol-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	103	103
9-OH-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	83	83
3-OH-BaP	NA	ND	ND	ND	ND	85	85

ND= no se detectó  
NA= no se analizó

En el ensayo 3 (ver tabla 3.12) se aumentó aún más la fuerza del eluyente b, pero contrariamente a los casos anteriores, se observa, desde la primera fracción de 1 mL la fuga de un 3 % del 9,10-dihidrodiol BaP, aumentando ésta gradualmente al adicionar un segundo, tercero y cuarto mililitro de acetoni-trilo:agua 30:90 v/v hasta llegar al 57% total.

Considerando los resultados anteriores, se propuso una secuencia de limpieza (a<sub>1</sub>) para la muestra de medio de cultivo líquido: primero 5 mL de agua, enseguida 4 mL de acetoni-trilo:agua 10:90 v/v y después 4 mL de acetoni-trilo:agua 20:80 v/v, para eluir a los compuestos se aplicó 3 mL de acetoni-trilo:agua 55:45 v/v. Sin embargo, al aplicar esta secuencia de limpieza en muestras reales de cultivo, no se observó la eliminación de interferentes que co-eluían con el 9,10-dihidrodiol BaP como puede observarse en el cromatograma del extracto eluido con acetoni-trilo:agua 55:45 v/v mostrado en la figura 3.9.1, además de que la presión del sistema cromatográfico aumentaba. Por lo tanto, se planteó optimizar una nueva secuencia de limpieza (a<sub>2</sub>) con 5 mL de agua, en seguida 4 mL de acetoni-trilo:agua (10:90 v/v) y después 1 mL de acetoni-trilo:agua (30:70 v/v), para eluir a los compuestos se aplicó 3 mL de acetoni-trilo:agua 55:45 v/v. El eluyente de limpieza, acetoni-trilo:agua 30:70 v/v representa un eluyente más fuerte con la capacidad de remover una mayor cantidad de interferentes, aún cuando con éste se ocasionara la fuga del primer compuesto, pero en un muy bajo porcentaje de 3%, de

acuerdo a los resultados presentados en la tabla 3.12. Entonces, se seleccionó esta última fracción de limpieza porque con ella se eliminaron las interferencias del 9,10-dihidrodiol BaP, que dificultaban su análisis como se muestra en el cromatograma del extracto eluido con acetonitrilo:agua 55:45 v/v mostrado en la figura 3.9.2.



**Figura 3.9.** Cromatogramas de extractos A de EFS obtenidos con 2 diferentes secuencias de limpieza. Secuencia  $a_1$ : 5.0 mL de agua, 4.0 mL de ACN:agua 10:90 v/v y elución con ACN:agua 55:45 v/v. Secuencia  $a_2$ : 5.0 mL de agua, 4.0 mL de ACN:agua 10:90 v/v, 1.0 mL de ACN:agua 30:70 v/v y elución con ACN:agua 55:45 v/v. Columna analítica HICHROM, SHERISORB de 250 x 4.6 mm d.i, empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ . Flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Concentración de cada metabolito de 1 ng  $\text{mL}^{-1}$  de muestra. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Elución isocrática con 85% de metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm. Concentración a 1 ng  $\text{mL}^{-1}$  de muestra.

### 3.3.1.3. Aplicación del método de EFS optimizado a muestras de cultivo líquido de microalgas libre de microorganismos.

En la tabla 3.13 se presenta la secuencia completa de limpieza y elución de los metabolitos de HAP's por EFS con los factores de recuperación selectiva de los compuestos en dos extractos de muestras de cultivo líquido de microalgas. La fracción A con los dihidrodióles en 3 mL de acetonitrilo:agua 55:45 v/v y la fracción B con los hidroxi-HAP's en 2 mL de acetonitrilo al 100 %.

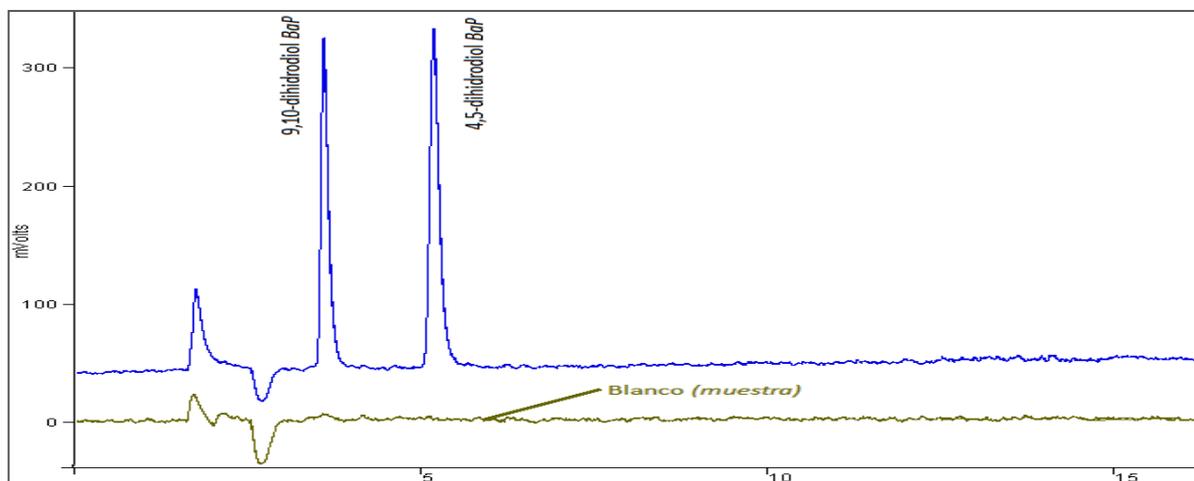
**Tabla 3.13.** Recobros obtenidos con la secuencia completa de EFS en muestra de cultivo líquido de microalgas (n=3). Volumen 15 mL de muestra con 20% de isopropanol. Muestra fortificada a 1 ng mL<sup>-1</sup> de cada analito.

COMPUESTO	LIMPIEZA DE INTERFERENTES			RECUPERACIÓN DE ANALITOS % de Recobro (promedio)		Recobro Global %	C.V
	5 mL de agua	4 mL de ACN:Agua (10:90)	1 mL de ACN:Agua (30:70)	Fracción A de 3 mL ACN:agua (55:45)	Fracción B de 2 mL de ACN al 100%		
9,10- dihidrodiol-BaP	NI	NI	NI	76	ND	76	2
4,5-dihidrodiol-BaP	NI	NI	NI	87	ND	87	0.8
9-OH-BaP	NI	NI	NI	ND	69	69	1.2
3-OH-BaP	NI	NI	NI	ND	62	62	4.3

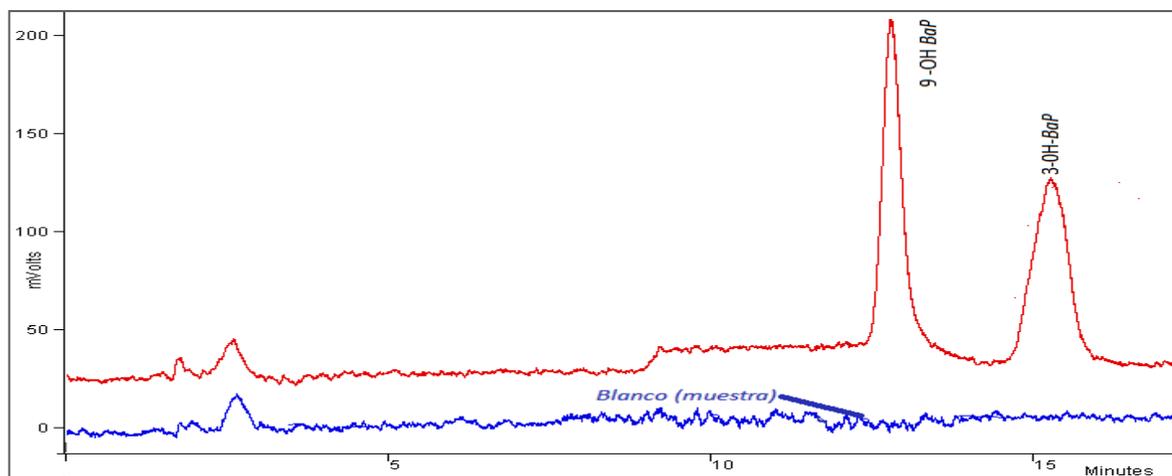
NI= no se inyectó  
ND= no se detectó

Con los datos provenientes de la tabla 3.13 se evaluó la reproducibilidad del método de EFS en muestras de cultivo líquido, la cual fue satisfactoria ya que se presentaron coeficientes de variación menor al 4 % y considerando que se tratan de muestras biológicas en el que intervienen diversos factores, como la variabilidad del medio de cultivo líquido.

En las figuras 3.10 y 3.11 se presentan los cromatogramas libres de interferencias de los dos extractos obtenidos de las fracciones A y B con el método desarrollado. Se observa que en la fracción A eluyen los primeros 2 compuestos correspondientes a los 2 dihidrodioles y en la fracción B eluyen los compuestos 3 y 4 que son los hidrox-BaP. Ambos cromatogramas se comparan con el extracto proveniente de una muestra no fortificada, para demostrar que no se presentan picos de interferencias que co-eluyen en los mismos tiempos de retención que los compuestos de interés y que la línea base es muy estable en los cromatogramas de ambos extractos.



**Figura 3.10.** Cromatogramas de la primera fracción A (eluida con 3 mL de acetonitrilo:agua 55:45) y de un extracto sin fortificar (blanco). Columna analítica HICHROM, SHERISORB de 250 x 4.6 mm d.i, empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ . Flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Concentración de cada metabolito de 1 ng  $\text{mL}^{-1}$  de muestra. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Elución isocrática 85% metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm.



**Figura 3.11.** Cromatogramas de la segunda fracción B (eluida con 2 mL de acetonitrilo al 100%) y de un extracto sin fortificar (blanco). Columna analítica HICHROM, SHERISORB de 250 x 4.6 mm d.i, empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ . Flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Concentración de cada metabolito de 1 ng  $\text{mL}^{-1}$  de muestra. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Elución Isocrática 85 % metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm.

### 3.3.2. Protocolo completo del método de extracción por EFS.

Considerando todo los parámetros optimizados en las secciones anteriores se estableció el protocolo completo para la extracción de los metabolitos de HAP's por la técnica de Extracción en Fase Sólida la cual se esquematiza en la siguiente figura 3.12.

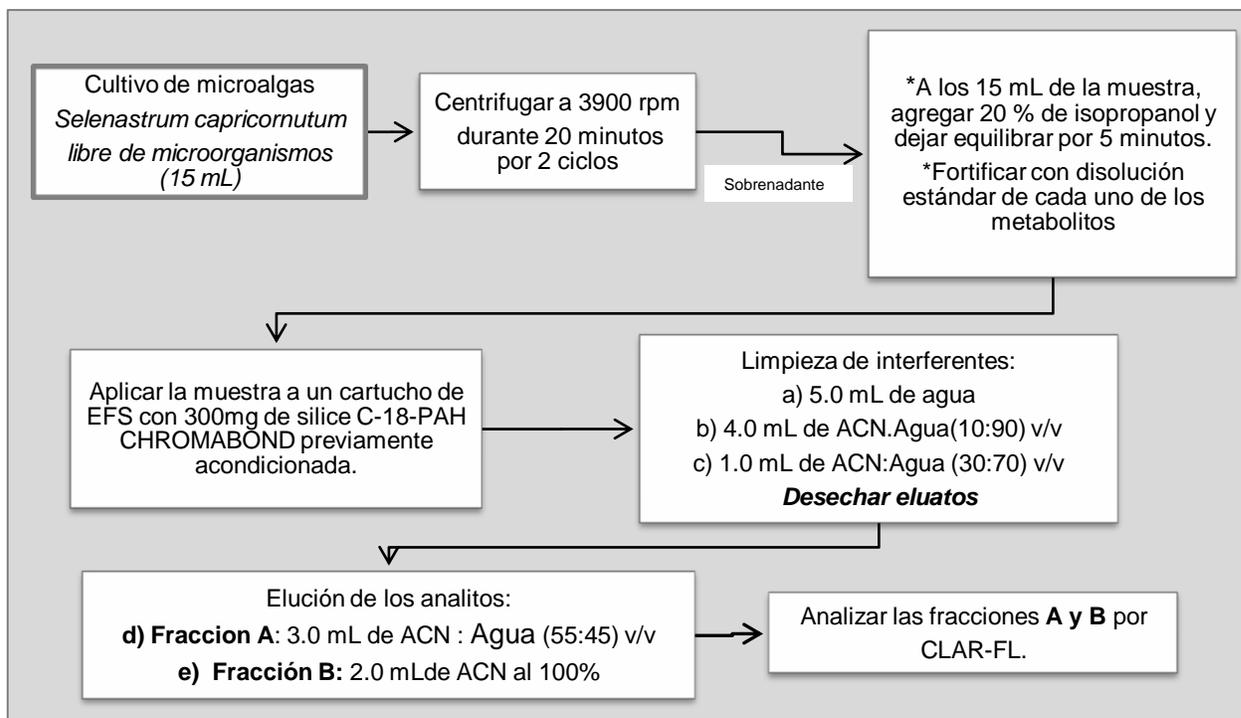


Figura 3.12. Procedimiento general de EFS para la preparación de la muestra y extracción de los metabolitos.

### 3.3.3. Validación del método de determinación EFS-CLAR-DF.

#### LINEALIDAD Y EXACTITUD

Para evaluar la validación del método de extracción EFS-CLAR-DF se prepararon muestras de cultivo líquido de microalgas (*Selenastrum capricornutum*) libre de microorganismos las que se sometieron al protocolo de extracción descrito en la sección anterior.

La linealidad del método se evaluó con las curvas obtenidas de las áreas de los picos en función de la concentración de los compuestos en la muestra. Estas curvas se presentan en la figura 3.13 con sus respectivas ecuaciones.

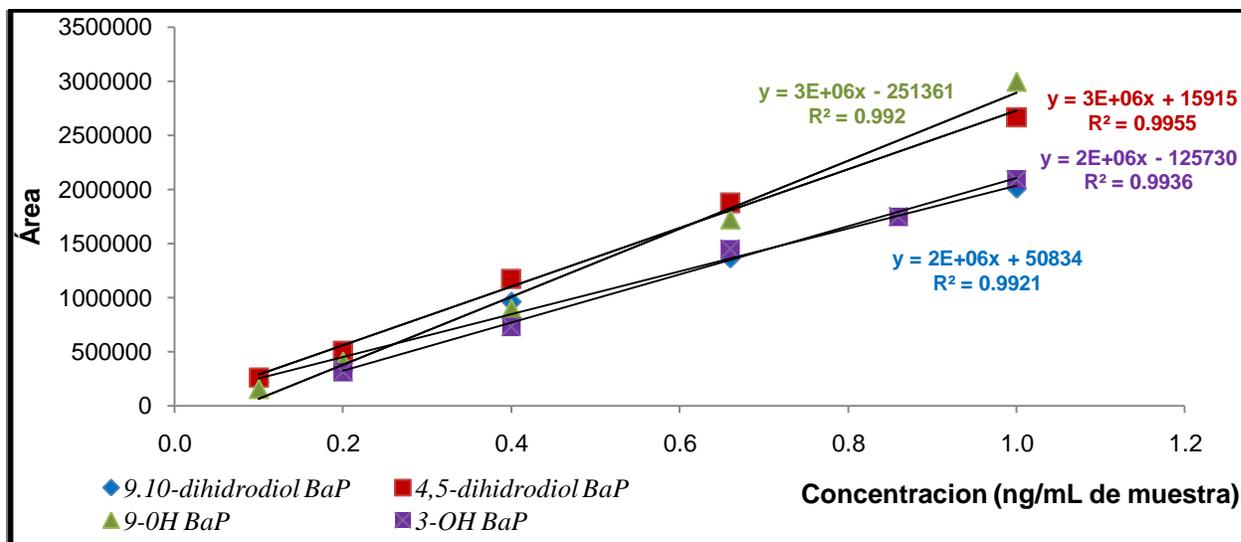


Figura 3.13. Linealidad del método. Respuesta del detector en función de la concentración. En un Intervalo de concentraciones de cada metabolito 0.1- 1.0 ng mL<sup>-1</sup> de muestra. Detección por fluorescencia.

Como se observa en la figura 3.13 las curvas presentan coeficientes de correlación (R<sup>2</sup>) por arriba de 0.99 para los cuatro metabolitos en el intervalo de concentraciones determinados para el método desarrollado, por lo tanto la linealidad del método es muy buena.

En la figura 3.14 se presentan las curvas de la cantidad de compuesto recuperado respecto a la cantidad de compuesto agregado de acuerdo al método. Se determinaron las ecuaciones y los coeficientes de correlación (R<sup>2</sup>) respectivos.

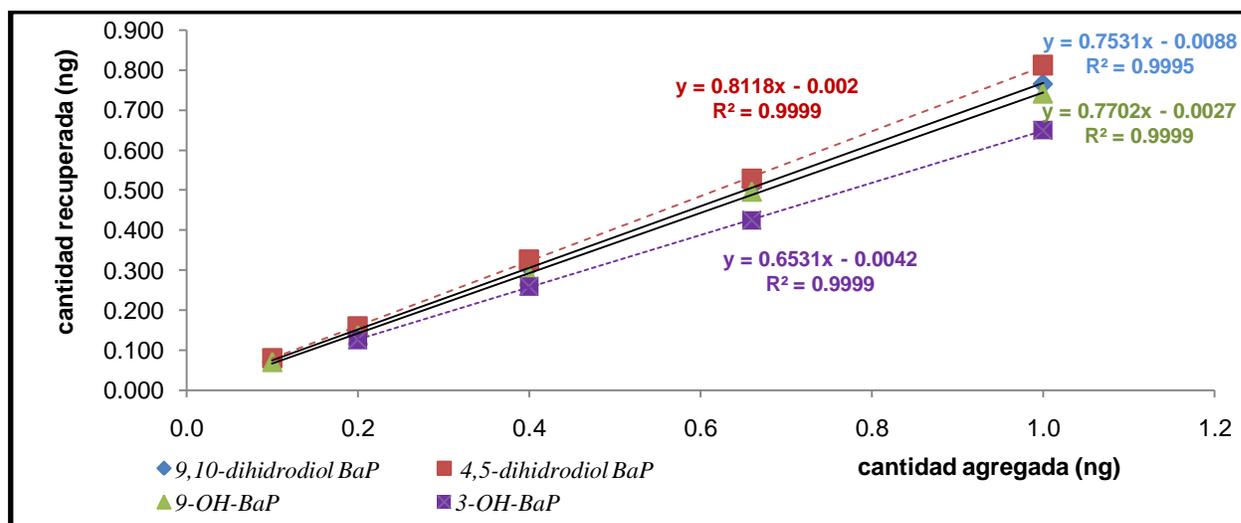


Figura 3.14. Exactitud del método. Cantidad recuperada de los metabolitos de HAP's en función de la cantidad agregada a diferentes niveles de concentración. Detección por fluorescencia

Las ecuaciones de las rectas de regresión lineal, en donde la pendiente indica el recobro global de los metabolitos, también son mostradas en la tabla 3.14 para cada uno de los compuestos, igualmente se muestran coeficientes de correlación  $R^2$  mayores a 0.999 para los 4 compuestos, verificando la excelente linealidad del método. Los recobros globales se estuvieron por arriba de 75 %, salvo el 3-OH BaP con 65 %.

**Tabla 3.14.** Recobro global (%) de los metabolitos de HAP's obtenido de la curva (cantidad adicionada -vs- cantidad recuperada) y coeficientes de correlación lineal.

Compuesto	Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	Recobro Pendiente de la recta X 100
9,10- dihidrodiol-BaP	0.9995	75
4,5-dihidrodiol-BaP	0.9999	81
9-OH-BaP	0.9999	77
3-OH-BaP	0.9999	65

### PRECISIÓN Y LÍMITES DE DETECCIÓN DEL MÉTODO

En la tabla 3.15 se muestran los resultados obtenidos de la precisión del método, representados con los coeficientes de variación obtenidos de los recobros de 3 extracciones realizadas en el mismo día y en diferentes días.

**Tabla 3.15.** Repetibilidad y reproducibilidad del método utilizando muestras fortificadas a una concentración  $0.4 \text{ ng mL}^{-1}$  de muestra (n=3).

Compuesto	Repetibilidad en un día RECOBRO	% C.V. de 3 extracciones (mismo día)	Reproducibilidad en 3 días diferentes RECOBRO	% C.V. de 3 extracciones en (días diferentes)
9,10- dihidrodiol-BaP	77	0.7	77	1.5
4,5-dihidrodiol-BaP	81	2.0	83	2.5
9-OH-BaP	76	1.6	73	2.5
3-OH-BaP	63	1.2	65	2.7

En la tabla 3.15 se muestra que el estudio de la precisión presentó buena repetibilidad como reproducibilidad del método, permitiendo trabajar con coeficientes de variación (C.V.) menores al 2.7 %. Por lo tanto, considerando que se trata de muestras biológicas complejas y que puede haber variabilidad en los medios de cultivo líquido de microalgas, dependiendo de los diferentes factores biológicos (temperatura, tiempo y los tipos de células), la precisión también es excelente.

Los límites de detección experimental y estadísticos, así como el límite de cuantificación se estimaron a partir de la curva de área -vs- concentración obtenida del análisis de muestras reales fortificadas con estándares de cada uno de los compuestos a diferentes niveles de concentración, extraídos con el método que se desarrolló y analizadas por CLAR-DF.

Tabla 3.16. Límites de detección y de cuantificación del método.

Compuesto	Límite de Detección (ng mL <sup>-1</sup> )		Límite de Cuantificación (ng/mL <sup>-1</sup> ), teórico.
	Teórico	Experimental	
9,10- dihidrodiol-BaP	0.12	0.08	0.3
4,5-dihidrodiol-BaP	0.10	0.08	0.3
9-OH-BaP	0.13	0.07	0.4
3-OH-BaP	0.09	0.1	0.3

Como se observa en la tabla 3.16. El límite de detección estadístico fué semejante al determinado directamente (experimental), para todos los compuestos. Se demuestra que el método es útil para cuantificar a los compuestos de interés en niveles de concentraciones trazas, del orden del ppb sin necesidad de evaporar el extracto.

### 3.3.4. Robustez del método de EFS.

#### Comparación entre muestras provenientes de *Selenastrum capricornutum* -vs- *Scenedesmus acutus*.

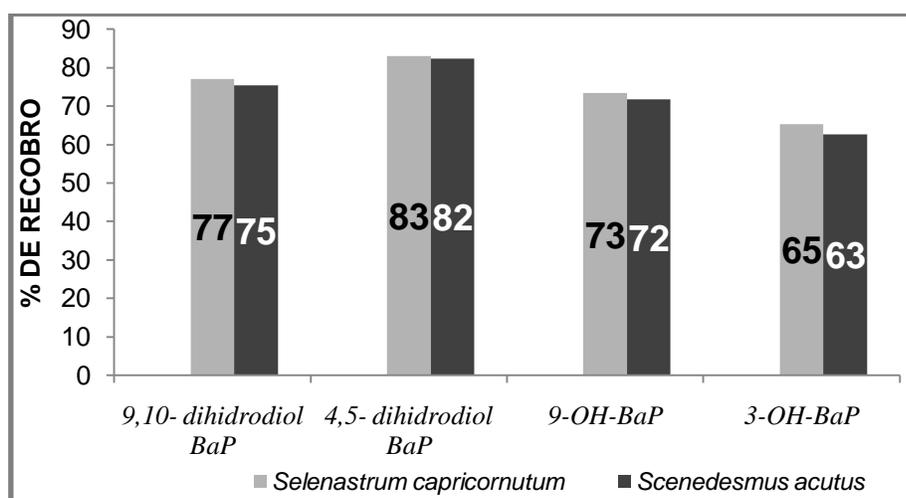
Con la finalidad de determinar la robustez del método de extracción, se evaluó la reproducibilidad, utilizando medios de cultivo líquido provenientes de dos diferentes especies de microalgas.

Los coeficientes de variación de los recobros promedio de 3 extracciones realizados en 3 días diferentes con cultivos procedentes de las dos especies de microalgas se muestran en la tabla 3.17.

**Tabla 3.17.** Recobros promedio obtenidos por el método de EFS optimizado del medio de cultivo proveniente de dos especies diferentes de microalgas. Fortificado a 0.4 ng mL<sup>-1</sup> de cada compuesto en 15 mL de muestra (n=3).

COMPUESTO	Recobro % ( <i>Selenastrum capricornutum</i> )	C.V %	Recobro % ( <i>Scenedesmus acutus</i> )	C.V %
9,10- dihidrodiol-BaP	77	1.5	75	1.9
4,5-dihidrodiol-BaP	83	2.5	82	3.1
9-OH-BaP	73	2.5	72	1.4
3-OH-BaP	65	2.7	63	1.9

En la figura 3.15 se presentan los recobros promedio de los metabolitos de las dos especies de microalgas, como se observa no hay casi diferencia de los recobros al aplicar el método de EFS optimizado.



**Figura 3.15** Resultados del recobro promedio de los metabolitos de HAP's en muestras de cultivo líquido provenientes de dos diferentes especies de microalgas (*Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*) por la técnica de EFS optimizada. Fortificación a 0.4 ng mL<sup>-1</sup> de cada compuesto en 15 ml de muestra, n=3.

Para comparar mejor si existe diferencia a nivel de recobro entre los dos ensayos realizados con dos medios de cultivos diferentes, se utilizó la prueba de t-STUDENT. La prueba proporciona un criterio para ver si es el mismo recobro para cada uno de los metabolitos o si hay diferencia significativa dependiendo el tipo de microalgas de acuerdo a las hipótesis planteadas a continuación:

Hipótesis nula (Ho): los recobros promedio de los 4 metabolitos de HAP's son iguales en las 2 especies de microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*.

Hipótesis alterna (Ha): Hay diferencia de los recobro promedio en entre las dos especies de microalgas.

Esta prueba se realizó utilizando un nivel de confianza del 95% y 99%, como se observa en la tabla 3.18 el valor de t calculado de cada uno de los 4 metabolitos fue menor al  $t_4=2.78$  ( $P=0.05$ ) y de  $t_4=4.60$  ( $P=0.01$ ), por lo tanto se aceptó la hipótesis nula de que no hay diferencia significativa a nivel de recobro de los metabolitos de HAP's en las dos especies de microalgas por el método de EFS. Por lo tanto, se puede afirmar que el método es robusto, pudiéndose utilizar con muestras de microalgas de origen diverso.

Tabla 3.18. Resultados de la t-Student con las muestras de 2 especies de microalgas con el método de EFS validado.

COMPUESTO	t-Students calculada	n	t $\alpha$ 2 (g.l.=n1-n2-2) Tablas $\alpha=0.05$	t $\alpha$ 2 (g.l.=n1-n2-2) Tablas $\alpha=0.01$
9,10-dihidrodiol BaP	1.78	6	2.78	4.60
4,5-dihidrodiol BaP	-0.17	6	2.78	4.60
9-OH-BaP	1.33	6	2.78	4.60
3-OH-BaP	2.19	6	2.78	4.60

### 3.4. Desarrollo y validación del método Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para la extracción de metabolitos de HAP's en *Selenastrum capricornutum*.

#### 3.4.1. Optimización de la elución selectiva de los metabolitos de HAP's.

##### 3.4.1.1. DMFS con disoluciones estándar sin muestra.

Se realizaron los primeros ensayos de DMFS fortificando el adsorbente con disolución estándar sin utilizar muestra para simular la extracción previamente sin tener el efecto de la matriz. De esta manera se puede conocer el orden de elución y recobro de los compuestos de interés sin la presencia de interferentes. Los resultados de los tres ensayos correspondientes a esta etapa se presentan en los cuadros 3.19 a 3.21. Se utilizaron tres diferentes secuencias de elución, en donde el eluyente intermedio formado por mezclas acetonitrilo:agua fue incrementando su fuerza de 20 % a 40 % de acetonitrilo.

**Tabla 3.19.** Ensayo 1. Elución con acetonitrilo:agua (20:80) v/v. Fortificación a 20 ng g<sup>-1</sup> Cartucho de DMFS empacado con 0.1 g de adsorbente.

COMPUESTO	% de recobro								Recobro global %
	5 mL de agua (eluyente a)	5 x 1 mL de acetonitrilo:agua (20:80). (eluyente b)					1 x 0.5 mL de acetonitrilo al 100% (eluyente c)		
	1	1	2	3	4	5	1	2	
9,10- dihidrodiol-BaP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	78	ND	78
4,5-dihidrodiol-BaP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	81	ND	81
9-OH-BaP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14	ND	14
3-OH-BaP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8	ND	8

ND= No se detectó

Como se observa en la tabla 3.19 al aplicar al cartucho de dispersión el eluyente a (agua millipore) no se detectó fuga de los metabolitos, al igual que al aplicar la mezcla de acetonitrilo: agua (20:80) v/v, por lo que ésta podría servir como eluyente de limpieza. La desorción de todos los analitos se presentó posteriormente al aplicar el acetonitrilo al 100%. Sin embargo, se observó una disminución muy drástica en los recobros del 9-OH-BaP y 3-OH-BaP que puede deberse a la aplicación previa de un eluyente rico en agua al cartucho.

**Tabla 3.20.** Ensayo 2. Elución con acetonitrilo: agua (30: 70) v/v. Fortificación a 20 ng g<sup>-1</sup>. Cartucho de DMFS empacado con 0.1 g de adsorbente.

COMPUESTO	% de recobro						Recobro global %
	5 mL de agua (eluyente a)	3 x 1 mL de acetonitrilo:agua (30:70). (eluyente b)			1 x 0.5 mL de acetonitrilo al 100% (eluyente c)		
	1	1	2	3	1	2	
9,10- dihidrodiol-BaP	ND	42	29	5	ND	ND	76
4,5-dihidrodiol-BaP	ND	10	11	13	52	ND	86
9-OH-BaP	ND	ND	ND	ND	16	ND	16
3-OH-BaP	ND	ND	ND	ND	7	ND	7

ND= No se detectó

En el ensayo 2 se observa que eluyeron los dos dihidrodiol, desde el primer mililitro de acetonitrilo:agua (30:70) v/v, por lo que este eluyente no serviría para la limpieza de interferentes. Sin embargo en base a estos resultados, se dedujo que el eluyente b podría servir para poder desorber completamente al primer dihidrodiol (9,10-dihidrodiol BaP); para desorber al segundo dihidrodiol (4,5-dihidrodiol BaP), se necesitaría un volumen mayor o aumentar la fuerza del eluyente, lo que se realizó en el ensayo 3, cuyos resultados se muestran en la tabla 3.21. Se observa también que con las condiciones del ensayo 2, no se presentó la fuga de los hidroximetabolitos con el

eluyente b, aunque su desorción posterior con acetonitrilo al 100 % (eluyente c) también se efectuó con muy bajos recobros al igual que en el ensayo 1.

**Tabla 3.21.** Ensayo 3. Elución con acetonitrilo: agua (40:60) v/v. Fortificación a 20 ng g<sup>-1</sup>. Cartucho de DMFS empacado con 0.1 g de adsorbente.

COMPUESTO	% de recobro						Recobro global %
	5 mL de agua. (eluyente a)	3 x 1 mL de acetonitrilo:agua (40:60) (eluyente b)			1 x 0.5 mL de acetonitrilo al 100% (eluyente c)		
	1	1	2	3	1	2	
9,10- dihidrodioI-BaP	ND	72	ND	ND	ND	ND	72
4,5-dihidrodioI-BaP	ND	60	18	ND	ND	ND	78
9-OH-BaP	ND	ND	ND	ND	15	ND	15
3-OH-BaP	ND	ND	ND	ND	7	ND	7

ND= No se detectó

En efecto, en el ensayo 3, al aumentar la fuerza del eluyente b constituido por acetonitrilo:agua (40:60) v/v, los dihidrodioles eluyeron completamente en 2 mL. Posteriormente, los hidroxí BaP fueron eluidos con acetonitrilo al 100% pero continuando con recobros muy bajos. Cabe destacar que el recobro obtenido por la técnica de EFS bajo condiciones de secuencia similares fue de 75 y 63 % correspondientemente. Las diferencias existentes entre la EFS y la DMFS se hacen evidentes en este caso. Por lo tanto, se decidió hacer un cuarto ensayo, pero ahora con muestra para observar si éste comportamiento se mantenía; el volumen y la secuencia de elución fueron similares al ensayo 3.

### 3.4.1.2. DMFS con muestra de microalgas.

En la tabla 3.22 se presentan los resultados del ensayo 4, utilizando muestras de microalgas (biomasa), aplicando la secuencia de elución del ensayo 3 para observar si la elución de los compuestos no se ve afectada al utilizar la matriz seleccionada.

**Tabla 3.22.** Ensayo 4. DMFS con muestras. Fortificación a 4 ng mg<sup>-1</sup> de muestra. Cartucho de DMFS empacado con 0.1 g de C18-PAH.y 5 mg de muestra.

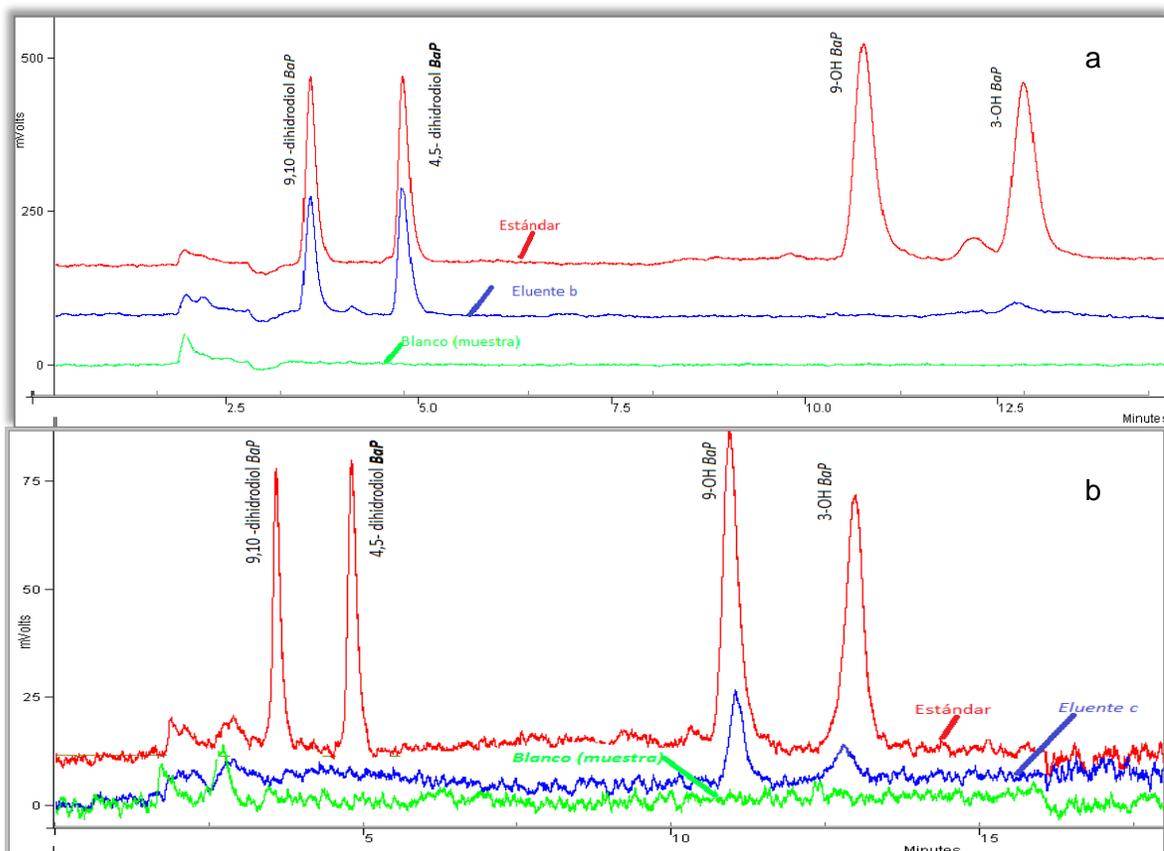
COMPUESTO	% de recobro						Recobro global %
	5 mL de agua. (eluyente a)	3 X 1 mL de acetonitrilo:agua (40:60). (eluyente b)			1 x 0.5 mL de acetonitrilo al 100% (eluyente c)		
	1	1	2	3	1	2	
9,10- dihidrodioI-BaP	NA	74	3	ND	ND	ND	77
4,5-dihidrodioI-BaP	NA	68	11	ND	ND	ND	79
9-OH-BaP	NA	ND	ND	ND	17	ND	17
3-OH-BaP	NA	ND	ND	ND	10	ND	10

ND= No se detectó

NA = no se analizó

En este ensayo se observó que, tanto la retención como la elución de los metabolitos fue similar al ensayo anterior sin muestra. Es decir, que con el eluyente b se desorbieron los dihidrodioles y los hidroxi-BaP con el eluyente c. Los hidroxi-BaP presentaron muy bajos recobros entre 17 y 10 % respectivamente, por lo que se buscó posteriormente incrementar el recobro de estos metabolitos con la aplicación de modificadores orgánicos de la matriz.

Cabe destacar que los eluatos obtenidos del eluyente c tenían una coloración ligeramente verdosa y así fueron inyectados al sistema cromatográfico, sin causar problemas en la presión del sistema. En la figura 3.16.a se presenta un cromatograma de la fracción 1 del eluyente b y en la figura 3.16.b, la primera fracción del eluyente c, ambos comparados con el cromatograma de una disolución estándar y un blanco (extracto proveniente de una muestra sin fortificar).



**Figura 3.16.** Cromatogramas de una disolución estándar a una concentración de  $2 \text{ ng mL}^{-1}$  y de los extractos de DMFS provenientes del ensayo 4 con el eluyente b (a) y el c (b). Columna analítica HICHROM, SHERISORB de  $250 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ , empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Nivel de fortificación de los metabolitos de  $0.4 \text{ ng mg}^{-1}$  de muestra. Volumen de inyección  $20 \mu\text{L}$ . Fase móvil: 85% de metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ )  $263 \text{ nm}$  y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ )  $430 \text{ nm}$ .

### 3.4.1.3. Ensayos de modificación de matriz.

Con la finalidad de aumentar el recobro del 3-OH y 9-OH, se probaron diferentes modificadores químicos de la matriz como tensoactivos (lauril sulfato de sodio y heptasulfonato de sodio) y ácidos (nítrico, sulfúrico, acético y ascórbico). En la tabla 3.23 se presentan los recobros porcentuales obtenidos para los analitos después de aplicar los modificadores a la muestra, previamente a ser sometida al proceso de extracción por DMFS, con las condiciones del ensayo 4.

**Tabla 3.23.** Recobro porcentual de los metabolitos al agregar a la muestra diferentes surfactantes y ácidos. Se utilizaron 100 mg de adsorbente y 5 mg de muestra fortificada con 0.2 ng mg<sup>-1</sup>, más 20 µL de la disolución del modificador.

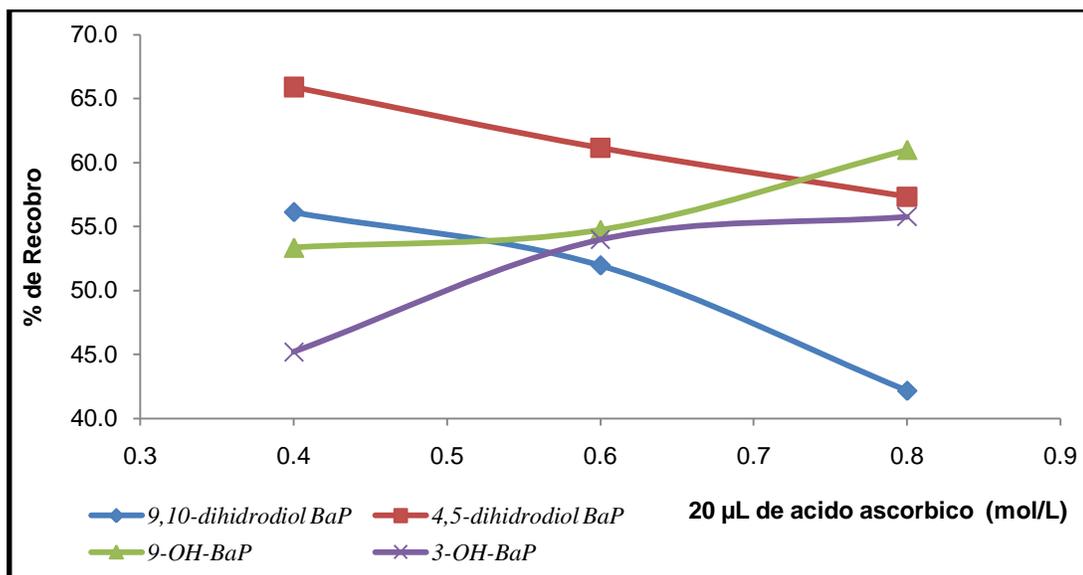
Compuesto	% de Recobro									
	Sin modificador	HSNa 1.0 M	LSNa 1.0 M	Ácido nítrico 0.1 M	Ácido nítrico 1.0 M	Ácido sulfúrico 0.1 M	Ácido acético 1.0 M	Ácido ascórbico		
								0.8 M	0.6 M	0.4 M
9,10-dihidrodiol-BaP	77	71	73	52	0.0	50	57	42	52	56
4,5-dihidrodiol-BaP	79	76	79	95	90	67	68	57	61	66
9-OH-BaP	17	16	14	33	42	18	16	61	55	53
3-OH-BaP	10	7	6	26	54	5	4	56	54	45

HSNa = Heptasulfonato de sodio.  
LSNa = Lauril sulfato de sodio.

Como se puede observar en la tabla 3.23, con ninguno de los dos tensoactivos se aumentó el recobro de los compuestos de interés. Con el ácido nítrico y el ácido ascórbico si aumentaron los recobros de los hidrox-BaP pero disminuyeron los recobros de los dihidrodioles. De hecho, con la concentración de ácido nítrico 1 M se perdió el primer compuesto correspondiente al 9,10-dihidrodiol BaP aunque con una concentración más baja para el HNO<sub>3</sub> de 0.1 M, no se perdió el primer compuesto, pero si disminuyeron el recobro del 9-OH BaP de un 42 % a un 33 % y para el 3-OH BaP de un 54 % a un 26 %. El ácido sulfúrico 0.1 M y al ácido acético 1 M no causaron un aumento significativo del recobro para los hidrox-BaP pero si disminuyeron el recobro de los dihidrodioles.

Entonces, debido a que el uso del ácido ascórbico en las tres concentraciones probadas sí se presentó un aumento en el recobro de los hidrox-BaP, aunque disminuyó un poco el de los dihidrodioles-BaP, éste se seleccionó como modificador de la matriz, buscando un compromiso con la concentración de 0.6 M, con la cual se

obtuvieron recobros cercanos al 50 % para los 4 compuestos. En la figura 3.17 se observa que la adición de ácido ascórbico en concentraciones crecientes aumenta gradualmente el recobro de los hidrox-BaP, pero lo contrario va sucediendo gradualmente con los dihidrodioles.



**Figura 3.17.** Optimización de la concentración de ácido ascórbico por DMFS. 5 mg de muestra, fortificada con 0.4 ng mg<sup>-1</sup> de cada metabolito más la adición de 20 µL de ácido ascórbico, utilizando 100 mg de C18-PAH CHROMABOND.

#### 3.4.1.4. Ensayos para establecer las condiciones finales de la DMFS.

Considerando los resultados anteriores, se plantearon 2 ensayos para optimizar la secuencia de elución de limpieza de interferentes y de elución de los compuestos de interés usando muestras de microalgas adicionadas con ácido ascórbico y fortificadas con los metabolitos. Se incluyó un paso de lavado más, respectivamente a la secuencia de elución con la finalidad de eliminar el máximo de interferentes polares.

Los resultados de los ensayos 1 y 2 se presentan en las tablas 3.24 y 3.25 respectivamente.

**Tabla 3.24.** Ensayo 1. Optimización de la DMFS con muestras. Fortificada con 0.2 ng mg<sup>-1</sup>, más 20 µL de ácido ascórbico. Cartucho de DMFS empacado con 100 mg de adsorbente y 5 mg de muestra.

COMPUESTO	% de recobro								Recobro global %	
	2 x5 mL de agua (eluyente a)		5.0 mL de acetonitrilo: agua (20:80) (eluyente b)	4 x 0.5 mL de acetonitrilo:agua (40:60). (eluyente c)				1 x 0.5 mL de acetonitrilo al 100% (eluyente d)		
	1	2	1	1	2	3	4	1		2
9,10- dihidrodiol-BaP	NI	NI	NI	31	22	ND	ND	ND	ND	53
4,5-dihidrodiol-BaP	NI	NI	NI	29	23	10	ND	ND	ND	62
9-OH-BaP	NI	NI	NI	ND	ND	ND	6	49	ND	55
3-OH-BaP	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	51	ND	51

ND = No se detectó

NI = No se inyectó

En la tabla 3.24 se observa que con el eluyente (a) se realizó un lavado inicial del cartucho DMFS previo con dos fracciones de 5 mL, el cual fue desechado dado que presentaba pigmento y turbidez. El eluyente (b) acetonitrilo:agua 20:80 v/v se utilizó también para eliminar interferencias polares. En el eluyente c de fuerza mayor que el anterior (b) fue en donde se recuperaron los 2 dihidrodioles BaP, aunque también empezó a eluir en 6 % el 9-OH BaP en la fracción 4. El último eluyente (d) permitió recuperar a los dos OH-BaP.

**Tabla 3.25.** Ensayo 2. Optimización de la DMFS con muestras. Fortificada con 0.2 ng mg<sup>-1</sup>, más 20 µL de ácido ascórbico. Cartucho de DMFS empacado con 100 mg de adsorbente y 5 mg de muestra.

Compuesto	% de recobro								Recobro global %
	10 mL de agua (eluyente a)	5.0 mL de acetonitrilo: agua (20:80). (eluyente b)	4 x 0.5 mL de acetonitrilo:agua (40:60). (eluyente c)				1 x 0.5 mL de acetonitrilo: agua (90:10) (eluyente d)		
	1	1	1	2	3	4	1	2	
9,10- dihidrodiol-BaP	NI	NI	32	23	ND	ND	ND	ND	55
4,5-dihidrodiol-BaP	NI	NI	29	24	6	ND	ND	ND	59
9-OH-BaP	NI	NI	ND	ND	ND	ND	47	9	56
3-OH-BaP	NI	NI	ND	ND	ND	ND	43	8	51

ND = No se detectó

NI = No se inyectó

En el ensayo 2 se disminuyó la fuerza del eluyente (d) modificando la composición del eluyente d, en el cual se desorben los hidroxi-HAP's en acetonitrilo:agua 90:10 v/v, con el fin de restringir la elución de interferentes de polaridad menor a los hidroxi-BaP que se encontraban presentes en los extractos de acetonitrilo puro (como los del ensayo anterior 1), las cuales aumentaban la presión del sistema cromatográfico. Entonces, en la tabla 3.25 se observa que con el eluyente 90:10 v/v se obtuvieron recobros parecidos a los que se obtuvieron en el extracto de acetonitrilo puro.

Se menciona que previo a la realización del ensayo 2 se trató de realizar una limpieza al extracto, mediante una filtración del extracto de acetonitrilo en filtros de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Sin embargo, se perdieron los metabolitos hasta en un 50 %; lo mismo sucedió cuando se quizó implementar el uso de una co-columna de limpieza empacada con sílice C18 y de C18-PAH. Estos experimentos de filtración y limpieza con co-columna se efectuaron sin aplicación de la muestra, solamente fortificando los adsorbentes. De aplicarse en ensayos de extracción con muestra se obtendrían recobros cercanos al 25 % los cuales se consideran ya muy bajos. Por esta razón, se decidió realizar la elución de los hidrox-BaP con una mezcla de acetonitrilo y un bajo porcentaje de agua (10%)

### 3.4.2. Protocolo del método de extracción por DMFS.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos anteriores, se diseñó un protocolo final para realizar la extracción de los metabolitos de HAP's de las microalgas por medio de la técnica de dispersión de matriz en fase sólida.

En la figura 3.18 se esquematiza el protocolo completo del método basado en la técnica DMFS para la extracción de metabolitos de HAP's en microalgas (biomasa).

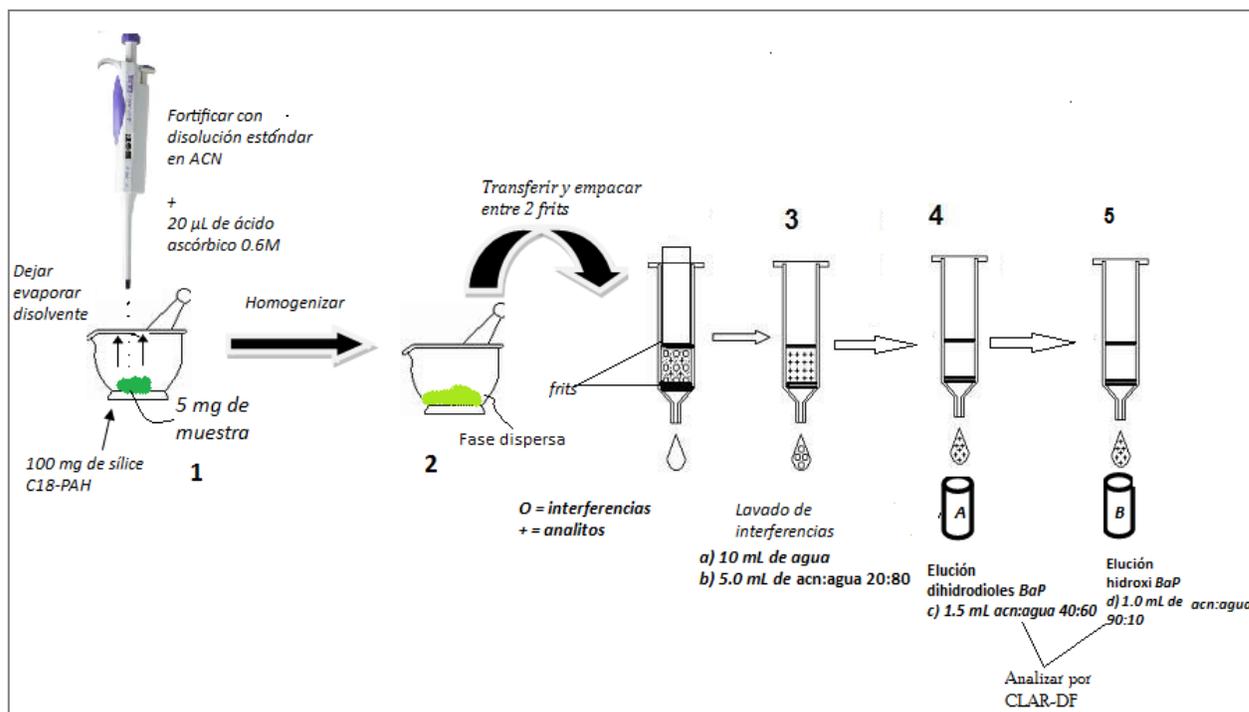


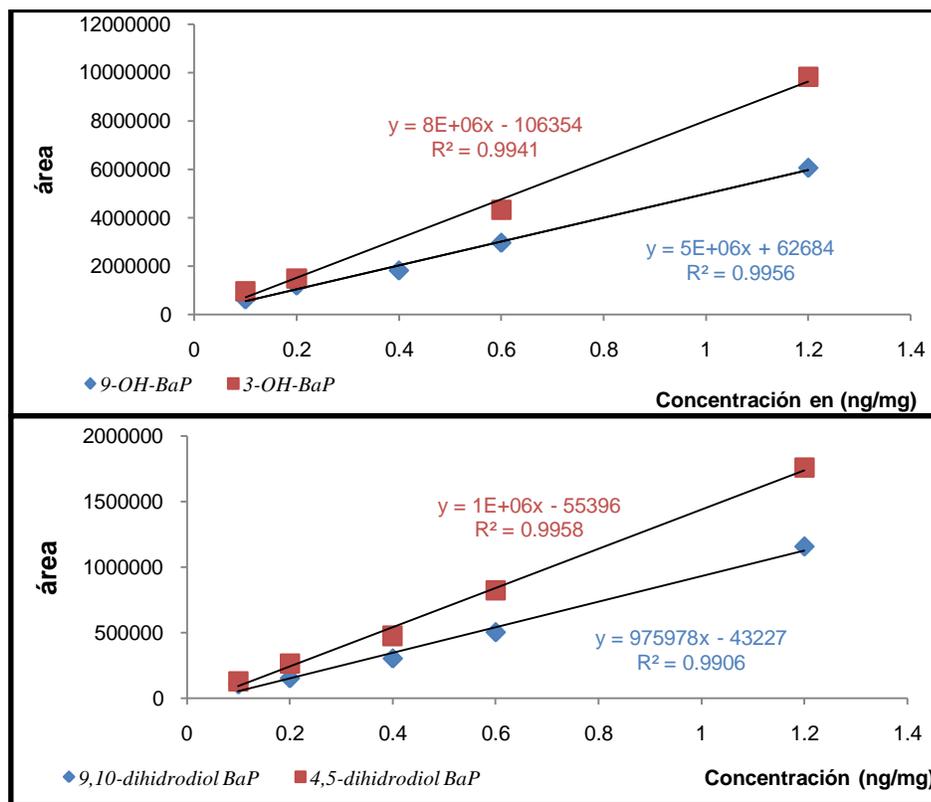
Figura 3.18. Preparación de la columna de DMFS y elución de los metabolitos para el análisis por CLAR-DF.

### 3.4.3. Validación del método de determinación DMFS-CLAR-DF.

#### Linealidad y exactitud

Para evaluar la linealidad del método se realizaron extracciones de muestras fortificadas a diferentes concentraciones y los extractos fueron analizados por CLAR-DF.

La linealidad del método de DMFS-CLAR-DF fue evaluada con el área obtenida de los picos cromatográficos en función de la concentración de los metabolitos en la muestra. Las curvas se presentan en la figura 3.19 con sus respectivas ecuaciones y coeficientes de correlación lineal.



**Figura 3.19.** Linealidad del método. Respuesta del detector en función de la concentración de los metabolitos en la muestra. En un Intervalo de concentraciones de cada metabolito 0.1- 1.2 ng mg<sup>-1</sup>de muestra. Analizada por CLAR-DF

Como se observa en la figura 3.19 las curvas presentaron coeficientes de correlación ( $R^2$ ) por arriba de 0.99 para los 4 metabolitos, por lo tanto se acepta la linealidad del método de DMFS desarrollado en el intervalo determinado.

En la figura 3.20 se presentan las curvas que representan a la cantidad agregada de los analitos en función de la cantidad recuperada con el método de extracción desarrollado. Con estos resultados se determinaron las ecuaciones y coeficientes de correlación ( $R^2$ ) respectivos.

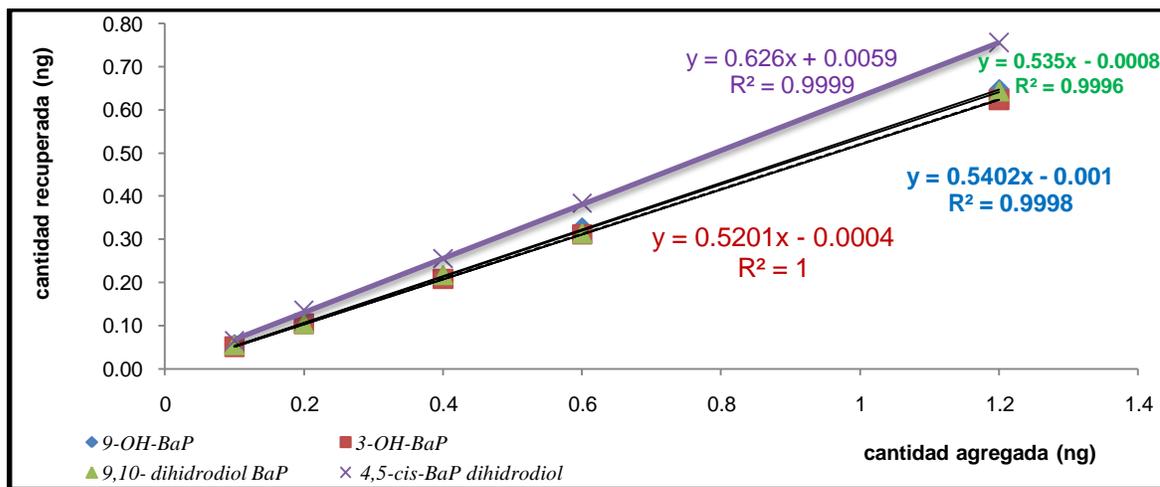


Figura 3.20. Exactitud del método. Cantidad agregada de los metabolitos en función de la cantidad recuperada, a 5 niveles de concentración. Analizada por CLAR-DF.

Se obtuvo un comportamiento completamente lineal con  $r^2 > 0.999$  y valores de pendientes que al multiplicarlos por 100 representan el recobro global para los metabolitos (tabla 3.26).

Tabla 3.26. Parámetros de la curva cantidad adicionada -vs- cantidad recuperada para los metabolitos de HAP's.

Compuesto	Coefficiente de correlación ( $r^2$ )	Recobro Pendiente de la recta X 100
9,10- dihidrodiol-BaP	0.9996	54
4,5-dihidrodiol-BaP	0.9999	61
9-OH-BaP	0.9998	54
3-OH-BaP	0.9999	52

Los recobros globales de los metabolitos se encontraron por arriba del 50 %, para todos los analitos como ya se había determinado en los ensayos de optimización de la secuencia de elución previos.

### Precisión del método.

En la tabla 3.27 se muestran los resultados de la precisión del método desarrollado representado con los coeficientes de variación de los recobros de tres extracciones el mismo día y en diferentes días.

Tabla 3.27. Repetibilidad y reproducibilidad del método desarrollado. Utilizando muestras fortificadas a dos niveles de concentraciones de cada metabolito 0.1 ng mg<sup>-1</sup> y 0.55 ng mg<sup>-1</sup> (reproducibilidad) y 0.2 ng mg<sup>-1</sup> (repetibilidad).

Compuesto	Repetibilidad en un día Recobro promedio	% C.V. de 3 extracciones (mismo día)	Reproducibilidad en 3 días diferentes. Recobro promedio		% C.V. de 3 extracciones en (días diferentes)	
	0.2 ng mg <sup>-1</sup>	0.2 ng mg <sup>-1</sup>	0.1 ng mg <sup>-1</sup>	0.55 ng mg <sup>-1</sup>	0.1 ng mg <sup>-1</sup>	0.55 ng mg <sup>-1</sup>
9,10- dihidrodiol-BaP	52	4.4	60	56	6.5	7.2
4,5-dihidrodiol-BaP	68	3.4	59	57	8.6	7.7
9-OH-BaP	53	5.7	58	51	10.8	5.3
3-OH-BaP	52	7.1	55	47	11.8	3.1

En la tabla 3.27 se muestra que el método presenta una buena repetibilidad al presentar coeficientes de variación menores a 7.1 % que es aceptable considerando que se trata de muestras biológicas de naturaleza muy compleja.

Asimismo se muestra reproducibilidad de método presentándose coeficientes de variación menores a 12 % a un nivel de concentración de 0.1 ng mL<sup>-1</sup> y coeficientes de variación menores a 7.7 % a una concentración de 0.55 ng mL<sup>-1</sup>.

### Límite de detección y cuantificación del método.

En la tabla 3.28 se presentan los límites de detección experimental y estadístico así como el límite de cuantificación para cada metabolito. Éstos resultan ser muy bajos, por lo tanto apropiados para la determinación de los metabolitos a nivel trazas.

Tabla 3.28. Límites de detección y Límites de cuantificación de los metabolitos con el método de DMFS desarrollado.

Compuesto	Límite de detección experimental (LDT) ng mg <sup>-1</sup>	Límite de detección teórico (LDT) ng mg <sup>-1</sup>	Límite de cuantificación (LC) ng mg <sup>-1</sup>
9,10- dihidrodiol-BaP	0.08	0.05	0.15
4,5-dihidrodiol-BaP	0.08	0.09	0.2
9-OH-BaP	0.09	0.1	0.2
3-OH-BaP	0.09	0.1	0.3

Los límites de detección estadísticos fueron semejantes a los determinados experimentalmente. Los límites de cuantificación comprendidos entre 0.1 - 0.3 ng mg<sup>-1</sup> indican el mínimo valor con el que se pueden cuantificar los analitos con confiabilidad.

### Reproducibilidad del método en diferentes cultivos de *Selenastrum capricornutum*.

Se determinó la reproducibilidad del método en muestras de microorganismos provenientes de tres matraces diferentes de cultivos de microalgas (*Selenastrum capricornutum*), bajo las mismas condiciones para verificar que el método funciona aún si existiera mayor o menor cantidad de interferencias, las cuales se supone pueden variar dependiendo del desarrollo de la colonia de algas en recipientes diferentes. En todos los casos se utilizó la misma cantidad de muestra (5 mg).

**Tabla 3.29.** Reproducibilidad del método en muestras de tres matraces de cultivos diferentes de *Selenastrum capricornutum*. Fortificada a una concentración de cada uno de los metabolitos de 0.2 ng mg<sup>-1</sup> de muestra.

COMPUESTO	% de Recobro			Promedio global ± D.E	C.V %
	matraz 1	matraz 2	matraz 3		
9,10-dihidrodiol BaP	49	53	55	53 ± 3.1	5.8
4,5-dihidrodiol BaP	60	60	66	62 ± 3.7	5.9
9-OH-BaP	51	52	59	54 ± 4.2	7.8
3-OH-BaP	57	57	48	54 ± 5.3	9.8

En la tabla 3.29 se presentan los recobros de cada matraz y la recobros promedio de los 4 metabolitos así como los coeficientes de variación, los cuales fueron menores a 10 %, ya que con ello fue evaluada la reproducibilidad del método en biomasa proveniente de tres matraces diferentes extraídos con el método de DMFS desarrollado, la cual se consideró aceptable, considerando que se trata de la misma especie de microalgas cultivada bajo las mismas condiciones.

También se probó la reproducibilidad del método en biomasa proveniente de un mismo matraz de medio del cultivo muestreado en diferentes días, con la finalidad de determinar, si ésta se ve afectada con la fase de crecimiento en que se encuentran las microalgas en el cultivo, los resultados de las determinaciones se presentan en la tabla 3.30.

**Tabla 3.30.** Reproducibilidad del método utilizando el mismo medio de cultivo de microalgas, en tres fases diferentes de crecimiento. Fortificada a 0.2 ng mg<sup>-1</sup> de muestra.

COMPUESTO	% de Recobro			Promedio global ± D.E	C.V %
	6 días	10 días	14 días		
9,10-dihidrodiol BaP	50	53	52	52 ± 1.6	3.0
4,5-dihidrodiol BaP	61	62	64	63 ± 1.4	2.3
9-OH-BaP	54	54	51	53 ± 1.8	3.4
3-OH-BaP	51	54	49	51 ± 2.4	4.7

Se evaluó la reproducibilidad con los coeficientes de variación, menores a 5%, lo que nos indica que no se presenta variación en cuanto a la fase de crecimiento en que se encuentran las células, ya que los coeficientes de variación obtenidos son inferiores a los que presenta la precisión del método (ver tabla 8.2 ).

#### 3.4.4. Robustez del método de DMFS.

##### *Selenastrum capricornutum* -vs- *Scenedesmus acutus*.

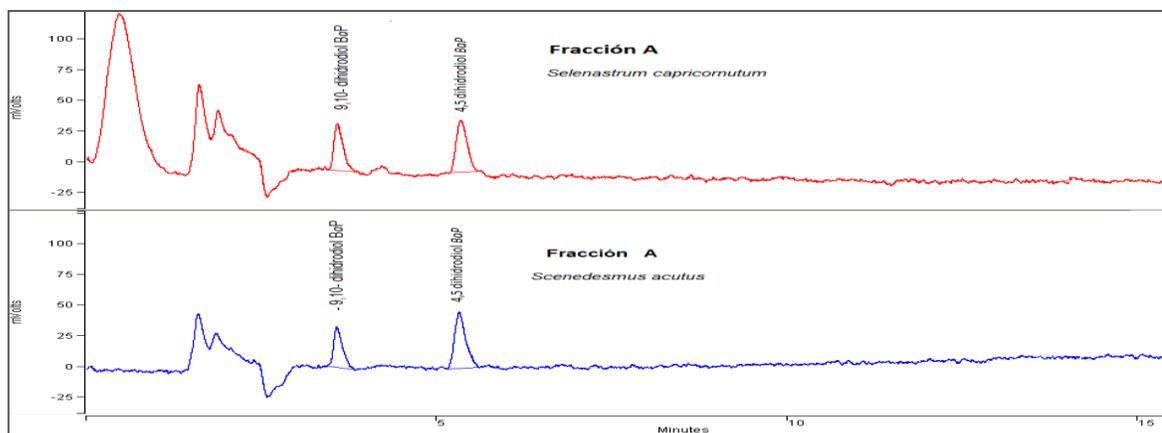
Con la finalidad de determinar la robustez del método de extracción, se evaluó el recobro y la reproducibilidad utilizando dos diferentes especies de microalgas, aplicando el mismo método de DMFS desarrollado. Las microalgas utilizadas fueron *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*.

La reproducibilidad del método se determinó con los coeficientes de variación de los recobros promedio de 3 extracciones realizadas en 3 días diferentes con biomasa procedente de las dos especies de microalgas. Los resultados se muestran en la tabla 3.31 junto con los recobros promedio.

**Tabla 3.31.** Recobros promedio obtenidos por el método de DMFS desarrollado usando dos especies de microalgas. 5 mg de muestra fortificada a  $0.4 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada compuesto con 100 mg de adsorbente.

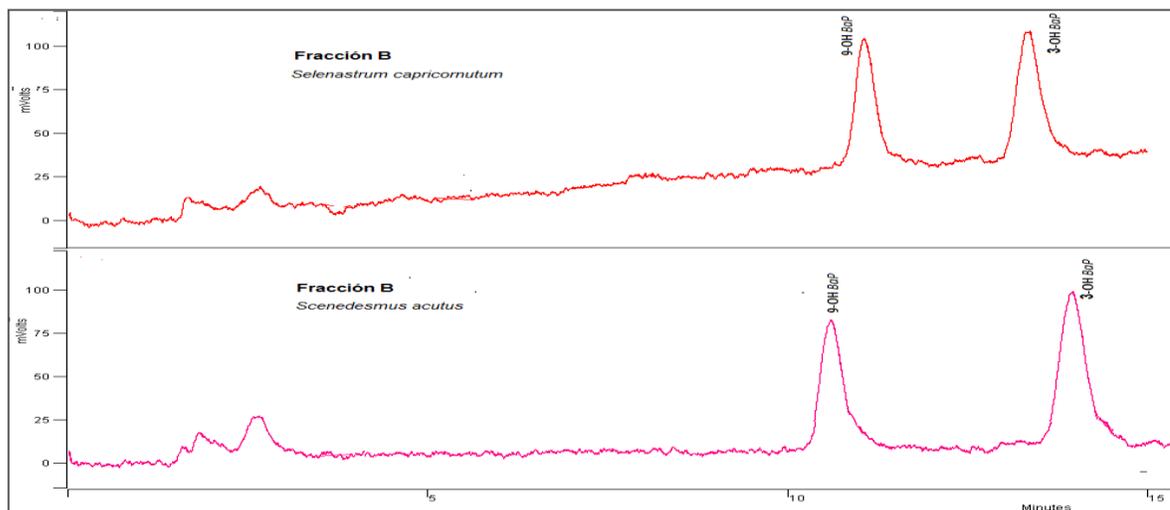
COMPUESTO	<i>Selenastrum capricornutum</i>	C.V %	<i>Scenedesmus acutus</i>	C.V %
9,10-dihidrodiol BaP	49	2.0	55	5.0
4,5-dihidrodiol BaP	59	6.6	65	9.2
9-OH-BaP	55	4.7	56	9.0
3-OH-BaP	52	4.6	51	3.2

Las figuras 3.21 muestran los cromatogramas de los extractos A obtenidos de aplicar el método de DMFS a las dos especies de microalgas *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*.



**Figura 3.21.** Cromatogramas de las fracciones A (eluidas con 1.5 mL de acetonitrilo:agua 55:45) extraídas con el método de DMFS de las dos microalgas *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum* Columna analítica HICHROM, SHERISORB de 250 x 4.6 mm d.i, empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ . Flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Fortificación a una concentración de 0.4 ng  $\text{mg}^{-1}$  de cada compuesto. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Elución isocrática con 85% metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm

El cromatograma proveniente del extracto de *Selenastrum capricornutum* parece tener mayores interferencias que eluyen al principio del cromatograma pero que no afectan en absoluto a los picos de interés.



**Figura 3.22.** Cromatogramas de las fracciones B (eluidas con acetonitrilo:agua 90:10) extraídas con el método de DMFS de las dos microalgas *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum* Columna analítica HICHROM, SHERISORB de 250 x 4.6 mm d.i, empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ . Flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Fortificación a una concentración de 0.4 ng  $\text{mg}^{-1}$  de cada compuesto. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Elución isocrática 85% metanol y 15 % metanol. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm.

En la figura 3.22 se presentan los cromatogramas de los extractos B de las dos microalgas. En ambos cromatogramas se observa una línea base muy estable y con poca interferencia en ambos cromatogramas que no dificulta su análisis.

Para conocer si existe diferencia a nivel de recobro entre los dos ensayos, se utilizó la prueba de t-STUDENT, para comparar el mismo método de DMFS en muestras provenientes de dos especies diferentes de microalgas. Esta prueba determina si se obtiene el mismo recobro para cada uno de los metabolitos o si hay diferencia significativa dependiendo del tipo de microalgas.

Hipótesis nula (Ho): los recobros promedio de los 4 metabolitos de HAP's son iguales en las 2 especies de microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*.

Hipótesis alterna (Ha): Hay diferencia en los recobros promedio entre las dos especies de microalgas.

Esta prueba se realizó utilizando un nivel de confianza del 95% y 99%, los resultados de la prueba de t-student para las dos especies se presentan en la tabla 3.32.

Tabla 3.32. Resultados de la prueba de t-Student con los 2 especies de microalgas por el método DMFS.

COMPUESTO	t-Student calculada	n	t α 2 (g.l=n1-n2-2) Tablas α=0.05	t α 2 (g.l=n1-n2-2) Tablas α=0.01
9,10-dihidrodiol BaP	3.9	6	2.78	4.60
4,5-dihidrodiol BaP	1.46	6	2.78	4.60
9-OH-BaP	0.4	6	2.78	4.60
3-OH-BaP	-0.39	6	2.78	4.60

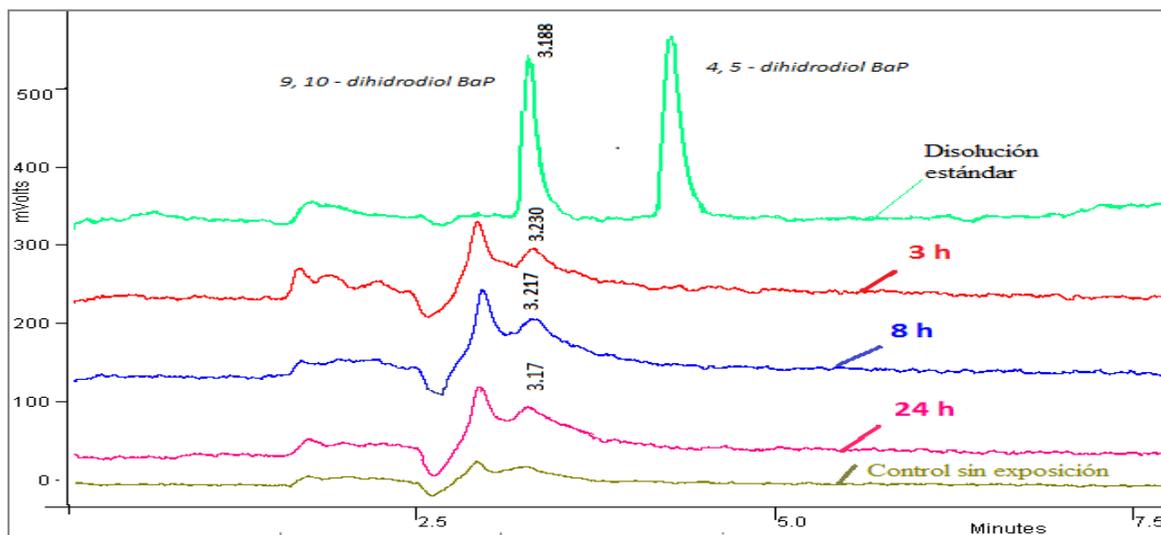
En la tabla 3.32 el valor de la t-Student calculada de los 4 metabolitos es menor al  $t_4=4.6$  ( $P=0.01$ ) y por lo tanto se aceptaría la hipótesis nula de no haber diferencia a nivel de recobro de los 4 metabolitos de HAP's entre las dos especies de microalgas con el método DMFS desarrollado. Sin embargo al 95 % confianza esto sólo se cumple para 3 de los compuestos, salvo para el 9,10-dihidrodiol BaP ya que el valor estimado de  $t_4=3.9$  es mayor que el  $t_4=2.78$  ( $P=0.05$ ) de tablas, por lo que en éste intervalo de confianza no se aceptaría la hipótesis nula, aceptándose que hay diferencia a nivel de recobro para este compuesto; sin embargo para los otros tres compuestos es menor al  $t_4=2.78$  ( $P= 0.05$ ) de tablas, aceptando que no hay diferencia en los recobros de estos metabolitos.

### 3.5. Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a BaP.

El objetivo de estos ensayos fue el de realizar un análisis cualitativo para aplicar los métodos de Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida seguidos del análisis por cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia, a cultivos de microalgas (*Selenastrum capricornutum*) expuestos a benzo[*a*]pireno. Lo anterior, para realizar una evaluación preliminar acerca de si las microalgas efectivamente tienen la capacidad de degradar al BaP a compuestos más polares como los dihidrodioles y los hidroxi-BaP.

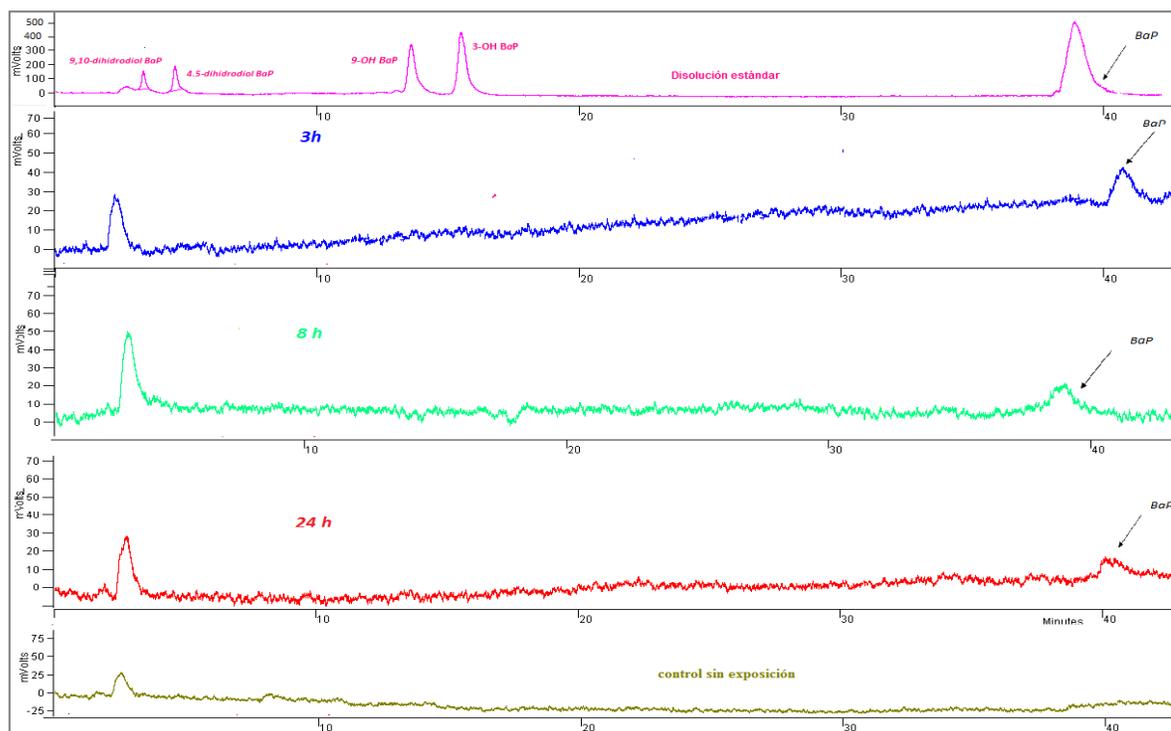
El primer ensayo realizado fue tomando la cantidad suficiente de disolución de BaP para tener una concentración de  $1.2 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP en 15 mL de medio de cultivo que se expusó bajo condiciones de iluminación de luz amarilla, en los tres diferentes tiempos seleccionados. Una vez que transcurrió el tiempo de exposición, las muestras fueron procesadas con el método de EFS optimizado y DMFS desarrollado para detectar a los metabolitos producto de la degradación del BaP por microalgas.

A continuación se presentan y discuten los cromatogramas obtenidos al inyectar los extractos o fracciones A y B, correspondientes a los diferentes tiempos de exposición estudiados; éstos se pueden observar en la figuras 3.23 a 3.26.



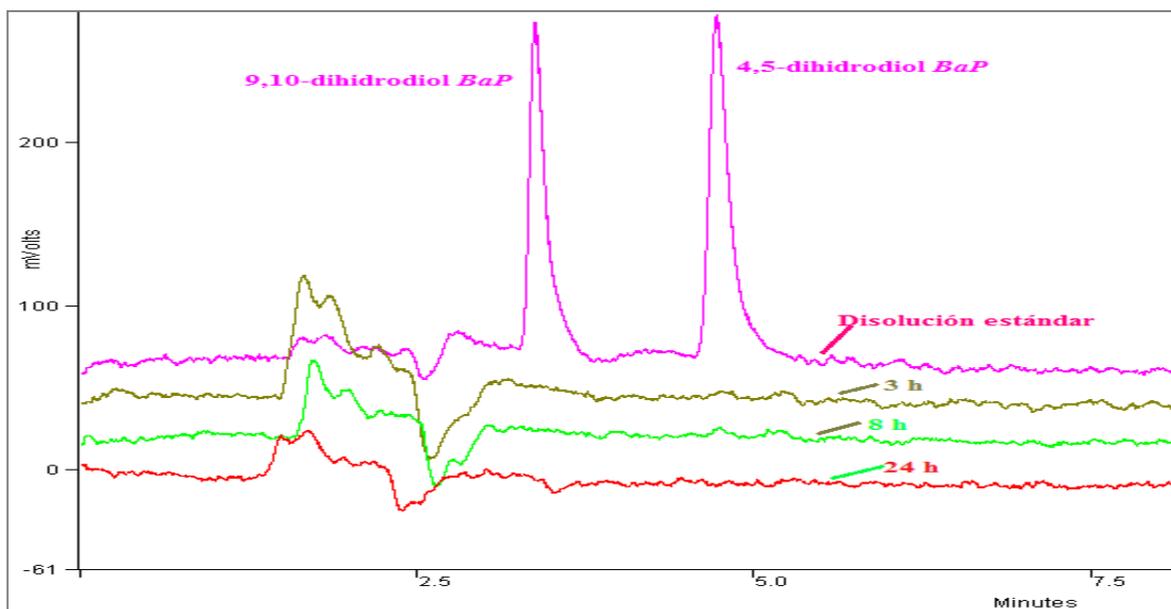
**Figura 3.23.** Cromatogramas de los extractos A obtenidos del medio de cultivo líquido por el método de EFS, de microalgas expuestas a una concentración de  $1.2 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP durante intervalos de tiempo de 3 h, 8 h y 24 h. Cromatogramas del control sin exposición y disolución estándar a una concentración de  $3 \text{ ng mL}^{-1}$ . Columna analítica HICHROM, SHERISORB de  $250 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ , empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85% metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm.

Como se observa en la figura 3.23, en los tres cromatogramas de los extractos procedentes de la exposición, se presenta un pico localizado en el tiempo de retención del 9,10-dihidrodiol BaP, ( $t_r = 3.2$ ) y que además no se distingue en el control de las microalgas no expuestas. Este pico se presenta con poca intensidad, indicando que el compuesto se encuentra en un nivel de concentración muy bajo, por debajo del límite de cuantificación, sin embargo, si se compara cuidadosamente el pico que se presenta a las 3 h y a las 8 h es un poco mayor que el de 24 h donde casi ya no se ve bien definido. Lo anterior podría indicar que este compuesto se forma entre las 0 y las 8 h de exposición al benzo[*a*]pireno y gradualmente va desapareciendo o transformándose en otro compuesto después de las 24 h. Este pico como ya se indicó, se presenta con muy baja respuesta cercana al límite de detección del método optimizado, razón por la que no se pudo cuantificar. Por otra parte, no podemos afirmar categóricamente que este pico corresponda al 9,10 dihidrodiol BaP hasta no contar con el espectro de masas, lo cual se pretende realizar en estudios futuros.



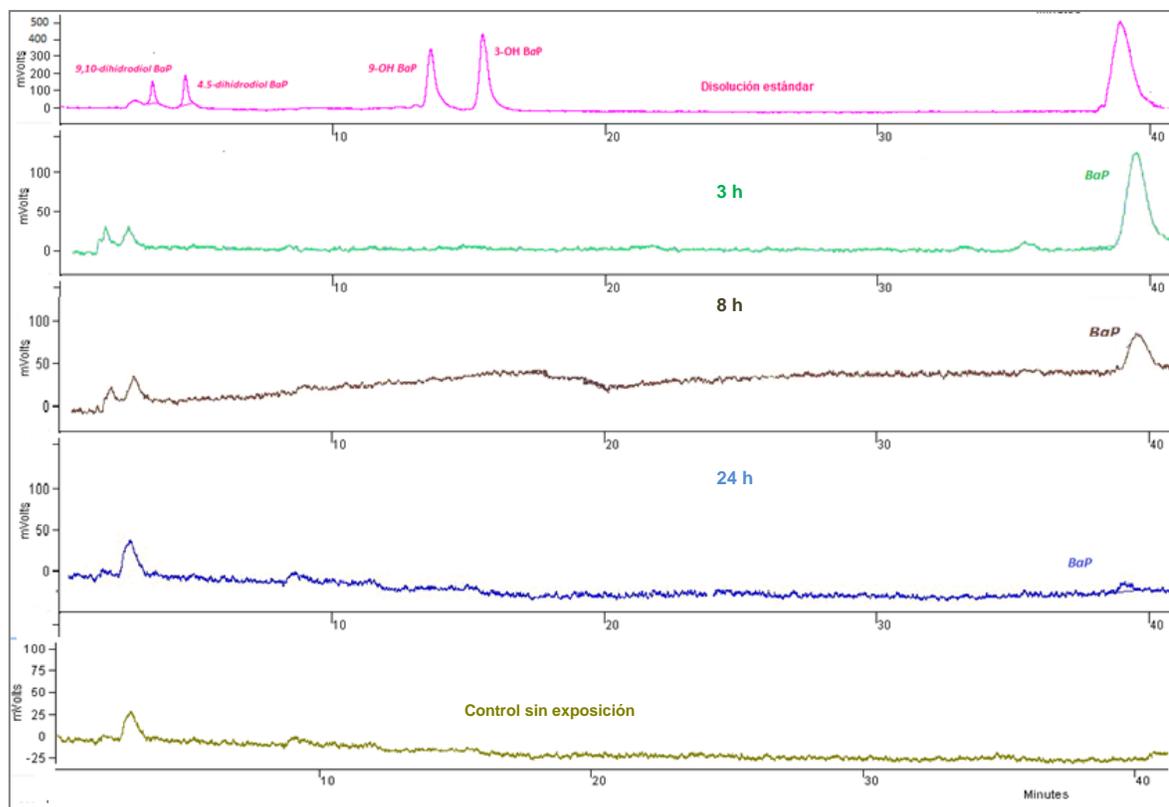
**Figura 3.24.** Cromatogramas de los extractos B obtenidos del medio de cultivo líquido por el método de EFS, microalgas expuestas a una concentración de  $1.2 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP durante intervalos de tiempo de 3 h, 8 h y 24 h. Cromatogramas del control sin exposición y una disolución estándar a una concentración de  $6 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada metabolito y  $9 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP. Columna analítica HICHROM, SHERISORB de  $250 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ , empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85 % metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ )  $263 \text{ nm}$  y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ )  $430 \text{ nm}$ .

En la figura 3.24 se observan los cromatogramas que corresponden a diferentes tiempos de exposición de las fracciones B extraídas por EFS en donde no se detectaron los hidroximetabolitos, pero si se alcanzó a detectar al BaP en el tiempo de retención cercano a los 40 min. Este pico tiene una intensidad cercana al límite de detección y se observa que al aumentar el tiempo de exposición su tamaño va disminuyendo a las 3 h, 8 h y 24 h de exposición, en donde casi se confunde con el ruido de fondo. La baja señal del BaP indica que efectivamente éste se está metabolizando. En el cromatograma de la disolución estándar también se incluyeron a los metabolitos.



**Figura 3.25.** Cromatogramas de los extractos A obtenidos de las microalgas (biomasa) por el método de DMFS, de microalgas expuestas a una concentración de  $1.2 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP durante intervalos de tiempo de 3 h, 8 h y 24. Cromatograma de una disolución estándar a una concentración de  $3 \text{ ng mL}^{-1}$ . Columna analítica HICHROM, SHERISORB de  $250 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ , empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85% metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm.

En la figura 3.25 proveniente de los extractos A extraídos por DMFS de las microalgas (biomasa), no se presentó ninguna señal de los dihidrodioles BaP, probablemente porque se metabolizan muy rápidamente o se presentan pero en muy bajas concentraciones que no es posible detectarlos por el método desarrollado.



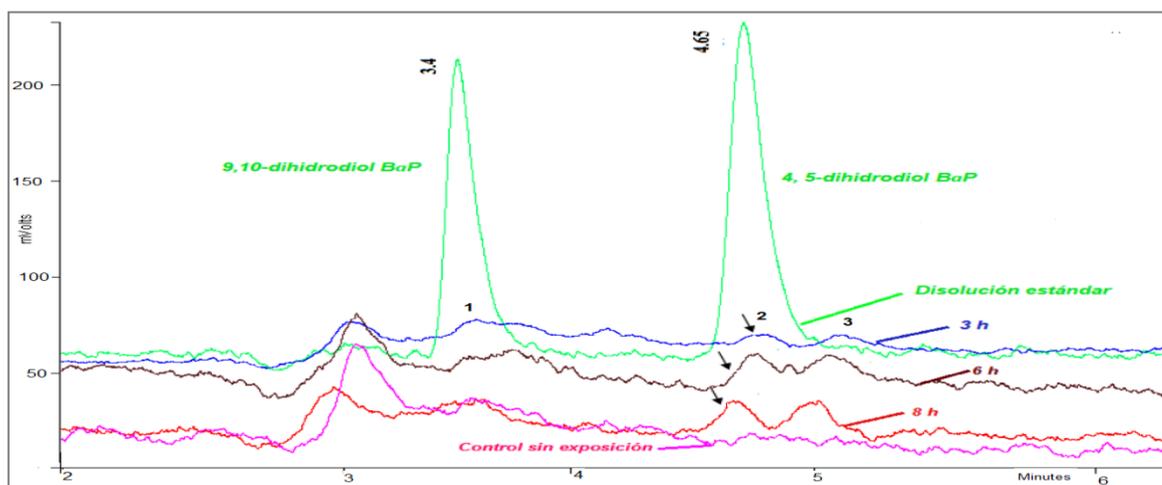
**Figura 3.26.** Cromatogramas de los extractos B obtenidos de las microalgas (biomasa) por el método de DMFS, de cultivos de microalgas expuestas a una concentración de  $1.2 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP durante intervalos de tiempo de 3 h, 8 h y 24 h. Cromatogramas del control sin exposición y de disolución estándar a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada metabolito y  $9 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP. Columna analítica HICHROM, SHERISORB de  $250 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ , empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85% metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ )  $263 \text{ nm}$  y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ )  $430 \text{ nm}$ .

Los cromatogramas de la figura 3.26 provienen de los extractos o fracciones B extraídos por DMFS de las microalgas (biomasa), y como se observa en ninguno de los tres se presentan señales de los metabolitos hidrox-BaP. Sin embargo, se observa en cada uno, un pico que corresponde al tiempo de retención del BaP (40 min), que claramente va disminuyendo con el tiempo de exposición. Esto puede indicar que el BaP agregado al medio, inicialmente queda adsorbido por las microalgas, pero como se aprecia este compuesto al pasar las horas de exposición no se está acumulando en las mismas, al contrario con el paso del tiempo se metaboliza. Si se acumulara el pico aumentaría de tamaño con el tiempo.

Con el propósito de conocer si al aumentar la concentración del BaP en el medio de exposición, se observaría la presencia de los metabolitos en mayor proporción, se realizó un segundo ensayo en donde se aumentó la concentración de BaP a  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Para este ensayo se tomó la cantidad suficiente de disolución de BaP para tener una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  en los 15 mL de medio de cultivo de microalgas expuestas ahora durante períodos más cortos. Entre las 3 y 8 h, del ensayo anterior, los cuales parecen ser más críticos; se agregó entre los dos tiempos, el ensayo de 6 h.

Las figuras 3.27 a 3.32 presentan los cromatogramas de los extractos A y B obtenidos con el método de EFS y DMFS bajo las nuevas condiciones establecidas, junto con el control de exposición y una disolución estándar.

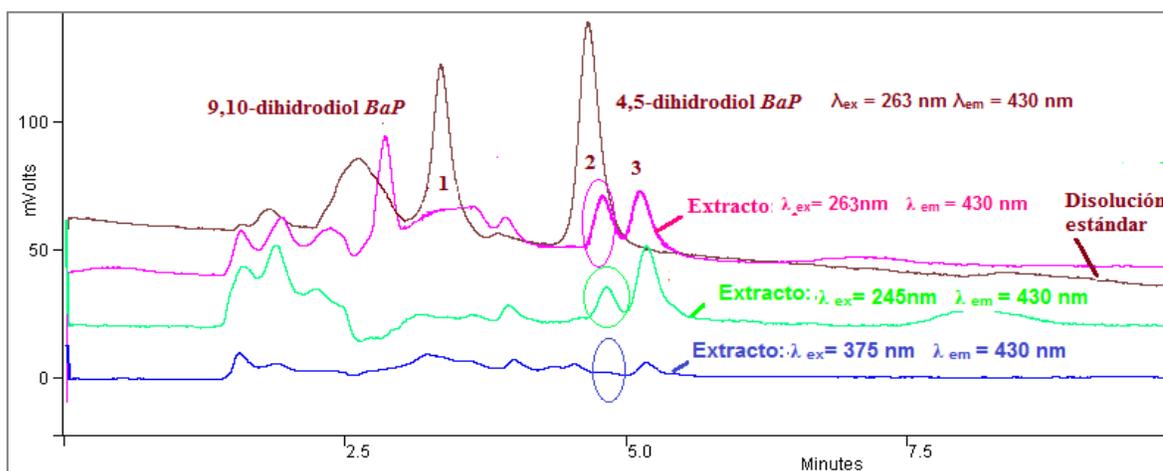


**Figura 3.27.** Cromatogramas de los extractos A obtenidos del medio de cultivo líquido por el método de EFS, de cultivos de microalgas expuestas a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP durante intervalos de tiempo de 3 h, 6 h y 8 h. Cromatogramas del control sin exposición y disolución estándar a una concentración de  $3 \text{ ng mL}^{-1}$ . Columna analítica HICHRON, SHERISORB de 250 x 4.6 mm d.i, empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85 % metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm.

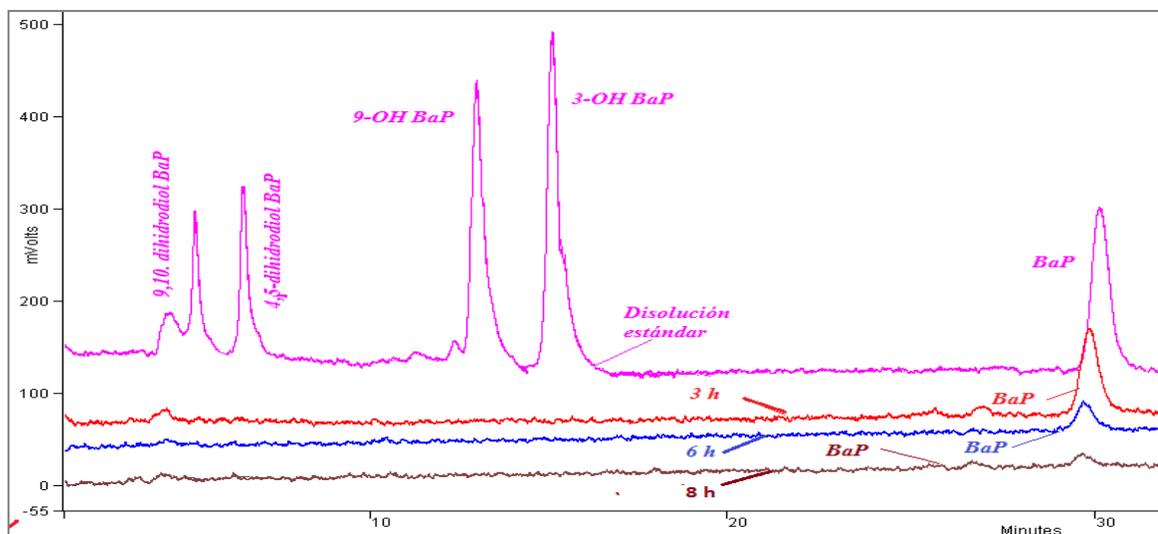
En este experimento se presentaron resultados diferentes, no directamente comparables, posiblemente relacionados con la concentración de exposición más alta del BaP, aumentada casi cinco veces con respecto al primer ensayo. Así, en la figura 3.27 en donde se muestran los cromatogramas provenientes de los extractos A obtenidos del medio de cultivo líquido por EFS durante los tres períodos de exposición, se observó la presencia bien definida de dos picos en la zona de 4.5 min a 5.5 min (picos 2 y 3), que eluyen muy cerca el uno del otro; uno de ellos (señalado con flecha) coincide con el tiempo de retención del 4,5-dihidrodiol BaP ( $t_r = 4.65$ ) y los dos van aumentando conforme aumenta el tiempo de exposición; el cromatograma del control no los presenta. Por otra parte, a diferencia del ensayo con  $1.2 \text{ ng mL}^{-1}$  es de notarse que el pico 1 correspondiente al 9,10-dihidrodiol BaP ( $t_r = 3.4 \text{ min.}$ ) no se detectó claramente, aunque es cierto que este metabolito parece formarse en muy

pequeñas cantidades, difíciles de detectar. También es de considerarse que este metabolito y el 4,5-dihidrodiol BaP no son los únicos que se pueden formar. De acuerdo a la literatura, existen otros metabolitos que también se pueden formar, como el 7,8 dihidrodiol BaP, el cual eluye posteriormente al 4,5-dihidrodiol BaP con tiempo de retención muy cercano, de acuerdo a la literatura (Warshawsky, 1995; Lindquist, 1985).

Entonces, para tener indicios de si el pico de  $t_r = 4.65$  min correspondería al 4,5-dihidrodiol BaP, se variaron las longitudes de onda de excitación y se dejó constante la de emisión en la detección por fluorescencia. Esto con el objetivo de ver si se presentaba correspondencia de los tamaños de los picos con las longitudes en que este metabolito se excita y emite. Estos ensayos se muestran en los cromatogramas presentados en la figura 3.28 de los extractos A, provenientes de la muestra con 8 h de exposición, detectados con las tres diferentes longitudes de excitación (245, 263 y 375 nm), donde la máxima es la de 263 seguida de 245 y 375 nm. Allí se observa que el pico 2 de  $t_r = 4.6$  en cuestión varió de tamaño conforme a lo esperado en el espectro del 4,5, dihidrodiol-BaP (ver anexo III), lo cual proporciona mayores posibilidades de que efectivamente se trate del 4,5, dihidrodiol-BaP. Sin embargo, para corroborar categóricamente la presencia del metabolito se tendría que obtener el espectro de masas.

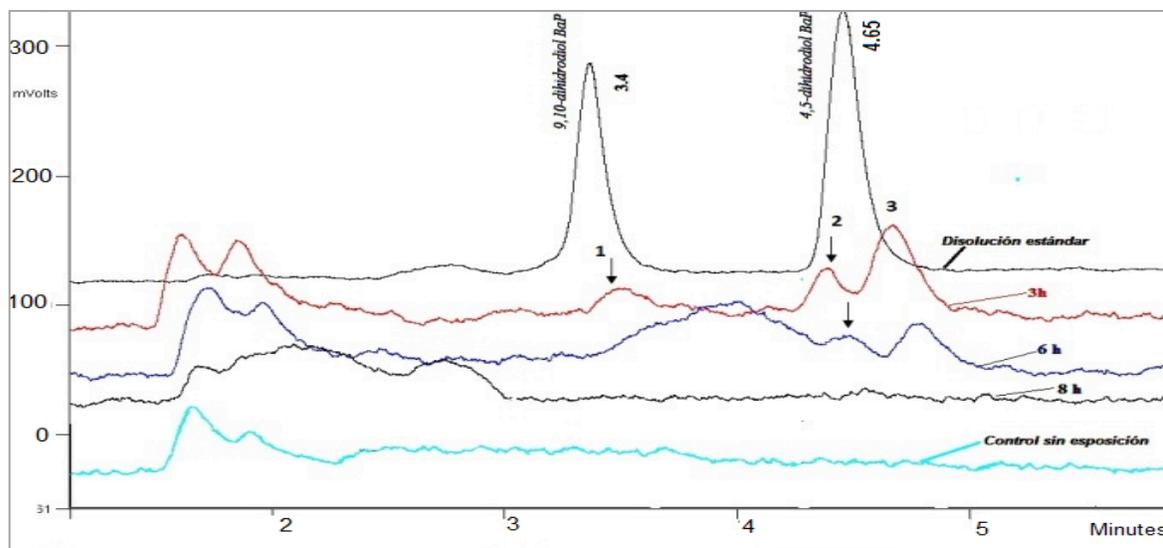


**Figura 3.28.** Cromatogramas de los extractos A obtenidos del medio líquido por el método de EFS, de cultivos de microalgas expuestas a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP por 8 h, analizada por CLAR-DF a tres diferentes longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) 263 nm, 245 nm y 375 nm a una longitud de emisión ( $\lambda_{em}$ ) 430 nm. Cromatograma de una disolución estándar a una concentración de  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada metabolito. Columna analítica HICHRON, SHERISORB de  $250 \times 4.6$  mm d.i, empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85 % metano y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación y de emisión. Señalado con un círculo el pico con el mismo tiempo de retención que el 4,5-dihidrodiol BaP.



**Figura 3.29.** Cromatogramas de los extractos B obtenidos del medio líquido por el método de EFS, de cultivos de microalgas expuestas a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP durante intervalos de tiempo de 3 h, 6 h y 8 h. Cromatograma de una disolución estándar a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada metabolito y  $3 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP. Columna analítica HICROM, SHERISORB de  $250 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ , empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85 % metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm.

La figura 3.29 muestra los cromatogramas de los extractos B obtenidos de la EFS, analizados por CLAR-DF en donde no se vió la presencia de ninguno de los hidroxilados BaP, pero se observó el pico que corresponde al BaP no adsorbido por las células de las microalgas, es decir lo que se encuentra en el medio y que se está consumiendo gradualmente. Si comparamos los cromatogramas de 3, 6 y 8 horas de exposición, el tamaño del pico del BaP se va disminuyendo, lo que indicó que efectivamente se está metabolizando y no adsorbiendo por las microalgas como se demostrará más adelante en la figura 3.32 que muestra al BaP presente en los extractos de la biomasa extraído por DMFS. Nuevamente, no se detectaron los hidroxilados metabolitos en el extracto.

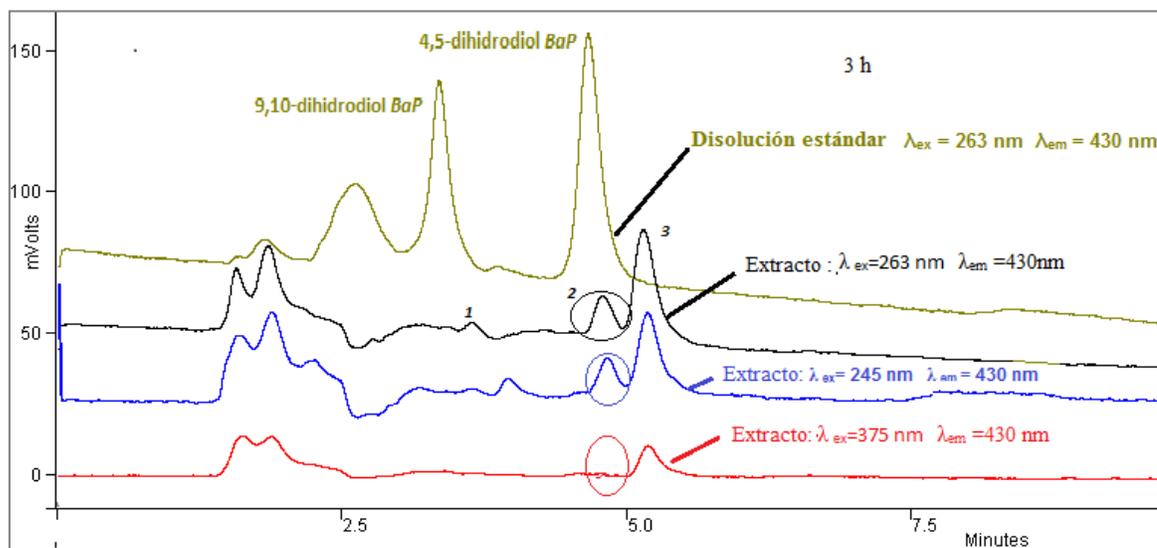


**Figura 3.30.** Cromatogramas de los extractos A obtenidos de las microalgas (biomasa) por el método DMFS, de cultivos de microalgas expuestas a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP durante intervalos de tiempo de 3 h, 6 h y 8 h. Cromatogramas del control sin exposición y disolución estándar a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ . Columna analítica HICHRON, SHERISORB de  $250 \times 4.6 \text{ mm}$  d.i., empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85% metanol y 15% agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430nm.

La figura 3.30 muestra los cromatogramas de los extractos A obtenidos de la biomasa con la técnica de DMFS después de 3, 6 y 8 h de exposición, observándose algo muy interesante: la aparición del pico 2 correspondiente a  $t_r = 4.65 \text{ min}$  de forma bien definida en el extracto de las 3 h, junto con el pico 3 adyacente a la derecha  $t_r = 5.1$ , ambos disminuyendo con el tiempo. El pico 1 de  $t_r = 3.4 \text{ min}$  correspondiente al tiempo de retención del 9,10-dihidrodiol BaP también se encuentra presente en el extracto de 3h aunque menos definido. A las 6 h de exposición los picos 2 y 3 disminuyen de tamaño, el pico 1 ya no se puede observar debido a que es muy pequeño y se presenta una perturbación en esa zona. A las 8 h ya no se observa ninguno de estos 3 picos en emisión y la zona comprendida entre 3 y 5 min es parecida a la que se presenta con el control sin exposición.

Si se comparan los resultados que muestran estos extractos de la biomasa con los extractos del medio de cultivo líquido correspondiente (figura 3.27) se puede interpretar que a las 3 h ya se formó el 4,5-dihidrodiol BaP (pico 2) en la célula y se empieza a liberar al medio; demostrándose esto entre las 6 y las 8 h. En este último tiempo, la célula ya no tiene ni forma al 4,5-dihidrodiol BaP, pero el compuesto se encuentra aún en el medio, probablemente esperando una próxima etapa de degradación.

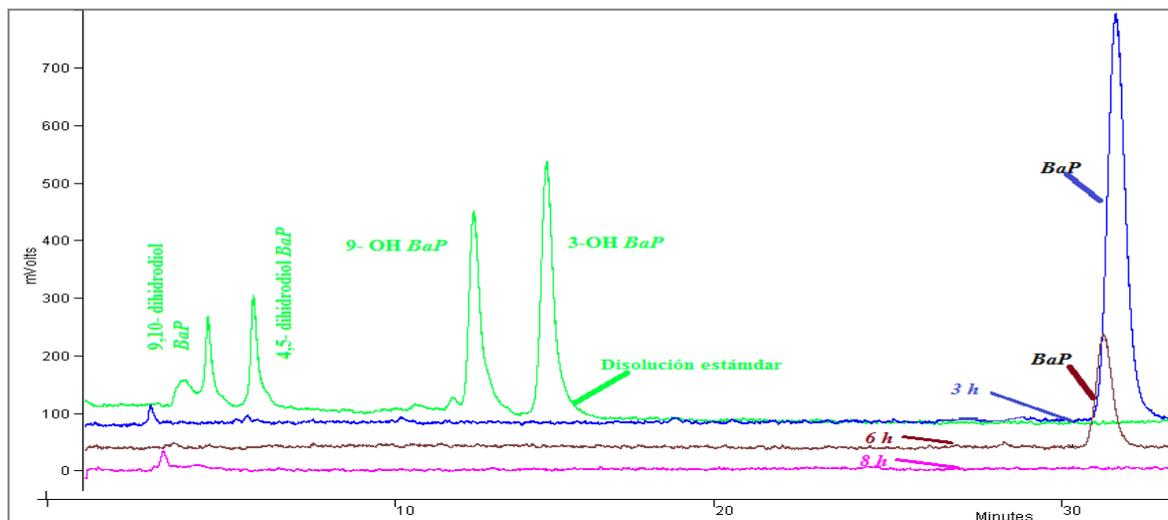
Posteriormente, con el fin de observar el comportamiento del pico 2 que presenta el mismo  $t_r = 4.65$  que el 4,5 dihidrodiol BaP, se inyectó el extracto A que correspondía a 3 h de exposición a diferentes longitudes de excitación en fluorescencia, ya que fue el que presentó un mejor tamaño para que se analizará por CLAR-DF. Los cromatogramas se presentan en la figura 3.31, donde se encerró en un círculo al pico referido (2).



**Figura 3.31** Cromatogramas de los extractos A obtenidos de la biomasa por el método de DMFS, con cultivos de microalgas expuestas a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP por 3 h, analizada por CLAR-DF a tres diferentes longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm., 245 nm y 375nm a una longitud de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm. Cromatograma de una disolución estándar a una concentración de  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada metabolito. Columna analítica HICHRON, SHERISORB de  $250 \times 4.6 \text{ mm}$  d.i, empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85 % metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia. Señalado con un círculo el pico con el mismo tiempo de retención que el 4,5-dihidrodiol BaP.

Si comparamos los cromatogramas de la figura 3.31 a las tres diferentes longitudes de onda de excitación probadas 263, 245 y 375 nm, se observa una disminución ligeramente apreciable en cuanto a la respuesta de los picos a 263 y 245 nm; en cambio al probar la longitud de 375 nm, el primer pico y el segundo ya no se aprecian, pero si el tercer pico, aún cuando la respuesta del mismo disminuye. Cabe destacar que a esta última longitud de onda el 9,10 dihidrodiol BaP y el 4,5-dihidrodiol BaP no excitan, estos resultados nos dan aún más indicios de que se trata de estos compuestos y de que el pico 3 posiblemente sea otro metabolito como el 7,8 o 11,12-dihidrodiol BaP, pero al no contar con estos últimos estándares y su espectro de fluorescencia no se podría confirmar categóricamente que se trate de estos últimos

compuestos. Con respecto al pico 1, posiblemente el 9,10 dihidrodiol BaP, se tendría que obtener su espectro de masa para poder confirmar que efectivamente se trata de este compuesto.



**Figura 3.32.** Cromatogramas de los extractos B obtenidos de la biomasa por el método de DMFS, de cultivos de microalgas expuestas a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  de BaP durante intervalos de tiempo de 3 h, 6 h y 8 h. Cromatograma de una disolución estándar a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  de cada metabolito. Columna analítica HICHRON, SHERISORB de  $250 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ , empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula  $5 \mu\text{m}$ . Flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Elución isocrática 85% metanol y 15 % agua. Detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 263 nm y de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 430 nm.

Por otra parte, los cromatogramas presentados en la figura 3.32 de las fracciones B obtenidas por el método de DMFS, muestran que no se encuentran presentes ninguno de los hidroxi-BaP, sólo se observa un pico que corresponde al BaP (cerca a los 30 min.), éste después de 3 a 6 h disminuye a más de la mitad de la respuesta que proporciona a las 3 h y si comparamos el de las 8 h ya no se aprecia nada, indicando que el contaminante adsorbido por las microalgas está siendo metabolizando rápidamente por las mismas y no liberándolo, al ya no encontrarse presencia del BaP en el medio líquido a las 8 h como se observó en la figura 3.29.

El conjunto de los resultados anteriormente presentados dan indicios de que efectivamente el BaP si se está degradando, por medio de la formación de metabolitos como los dihidrodioles (picos 1, 2 y 3). La formación de los dihidrodioles parece darse dentro de un intervalo de tiempo máximo de 6 h. De la figura 3.30 correspondiente a los extractos de la biomasa se observa que las microalgas ya no tienen en sus células a los dihidrodioles a las 8 h. Los compuestos en cuestión son desprendidos por las

microalgas al medio líquido y éstos pueden estar presentes allí hasta las 8 h, particularmente el 4,5-dihidrodiol BaP (pico 2) y el pico (3) adyacente, porque el pico 1 (9,10-dihidrodiol BaP) parece desaparecer más rápidamente del medio que los otros dos dihidrodioles (picos 2 y 3). Sin embargo, no se puede asegurar de que efectivamente se trate de estos 2 metabolitos hasta no contar con sus espectros de masas que puedan confirmar su presencia. Los hidroximetabolitos no se detectaron, pero eso no indica que no se formen, pueden aparecer en muy bajas concentraciones que no son posibles de detectar con la metodología desarrollada.

Warshawsky y colaboradores en 1995, demostraron el metabolismo del BaP por *Selenastrum capricornutum* bajo la exposición a luz amarilla durante 2 días a 23°C por ciclos de 16 h de luz y 8 de oscuridad, conduce a la formación del 4,5 y 11,12-dihidrodiol BaP como principales metabolitos, después el 9,10-dihidrodiol BaP y por último el 7,8-dihidrodiol BaP, que se forman en menor porcentaje, la mayor cantidad de ellos se encontraron presentes en el medio líquido y en menor proporción en la biomasa. En cuanto al análisis por CLAR los metabolitos analizados por estos autores, el primer compuesto en eluir es el 9,10-dihidrodiol BaP, seguido del 4,5-dihidrodiol BaP y 7,8 dihidrodiol BaP, después eluyen los 9-OH, 3-OH y 7-OH, bajo las condiciones cromatográficas siguientes: columna cromatográfica Radial-Pak Nova Pak C-18 de 10 cm x 8 mm d.i, tamaño de partícula de 5 µm, usando un gradiente metanol – agua, iniciando con un gradiente de 80 % a 100 % de metanol, a un flujo de 2.5 mL min<sup>-1</sup>.

De acuerdo con Warshawsky bajo la luz amarilla los principales metabolitos formados en medio líquido son los dihidrodioles en un 89.5 %, seguido por los hidroximetabolitos (9-OH, 3-OH y 7-OH) en un 1.7 % y la quinona en 0.9 %. En la biomasa los metabolitos están presentes en un menor porcentaje: los dihidrodioles se presentan en un 29.3%, los hidroximetabolitos en un 6.4 % y las quinonas en un 3.0%. Con esta información y con los resultados de los ensayos de exposición realizados en el presente trabajo, coincide que los metabolitos que se forman en mayor proporción son los dihidrodioles; los hidroximetabolitos al ser los que se forman en muy bajo porcentaje sería más difícil de ser observados y cuantificados posiblemente por ello no los apreciamos en los bioensayos. Los

resultados de los bioensayos realizados, servirán de base para estudios biológicos más detallados, utilizando la herramienta analítica desarrollada y validada.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se optimizaron y desarrollaron dos métodos analíticos para la extracción de los principales metabolitos de HAP's, para determinar al 9,10-dihidrodiol BaP, 4,5-dihidrodiol BaP, 9-OH BaP y 3-OH BaP en cultivos de microalgas *Selenastrum capricornutum*.

El método de EFS-CLAR-DF optimizado permitió la extracción y concentración de los metabolitos del BaP en cultivos líquidos de microalgas fortificadas con disoluciones estándar de los analitos a estudiar.

El método DMFS-CLAR-DF desarrollado se aplicó por primera vez a muestras de microalgas (biomasa), lo que permitió utilizar muestras pequeñas del orden de miligramos y una preparación más simple de la muestra.

Los métodos EFS-CLAR-DF y DMFS-CLAR-DF resultaron ser precisos y exactos para la determinación de los cuatro metabolitos del BaP en cultivos de microalgas. Así mismo la linealidad presentó  $R^2$  entre 0.990 y 0.996. Igualmente se determinaron los límites de detección y cuantificación del orden de  $\text{ng mL}^{-1}$  para los dos métodos permitiendo determinar estos compuestos a nivel de trazas.

Las dos metodologías analíticas que se desarrollaron en este trabajo sirvieron para ser aplicadas en los bioensayos de exposición de cultivos de microalgas expuestas a contaminantes orgánicos como el BaP. Se demostró la capacidad que tienen las microalgas *Selenastrum capricornutum* de metabolizar el BaP formando compuestos de mayor polaridad que el mismo como son los dihidrodioles y los hidrox-HAP's.

La presencia de picos observados en los cromatogramas una vez realizados los ensayos de exposición y comparados con una disolución estándar dan indicios de que efectivamente *Selenastrum capricornutum* tiene la capacidad de metabolizar el BaP, formando como principales metabolitos a los dihidrodioles.

Este trabajo es el principio del desarrollo de un estudio de la degradación del BaP por microalgas y determinación de la capacidad que tienen estos microorganismos como biorremediadores y bioindicadores de contaminación por HAP's.

---

**REFERENCIAS**

- Ahmed, F. E.** 2003. Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, pp 170 - 185.
- Barranco, A, Alonso-Salces, R. M., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., Sarobe, M.** 2003. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *Journal of Chromatography A*, 988, pp. 33 – 40.
- Barker, S. A.** 2000. Matrix solid-phase dispersion. Review. *Journal of Chromatography A*, 885, pp. 115 – 127.
- Barker, S. A.** 2007. Matrix solid-phase dispersion (MSPD). Review. 2007. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (2), pp. 151 - 162.
- Brum, D., Casella, R., Pereira-Netto A.** 2008. Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PHAs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*, 74, pp. 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, pp. 104 – 115.
- Camel, V.** 2003. Solid phase extraction of trace elements. Review. *Spectrochimica Acta Part B*, 58, pp. 1177 – 1233.
- Campo, L., Rossella, F., Fustinoni, S.** 2008. Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. *Journal of Chromatography B*, 875, pp. 531 – 540.
- Cerniglia C. E.,** 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, pp. 331 - 338.

- 
- Chan, S. M. N., Luan, T. G., Wong, M. H., Tam, N. F. Y.** 2006. Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, pp. 1772 – 1779.
- Doubden, P.** 2003. PAHs: An Ecotoxicological Perspective. Wiley, USA. pp. 5 – 38.
- Fan, R., Dong, Y., Zhang, W., Wang, Y., Yu, Z., Sheng, G., Fu J.** 2006. Fast simultaneous determination of urinary 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 836, pp. 92 – 97.
- Fidalgo-Used, N., Blanco-González, E., Sanz-Mendel, A.** 2007. Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chimica Acta*, 590, pp. 1 – 16.
- García de Marina Bayo, A., Yusá-Marco, D. J.** 2008. HPLC fundamental. Editorial Universidad Politecnica de Valencia. pp. 27- 68.
- García-López, M., Canosa, P., Rodríguez, I.** 2008. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, pp. 963–974.
- Giraud, F., Giraud, P., Kadri, M., Blake, G., Steiman, R.** 2001. Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water Research*, 35, pp. 4126 – 4136.
- Gómez, L. M., Hurtado, C., Dussán, J., Parra, J., Narváez, S.** 2006. Determinación de la capacidad de degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas aisladas de sedimentos en el Caribe Colombiano. *Actual Biol*, 28, pp. 125 – 137.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C. C., Cid, H. A.** 2006. Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. *Environmental Pollution*, 144, pp. 266 – 271.

**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, pp. 47–55.

**Harris, D.C.** 2001. *Análisis químico cuantitativo 2<sup>da</sup>*. Editorial Reverté S. A, pp. 693 - 719.

**Haritash, A. K., Kaushik, C. P.** 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169, pp. 1 – 15.

**Hennion, M. C.** 1999. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. Review. *Journal of Chromatography A*, 856, pp. 3 - 54.

<http://web.biosci.utexas.edu/utex>.

<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag//artoct05/mmdesmid.html>.

**Jacques, C., Jamin, E. L., Perdu, E., Duplan, H., Mavon, A., Zalko, D., Debrauwer, L.** 2010. Characterisation of B(*a*)P metabolites formed in an ex vivo pig skin model using three complementary analytical methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, pp. 1691 - 1701.

**Juhasz, A. L., Naidu, R.** 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, pp. 57 – 88.

**Kristenson, E. M., Ramos, L., Brinkman, U. A. T.** 2006. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry* 25, pp. 96 - 111.

**Kolar, B. A., Hrsak, D., Fingler, S., Cetkovic´ H., Petric´, I., Kolic´, U.N.** 2007. PCB-degrading potential of aerobic bacteria enriched from marine sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60, pp. 16 - 24.

- Ke, L., Luo L., Wang, P., Luan, T., Tamb, N. F-Y.** 2010. Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology*, 101, pp. 6950 - 6961.
- Leroyer, A., Jeandel, F., Maitre, A., Howsam, M., Deplanque, D., Mazzuca, M., Nisse, C.** 2010. 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations. *Science of the Total Environment*, 408, pp. 1166 - 1173.
- Levin, L., Viale, A., Forchiassin, A.** 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, pp. 1 - 5.
- López-Adrian, S. J., Barrientos-Medina, R. C.** 2005. La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la península de Yucatán, Ed. De la Universidad autónoma de Yucatán. pp. 1 - 21.
- Longfellow, Ph. D. D. G.** 1993. Handbook of analytical and spectral data for polycyclic aromatic hydrocarbons. Benzo[a]pyrene and its metabolites. Midwest Resear institute Kansas City, Missouri. pp. 10 – 45.
- Mancera-López, M. E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Saucedo-Castañeda, G., Barrera-Cortés, J.** 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation – bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, pp. 151 - 160.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez, H.** 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39, pp. 27 - 36.
- Marcé, R. M., Borrull, F.** 2000. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. Review. *Journal of Chromatography A*, 885, pp. 273 - 290.

---

**Mazéas, O., Budzinski, H.** 2005. Solid-phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383, pp. 985 - 990.

**Mc Master, Marvin.** 1994 *HPLC: A Practical User's Guide*. Wiley-VCH. Willard H.H Métodos instrumentales de análisis. Editorial continental. pp. 21 – 59.

**Osman, K. A., Ibrahim, G. H., Askar, A. I., Rahman, A. A., Alkhail, A.** 2008 Biodegradation kinetics of dicofol by selected microorganisms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91, 180 - 185.

**Pena, M. T., Casais M. C., Mejuto, M. C., Cela R.** 2007. 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, pp. 32 - 38.

**Pena, M. T., Casais M. C., Mejuto, M. C., Cela R.** 2008. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. *Analytica Chimica Acta*, 626, 155 - 165.

**Pena, M.T., Casais, M.C., Mejuto, M.C., Cela, R.** 2009. Development of an ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216, pp. 6356 - 6364.

**Pena, M.T., Casais, M.C., Mejuto, M.C., Cela, R.** 2010. Development of a sample preparation procedure of sewage sludge samples for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on selective pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, pp. 425 - 435.

**Rey-Salgueiro, L., Martínez-Carballo, E., García-Falcón, M. S., González-Barreiro, C., Simal-Gándara J.** 2009. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. *Food Chemistry*, 115, pp. 814 - 819.

- 
- Potin, O., Veignie, E., Rafin, C.** 2004. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, pp. 71 - 78.
- Poole, C. F., Gunatilleka, A. D., Sethuraman, R.** 2000. Contributions of theory to method development in solid-phase Extraction. *Journal of Chromatography A*, 885, pp. 17 - 39.
- Rubio-Armendáriz, C., Álcarez-Marante, R. y Hardisson de la Torre, A.** 2006. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) en productos de la pesca: revisión. *Toxicol*, 23, pp. 1 - 6.
- Skoog, Douglas A., Leary James, J.** 1994, *Análisis Instrumental*. Ed. Madrid: McGraw-Hill. pp. 730 – 775.
- Soriano Sanz, J.A.** 2009. Evaluación y seguimiento del contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en mejillón silvestre de la costa de galicia y cantábrico, antes y después del vertido del b/tprestige. Departamento de química analítica, Universidad de Coruña, pp. 1-337.
- Schoeny, R., Cody T., Warshawsky, D., Radike, M.** 1988. Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species. *Mutation Research*, 197, pp. 289 - 302.
- Stellman, J. M., McCan, M.** 2001. Hidrocarburos poliaromáticos. En: *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. 3ª edición. Madrid: Organización Internacional del Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales Subdirección General de Publicaciones. pp. 9 - 310
- Sogorb-Sánchez, M. A., Vilanova, G. E.** 2004. *Técnicas Analíticas de Contaminantes químicos*. Ediciones Diaz Santos pp. 142 - 196.
- Toriba, A., Nakamura, H., Chetiyankornkul, T., Kizu, R., Makino T., Nakazawa, H., Yokoi T., Hayakawa, K.** 2003. Method for determining monohydroxybenzo[a]pyrene

isomers using column-switching high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 312, pp. 14 - 22.

**Wang, H., Yu S., Campiglia, A. D.** 2009. Solid-phase nano-extraction and laser-excited time-resolved Shpol'skii spectroscopy for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples. *Analytical Biochemistry*, 385, pp. 249 - 256.

## ANEXOS

### Anexo I

Ejemplo del cálculo del límite de detección y límite de cuantificación del sistema, con los datos de la curva de calibración del 4,5-dihidrodiol BaP.

4.5-hidroxi benzo[a]pireno				
CONCENTRACIÓN X ng mL <sup>-1</sup>	ÁREA Y	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	XY
0.5	267714	0.25	71670785796	133857
0.5	262476	0.25	68893650576	131238
0.5	266586	0.25	71068095396	133293
1.0	479766	1	2.30175E+11	479766
1.0	474388	1	2.25044E+11	474388
1.0	476466	1	2.2702E+11	476466
2.0	1008425	4	1.01692E+12	2016850
2.0	1041811	4	1.08537E+12	2083622
2.0	1037891	4	1.07722E+12	2075782
3.0	1689755	9	2.85527E+12	5069265
3.0	1621557	9	2.62945E+12	4864671
3.0	1695997	9	2.87641E+12	5087991
5.0	3073524	25	9.44655E+12	15367620
5.0	3007412	25	9.04453E+12	15037060
5.0	2995133	25	8.97082E+12	14975665
<b>34.5</b>	<b>19398901</b>	<b>117.75</b>	<b>3.99E+13</b>	<b>68407534</b>

Pendiente

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

$$m = \frac{15(68407534) - (34.5)(19398901)}{15(117.75) - (34.5)^2} = 619533$$

Ordenada al origen

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

$$b = \frac{19398901 - 619533(34.5)}{15} = -131666$$

Desviación estándar de la regresión

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

---

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{3.99E+13 - 619533(68407534) - (-131666)(19398901)}{15-2}} = 75166$$

### Límite de Detección

$$L.D. = \frac{3.3 * S_{y/x}}{m}$$

$$L.D = \frac{3.3 * 75166}{619533} = 0.4 \text{ ng mL}^{-1}$$

$$L.C. = \frac{10 * S_{y/x}}{m}$$

$$L.D = \frac{10 * 75166}{619533} = 1.2 \text{ ng mL}^{-1}$$

## Anexo II

### PRUEBA DE t-STUDENT

Para comparar los ensayos de las dos especies de microalgas con los dos métodos de EFS y DMFS se realizó la prueba de t-student la cual nos proporciona la probabilidad de que dos conjuntos de datos sean diferentes entre si a dos niveles de confianza de 95% y 99% para observar si al aplicar los métodos desarrollados y optimizados proporcionan los mismos recobro de los analitos o si existe diferencia significativas aplicar los método.

Ejemplo de análisis estadístico de los recobros de los metabolitos de HAP's recuperados al aplicar el método de EFS.

Tipo de microalgas	<i>Selenastrum capricornutum</i>	<i>Scenedesmus acutus</i>
	<b>A</b>	<b>B</b>
Recobro	76	77
	78	74
	77	76

	Resumen de datos	
	A	B
<b>n</b>	3	3
<b>Σx</b>	231	226
<b>SS</b>	2.85	3.26
<b>Promedio</b>	77.16	75.37

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma_p \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

Donde:

t = valor estadístico de la prueba t de Student.

$\bar{X}_1$  = valor promedio del grupo 1.

$\bar{X}_2$  = valor promedio del grupo 2.

$\sigma_p$  = desviación estándar ponderada de ambos grupos.

$N_1$  = tamaño de la muestra del grupo 1.

$N_2$  = tamaño de la muestra del grupo 1.

$$\sigma_p = \sqrt{\frac{SC_1 + SC_2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

Donde:

$\sigma_p$  = desviación estándar ponderada.

SC = suma de cuadrados de cada grupo.

N = tamaño de la muestra 1 y 2.

$$t = \frac{77.16 - 75.37}{1.23 \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = 1.78$$

Diferencia de media como hipótesis	0
Grados de libertad = $n_1 + n_2 - 2$	4
Estadístico t	+1.78
Probabilidad ( $T \leq t$ ) una cola	0.075
Valor t crítico una cola	2.132
Probabilidad ( $T \leq t$ ) dos cola	0.151
Valor t crítico dos colas	1.77

### Anexo III

#### ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN EN FLUORESCENCIA DE LOS METABOLITOS DE HAP'S.

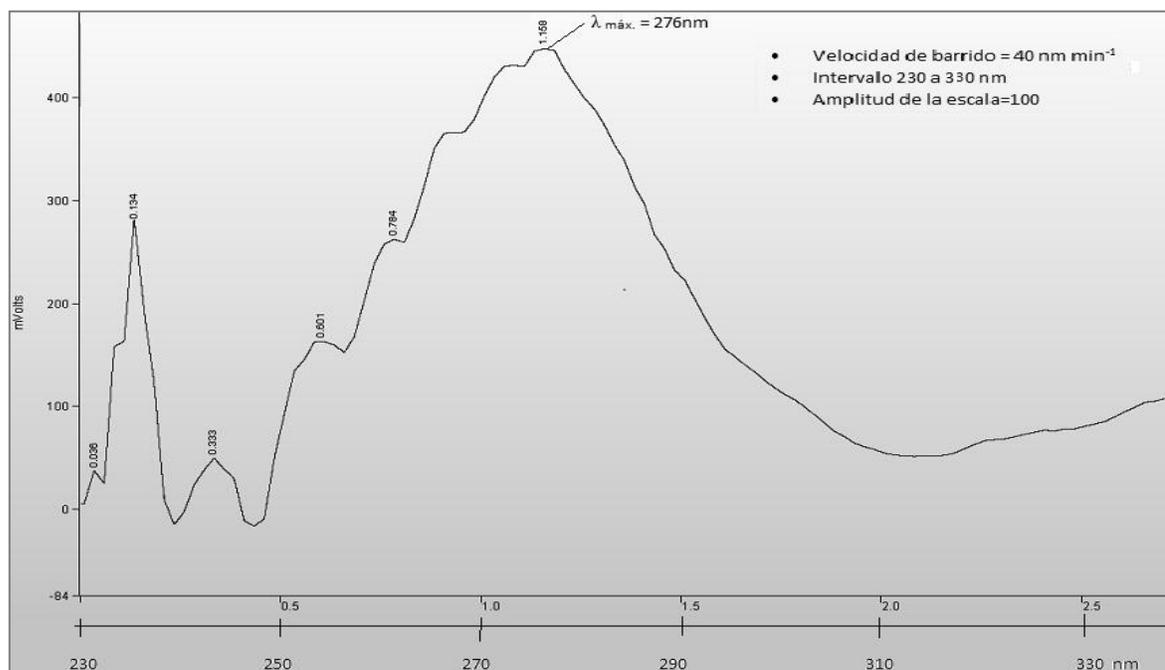
Longitudes de onda de excitación y emisión de máxima adsorción de cada uno de los metabolitos de HAP's obtenidos a partir de los espectros de excitación y emisión.

Compuesto	$\lambda$ ex máx FL (nm)	$\lambda$ ex máx FL (nm)
9,10-dihidrodiol BaP	276	407
4,5- dihidrodiol BaP	266	ND
9-OH BaP	266	416
3-OH BaP	260	438

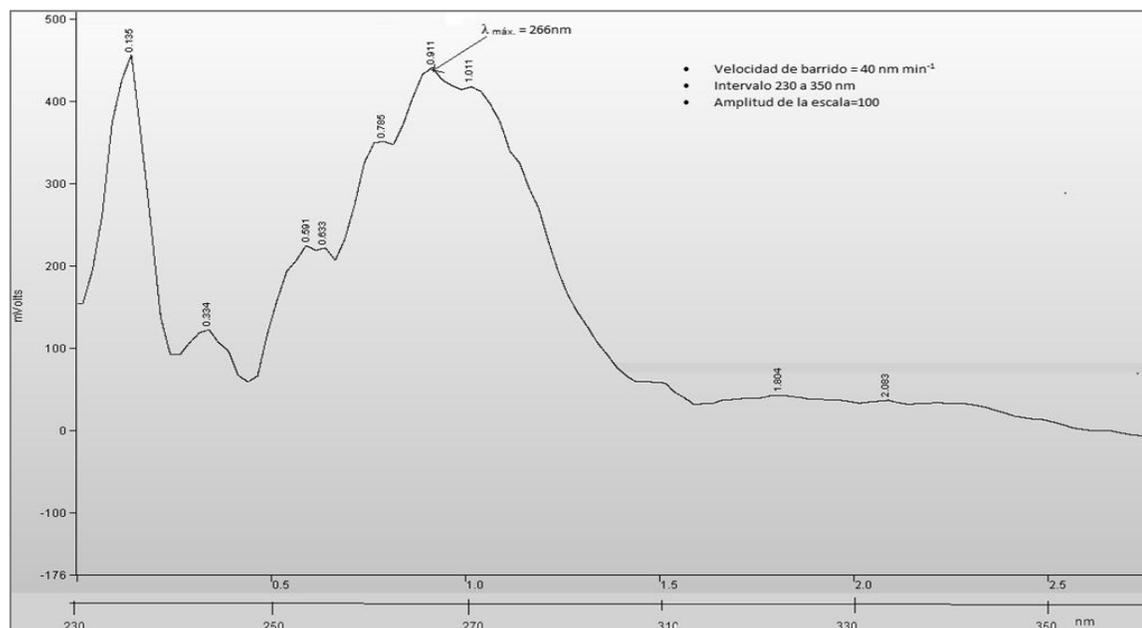
ND = No determinado

Espectros de excitación obtenidos con detector de fluorescencia.

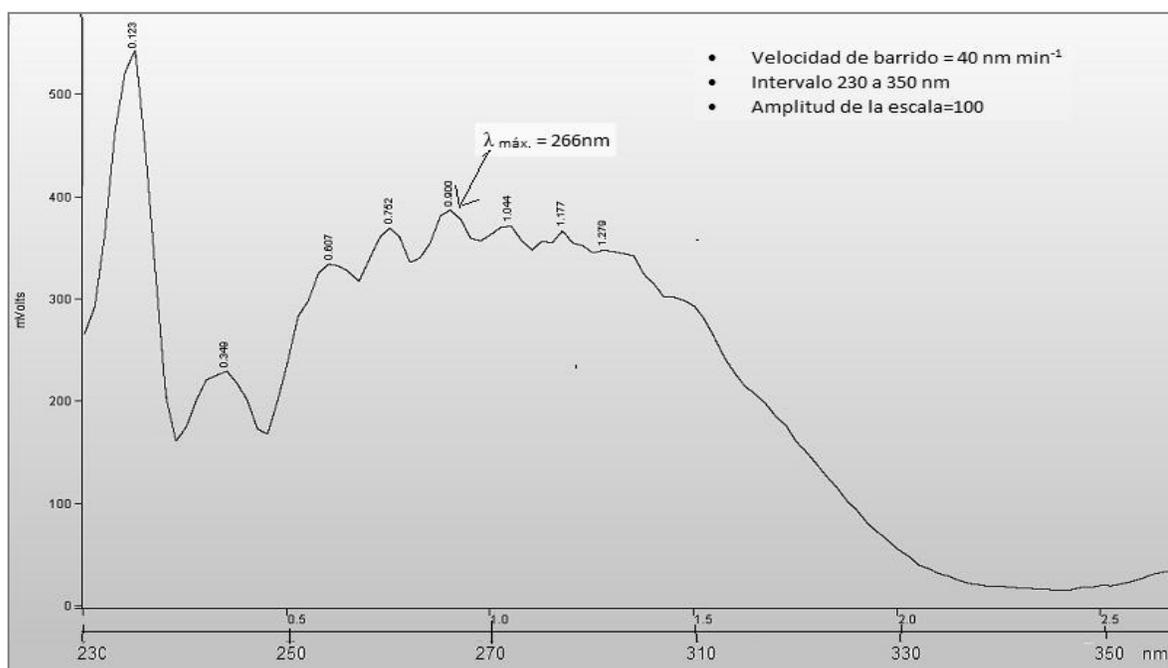
Espectro de excitación del compuesto 9,10-dihidrodiol BaP obtenido con detector de fluorescencia.



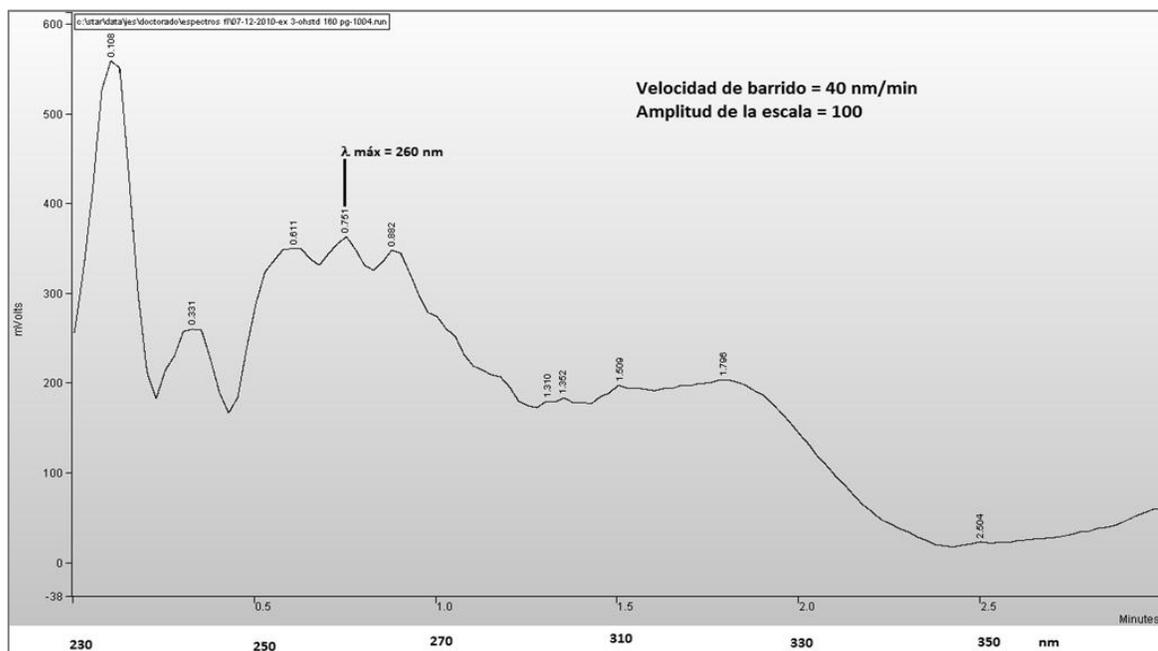
Espectro de excitación del compuesto 4,5-dihidrodiol BaP obtenido con detector de fluorescencia.



Espectro de excitación del compuesto 9-OH BaP obtenido con detector de fluorescencia.

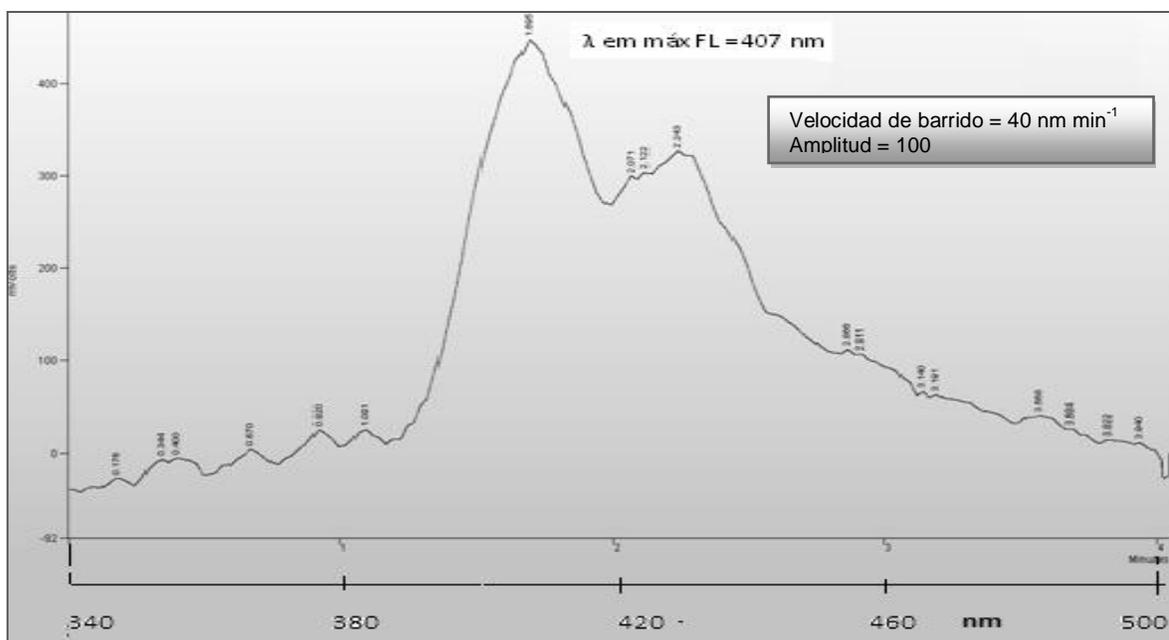


Espectro de excitación del compuesto 3-OH BaP obtenido con detector de fluorescencia.



Espectros de emisión obtenidos con detector de fluorescencia.

Espectro de emisión del compuesto 9, 10 dihidrodiol BaP obtenido con detector de fluorescencia.





Espectro de excitación del compuesto 4,5 dihidrodiol BaP obtenido con detector de fluorescencia.

