



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
MEDIO ACUOSO POR *Scenedesmus acutus***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ADRIANA MONTAÑO MONTIEL



MÉXICO, D.F.

2013



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.



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: **Profesor: Víctor Manuel Luna Pabello**

VOCAL: **Profesor: Araceli Patricia Peña Álvarez**

SECRETARIO: **Profesor: Martha Patricia García Camacho**

1° SUPLENTE: **Profesor: Adrián de Santiago Zarate**

2° SUPLENTE: **Profesor: José Guadalupe de la Rosa Canales**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Análisis de Trazas, laboratorio 3D anexo, edificio A 3^{er} piso, Facultad de Química, circuito interior Ciudad Universitaria.

ASESORA DEL TEMA:

Dra. Martha Patricia García Camacho _____

SUSTENTANTE (S):

Adriana Montaña Montiel _____

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química por la formación profesional recibida, por los excelentes profesores y la de oportunidad de aprender y desarrollar mi vocación.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el proyecto PAPIIT IN223111.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento para proyecto de Ciencia Básica número 166389.

Al Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” del Departamento de Superación Académica de la Facultad de Química por la beca otorgada para realizar esta tesis correspondiente al periodo 2012-2013.

A la Dra. Martha Patricia García por su asesoría durante la realización de este trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	10
CAPITULO 1. ANTECEDENTES	11
1.1. Características generales de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).....	11
1.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs estudiados.....	12
1.2. Contaminación por HAPs.....	13
1.2.1. Origen de los HAPs.....	13
1.2.2. Presencia en el ambiente.....	14
1.3. Toxicidad.....	15
1.4. Remediación de los HAPs.....	18
1.4.1. Biorremediación de HAPs.....	19
1.5. Características generales de las microalgas.....	21
1.5.1. <i>Scenedesmus acutus</i>	22
1.6. Análisis de HAPs.....	23
1.6.1. Métodos de extracción de HAPs en muestras ambientales.....	24
1.6.2. Generalidades de la cromatografía de líquidos.....	32
CAPITULO 2. MATERIALES Y EQUIPO	37
2.1. Disolventes y reactivos.....	37
2.2. Materiales y equipo para la preparación de muestras.....	37
2.2.1. EFS y DMFS.....	38
2.3. Muestra biológica.....	38
2.4. Sistema cromatográfico.....	38
2.5. Disoluciones estándar de HAPs.	39
CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
3.1. Esquema general de experimentación.....	40

3.2. Análisis cromatográfico.....	41
3.2.1. Selección de la longitud de onda óptima para la detección.....	41
3.2.2. Selección de las condiciones para la separación cromatográfica.....	41
3.2.3. Selección de la composición de la fase móvil.....	41
3.2.4. Linealidad del sistema.....	42
3.2.5. Límite de detección y cuantificación del sistema.....	43
3.2.6. Precisión del sistema.....	43
3.3. Preparación de muestras algales.....	44
3.3.1. Estandarización del número de células.....	44
3.4. Optimización de los métodos de extracción.....	45
3.4.1. Recobro.....	45
3.4.2. Acondicionamiento del adsorbente.....	45
3.4.3. Extracción en Fase Sólida.....	46
3.4.4. Dispersión de Matriz en Fase Sólida.....	46
3.5. Ensayos de exposición.....	46
3.5.1. Extracción de los HAPs del medio líquido.....	47
3.5.2. Extracción de los HAPs de la biomasa.....	48
3.6. Análisis estadístico.....	49
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1. Análisis cromatográfico.....	50
4.1.1. Selección de la longitud de onda para la detección de los HAPs.....	50
4.1.2. Selección de las condiciones para la separación cromatográfica.....	50
4.1.3. Selección de la composición de la fase móvil.....	51
4.1.4. Linealidad del sistema.....	52
4.1.5. Límite de detección y límite de cuantificación del sistema.....	54
4.1.6. Precisión del sistema.....	54
4.2. Optimización de los métodos de extracción.....	55
4.2.1. Extracción en Fase Sólida.....	55
4.2.2. Dispersión de Matriz en Fase Sólida.....	55

4.3. Estandarización del número de células.....	56
4.4. Ensayos de Exposición.....	59
4.4.1. Ensayos de exposición a HAPs de forma individual.....	59
4.4.2. Ensayos de exposición a pares de HAPs.....	67
CAPITULO 5. CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS.	74
ANEXO I.....	80

ABREVIATURAS

% C.V.	Por ciento del coeficiente de variación.
BaA	Benzo[a]antraceno
BaP	Banzo[a]pireno
C18	Octadecil silano
C8	Octil silano
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CLAR-EM	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
CYP1A1	Enzima de la familia CYP1 parte del citocromo P450.
CYP3A1	Enzimas del citocromo P450.
DFL	Detector de fluorescencia
DMFS	Dispersión de matriz en fase sólida
EFS	Extracción en fase sólida
EH	Epóxido hidrolasa.
GTS	Glutation-S-Transferasa.
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HAPs-APM	Hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto peso molecular
HAPs-BPM	Hidrocarburos aromáticos policíclicos de bajo peso molecular
κ'	Factor de capacidad
ELL	Extracción líquido-líquido
MAE	Extracción asistida por microondas
MM	Microalgas muertas
MV	Microalgas vivas

OCPs	Plaguicidas organoclorados
PCBs	Bifenilos policlorados
P.F.	Punto de fusión
P.E.	Punto de ebullición
PLE	Extracción por líquidos presurizados
SFE	Extracción por fluidos supercríticos
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
UV-DAD	Detector ultravioleta de arreglo de diodos

RESUMEN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son contaminantes orgánicos persistentes con capacidades cancerígenas y/o mutágenicas, por ello se han desarrollado metodologías para su monitoreo y remoción.

El empleo de microorganismos se presenta como una atractiva opción para la biorremediación de estos compuestos. En este trabajo se evaluó la remoción de antraceno, pireno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno por la microalga de agua dulce llamada *Scenedesmus acutus*.

Los cuatro HAPs fueron extraídos de los componentes del cultivo de *S. acutus*, por medio de una metodología analítica basada en la extracción con adsorbentes. Se recurrió a la Extracción en Fase Sólida (EFS) para el aislamiento de los HAPs del medio de cultivo líquido y la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para la extracción de los contaminantes presentes en la biomasa. Los extractos obtenidos por fueron analizados por CLAR-UV-DAD.

La metodología analítica optimizada demostró ser eficiente y precisa en EFS con recobros del 75-89% y %C.V. menores al 5.5% en matrices reales. Para DMFS se obtuvieron recobros del 75-85% y %C.V. menores al 8.1%, valores aceptables para el manejo de matrices complejas.

La remoción de los contaminantes fue evaluada exponiendo a *S. acutus* a los HAPs de forma individual y por pares de compuestos. En todos los tiempos la microalgas vivas (MV) y microalgas muertas (MM) fueron capaces de remover HAPs del medio líquido principalmente por la adsorción en la biomasa, sin embargo las MV fueron significativamente más eficientes en la remoción de HAPs.

En los ensayos por pares de compuestos se evaluaron las mezclas antraceno-BaA, pireno-BaP y BaA-BaP, evidenciando que la remoción, principalmente de BaA y BaP, se favorece por la presencia de otro HAP.

INTRODUCCIÓN

Nuestra época está marcada por el deterioro del ambiente, un claro ejemplo de este problema es la creciente contaminación por compuestos orgánicos persistentes.

La materia orgánica se encuentra extensamente distribuida en forma de vegetación, combustibles fósiles, víveres, carbón, tabaco, etc. y su uso en procesos de combustión hace que sus productos, dióxido de carbono y agua, también se encuentren de forma generalizada en el ambiente. Cuando la combustión es incompleta (pirólisis), parte del combustible no reacciona con el oxígeno y se forman varios subproductos entre los que se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

La pirolisis de productos orgánicos es un proceso que ocurre continuamente, lo que implica una amplia distribución de los HAPs en el aire, suelo, agua, sedimentos, tejidos biológicos e incluso alimentos. El interés en estos hidrocarburos radica en la toxicidad de muchos de ellos y la frecuencia con la que se detectan.

Los HAPs de más de tres anillos aromáticos son compuestos persistentes en el ambiente y con características cancerígenas y/o mutagénicas, lo anterior se debe a su gran estabilidad conseguida a través de su estructura de anillos aromáticos fusionados, a su baja solubilidad en agua y a su presencia en el ambiente como parte de mezclas complejas de compuestos orgánicos e inorgánicos. Por tales características los HAPs son monitoreados y se busca su remoción del ambiente.

La USEPA (United States Environmental Protection Agency, por sus siglas en inglés) recomienda vigilar la concentración de por lo menos 16 HAPs, estos son considerados contaminantes prioritarios debido a la información que respalda el daño a la salud humana y por encontrarse en mayor concentración que el resto de los compuestos pertenecientes a este grupo.

Los métodos de remediación de HAPs buscan modificar, extraer o inmovilizar a los compuestos haciendo uso de tratamientos fisicoquímicos o térmicos, la mayoría de estos tratamientos no pueden aplicarse *in situ* y requieren realizarse en varias ocasiones lo que implica un alto costo operativo y consumo de reactivos, en cambio la

biorremediación se presenta como una atractiva opción en la remoción de HAPs ya que es un proceso más rentable y al mismo tiempo puede acoplarse a otras tecnologías para hacer más eficiente la remoción.

La biorremediación de sitios contaminados por los HAPs considera la degradación completa de compuestos de uno a tres anillos, calificando como compuestos persistentes a los hidrocarburos de cuatro anillos o más, como el pireno, el benzo[a]antraceno (BaA) y el benzo[a]pireno (BaP). El incremento en la producción de éstos HAPs-APM ha llevado al estudio de su remediación por diversos medios siendo los más aptos los llevados a cabo por microorganismos como hongos y microalgas. En particular ha sido observada la transformación eficiente del benzo[a]pireno por microalgas de agua dulce tales como *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus* y *Ankistrodesmus braunii*, siendo capaces de degradar rápidamente BaP a dihidrodiolés (*Warshawsky et al.* 1995). Sin embargo, estos estudios son escasos, no se han enfocado a otros HAP-APM, recurren a metodologías sofisticadas para realizar la determinación analítica, como el empleo de isotopos de C¹⁴, y habitualmente utilizan métodos de extracción con disolventes tradicionales que requieren de grandes cantidades de reactivos y muestras, lo que limita el manejo de bioensayos en pequeños volúmenes de medio y a concentraciones cercanas a las encontradas comúnmente en el ambiente. Las metodologías convencionales para el proceso de preparación de muestra se basan en la extracción líquido-líquido sin embargo, actualmente existen técnicas alternativas como la extracción en fase sólida (EFS) que emplea menor cantidad de disolventes y está perfectamente adaptada para el manejo de muestras acuosas, y la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) que ha demostrado ser una técnica óptima para el manejo de muestras sólidas, semisólidas y viscosas. Además ambas técnicas siguen los lineamientos de la química verde al reducir el volumen de disolventes empleados, disminuir el uso de reactivos de alta toxicidad, minimizar el uso de material desechable y aminorar la generación de residuos.

Muchas veces los procesos de preparación de muestras son el punto clave para combinar tiempo y eficiencia en la mayoría de los procedimientos analíticos, si el proceso de preparación de muestra no es adecuado el proceso analítico completo puede no cumplir su objetivo sin importar las técnicas instrumentales empleadas.

Debido a las ventajas ofrecidas por la EFS y la DMFS estas técnicas se propusieron para el desarrollo del presente trabajo, conjuntamente se empleó la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para el análisis de los extractos ya que es una técnica comúnmente empleada en el análisis de HAPs acoplada a detectores espectrofotométricos de fluorescencia o ultravioleta.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar en el laboratorio la remoción de antraceno, pireno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno en cultivos líquidos de *Scenedesmus acutus* mediante metodología analítica miniaturizada basada en la extracción de los analitos con adsorbentes y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Objetivos específicos:

- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis y la detección espectrofotométrica de antraceno, pireno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno.
- Optimizar un método basado en la técnica de extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida para la extracción de HAPs de los componentes del cultivo de microalgas.
- Determinar antraceno, pireno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno en los componentes del cultivo de *S. acutus* expuestos a los contaminantes por diferentes tiempos.
- Evaluar la capacidad de *S. acutus* para remover del medio de cultivo antraceno, pireno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno de forma individual y por pares, en condiciones de cultivo a diferentes tiempos de exposición.

CAPÍTULO 1.

ANTECEDENTES

1.1. Características generales de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son un grupo de compuestos que se caracterizan por la unión de anillos bencénicos, sin heteroátomos y que pueden encontrarse en varias disposiciones isoméricas.

Los HAPs como compuestos químicos puros son sustancias sólidas a temperatura ambiente, incoloros, blancos o amarillos verdosos, de baja volatilidad, absorben radiación ultravioleta de acuerdo a su carácter aromático y producen un espectro fluorescente característico. Los HAPs provienen de la biosíntesis de algunos organismos, la descomposición térmica de moléculas orgánicas y su subsecuente recombinación como ocurre en la combustión incompleta a altas temperaturas (500-800°C) o a bajas temperaturas por un periodo prolongado (100-300°C) (*Haritash y Kaushik, 2009*).

Los HAPs se pueden clasificar en: hidrocarburos de bajo peso molecular (HAPs-BPM) que comprenden compuestos de 2 a 3 anillos aromáticos y los hidrocarburos con 4 a 7 anillos que son considerados de alto peso molecular (HAPs-APM). Esta clasificación se basa en la relación que existe entre las propiedades fisicoquímicas y el peso molecular de los compuestos, ya que tales características influyen en la distribución, efectos sobre sistemas biológicos y consecuencias en el ambiente, por ejemplo una característica de los HAPs-APM es la baja solubilidad en agua que respalda su baja biodegradabilidad. Aun cuando varios HAPs contengan la misma cantidad de anillos, la diferente configuración de los mismos implica variaciones en las propiedades de los compuestos.

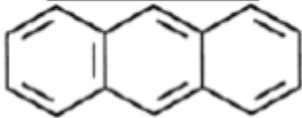
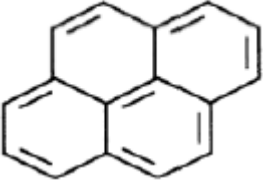
Debido a su estructura química los HAPs fácilmente absorben la luz solar en el visible y las regiones ultravioleta y son particularmente sensibles a los efectos de la radiación UV por lo que se considera a la fotólisis como una vía importante de degradación de los HAPs en el ambiente (*Arfsten et al. 1996*).

La OMS y la USEPA recomiendan monitorear por lo menos 16 HAPs los cuales son: antraceno, naftaleno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, fluorantheno, pireno, fluoreno, fenantreno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, benzo[g,h,i]perileno, acenaftileno, acenafteno.

1.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs estudiados.

En la Tabla 1.1.1.1. se presentan algunas propiedades fisicoquímicas y las estructuras de los HAPs que se utilizaron en este trabajo. Estos son compuestos sólidos a temperatura ambiente con p.f. por arriba de 100 °C. Se observa que son compuestos con baja solubilidad en agua y la solubilidad disminuye si el peso molecular aumenta; con el incremento en el peso molecular la resistencia a la oxidación y a la reducción es mayor, esto dificulta la remediación de los compuestos por tratamientos fisicoquímicos.

El log K_{ow} de los HAPs es superior a 4, lo que indica que son compuestos de baja polaridad, en especial el benzo[a]pireno, el compuesto más pesado con 5 anillos aromáticos fusionados. Valores de log K_{ow} superiores a 3.5 indican una alta afinidad por lípidos (Vighi, 1993) por eso se consideran a estos 4 HAPs como compuestos bioacumulables y se tiene especial atención en la acumulación en tejido graso de BaP y BaA, compuestos con valores de log K_{ow} mayores a 5.

Características del compuesto	Estructura
<p><u>Antraceno</u></p> <p>Peso molecular: 178 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 218 °C</p> <p>Punto de ebullición: 342 °C</p> <p>Solubilidad en agua: 1.25 mg/L</p> <p>Log K_{ow}: 4.45</p>	<p><u>Antraceno</u></p> 
<p><u>Pireno</u></p> <p>Peso molecular: 202 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 156 °C</p> <p>Punto de ebullición: 404 °C</p> <p>Solubilidad en agua: 1.27 mg/L</p> <p>Log K_{ow}: 4.88</p>	<p><u>Pireno</u></p> 

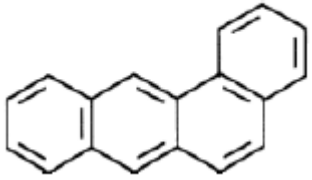
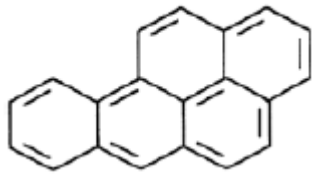
<p><u>Benzo[a]antraceno (BaA)</u></p> <p>Fue el primer hidrocarburo obtenido en estado químicamente puro. (Agudo, A. 2010)</p> <p>Peso molecular: 228 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 162 °C</p> <p>Punto de ebullición: 400 °C</p> <p>Solubilidad en agua: 0.04 mg/L</p> <p>Log K_{ow}: 5.47</p>	<p><u>Benzo(a)antraceno</u></p> 
<p><u>Benzo[a]pireno (BaP)</u></p> <p>Compuesto empleado como elemento de referencia en diferentes estudios ambientales, ampliamente estudiado y con gran distribución en el ambiente.</p> <p>Peso molecular: 252 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 179 °C</p> <p>Punto de ebullición: 310 °C</p> <p>Solubilidad en agua: 0.0038 mg/L</p> <p>Log K_{ow}: 6.04</p>	<p><u>Benzo(a)pireno</u></p> 

Tabla 1.1.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs utilizados en este trabajo.

1.2. Contaminación por HAPs.

1.2.1. Origen de los HAPs.

El creciente ingreso de HAPs a los ecosistemas es preocupante porque estos hidrocarburos son compuestos tóxicos, ubicuos, persistentes y con potencial de bioacumulación y por lo tanto se distribuyen a lo largo de aguas, suelos y seres vivos.

A pesar de que las fuentes naturales contribuyen a la presencia de HAPs en el ambiente, la mayor cantidad proviene de las actividades humanas, ya sea por vertido accidental o intencional o por la combustión de combustibles fósiles para la generación de calor y energía.

En ambientes acuáticos los HAPs provienen principalmente del petróleo, seguido de la pirólisis de combustibles y otra materia orgánica.

Las principales fuentes antropogénicas de HAPs son plantas industriales y calefacción doméstica (51%); la incineración de materia orgánica y combustión al aire libre son responsables por 28% de las emisiones a la atmósfera, industrias (aluminio, fundidoras

de acero e ingeniería de gas) por el 20% y el transporte terrestre es responsable por 0.9% de las emisiones (*Skupinska et al. 2004*).

En E.U.A. se estima que más del 50% del BaP en la atmósfera proviene de la combustión incompleta de combustibles, la incineración de basura y la refinación de petróleo; un ejemplo es el aceite crudo, el cual contiene fenantreno, benzo[a]pireno, naftaleno y el criseno. Consecuentemente la cantidad de HAPs es mayor en zonas urbanas y/o industriales alcanzando concentraciones de 10 a 100 veces mayores a las zonas no urbanas (*Harvey, 1991*).

1.2.2. Presencia en el ambiente.

En el medio usualmente los HAPs se encuentran como mezclas complejas de varias clases de hidrocarburos. Se estima que hasta el 89% de los HAPs se encuentran en suelo, 10% en sedimentos y 0.5% en agua.

Los hidrocarburos ingresan a la atmósfera por consecuencia de la combustión de materia orgánica, la cual genera una mezcla de HAPs en fase gaseosa; generalmente los HAPs-APM presentes en la atmósfera son adsorbidos en partículas, en cambio los de bajo peso molecular permanecen en fase gaseosa. De esta forma los HAPs son transportados por el viento hasta ser removidos por precipitación. La lluvia retira a los HAPs de la atmósfera permitiendo su posterior incorporación al agua, biota y/o suelo (*Skupinska et al. 2004*).

En cuerpos de agua estos contaminantes poco polares se acumulan principalmente en sedimentos, arcillas y organismos acuáticos inferiores. Algunos HAPs tienen importante presencia en aguas superficiales y aguas subterráneas, así como en agua potable y principalmente en cuerpos de agua contaminados con surfactantes. Los HAPs ingresan a aguas superficiales a través de descargas de plantas industriales y de tratamiento de aguas residuales.

Los HAPs pueden ser liberados a suelos a partir de desechos peligrosos, si éstos se escapan de los contenedores de almacenamiento; por fertilizantes, composta, combustibles y grasas usados en agricultura, por agua proveniente de caminos asfaltados y aguas residuales; una vez en el suelo los HAPs se unen a otras partículas

y en ocasiones pueden contaminar acuíferos lo que representa un daño potencial a la salud humana.

Cerca del 70% de la exposición a HAPs de una persona no fumadora se asocia a la dieta. En agua potable se han encontrado HAPs en un rango de concentración muy amplio que va de 1 ng/L a 11 µg/L, frecuentemente fluoranteno, fenantreno y antraceno (*Skupinska et al.* 2004). La USEPA ha propuesto un límite máximo de concentración de 0.2 µg/L para BaP en agua potable. Aunque el BaP es comúnmente empleado como indicador de los niveles de HAPs su concentración y origen puede variar a la de otros hidrocarburos presentes.

La concentración de HAPs en aguas es al nivel de µg/L, sin embargo los HAPs son compuestos persistentes y se acumulan en suelo, sedimentos e incluso la biota (*Sidney Man Ncgai, et al.* 2006).

Una vez en el ambiente la atenuación natural de los HAPs se puede dar por fenómenos físicos (fotólisis, volatilización, adsorción/desorción), por reacciones químicas y principalmente por degradación con bacterias, hongos y microalgas (*Haritash y Kaushik*, 2009).

1.3. Toxicidad.

En 1775 los médicos británicos Sir Percival Pott y John Hill informaron la aparición anormalmente elevada del cáncer de piel de escroto entre los deshollinadores; este tipo de tumor prácticamente no se encontraba en otros pacientes; su deducción fue que algunos de estos trabajadores acababan por desarrollar este extraño tumor tras muchos años de exposición al hollín, material que contiene grandes cantidades de HAPs. Posteriormente Ernest Kennaway y su equipo del “Royal Cancer Hospital de Londres” consiguieron demostrar que ciertos compuestos aislados del alquitrán eran responsables de tumores de piel en ratones (*Agudo*, 2010).

El Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (HHS por sus siglas en inglés) considera como carcinógenos para humanos y animales a los siguientes HAPs: benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, criseno e indeno[1,2,3-c,d]pireno (*ASTDR*, 1996).

Los HAPs entran en contacto con el organismo a través de diferentes vías ya sea por inhalación, consumo o contacto con la piel. La velocidad con la cual ingresan al cuerpo puede ser influida por la presencia de otros compuestos a los cuales se está expuesto, por ejemplo las mezclas de HAPs, como el alquitrán y la brea, fácilmente desprenden compuestos volátiles que irritan la piel y las mucosas.

Otra forma de introducción al cuerpo es consumir agua o alimentos que contienen HAPs. Una vez en el organismo los hidrocarburos tienden a almacenarse en el tejido adiposo, hígado, riñones, el bazo, las glándulas suprarrenales y los ovarios (ASTDR, 1996); repercutiendo en la salud por su capacidad mutagénica y cancerígena.

El benzo[a]pireno es uno de los HAPs más importantes por sus características fisicoquímicas, distribución, metabolismo, potencial carcinógeno y por ser utilizado como modelo en el proceso de bioactivación. Este hidrocarburo polinuclear sufre una bioactivación que da como resultado metabolitos más tóxicos que la molécula original. Tal efecto de biotransformación forma epóxidos con gran afinidad por moléculas nucleofílicas como las proteínas, lípidos o ácidos nucleicos (Díaz-Báez, 2004).

La bioactivación mostrada en la Figura 1.3.1, se lleva a cabo principalmente en el hígado. El proceso consiste en la oxidación y conjugación de los HAPs que tienen como objetivo transformar el compuesto original en un compuesto más hidrosoluble y favorecer su eliminación por la orina. La capacidad genotóxica de los HAPs radica en el paso de oxidación donde se producen epoxidioles que son altamente reactivos con capacidad para unirse a bases nitrogenadas, formando aductos. Si se forma el aducto del BaP con la guanina del ADN (ver Figura 1.3.2) ésta no puede emparejarse con la citosina lo que produce una transcripción errónea del código genético y por lo tanto desencadenar una división celular descontrolada, por ello se dice que el BaP es promotor de cáncer.

Los estudios a nivel celular indican que la coexposición a HAPs más luz UV promueve la formación de radicales capaces de dañar los componentes celulares esenciales, tales como las membranas celulares o el ADN. La evidencia indica que la toxicidad de los HAPs es principalmente causada por mecanismos fotodinámicos que requieren oxígeno. Los radicales de oxígeno ($\cdot\text{OH}$), superóxido, o el oxígeno singlete, pueden

dañar las membranas celulares a través de la peroxidación de lípidos y también puede dañar el ADN (Arfsten et al. 1996).

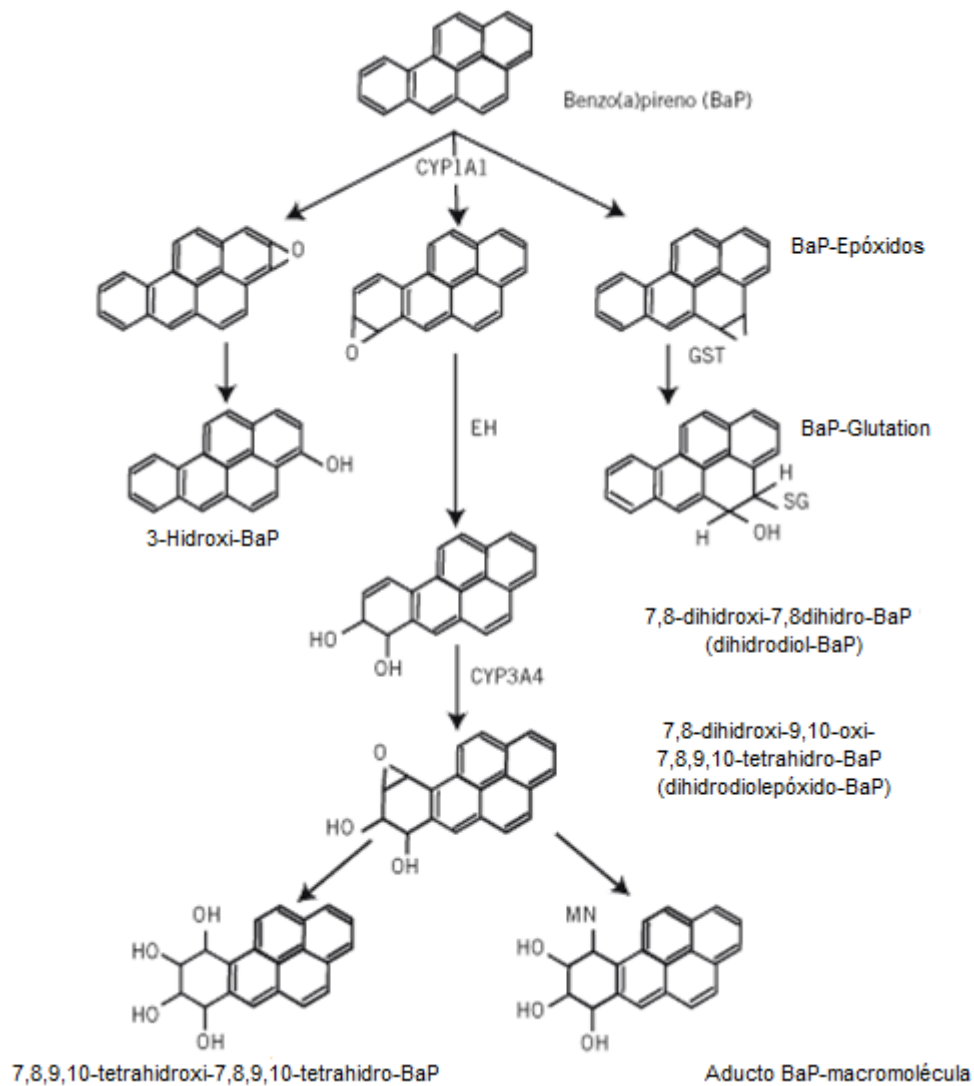


Fig. 1.3.1. Activación metabólica del BaP en humanos y formación del aducto de ADN. (Mastandrea, 2005)

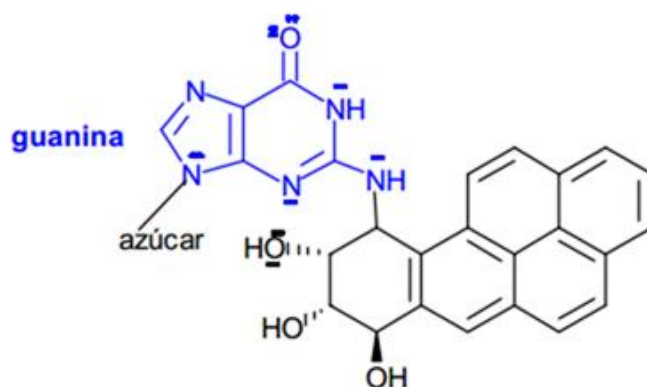


Fig. 1.3.1. Aducto Guanina-derivado del BaP.

1.4. Remediación de los HAPs.

La remediación busca alterar la composición del compuesto contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o concentración del mismo. Las estrategias seguidas en la remediación pueden ser: destrucción o modificación de los compuestos, extracción o separación del medio y aislamiento o inmovilización.

Las tecnologías aplicadas se basan en la naturaleza de los tratamientos, los cuales se dividen en:

- Tratamientos fisicoquímicos: son tratamientos que utilizan las propiedades de los compuestos xenobioticos o del medio que los contiene para transformar o separar a los contaminantes del ambiente. Por ejemplo la fotodegradación de HAPs inducida por radiación UV por si sola o en combinación con un catalizador como los procesos de oxidación avanzada que se emplean en conjunto con luz UV: UV/H₂O UV/ozono, ozono/H₂O₂ y reacción de Fenton, ya que la oxidación sólo atenúa el contaminante pero no lo elimina, generando en algunas ocasiones productos más tóxicos, como es el caso de los propios HAPs.

El uso de carbón activado es uno de los tratamientos más accesibles para la remoción de HAPs pero su alto costo operacional evita el tratamiento de grandes volúmenes de agua.

-
- Tratamientos térmicos: son aquellos que aplican calor para descomponer o volatilizar contaminantes en un suelo. Son tratamientos muy costosos que requieren mano de obra capacitada y son aplicables a un limitado grupo de compuestos.
 - Tratamientos biológicos o biorremediación: recurren a la actividad metabólica de ciertos organismos para remover, aislar o transformar a los contaminantes en metabolitos inocuos; como es el caso del tratamiento utilizado en este trabajo.

Las ventajas de la biorremediación son: el empleo de más de una estrategia de remediación, la posibilidad de acople con otro tipo de tratamientos, su aplicación por tiempos prolongados y menor costo.

1.4.1. Biorremediación.

Uno de los principales procesos que ayudan a la atenuación natural de los HAPs es la biorremediación, la cual tiene como parte esencial la actividad microbiana que contribuye a cambiar la química de los compuestos. La adaptabilidad que tenga la población microbiana, así como el requerimiento nutricional, es lo que permite disminuir la concentración de los contaminantes.

El principio de infalibilidad microbiana, enunciado por Gale en 1952, propone que en las condiciones adecuadas, todas las sustancias naturales podían ser degradadas por algún microorganismo. No obstante la etapa limitante es la eficiencia de las rutas catabólicas microbianas a pesar de que existan las enzimas adecuadas para llevar a cabo la completa mineralización de ciertos compuestos xenobióticos, estos procesos no son lo suficientemente rápidos como para mantener un equilibrio entre la liberación y eliminación de éstos.

El tiempo de degradación de los HAPs depende de la matriz en que se encuentren. La degradación microbiana de los HAP en ecosistemas acuáticos y terrestres es fuertemente influida por una amplia variedad de factores abióticos y bióticos, los cuales incluyen: temperatura, pH, tipo de suelo, aeración, nutrientes, profundidad, difusión, adaptación microbiana, previa exposición química, toxicidad del sedimento, propiedades fisicoquímicas de los HAPs, concentración y factores estacionales (*Agudo 2010*).

Varios microorganismos como hongos, bacterias y microalgas, al igual que los consorcios formados por dichos organismos han demostrado la capacidad de biotransformar HAPs-BPM como el naftaleno y el fenantreno, en diferentes metabolitos no tóxicos (*Cerniglia*, 1993; *Haritash y Kaushik*, 2009).

Investigaciones previas han manifestado que diferentes grupos taxonómicos incluyendo cianobacterias, diatomeas, microalgas verdes y pardas, son capaces de metabolizar naftaleno de 0.1-2.4%. (*Sidney Man Ncgai et al.* 2006).

Los estudios realizados con bacterias consideran que los HAPs-BPM son más fáciles de degradar que los hidrocarburos de más de tres anillos (*Cerniglia*, 1993; *Sidney Man Ncgai et al.* 2006).

La microalga *C. angulosa* fue capaz de remover naftaleno por acumulación dentro de la célula y posteriormente biotransformarlo en 4 principales metabolitos a concentraciones no tóxicas para el alga, esto propuso la formación de cis-naftaleno dihidrodiol por una microalga eucariota (*Ghasemi et al* 2011).

Pocos géneros de bacterias, como *Burkholderia cepacia*, son capaces de metabolizar HAPs-APM no obstante se han encontrado hongos, por ejemplo *Coniothyrium sp.*, *Fusarium sp.*, y algunas algas que efectúan su transformación (*Sidney Man Ncgai et al.* 2006) aunque su empleo en biorremediación no ha sido ampliamente estudiado.

Lei et al (2002) reportó la remoción de pireno del 34% al 100% en 7 días, por siete especies de microalgas: *Chlamydomonas sp.*, *Chlorella miniata*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum* y *Synechocystis sp.* Más del 65% del pireno adsorbido fue unido a la pared celular de *S. capricornutum* sugiriendo que la biosorción es un proceso importante en la remoción de HAPs asimismo el pireno removido fue dependiente de la concentración de biomasa algal usada.

Otras microalgas como *Anabaena flosaquae*, *Ankistrodesmus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Euglena gracilis*, *Ochromonas malhamensis* y *Scenedesmus acutus*, han expuesto su capacidad de metabolizar benzo[a]pireno en diferente grado (*Sidney Man Ncgai et al.* 2006).

Lindquist & Warshawsky, y Warshawsky et al. (1985,1995) demostraron la oxidación de BaP por la microalga verde de agua dulce *Selenastum capricornutum*. La degradación de BaP resultó en el formación de cis-4, 5-, 7,8-, 9,10- y 11,12-dihidro-BaP-dioles. Aunque sólo se ha documentado la degradación de pocos HAPs-APM se han elucidado algunas de las rutas metabólicas que siguen y se ha evaluado la adsorción por parte de la pared celular (*Haritash y Kaushik, 2009*).

La formación de cis-dihidrodiolés como metabolitos del benzo[a]pireno sugiere una reacción catalizada por dioxigenasas, similar a lo encontrado en procariontes heterótrofos, más allá de las reacciones catalizadas por monooxigenasas como las encontradas en hongos y mamíferos (*Cerniglia, 1993*).

Generalmente los microorganismos remueven contaminantes orgánicos o metales pesados mediante adsorción fisicoquímica en la pared celular o en la superficie celular de forma rápida y pasiva. En el caso del fitoplancton los compuestos son acumulados dentro de la célula por absorción activa y posteriormente son degradados a través de reacciones enzimáticas. La eficiencia de la remoción comúnmente se ve afectada por la concentración del número de células porque mayor cantidad de biomasa provee mayor superficie celular, volumen y enzimas disponibles para la biosorción y degradación de los contaminantes (*Sidney Man Ncgai, et al. 2006*).

La biorremediación se presenta como una atractiva opción en la remoción de HAPs, ya que es un proceso más rentable que los procesos abióticos, tales como la oxidación química, la fotooxidación y la adsorción por adsorbentes y otros filtros.

La biorremediación se ha empleado con éxito en varias ocasiones y tiene el beneficio de ser una estrategia relativamente sencilla, sin ser necesaria la caracterización a priori de las rutas catabólicas que intervienen en el proceso; la principal desventaja es que el resultado final no es totalmente predecible.

1.5. Características de las microalgas.

Las microalgas constituyentes del fitoplacton son las principales productoras de oxígeno y son la base de las cadenas alimenticias en ambientes acuáticos.

Las microalgas de agua dulce son microorganismos que se han adaptado a vivir en medios de características muy variadas, por lo tanto es fácil encontrarlas en cenotes, cuevas, manantiales, ríos, lagunas, humedales, o en ambientes artificiales como pozos, bordos, pozas de extracción de material pétreo e incluso en medios contaminados. La amplia distribución de las microalgas en ambientes dulceacuícolas les permite tener una relación cercana con el hombre, por ejemplo, las algas pertenecientes al grupo Chlorophyta han sido objeto de estudio por su potencial en acuicultura, farmacología, genética, bioquímica, biotecnología y biorremediación.

En la actualidad se ve a las microalgas como una opción para aliviar la contaminación ambiental porque son microorganismos capaces de bioacumular y/o biotransformar metales tóxicos y contaminantes orgánicos como Mirex, Toxafeno, DDT, Paration, etc. (Ghasemi et al 2011; Sidney Man Ncgai, et al. 2006).

Chlorella spp. y *Scenedesmus spp.* se encuentran entre las microalgas verdes mayormente distribuidas, ya que estos géneros se encuentran en la mayoría de los ambientes acuáticos del mundo. Especies de ambos géneros se utilizan a menudo en las pruebas de toxicidad debido a su sensibilidad a diferentes contaminantes, su ciclo de vida relativamente corto y la facilidad para su manejo en cultivos de laboratorio (Sabatini et al, 2009).

1.5.1. *Scenedesmus acutus*.

S. acutus, también conocida como *S. obliquus*, es una microalga dulceacuícola de forma elipsoide u ovoide, que se caracteriza por formar grupos de más de 2 células.

La Figura 1.5.1.1 presenta su fotografía y a continuación se indica su clasificación taxonómica:

Dominio: Eukaryota	UTEX #: B 72
Reino: Plantae	Dimensiones: promedio 12µm largo, 5.9 µm ancho.
División: Chlorophyta	
Clase: Chlorophyceae	
Orden: Sphaeropleales	
Familia: Scenedesmaceae	
Género: <i>Scenedesmus</i>	
Especie: <i>Scenedesmus acutus f. alternans</i>	

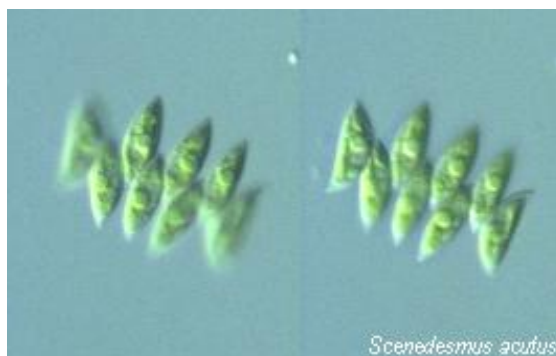


Fig 1.5.1.1. Imagen con microscopio óptico de *Scenedesmus acutus*.

(Microbial Digital Specimen Archives
http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/chlorophyta/scenedesmus/acutus/alternans_3.html)

Scenedesmus es un género frecuentemente estudiado por su potencial como materia prima para producir biodiesel, se reproduce fácilmente en aguas ricas en nutrientes, especialmente con alto contenido de nitrógeno (Gómez y Ramírez, 2004), ya sean ríos o arroyos, lagunas o lagos tanto permanentes como estacionales.

S. acutus ha sido identificada en cuerpos de agua en Río Negro, Salta y Tierra del Fuego, (Sistema de Información de Biodiversidad Argentina); en el Río San Juan, Cuba (Pérez et al. 2003); en Lagos cerca de Sudbury, Canadá (Stockes y Hutchnison 1973); en Laemphakbia, Tailandia (Chaichalem et al. 2012) y en la Península de Yucatán (López y Barrientos. 2005).

En investigaciones previas se ha demostrado que *S. acutus* tiene la capacidad de metabolizar el benzo(a) pireno a dihidrodioles (Warszawsky et al. 1995), sin embargo se desconoce si esta alga tiene capacidad de degradar otros HAPs.

1.6. Análisis de HAPs.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son compuestos tóxicos monitoreados en distintos países aplicando diferentes métodos para su análisis, por ejemplo el método USEPA 3540 (compuestos orgánicos semivolátiles en sólidos), USEPA 550 y 550.1 (HAPs en agua potable); en España el método MTA/MA-039/A00 (HAPs en aire) del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales; a nivel nacional el método de la norma NMX-AA-146-SCFI-2008 (HAPs en suelos). Todos estos métodos analizan HAPs por cromatografía de líquidos o cromatografía de gases.

La selección de la técnica de análisis de estos hidrocarburos se basa en sus características fisicoquímicas, por ello el empleo de la cromatografía de líquidos acoplada a detectores de UV o fluorescencia es bastante recurrente. En México la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 recomienda usar la cromatografía de líquidos acoplada a UV (CLAR-UV) para el análisis de HAPs además el uso de este detector permite relacionar el valor de absorbancia a una longitud de onda determinada, el espectro de absorción y el tiempo de retención con la concentración e identidad de los analitos de interés en la muestra.

Independientemente de la matriz en donde se realice el análisis, se requiere la purificación del extracto antes del análisis cromatográfico para eliminar los compuestos interferentes.

En el caso de los HAPs, compuestos poco polares, se emplea la cromatografía de reparto en fase reversa.

1.6.1. Métodos de extracción de HAPs en muestras ambientales.

Las muestras ambientales muchas veces se consideran matrices complejas por lo que presentan gran cantidad de interferentes, el análisis de éstas implica la purificación de las muestras y el aislamiento del analito de interés. Al mismo tiempo el proceso de extracción del analito deber ser compatible con el posterior análisis instrumental.

El tratamiento de la muestra se convierte en un proceso prioritario al considerar las bajas concentraciones en las que se identifican y/o cuantifican a los HAPs y la presencia de otros compuestos altamente relacionados.

1.6.1.1. Matrices acuosas.

Dentro de los ambientes acuáticos los HAPs sufren una serie de procesos de remediación tales como evaporación, oxidación, degradación microbiana, dispersión y disolución en el agua (*Fidalgo-Used et al 2007*).

En cuanto a las técnicas usadas para el aislamiento de los HAPs en los métodos oficiales y en diferentes trabajos de investigación, resumidos en la Tabla 1.6.1.1.1, se ha recurrido comúnmente a la extracción líquido-líquido (ELL) en diferentes matrices, lo que implica el uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos y un prolongado

tiempo de extracción. Para disminuir los inconvenientes de la clásica ELL se ha extendido el uso de la EFS porque reduce el tiempo de preparación de muestra, emplea menores cantidades de disolvente y mejora la recuperación de analitos polares parcialmente solubles en agua, tales como algunos productos de degradación de microcontaminantes orgánicos (*Hennion, 1999*). La EFS es principalmente usada para el manejo de matrices acuosas. (*Ahmed, 2003*).

Analitos	Método de extracción	Matriz	Cantidad de muestra	Extracción	Cantidad de disolvente	Análisis	Referencias
5 HAPs	ELL	Medio de cultivo y biomasa algal	100 mL	Etil acetato	62 mL	CG-EM	<i>Ke et al. 2010.</i>
15 HAPs	ELL	Agua de río	300 mL	Hexano	20-80mL	CLAR-DFL	<i>Brum et al. 2008</i>
12 HAPs	ELL	Aceite comestible (aceite de coco crudo y refinado, aceite de girasol, palma, oliva y aceite residual de oliva)	0.5 g	Dimetilformamida /agua	10 mL	CLAR-DFL	<i>Barranco et al. 2003.</i>
2 HAPs	ELL	Cultivo líquido de hongos	25 mL	Acetato de etilo	25 mL	HPLC-DFL	<i>Guiraud et al. 2001.</i>
6 HAPs	Nano-extracción en fase sólida	Leche, agua de río y mar	500 mL	Acetonitrilo	6 mL	CLAR-DFL	<i>Zhang et al. 2012.</i>
18 HAPs	Microextracción dispersiva líquido-líquido	Agua de grifo, fuente, pozo, río, agua de lluvia, embotellada, tratada y residual.	10 mL	1-octil-3-metilimidazolium hexafluorophosfato ([C8MIM][PF6])	50 µL	CLAR-DFL	<i>Pena et al. 2009.</i>
16 HAPs	EFS	Agua residual, descargas industriales y aguas tratadas.	900 mL	n-hexano/2-propand/acetona	12 mL	CLAR-UV-DAD y DFL	<i>Buseti et al. 2006</i>
Metabolitos de HAPs	EFS	Bilis de peces	100 µL	Metanol	6 mL	CG-EM	<i>Mazéas y Budzinski, 2005.</i>

Tabla. 1.6.1.1.1. Resumen de publicaciones relacionadas con la extracción de HAPs en matrices acuosas.

La EFS implica el reparto de solutos entre una fase líquida -muestra- y una sólida -adsorbente-, su principal ventaja es la purificación y extracción simultánea de los analitos.

A continuación se describen los principios y procedimientos de la EFS puesto que se empleó esta técnica para el desarrollo del presente trabajo.

1.6.1.1.1. Extracción en Fase Sólida.

La EFS es una técnica que permite realizar de forma simultánea la extracción y concentración de la muestra, así como la limpieza de interferentes, también disminuye el tiempo de preparación de muestra y la cantidad de disolventes empleados. Desarrollada en los 80s, la EFS ha sido comúnmente empleada en la extracción de compuestos orgánicos de matrices acuosas complejas como es el caso de los HAPs presentes en fluidos biológicos o aguas naturales, residuales o residuales tratadas.

La EFS consiste en la transferencia de los compuestos contenidos en la muestra hacia los sitios activos de una fase sólida empacada en una columna o cartucho. Posteriormente la desorción de los analitos se lleva a cabo al agregar pequeños volúmenes de disolvente de gran fuerza eluyente. Esta transferencia depende de la relación del adsorbente, el analito y el eluyente.

Al igual que las columnas cromatográficas, la fase sólida se constituye por adsorbentes de carácter polar o apolar; comúnmente sílice con grupos enlazados diol, ciano, octadecilo, octilo o metilo etc.

La técnica de EFS consiste en 3 ó 4 etapas básicas que se resumen a continuación y se ilustran en la Figura 1.6.1.1.1.1.

- Acondicionamiento. De acuerdo a la naturaleza del adsorbente el material debe ser acondicionado con el disolvente apropiado, seguido del disolvente en el que se encuentra la muestra. Este paso permite la humectación del material y la solvatación de los grupos funcionales. Al mismo tiempo permite la remoción de impurezas contenidas inicialmente en el adsorbente.
- Carga de la muestra. La muestra pasa a través de la columna de adsorbente por efecto de la gravedad, bombeado o por vacío. El volumen de muestra y la velocidad de flujo debe permitir la retención eficiente de los analitos sin prolongar demasiado el tiempo de preparación de muestra. En este momento

los analitos son concentrados en el adsorbente separados de la mayoría de los componentes iniciales en la muestra.

Los compuestos son usualmente adsorbidos en la fase sólida por fuerzas de van der Waals.

- Limpieza. Este proceso permite separar, por sus características fisicoquímicas, compuestos distintos a los analitos de interés provenientes de la matriz.

El disolvente empleado debe permitir eliminar las impurezas y mantener a los compuestos de interés en el adsorbente. La composición y el volumen de las disoluciones de limpieza están relacionados con el recobro del analito.

- Elución. El paso final consiste en la aplicación del disolvente apropiado con fuerte afinidad por los analitos para que pueda romper las interacciones con el adsorbente y consecuentemente permita sólo la elución de los analitos de interés. El volumen empleado debe ser ajustado para obtener un recobro cuantitativo, así mismo se debe considerar la velocidad de flujo.

Disolventes orgánicos como metanol o acetonitrilo son comúnmente empleados en fase reversa porque las interacciones formadas con los analitos son más fuertes que las interacciones adsorbente-analito y también son disolventes que se adaptan a sistemas en línea.

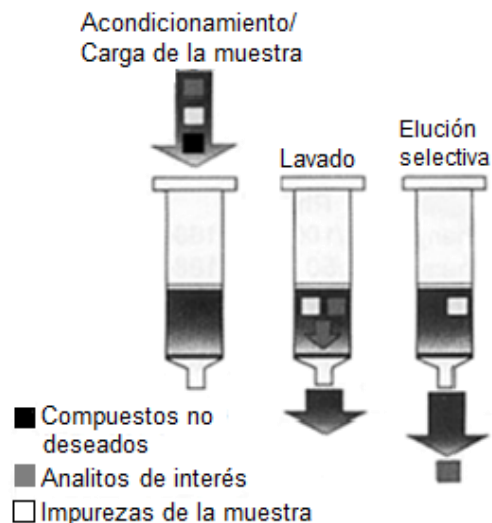


Fig. 1.6.1.1.1.1. Esquema general de la Extracción en Fase Sólida. (Imagen modificada de http://www.icon-sa.com/accubond_extraccion_fase_solida.htm)

1.6.1.2. Biota.

El análisis de contaminantes orgánicos persistentes en plantas o animales requiere el empleo de técnicas analíticas que permitan extraer a los analitos de interés de matrices sólidas o semisólidas, con óptima selectividad, recobro y la mínima presencia de interferentes.

Las técnicas de extracción más conocidas para las muestras de biota incluyen extracción Soxhlet, extracción asistida por sonicación, extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción asistida por microondas (MAE), extracción por líquidos presurizados (PLE) y dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) (*Fidalgo-Used et al.* 2007) como se muestran en la Tabla 1.6.1.2.1. La mayoría de estas técnicas requieren un pre-tratamiento de muestra para eliminar humedad y/o lípidos o para romper membranas, por ejemplo secado químico con sulfato de sodio, el secado por congelación o liofilización, la homogenización y molienda en el caso de tejidos biológicos, tomando en cuenta que los pre-tratamientos más simples son los más elegidos por el consumo de tiempo y dinero.

Los lípidos pueden ser la principal interferencia en el análisis de contaminantes en matrices biológicas. Las columnas de la CLAR son altamente sensibles a pequeñas cantidades de material lipídico, lo cual afecta la superficie activa de la fase estacionaria y degrada el poder de resolución de la columna. Así la presencia de lípidos en los extractos debe ser reducida tanto como sea posible para extender la vida de columna y mejorar los límites de detección y cuantificación (*Pensado et al* 2005).

Analitos	Método de extracción	Matriz	Cantidad de muestra	Extracción	Cantidad de disolvente	Análisis	Referencias
HAPs, PCBs, OCPs	Extracción Soxhlet	Hígado de pescado	0.4 g	n-hexano/ Diclorometano	–	CG-EM	<i>Vives y Grimalt, 2002.</i>
HAPs (16 contaminantes prioritarios USEPA)	Extracción Soxhlet	Vesícula biliar e hígado de diferentes especies de peces (anguilas, peces dorados y bagres)	órganos completos	Diclorometano	80mL	CG-EM	<i>Pointet y Milliet, 2000.</i>

HAPs totales	Extracción asistida por ultrasonido	Mejillón	0.5g	Diclorometano y n-hexano	6.5y25 mL	Espectrofluorometría	Rodríguez-San Martín et al. 2005.
HAPs (16 contaminantes prioritarios USEPA)	Extracción asistida por ultrasonido	Agujas de pino (<i>Pinus pinea</i> L.)	10g	n-hexano/ Diclorometano	100mL	CG-EM	Ratola et al. 2006.
HAPs (16 contaminantes prioritarios USEPA)	SFE	Suelos, sedimentos, cenizas volantes y otros materiales sólidos que sean susceptibles de extracción con disolventes convencionales	2-3g	CO ₂	20mL	CLAR/CG-EM	Método EPA 3561
6 HAPs	MAE	Músculo de pescado (robalo y salmón)	115g	n-hexano	10mL	CLAR-DLF	Pena et al. 2006.
HAPs (16 contaminantes prioritarios USEPA)	PLE	Tejido de peces (trucha) y agujas de abeto (<i>Picea abies</i>)	5gy80g	Hexano/ Acetona	33y66 mL	CLAR-DFL	Jánská et al. 2004.
24 HAPs	PLE	Mejillón, filete de salmón, aceite de pescado y alimento de pescado	mejillón: 5 g, salmón: 1.3 g, alimento de pescado: 15g, aceite de pescado:0.25g	Diclorometano	-	CG-EM	Liguori et al. 2006.
6 HAPs	DMFS	Tejido de pescado (salmón y rodaballo)	0.6-0.8g y2g deC18	Acetonitrilo	10mL	CLAR-DLF	Pensado et al. 2005.
17 HAPs	DMFS	Lodos de aguas residuales	0.2g muestra y 1gdeflorisil	Diclorometano /metanol	6mL	CLAR-DFL	Pena et al. 2008.
4 HAPs	DMFS	Microalga verde (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	5mg muestra y 100mg de C18	Acetonitrilo/ agua	1 mL	CLAR-DFL	Olmos-Espejel et al. 2012.
3 HAPs	DMFS	Protozoario (<i>Colpoda cucullus</i>)	5mg y 100mg de C18	Acetonitrilo	500µL	CLAR-DFL	García de Llasera y Olmos-Espejel, 2011.

Tabla 1.6.1.2.1. Publicaciones relacionadas con la extracción de HAPs en matrices sólidas y semisólidas.

El estudio de HAPs en microorganismos recurre a la extracción con disolventes orgánicos (Ver Tabla 1.6.1.1.1) como técnica primordial en la preparación de muestras con un gran consumo de reactivos y un prolongado tiempo de extracción. El principal problema de extraer analitos de una muestra de microorganismos es la cantidad

disponible, la viscosidad de la misma y la presencia de compuestos interferentes; por tales inconvenientes la DMFS resulta una técnica adecuada ya que permite un fácil manejo de muestras sólidas, semisólidas y líquidas muy viscosas, reduce el consumo de disolventes y el tiempo de preparación de muestras sin perder selectividad, además ha sido ampliamente aplicada a matrices biológicas (*Barker. 2007*).

A pesar de la idoneidad de la DMFS para la preparación de muestras biológicas se tienen escasos reportes del uso de esta técnica en microorganismos (*Cameán et al. 2004; García de Llasera y Olmos-Espejel 2011; Olmos-Espejel et al 2012*) y sólo se cuenta con una referencia de su uso en microalgas (ver Tabla 1.6.1.2.1.).

1.6.1.2.1. Dispersión de Matriz en Fase sólida.

La DMFS fue desarrollada en 1989 por Barker y se ha convertido en una técnica de gran aceptación por la simpleza y versatilidad en el proceso de preparación de muestras, asimismo ha demostrado su eficacia para aislar gran variedad de sustancias activas, plaguicidas y otros contaminantes provenientes de matrices complejas tanto vegetales como animales (*Barker, 2007*).

Esta técnica se basa en el mecanismo de desintegración de la estructura de la matriz sobre el adsorbente, el cual es utilizado como material de empaque de un cartucho, el empaque conseguido es una fase de características únicas por la dispersión de los analitos en el adsorbente con base en su polaridad relativa, su coeficiente de reparto y su interacción con la fase sólida. Las ventajas de la DMFS son: la disminución de volúmenes de disolvente empleado, menor cantidad de muestra, eliminación de otros procesos de preparación de muestra, menor tiempo de extracción y la aplicación directa a muestras sólidas, semisólidas y altamente viscosas.

La elección del adsorbente es un factor importante en la realización de la DMFS y debe considerar la composición de la muestra y el tipo de analito. La mayor abrasión y dispersión de los componentes de la matriz se producirán en la medida que los componentes interactúen con las características químicas de la superficie del adsorbente. Comúnmente los soportes sólidos son materiales derivados de la sílice, por ejemplo la sílice enlazada al octadecilsilano, un adsorbente de fase reversa. La selectividad de la DMFS depende de la combinación adsorbente/disolvente empleada,

por ejemplo la sílice unida a C18 es el adsorbente más popular para la extracción de tejidos animales, mientras que para las muestras vegetales C8, C18 y Florisil se han usado extensamente. El tamaño de partícula es otro factor de importancia porque partículas de diámetro muy pequeño (3-20 μm) dificultan la obtención de un flujo adecuado de elución y conllevan tiempos de elución prolongados y presión excesiva de vacío, por ello se recomiendan partículas con diámetro entre 40-100 μm que además de permitir una dispersión y extracción adecuada, son materiales menos costosos (*Barker, 2007*).

El proceso de extracción por la técnica de DMFS se resume en la Figura 1.6.1.2.1.1 y los pasos generales se describen a continuación:

- Mezcla. En un mortero de ágata o de vidrio se coloca la muestra y un adsorbente o una fase unida adecuada para extraer a los analitos de interés. El adsorbente y la muestra se mezclan entre sí manualmente con un pistilo de vidrio o de ágata por alrededor de 30 segundos. La unión del soporte sólido con la muestra produce un corte abrasivo, causado por fuerzas de cizalla que inducen la ruptura de la estructura de la muestra; de esta forma la muestra es dispersada sobre la superficie del material de soporte unido a una fase, causando interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, que hacen de la fase dispersa un empaque de características particulares para conseguir el aislamiento del analito de interés.
- Empaque. Una vez mezclado, el material se transfiere a una columna o cartucho que permite realizar la elución con disolventes. Regularmente la mezcla de adsorbente/muestra se encuentra comprimida entre 2 filtros formando la columna de empaque, la compresión debe ser suficiente para evitar la formación de canales pero no demasiada porque al sobre-compactar el material se dificulta el paso de elución.
- Elución selectiva. Se debe utilizar un disolvente apropiado o una secuencia de disolventes que permita limpiar la columna o aislar directamente el compuesto(s) de interés. La naturaleza del disolvente y el volumen de elución son fundamentales porque deben consentir que los analitos de

interés sean eficientemente adsorbidos y posteriormente desorbidos de la columna y al mismo tiempo que los componentes interferentes de la matriz puedan ser retenidos en el empaque o que eluyan en fracciones previas a los componentes de interés (*Fidalgo-Used, 2007*).

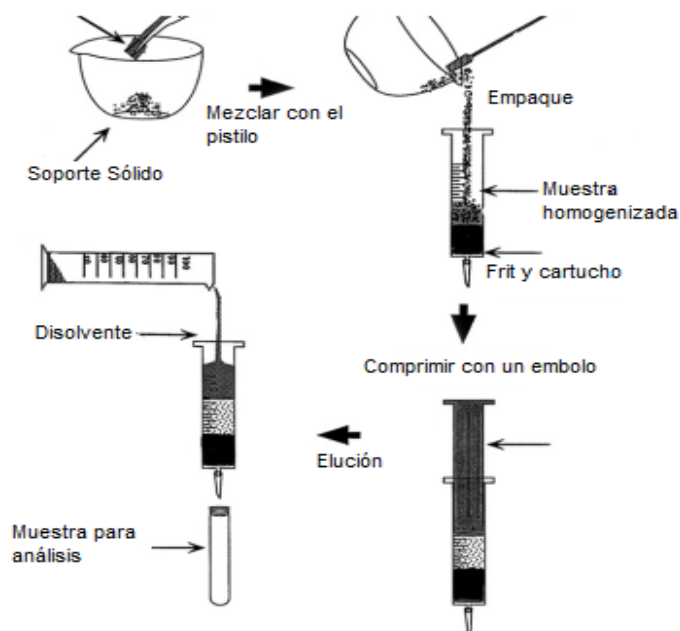


Fig. 1.6.1.2.1.1 Pasos generales de la DMFS.
(Imagen modificada: Barker, 2007)

1.6.2. Generalidades de la cromatografía de líquidos.

La cromatografía es una técnica de separación que se basa en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una de las cuales constituye un lecho estacionario y la otra es un fluido que pasa a través de la fase estacionaria.

La cromatografía de líquidos hace referencia al estado de la fase móvil; inicialmente se llevaba a cabo en una columna empacada de fase estacionaria, donde la muestra y la fase móvil fluían por efecto de la gravedad.

Posteriormente surgió una nueva técnica la cual tiene como principal característica la alta presión, conocida por sus siglas en inglés como HPLC (High Performance Liquid Chromatography) es decir, cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), la cual es ampliamente utilizada para el análisis de trazas de contaminantes.

La CLAR es una técnica de separación rápida donde la mezcla de compuestos se transfiere a una columna empacada con partículas de adsorbente de 3-10 μm de diámetro. La separación ocurre cuando un disolvente a alta presión pasa a través de la columna y los componentes a separar se retienen en la fase estacionaria, provocando su salida a diferentes tiempos.

En la cromatografía de líquidos, los diferentes reactivos empleados como fases móviles y estacionarias permiten separar moléculas de propiedades fisicoquímicas muy similares.

La atracción o repulsión relativas que presentan las moléculas o iones, tanto de las fases inmiscibles entre sí como de los solutos, da como resultado la separación de los componentes. Estas fuerzas intermoleculares pueden ser puentes de hidrógeno, momentos dipolares permanentes o inducidos, fuerzas de dispersión o interacciones dieléctricas. Tal balance de fuerzas conlleva a que las sustancias migren por la columna a diferente velocidad.

La cromatografía de líquidos puede clasificarse de acuerdo al tipo de mecanismo involucrado en la separación: cromatografía de adsorción, cromatografía de reparto, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión y cromatografía de afinidad.

Para la realización de este trabajo se empleó la cromatografía de reparto la cual consiste en una fase estacionaria constituida por un soporte que contenga grupos funcionales de polaridad variada, químicamente unidos. Por lo tanto el soluto se equilibra entre dicha fase estacionaria y una fase móvil. Para este tipo de cromatografía se tienen dos metodologías de trabajo:

- **Fase normal:** la fase móvil es un disolvente no polar, y la fase estacionaria es un soporte con grupos polares como $-\text{CN}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COO}^-$, etc.

Los disolventes más empleados en este tipo de cromatografía son: hexano, tetracloruro de carbono, benceno, etc. La fase móvil tendrá una mayor fuerza eluyente cuanto mayor sea su polaridad.

-
- **Fase reversa:** aquí la fase móvil es polar y la fase estacionaria es apolar. En este tipo de cromatografía los analitos menos polares presentan mayor afinidad con la fase estacionaria, por lo que quedan retenidos por más tiempo y eluyen después de los compuestos polares. Habitualmente la fase estacionaria posee partículas de sílice químicamente modificadas con hidrocarburos, siendo las más utilizadas las recubiertas con grupos octadecilo (C18) y octil (C8). Los disolventes más empleados como fase móvil son metanol, agua, acetonitrilo, acetato de etilo, así como mezclas de éstos para obtener eluyentes de fuerza intermedia. La fase móvil tendrá una mayor fuerza eluyente cuanto menor sea su polaridad.

Posterior a la separación los solutos, éstos compuestos son registrados por un detector, la información se transmite a un sistema electrónico y los datos se obtienen en forma de un cromatograma que representa las señales de cada compuesto en forma de un pico gaussiano. El número de picos es igual al número de componentes separados de la muestra, no necesariamente de los componentes presentes en la muestra original.

1.6.2.1. Parámetros que influyen en la separación cromatográfica.

Los parámetros a considerar en la separación cromatográfica se describen a continuación:

Tiempo de retención (t_r): Se refiere al tiempo que un componente permanece en la columna, es decir, es el tiempo considerado entre la inyección del analito y hasta que éste alcanza el detector. Es característico del compuesto para condiciones de operación constantes.

Tiempo muerto (t_m): Es el tiempo necesario para que un soluto no retenido o la fase móvil, atraviese la columna.

Número de platos teóricos (N): Cada plato teórico constituye un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases móvil y estacionaria.

Se define por la siguiente ecuación:

$$N = \frac{L}{H} \dots \dots \dots (1.6.2.1.1)$$

Donde L es la longitud del relleno de la columna, habitualmente en cm.

H se refiere a la altura del plato.

Para calcular el número de platos teóricos también se emplean las ecuaciones:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right) \qquad N = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right) \dots \dots \dots (1.6.2.1.2)$$

Donde w es el ancho de la base del pico cromatográfico y $w_{1/2}$ es el ancho a la mitad de la altura de la banda.

Regularmente se asume que los picos cromatográficos tienen una forma gaussiana, así podemos definir a H por:

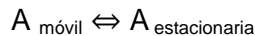
$$H = \frac{\sigma^2}{L} \dots \dots \dots (1.6.2.1.3)$$

Donde σ^2 es la varianza de la curva gaussiana o pico.

Eficiencia: comúnmente la eficiencia de una columna se define por medidas cuantitativas como son la altura del plato (H) y el número de platos (N).

La eficiencia de la columna es mayor, cuanto mayor sea el número de platos teóricos y menor sea la altura de los platos.

Coefficiente de reparto: Los equilibrios de distribución implicados en cromatografía se describen por ecuaciones simples que suponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y móvil. Así para una especie A:



Donde K es constante de este equilibrio y se denomina constante de distribución. Definida por la ecuación 1.6.2.1.4.

$$K = \frac{C_s}{C_M} \dots \dots \dots (1.6.2.1.4)$$

Donde C_s es la concentración molar de analito en la fase estacionaria y C_M es la concentración molar de analito en la fase móvil.

El factor de capacidad (k'): Relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna, para un conjunto de condiciones definidas, k' , es una medida del tiempo que transcurre un soluto en la fase estacionaria y el tiempo transcurrido en la fase móvil. Se define como la relación de los moles de un analito en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil:

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K \frac{V_s}{V_m} \dots \dots \dots (1.6.2.1.5)$$

Comúnmente se emplea para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas. En términos experimentales se describe como la ecuación 1.6.2.1.6.

$$k' = \frac{tr - tm}{tm} \dots\dots\dots(1.6.2.1.6)$$

Selectividad (α): es la capacidad del sistema para separar dos bandas cromatográficas. Es una muestra de la afinidad de los solutos por las fases implicadas y señala el potencial de separación de dichos solutos en un sistema dado. El factor de selectividad para dos especies, A y B, se define como:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{tr_B - tm}{tr_A - tm} \dots\dots\dots(1.6.2.1.7)$$

Resolución: es la medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos analitos o picos adyacentes, se define como la distancia entre los picos dividida entre el ancho promedio de las bandas.

La relación entre el número de platos de una columna, el factor de capacidad, la selectividad y la resolución es:

$$Resolución = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_m} \right) \dots\dots\dots(1.6.2.1.8)$$

Donde k'_2 es el factor de capacidad del componente más retenido y k'_m es la media de los factores de capacidad de ambos componentes.

Si la retención y el ancho de la banda se miden en unidades de tiempo la fórmula de la resolución es:

$$Resolución = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2|tr_B - tr_A|}{W_A - W_B} \dots\dots\dots(1.6.2.1.9)$$

Donde ΔZ es la separación de los picos y W es la anchura de la base de los picos.

CAPÍTULO 2.

MATERIALES Y EQUIPO

A continuación se enlistan los equipos, materiales y reactivos empleados en el desarrollo experimental.

2.1. Disolventes y reactivos

- ◇ Metanol (MeOH) grado cromatográfico (J.T. Baker. México).
- ◇ Acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico (J.T. Baker. México).
- ◇ Agua tipo I, obtenida de un equipo de purificación (Simplicity UV, Millipore, EUA).
- ◇ Isopropanol (EM Science, Alemania).
- ◇ Estándares de HAPs (ChemService, EUA) pureza $\geq 98\%$:
 - Benzo[a]pireno
 - Pireno
 - Benzo[a]antraceno
 - Antraceno

2.2. Materiales y equipo para la preparación de muestras.

- ◇ Centrifuga marca SIGMA, modelo 2-5 (SIGMA, Alemania).
- ◇ Lámparas de luz fría 14 watts.
- ◇ Foco de luz amarilla 10 watts.
- ◇ Agitador Orbital para matraces de 250 mL, modelo 2346Q (ThermoScientific, EUA).
- ◇ Balanza analítica, modelo AG 245 (Mettler Toledo, Suiza).
- ◇ Tubos para centrifuga de 15 mL.
- ◇ Matraces Erlenmeyer de 50 y 250 mL.
- ◇ Micropipeta de volumen de 100-1000 μL (Eppendorf, Alemania).
- ◇ Espátula de cromo-níquel.
- ◇ Medio Bristol: NaNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y NaCl ; 99% (J.T. Baker, DF, México).

-
- ◇ Proteosa-peptona (MCD Lab., México).
 - ◇ Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (ThermoScientific, EUA).
 - ◇ Ultrasonido modelo Bransonic 1210 (Branson, EUA).

2.2.1. EFS y DMFS

- ◇ Cartuchos de empaque para extracción en fase sólida de 6 y 1 mL, con sus “frites” superiores e inferiores (Varian, EUA).
- ◇ Jeringa de 20 mL con adaptador.
- ◇ Sílice C-18 Supelclean de 45 µm de diámetro de partícula (Supelco, EUA).
- ◇ Mortero y pistilo de ágata de 20 mL.
- ◇ Viales con tapón de rosca de 1, 4 y 40 mL de capacidad.

2.3. Muestra biológica.

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

2.4. Sistema cromatográfico.

- ◇ Bucle de inyección de 20 µL, (Rheodyne, EUA).
- ◇ Jeringa de 50 µL (Hamilton, EUA).
- ◇ Precolumna de guarda de acero inoxidable 13/4.5 (Upchurch-Scientific, EUA), empacada con sílice fase inversa Nucleosil C-18 (Phenomenex, EUA).
- ◇ Columna analítica Agilent de 150 x 4.60 mm empacada con fase inversa Eclipse XDB- C18 tamaño de partícula 3.5 µm.(Agilent, EUA)
- ◇ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución bomba ProStar 210 (Varian, EUA).
- ◇ Detector UV de arreglo de diodos Polychrom 9065 (Varian, EUA).
- ◇ *Software* de control y procesamiento de datos Star Workstation, versión 6.0 (Varian, EUA).

2.5. Disoluciones estándar de HAPs.

Se prepararon disoluciones madre de 100 µg/mL de cada uno de los hidrocarburos utilizando metanol como disolvente.

A partir de estas disoluciones madre se prepararon disoluciones de trabajo de cada uno de los HAP y las mezclas a una concentración de 40 µg/mL utilizando ACN como disolvente.

BaP 40.27 µg/mL

Pireno 40.42 µg/mL

Antraceno 39.06 µg/mL

BaA 40.0 µg/mL

DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. Esquema general de experimentación.

Con base en una metodología para la extracción y análisis de BaP y BaA en los componentes de los cultivos algales de *Selenastrum capricornutum* (Velasco, 2011) se desarrolló otra metodología para aislar antraceno, pireno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno a partir de la biomasa y el medio líquido de los cultivos de la microalga *Scenedesmus acutus* por medio de las técnicas de EFS y DMFS con adsorbentes de fase reversa, para el posterior análisis de los extractos por CLAR-UV.

La Figura 3.1.1. representa las etapas en las que se realizó la experimentación del presente trabajo.

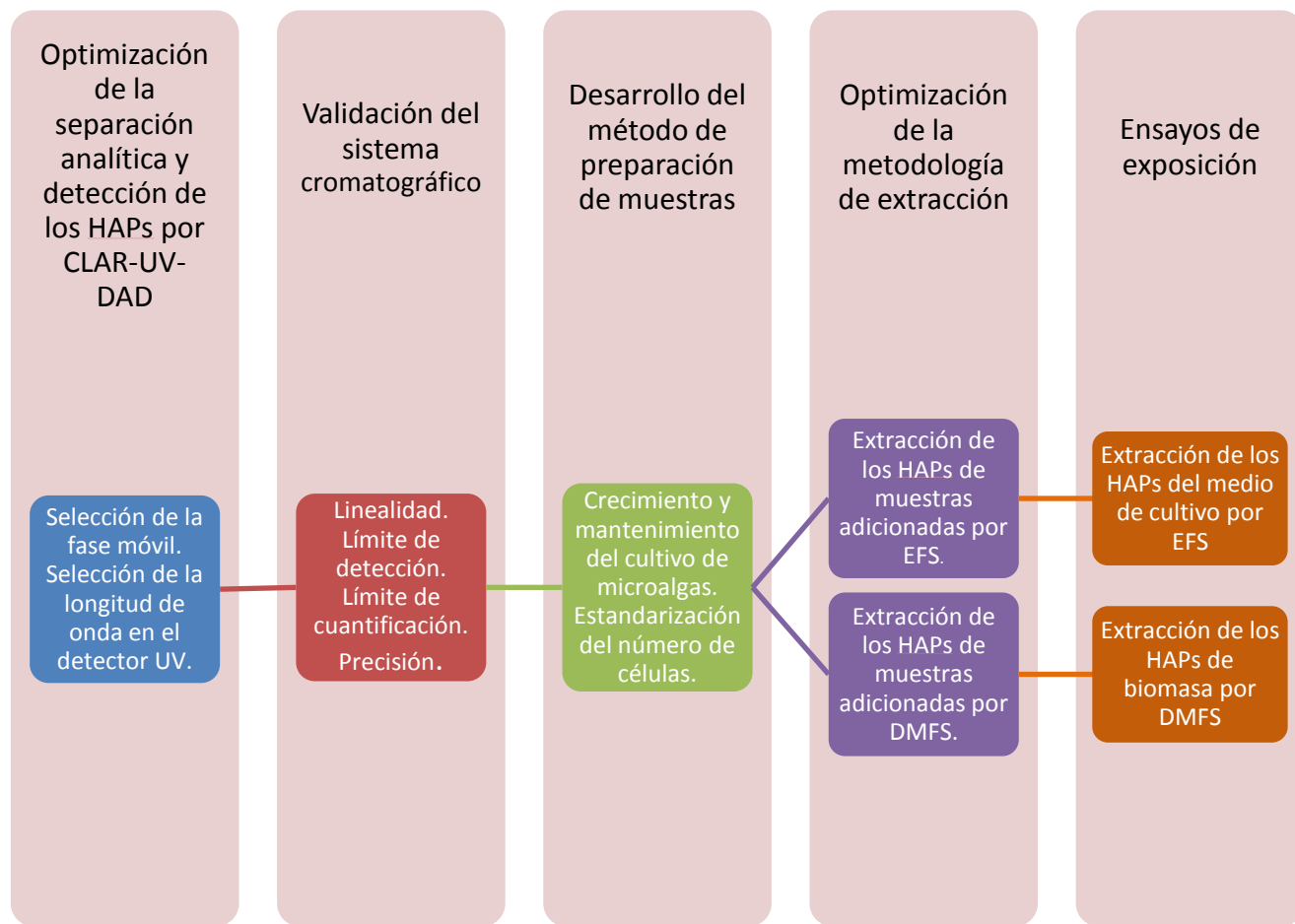


Fig. 3.1.1. Diagrama general de la experimentación.

3.2. Análisis cromatográfico.

3.2.1. Selección de la longitud de onda para la detección.

Para determinar la longitud de onda óptima para la detección de cada hidrocarburo: BaP, pireno, antraceno y BaA, se obtuvo su espectro de absorción al inyectar al cromatógrafo una disolución de 1 mg/L de cada uno de los compuestos por separado. Con el detector UV-DAD se hizo un barrido en un intervalo de 200 a 400 nm. Para el análisis se eligió la longitud de onda a la cual el compuesto presentó la máxima absorción o cercana, de acuerdo a las posibilidades del detector utilizado.

3.2.2. Selección de las condiciones para la separación cromatográfica.

Para optimizar la separación de los compuestos se realizaron inyecciones de las disoluciones estándar de las mezclas BaP-Pireno y BaA-Antraceno a una concentración de 1 µg/mL, variando la composición de fase móvil metanol:agua. Se probaron diferentes porcentajes de metanol: 100%, 95%, 90%, 85%, 80% a un flujo de 1mL/min. Con los tiempos de retención obtenidos y con el tiempo muerto determinado, se calculó el factor de retención (k') para cada porcentaje de metanol en la fase móvil, usando la fórmula 1.6.2.1.6. Posteriormente se determinó la dependencia de k' en función del porcentaje de metanol, con el gráfico de $\log k'=f$ (porcentaje de metanol).

3.2.3. Selección de la composición de la fase móvil.

La selección de la composición de la fase móvil óptima para el análisis se basó en el estudio de la separación de los hidrocarburos y los compuestos interferentes que aparecen cuando se trabaja con extractos provenientes de muestras de algas.

Se emplearon diferentes proporciones de agua y metanol como fase móvil, en un intervalo de 85-100%, con modificaciones del 5%; con cada fase móvil se inyectaron 20 µL de una disolución de 1 mg/L de pireno, antraceno, BaA y BaP por separado, para su posterior comparación con los interferentes presentes en un blanco de muestras algales (cultivos no expuestos al contaminante).

3.2.3.1. Condiciones de análisis de extractos de medio de cultivo.

A continuación se describen las condiciones cromatográficas seguidas en el análisis de extractos de muestras provenientes del medio de cultivo de microalgas.

Fase estacionaria: columna analítica Agilent de 150x4.60 mm empacada con fase inversa Eclipse XDB- C18 tamaño de partícula 3.5 μm .

Fase móvil: flujo isocrático 100% metanol, 1mL/min.

Detección: UV arreglo de diodos (DAD).

3.2.3.2. Condiciones de análisis de biomasa algal.

Las muestras de biomasa de *S. acutus* se analizaron bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

Fase estacionaria: columna analítica Agilent de 150x4.60 mm empacada con fase inversa Eclipse XDB- C18 tamaño de partícula 3.5 μm .

Fase móvil: flujo isocrático 90:10 metanol:agua 1mL/min.

Detección: UV arreglo de diodos (DAD).

3.2.4. Linealidad del sistema.

Para la determinación de la linealidad del sistema cromatográfico se inyectaron por triplicado 20 μL de disoluciones estándar de BaP, pireno, antraceno y BaA por separado, en las siguientes concentraciones 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 6, 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

Bajo estas condiciones se registró la respuesta del detector en unidades de área del pico y con los datos obtenidos se construyó el gráfico de respuesta del detector en función de la concentración de cada uno de los compuestos, una curva de calibración. La linealidad del sistema se evaluó con el coeficiente de determinación (R^2) de cada curva.

3.2.5. Límite de detección y cuantificación del sistema.

Las curvas de calibración se obtuvieron con las áreas de cada pico de los HAPs en concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 µg/mL cercanas a los límites esperados (ACS, 1980) y se llevó a cabo la regresión lineal mediante el ajuste de mínimos cuadrados. Los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) se calcularon a partir de la siguiente relación:

$$LC = \left(\frac{3.3 * S_y}{b} \right) \dots\dots\dots 3.2.5.1$$

$$LD = \left(\frac{10 * S_y}{b} \right) \dots\dots\dots 3.2.5.2$$

Donde $b = pendiente$

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

3.2.6. Precisión del sistema.

3.2.6.1. Reproducibilidad.

La reproducibilidad del sistema cromatográfico se determinó en tres días diferentes realizando por triplicado la inyección de una disolución estándar de cada HAP a una concentración de 1 y 8 µg/mL.

Con los datos generados de la respuesta del detector se calculó el coeficiente de variación (C.V.) para cada punto con ayuda de la fórmula 3.2.6.1.1.

$$\%C.V. = \frac{\sigma}{X} * 100 \dots\dots\dots(3.2.6.1.1)$$

Donde X es el promedio del área y σ es la desviación estándar.

3.2.6.2. Repetibilidad.

La repetibilidad se refiere al grado de concordancia de los resultados, cuando las condiciones se mantienen constantes, tanto como es posible, con el mismo analista, reactivos, equipo e instrumentos llevado a cabo dentro de un corto periodo de tiempo.

Se determinó la repetibilidad del sistema mediante la inyección de una disolución estándar de los hidrocarburos por triplicado a concentraciones de 1 y 8 µg/mL, en el mismo día.

Con los datos obtenidos de la respuesta de los HAPs se calculó el coeficiente de variación (C.V.) para cada compuesto utilizando la fórmula 3.2.6.1.1.

3.3. Preparación de muestras algales.

S. acutus fue cultivada en medio líquido Bristol–proteosa peptona, cuya composición se enlista en la tabla 3.3.1, a partir de cultivos sólidos de la microalga.

Componente	Concentración final en el medio
NaNO ₃	2.94 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.17 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 mM
Na ₂ HPO ₄	0.43 mM
NaH ₂ PO ₄	1.29 mM
NaCl	0.43 mM
Proteosa peptona	0.5 g/L

Tabla 3.3.1. Composición del medio líquido para el crecimiento de *S. acutus*.

El medio líquido inoculado se colocó a temperatura ambiente, manteniendo aireación permanente, dentro de una cámara con lámparas de luz fría, con ciclos de luz:oscuridad 16:8 horas.

La cantidad de microalgas se estandarizó mediante una curva de calibración donde a una absorbancia espectrofotométrica de valor 1.0 a 685 nm, se obtenían de 4 - 6 X 10⁶ células.

Adicional a las muestras de microalgas vivas (MV), se utilizaron controles de microalgas muertas (MM), dichos controles se obtuvieron al someter a cultivos de microalgas con absorbancia 1 a λ de 685 nm a un proceso de esterilización por autoclave (121°C por 20 min).

3.3.1. Estandarización del número de células.

Para relacionar la absorbancia con el número de células y la biomasa algal, se sembró *S. acutus* en medio líquido Bristol-proteosa peptona y diariamente se tomaron 7 mL del cultivo hasta que se obtuvo un valor de absorbancia de 1. Contando el día 0 como el día en el que se inoculó el medio.

A partir de esta alícuota se midió la absorbancia a 685 nm, la longitud de onda donde la clorofila presenta un máximo; se cuantificó el número de células con la cámara de Neubauer; y se pesó la biomasa seca. La medición de estos parámetros se hizo en 3 cultivos de la microalga sembrados el mismo día y un blanco que sólo contenía medio Bristo-proteosa peptona.

3.4. Optimización de los métodos de extracción.

Para la optimización de la extracción de los HAPs por EFS y DMFS se utilizó medio líquido y biomasa algal provenientes de cultivos de *S. acutus* libres de hidrocarburos. El medio de cultivo fue adicionado con disoluciones estándar de HAPs para obtener una concentración de 267 µg/L, de igual forma la biomasa fue adicionada con una concentración final de 800 µg/g; para cada ensayo se usaron aproximadamente 5 mg de biomasa seca.

Con los datos obtenidos se evaluó porcentaje de recuperación y precisión.

3.4.1. Recobro.

La recuperación de un método se deriva de la medición de blancos adicionados, estos pueden ser disoluciones estándar o muestras adicionadas con el analito de interés. El recobro constituye un factor de corrección en la cuantificación de los analitos.

El recobro se determinó con la fórmula 3.4.1.1.

$$\% \text{ Recobro} = \frac{[\text{analito encontrado}]}{[\text{analito agregado}]} \times 100\% \dots \dots \dots (3.4.1.1)$$

Donde [analito encontrado] se basa en la señal de analito neta del blanco adicionado y se compara con la respuesta del [analito agregado], del cual se conoce la concentración.

Porcentajes de recuperación cercanos al 100% no se ven gravemente afectados por la variabilidad propia del proceso recuperación, en cambio un recobro bajo depende más de la precisión de la recuperación real a esa concentración (ACS, 1980).

3.4.2. Acondicionamiento del adsorbente.

Previo al uso la sílice C18 Supelclean fue acondicionada con metanol 100% en una relación de 1 mL por 1 g de adsorbente y se dejó secar al vacío por una hora. Este

proceso permite eliminar impurezas del material y favorece la interacción con los analitos de interés al solvatar las moléculas del adsorbente.

3.4.3. Extracción en Fase Sólida (EFS).

El proceso de extracción se inició con 15 mL de medio de cultivo a los cuales se les agregó 100 µL de antraceno, pireno, BaP y BaA a 40 µg/mL, posteriormente se agregó isopropanol al 20% y se dejó equilibrar por 5 min.

La muestra adicionada con HAPs se hizo pasar a través de una columna de extracción, la cual se preparó en un cartucho de polipropileno con capacidad de 6 mL, empacado con 300 mg de sílice C18 y 2 *frits* al inicio y final del empaque, posteriormente la columna se acondicionó con 3 mL de ACN 100% seguidos de 10 mL de agua tipo I.

Con ayuda del vacío, la muestra se hizo pasar por el cartucho seguida de 5 mL de agua, 4 mL de ACN 10%, 3 mL de ACN 55% y finalmente 4 mL de ACN 100%, ésta última fracción se colectó para su posterior análisis por CLAR-UV-DAD.

3.4.4. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)

Sobre un mortero de ágata se colocaron 5 mg de biomasa, proveniente de cultivos de *S. acutus*, se adicionaron 100 µL de pireno, antraceno, BaP y BaA a 40 µg/mL, una vez que el disolvente se evaporó, se agregó 100 mg de sílice derivatizada con C18; los componentes se mezclaron hasta obtener una fase lo más homogénea posible. La fase obtenida se empacó en cartuchos de polipropileno con capacidad de 1 mL, a través de la cual, con ayuda del vacío, pasaron 10 mL de agua, 5 mL de ACN 20%, 1.5 mL de ACN 40% y 0.5 mL de ACN 90%, La fracción final se analizó por CLAR-UV-DAD.

3.5. Ensayos de exposición.

Los cultivos se emplearon en ensayos de exposición a HAPs cuando mostraron una absorbancia espectrofotométrica de 1.0, a 685 nm. Se aplicaron disoluciones de antraceno, pireno, BaA y BaP disueltos en ACN, a una concentración en el medio de cultivo de 267 µg/L.

Bajo condiciones de esterilidad se tomaron 15 mL del cultivo y transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 50 mL, posteriormente se agregaron 100 µL de una disolución 40 µg/mL (ver sección 2.5) de los HAPs.

Una vez que el cultivo estaba en contacto con el hidrocarburo, las microalgas se colocaron en una cámara con luz amarilla y agitación constante por el tiempo de exposición definido. Los tiempos de exposición individual probados fueron: 0.75, 2, 6, 15, 24 y 48 h.; para mezclas de HAPs se manejaron 0.75, 2, 6 y 24 h.

Finalizado el tiempo de exposición, el medio se transfirió a tubos de centrifuga de 15 mL para centrifugarlos a una velocidad 3900 rpm por 20 min., con ello se obtuvo el medio líquido sin microalgas y el botón celular, mismo que se dejó secar sobre portaobjetos de vidrio a temperatura ambiente.

Para cada tiempo se realizaron 3 repeticiones, un blanco y un triplicado del control de algas muertas. En todos los casos se siguió el procedimiento ilustrado en la Figura 3.5.1.

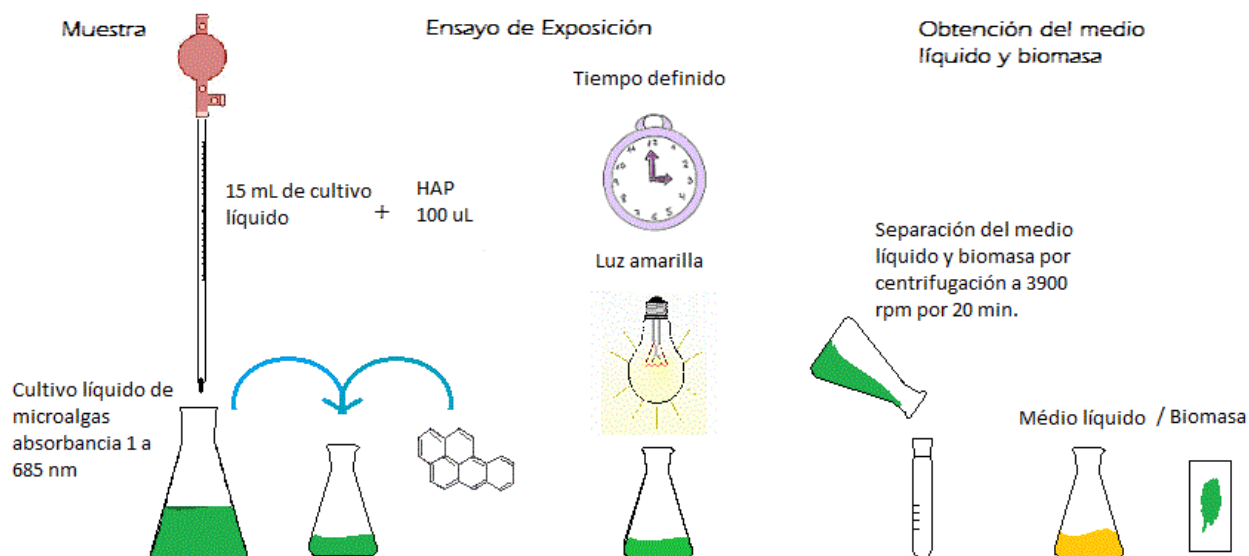


Figura 3.5.1. Procedimiento de los ensayos de exposición a HAPs.

3.5.1. Extracción de los HAP del medio líquido.

La extracción de los HAP se realizó por medio de EFS, siguiendo la metodología descrita en la sección 3.4.3.

El sobrenadante proveniente del ensayo de exposición fue adicionado con 20% de isopropanol, como modificador orgánico para disminuir la adsorción de los HAPs a las paredes del material de vidrio. Posteriormente se siguió el proceso expuesto en la Figura 3.5.1.1, el cual muestra desde el empaque de la columna, la aplicación de la

muestra, la limpieza de interferentes provenientes de la matriz con eluentes de fuerza débil y la obtención final del extracto donde se encuentran los HAPs.

El extracto final de 4 mL de ACN fue analizado por CLAR con detector UV con arreglo de diodos, con el fin de encontrar el (los) hidrocarburo(s) agregado en el ensayo de exposición.

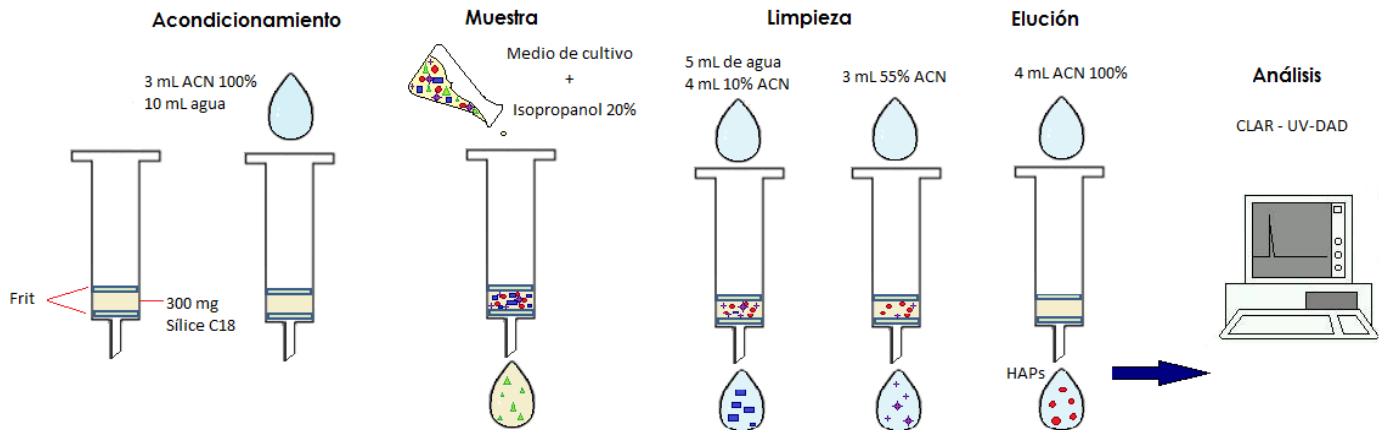


Figura 3.5.1.1. Proceso de EFS al que se somete el medio de cultivo líquido proveniente de cultivos expuestos a HAPs.

3.5.2. Extracción de los HAP de la biomasa.

Una vez que el botón de microalgas se encontraba seco, este se pesó y dispersó con la fase C18 en un mortero de ágata hasta obtener una fase uniforme, la mezcla se empacó en cartuchos de extracción y se siguió el proceso señalado en la optimización del proceso de extracción, el cual se ilustra en la Figura 3.5.2.1.

En todos los casos los extractos obtenidos se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su análisis por CLAR-UV-DAD.

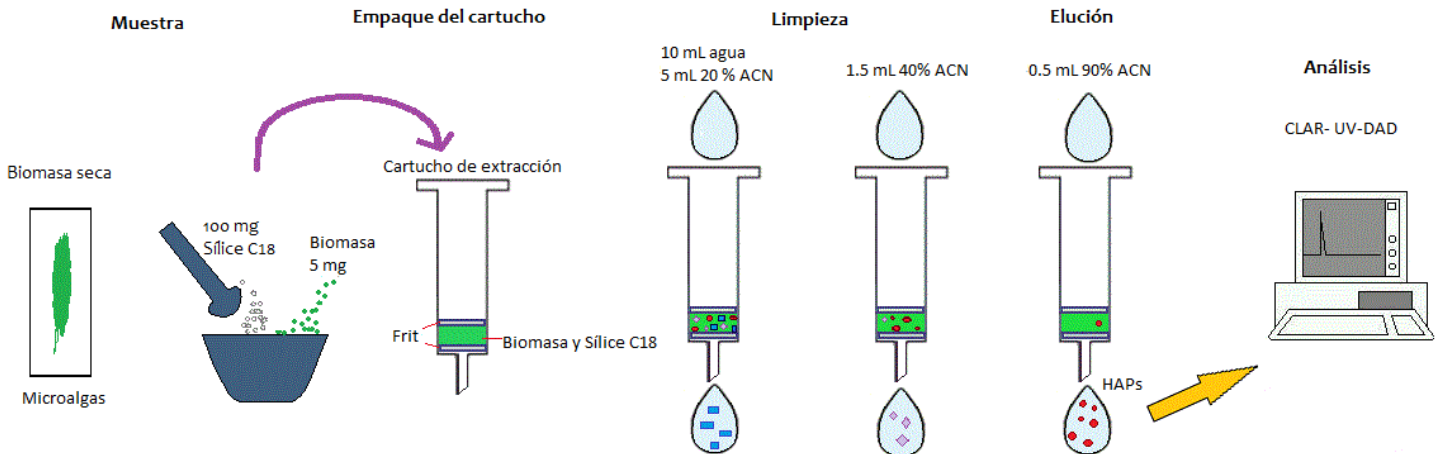


Figura 3.5.2.1. Proceso de DMFS al que se sometió la biomasa obtenida de cultivos de *S. acutus* expuestos a los HAPs.

3.6. Análisis estadístico

Se calcularon los promedios y la desviación estándar para cada exposición. Conjuntamente se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de una vía al 95 % de confianza, para los datos de cada HAP a todos los tiempos estudiados y comparar los tratamientos (exposiciones individuales y en muestras). Posterior a este análisis se llevó a cabo una prueba de Tukey para una comparación múltiple entre los controles de MM y los datos de MV de los tratamientos.

Para comprar pares de datos de MM y MV a un tiempo dado se realizó una prueba de t al 95% de confianza.

Todos los análisis estadísticos mencionados fueron llevados a cabo con el programa Graphpad Prism 6[®] (GraphPad software, EUA).

CAPÍTULO 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis cromatográfico.

4.1.1. Selección de la longitud de onda para la detección de los HAPs.

De acuerdo al espectro conseguido con el detector de UV se seleccionó la longitud de onda óptima para cada uno de los compuestos.

La Tabla 4.1.1.1 señala las longitudes de onda que presentaron mayor respuesta y pudieron ser seleccionadas en el detector UV-DAD.

Compuesto	λ nm
Pireno	239
Antraceno	249
Benazo[a]pireno	263
Benzo[a]antraceno	287

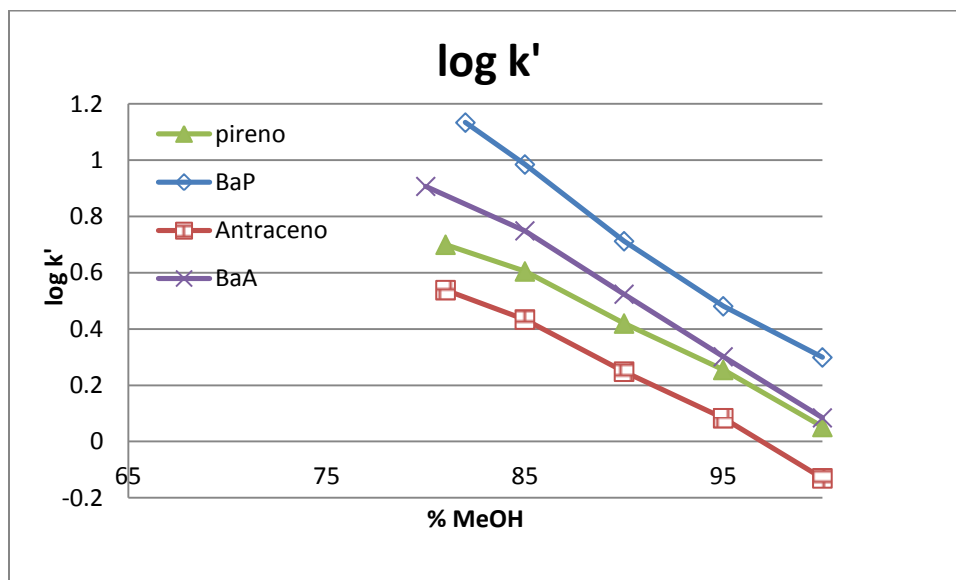
Tabla 4.1.1.1. Longitudes de onda óptimas para la detección de los HAPs.

Los espectros de absorción UV de cada compuesto se muestran en el anexo I.

4.1.2. Selección de las condiciones para la separación cromatográfica.

La Gráfica 4.1.2.1 exhibe el valor de $\log k'$ para las proporciones MeOH:Agua probadas. Las curvas obtenidas se muestran paralelas entre sí, lo que indica buena separación de los compuestos en las proporciones examinadas.

Al realizar una comparación de los tiempos de retención y la composición de la fase móvil, se optó por utilizar una fase móvil de metanol 100% para las muestras provenientes del medio líquido, que además de permitir la separación de los compuestos utilizados en mezcla (antraceno-BaA, pireno-BaP y BaA-BaP), consiente la separación de posibles interferentes más polares provenientes de las microalgas.



Grafica 4.1.2.1. Variación de k' de los HAPs en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.

4.1.3. Selección de la composición de la fase móvil.

Al comparar los tiempos de retención de los HAPs con los t_r de las interferencias provenientes de blancos de muestras reales, se decidió utilizar como fase móvil metanol 90% en los extractos de la biomasa algal y 100% metanol en el análisis de los extractos del medio líquido por la poca presencia de interferentes debido a la selectividad del método de extracción por EFS, como se observa en el cromatograma de la Figura 4.1.3.1.

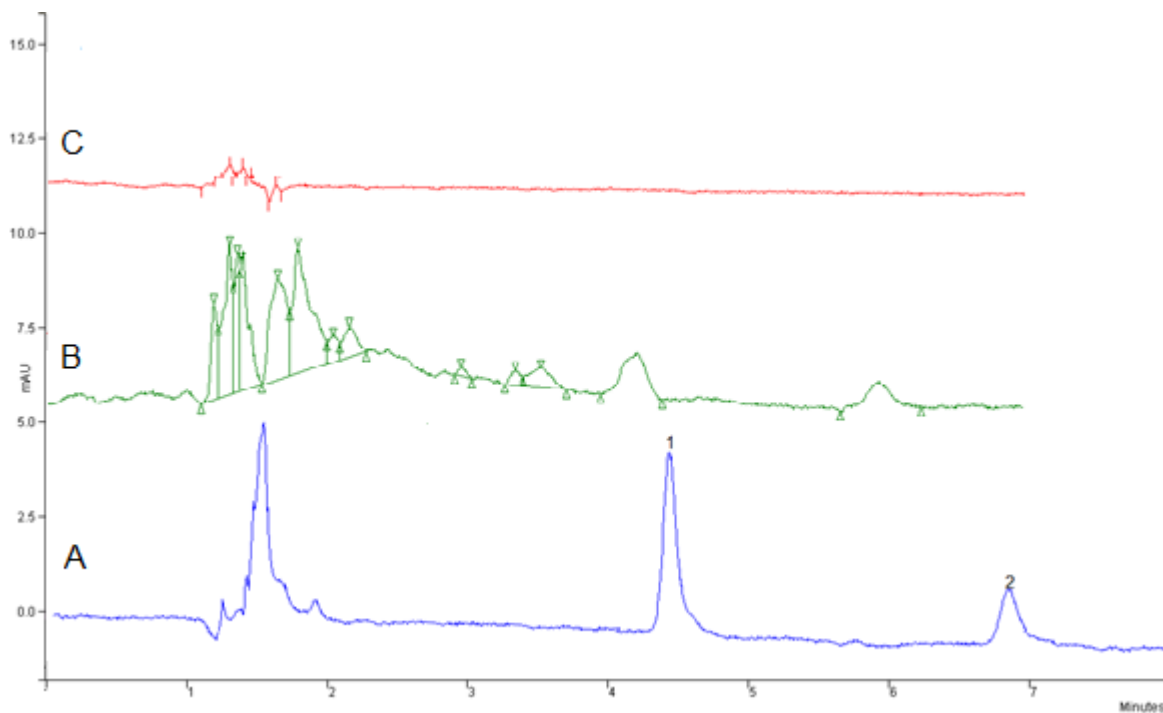
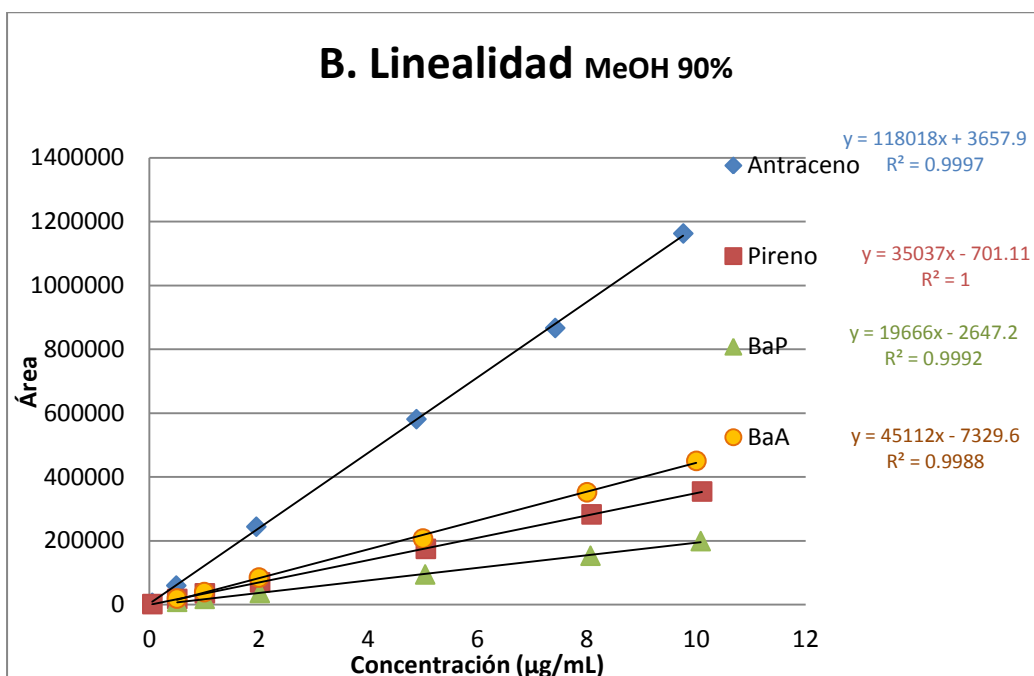
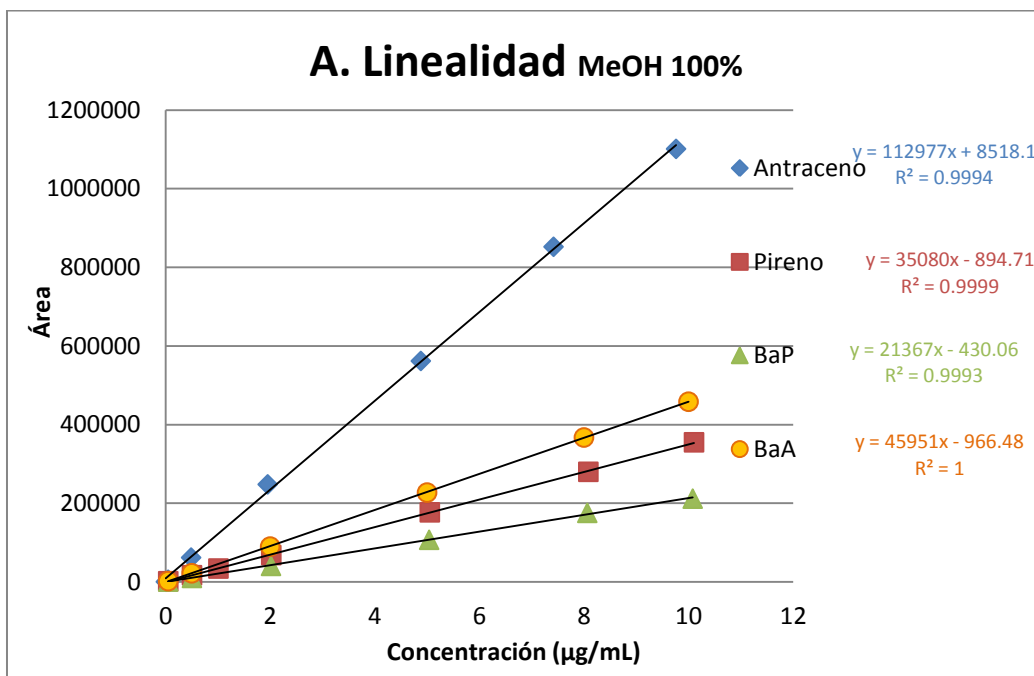


Figura 4.1.3.1. Cromatogramas obtenidos de blancos extraídos por DMFS (B) y EFS (C), comparación con un estándar (A) de antraceno (1) y BaA (2) a 0.05 mg/L, mostrados a 249 nm. Condiciones C: fase móvil 1mL/min, 100% MeOH. Condiciones A y B: 90% MeOH. Detector UV-DAD.

4.1.4. Linealidad del sistema.

En las Gráficas 4.1.4.1.A y B se indican las respuestas en área de los HAPs a concentraciones de 0.05 a 10 $\mu\text{g/mL}$, en las fases móviles seleccionadas. Los cuatro HAPs presentan una $r^2 > 0.998$ lo que indica que el sistema tiene una respuesta lineal en este intervalo de concentraciones.



Gráficas 4.1.4.1. Curvas de calibración de BaP, BaA, Pireno y Antraceno, en fase móvil MeOH 100%(A) y 90%(B).

4.1.5. Límite de detección y límite de cuantificación del sistema.

Los límites de detección y cuantificación de cada HAP dependen de sus características fisicoquímicas (coeficientes de absorptividad) por lo que los valores difieren entre sí, como se puede apreciar en la Tabla 4.1.5.1.

Compuesto	Antraceno (µg/mL)	Pireno (µg/mL)	BaA (µg/mL)	BaP (µg/mL)
LD	0.03	0.09	0.11	0.07
LC	0.08	0.26	0.35	0.22

Tabla 4.1.5.1 Límites de detección y cuantificación de los 4 HAPs estudiados.

4.1.6. Precisión del sistema.

4.1.6.1. Reproducibilidad y repetibilidad.

La evaluación de la reproducibilidad y repetibilidad del sistema se llevó a cabo con inyecciones de disoluciones de estándares a 1 y 8 µg/mL.

La Tabla 4.1.6.1.1 muestra el % C.V. de las inyecciones de cada hidrocarburo.

Los cuatro HAPs estudiados cuentan con valores de %C.V. mayores en las inyecciones de días diferentes comparados con el valor del %C.V. de inyecciones realizadas el mismo día, esto se explica porque las inyecciones realizadas en diferentes días implican la variación del operador, el equipo y además la variación en la preparación del estándar y de las condiciones ambientales, no obstante estos valores menores a 2.22%, son %C.V. muy buenos y por lo tanto aceptables para la reproducibilidad del sistema.

Compuesto Concentración (µg/mL)	BaP		Pireno		Antraceno		BaA	
	Repetibilidad	Reproducibilidad	Repetibilidad	Reproducibilidad	Repetibilidad	Reproducibilidad	Repetibilidad	Reproducibilidad
1	1.42%	1.71%	0.969%	1.04%	1.25%	1.74%	0.798%	1.35%
8	0.923%	1.64%	0.722%	2.08%	0.668%	2.22%	0.736%	1.12%

Tabla 4.1.6.1.1. Valores de %C.V. de la reproducibilidad y repetibilidad para el sistema cromatográfico.

4.2. Optimización de los métodos de extracción.

La optimización de los métodos hace referencia a la caracterización de un método de análisis, la cual considera todas las fuentes de variación para conocer el grado de concordancia entre el valor real y medidas repetidas obtenidas bajo las mismas condiciones.

El recobro es uno de los parámetros comúnmente evaluados. Un recobro aceptable se define en función del nivel de concentración manejado y del propósito del análisis, por ello este parámetro fue evaluado continuamente para verificar la eficiencia de la extracción y limpieza de interferentes en las metodologías empleadas.

4.2.1. Extracción en Fase Sólida

Se calculó el porcentaje de recobro para cada HAP con los datos obtenidos de muestras adicionadas y se evaluó la precisión con el %C.V. de los triplicados realizados el mismo día y en tres días diferentes. Los resultados se indican en la Tabla 4.2.1.1.

HAP	Porcentaje de recobro	%C.V. (mismo día)	%C.V. (diferentes días)
Antraceno	75	4.4	5.5
Pireno	85	3.6	3.5
BaA	89	3.2	3.4
BaP	89	2.9	4.7

Tabla 4.2.1.1. Valores de recuperación y %C.V. de los HAPs extraídos con el método de EFS.

El método cuenta con recobro, reproducibilidad y repetibilidad aceptables con valores superiores al 75 % y %C.V. menores al 5.5% en matrices reales. Además el método de EFS cubre las recomendaciones de la USEPA para matrices acuosas con cobros entre 70% y 130% (*Hennion, 1999; USEPA 2003*).

4.2.2. Dispersión de Matriz en Fase Sólida.

Los cobros y valores de %C.V. expuestos en la Tabla 4.2.2.1 se obtuvieron de matrices reales adicionadas.

HAP	Porcentaje de recobro	%C.V. (mismo día)	%C.V. (días diferentes)
Antraceno	75	5.6	6.5
Pireno	78	5.6	8.1
BaA	85	3.7	7.8
BaP	85	3.7	5.5

Tabla 4.2.2.1. Valores de recuperación y %C.V. de los HAPs extraídos por DMFS.

Los HAPs extraídos por este método muestran recobros de 75% a 85%, siendo el antraceno el compuesto que cuenta con el menor recobro debido a su polaridad a causa de la pérdida de pequeños porcentajes de este HAP en fracciones de la secuencia de limpieza, dejando un menor porcentaje en la fracción final en comparación con los otros hidrocarburos estudiados.

Las muestras reales de biomasa incluyen mayor cantidad de interferentes (en especial pigmentos difíciles de eliminar completamente) por lo que es evidente que la variación aumente en comparación con el método de EFS, aun así el método tiene parámetros aceptables, los cuales cumplen con las recomendaciones de la USEPA (USEPA, 2003).

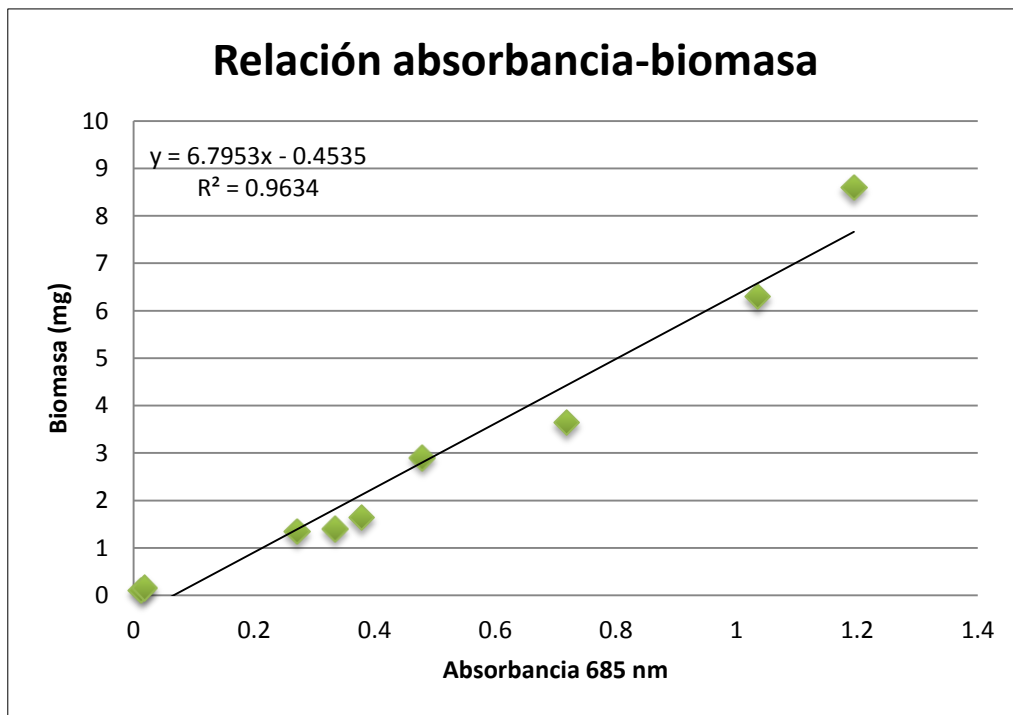
4.3. Estandarización del número de células.

El crecimiento microbiológico se monitorea por varios métodos, al usar cualquiera de ellos conviene considerar que es difícil obtener resultados exactos y las cuentas individuales poseen mucha variación entre sí debido a numerosas desviaciones inherentes a los microorganismos.

De acuerdo al seguimiento del peso de la biomasa, la absorbancia y el número de células se estableció una relación para utilizar la misma cantidad de células en cada ensayo de exposición, puesto que la eficiencia de la remoción de los contaminantes se ve afectada por la concentración algal.

Mayor cantidad de biomasa suministrará mayor superficie celular, volumen y cantidad de enzimas, características que influyen en los procesos de adsorción, absorción y degradación de HAPs, de igual manera se debe considerar que al tener una alta concentración de células algales, estas pueden agregarse y reducir el área de adsorción.

El seguimiento de los parámetros antes mencionados se representa en las Gráficas 4.3.1 y 4.3.2.



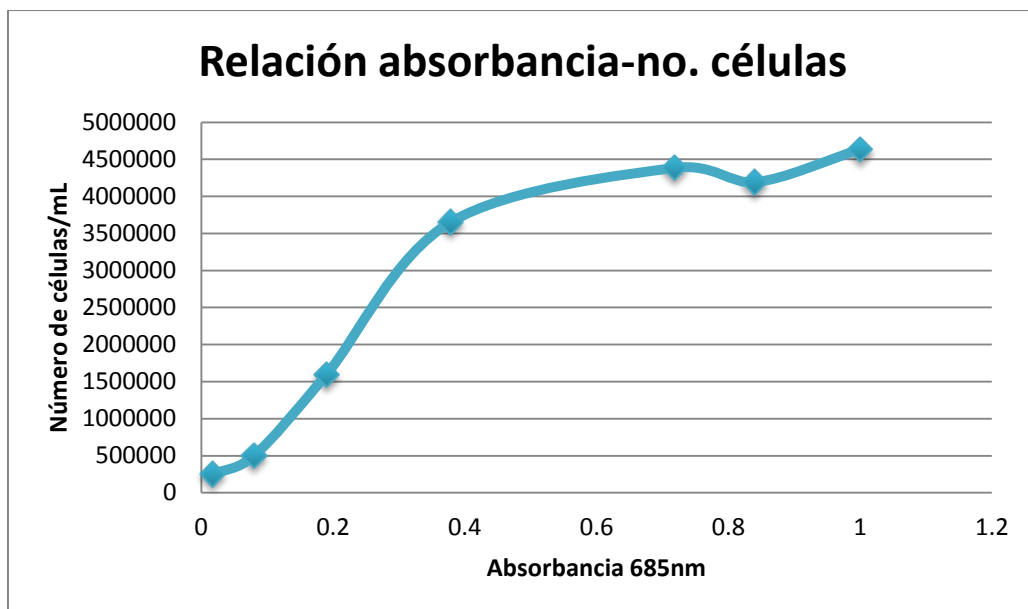
Gráfica 4.3.1. Biomasa seca en relación con la absorbancia del medio de cultivo de *S. acutus*.

La Gráfica 4.3.1 muestra una relación lineal ($r^2 = 0.9634$) entre la biomasa algal y la absorbancia del cultivo. Cabe mencionar que al inicio del crecimiento la biomasa fue difícil de cuantificar por su baja cantidad además con este parámetro no se diferencian células vivas y muertas, a diferencia del conteo de células por microscopio óptico.

La medida de la absorbancia es una técnica adecuada y rápida para determinar el peso seco de distintos microorganismos por unidad de volumen del cultivo. Debe destacarse que tales mediciones son directamente proporcionales a valores bajos de absorbancia (*Stanier, 1992*). Sin embargo, se encuentran absorbancias muy diferentes por número de microorganismos cuando el tamaño celular es diferente, por esta razón es conveniente estimar el número de microorganismos totales o el número de microorganismos viables con una curva de calibración específica para el organismo.

La relación existente entre el número de células y la absorbancia se puede apreciar en la Gráfica 4.3.2, ya que ambos parámetros se evaluaron diariamente es posible comparar esta relación con una curva de crecimiento de microorganismos (García y Vaca, 2009), aunque el seguimiento no llegó a la fase de muerte celular. Este comportamiento se puede observar porque el número de células es un parámetro directamente relacionado con el crecimiento celular y más sensible que la cuantificación de biomasa.

Basándose en el comportamiento de usual de una curva de crecimiento, en la Gráfica 4.3.2 se puede observar claramente una fase de crecimiento acelerado y una probable etapa de de equilibrio entre las células nuevas y las ya existentes, por ello es que se aprecia una tendencia a estabilizarse en valores de absorbancia mayores a 0.8.



Gráfica 4.3.2. Relación de absorbancia con el número de células de *S. acutus*.

4.4. Ensayos de Exposición.

4.4.1. Ensayos de exposición a HAPs de forma individual.

En la Gráfica 4.4.1.1 se señalan las cantidades obtenidas de los HAPs de los ensayos de exposición de forma individual en los cultivos de microalgas vivas (MV) y microalgas muertas (MM). Los porcentajes mostrados como totales son la suma de la cantidad del HAP proveniente de la biomasa más la cantidad recuperada del medio líquido.

En todos los casos se empleó una prueba de t para comparar los datos de las muestras de MV con el control de MM, en la mayoría de los tiempos existe una diferencia estadísticamente significativa entre las MV y el control de MM, con un 95% de confianza.

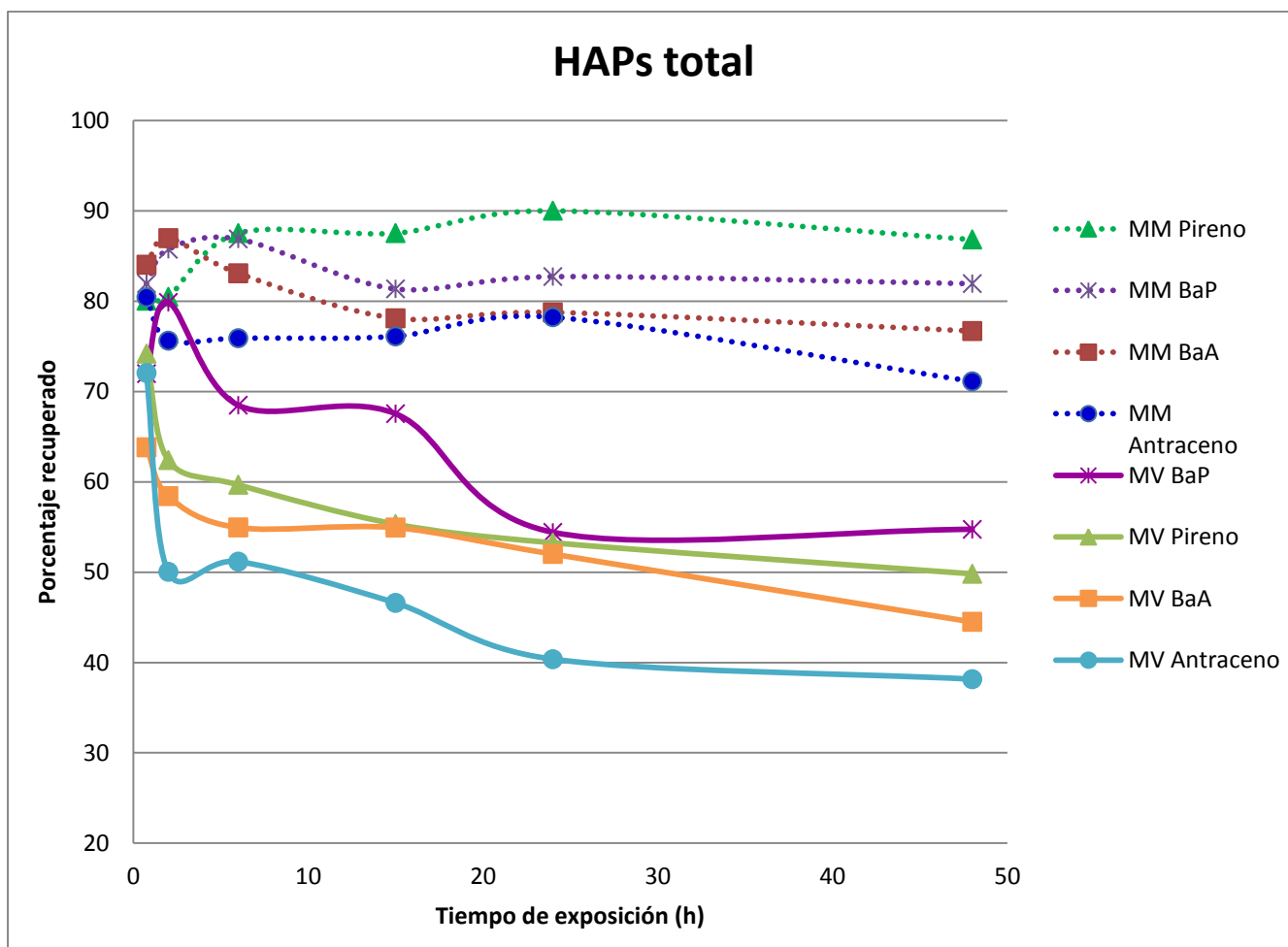
Los controles de MM de pireno, antraceno, BaA y BaP, exhiben una mayor cantidad de HAPs en comparación con las MV para todos los tiempos de exposición, esto sumado a la evidencia estadística, indica que la disminución del hidrocarburo que se da en microalgas vivas puede atribuirse al metabolismo de *S. acutus*.

En el caso de MV expuestas a antraceno se observa una disminución del 72% al 50% de 0.75 h a las 2 h. En tiempos posteriores, de 6 h a 48 h, la reducción del hidrocarburo va del 51% al 38%.

Para el caso de la exposición a pireno en MV a las 0.75 h se tiene un 74% y a las 6 h se cuenta con un 60% del compuesto agregado inicialmente pero en tiempos mayores la disminución es más lenta, con porcentajes de 55% a las 15 h y 50% a las 48 h.

En MV el BaA no presenta una disminución inicial tan grande como los anteriores compuestos, con 64% a las 0.75 h y 55% a las 6 h, llegando a un 45 % a las 48 h. Así mismo en MV el BaP muestra una reducción discreta en los primeros tiempos con un 68% de BaP a las 6 h, y una reducción mayor en tiempos subsecuentes que va de 67 % a las 15 h a un 55% a las 48 h, lo cual contrasta con el comportamiento de los otros HAPs en el mismo lapso de tiempo.

Las diferencias anteriores sugieren que la degradación de los HAPs está relacionada con su estructura puesto que el antraceno, compuesto de 3 anillos, presenta una disminución mayor en tiempos cortos en contraste con el BaP de 5 anillos donde la reducción se da en mayor tiempo y de forma paulatina. La rápida desaparición del antraceno puede atribuirse a su mayor solubilidad en el medio acuoso y su estructura molecular, lo que facilita que la microalga lo internalice y metabolice.



Gráfica 4.4.1.1. Suma de cada HAP extraído en biomasa y medio de cultivo para MV y MM.

Se debe considerar que el hidrocarburo es removido del medio por adsorción en las células y biodegradación del compuesto. La Tabla 4.4.1.1 resume los porcentajes de remoción del medio de cultivo en relación a la cantidad agregada inicialmente.

HAP	Antraceno	Pireno	BaA	BaP
Remoción MV	58%	73%	83%	82%
Remoción MM	58%	69%	75%	64%

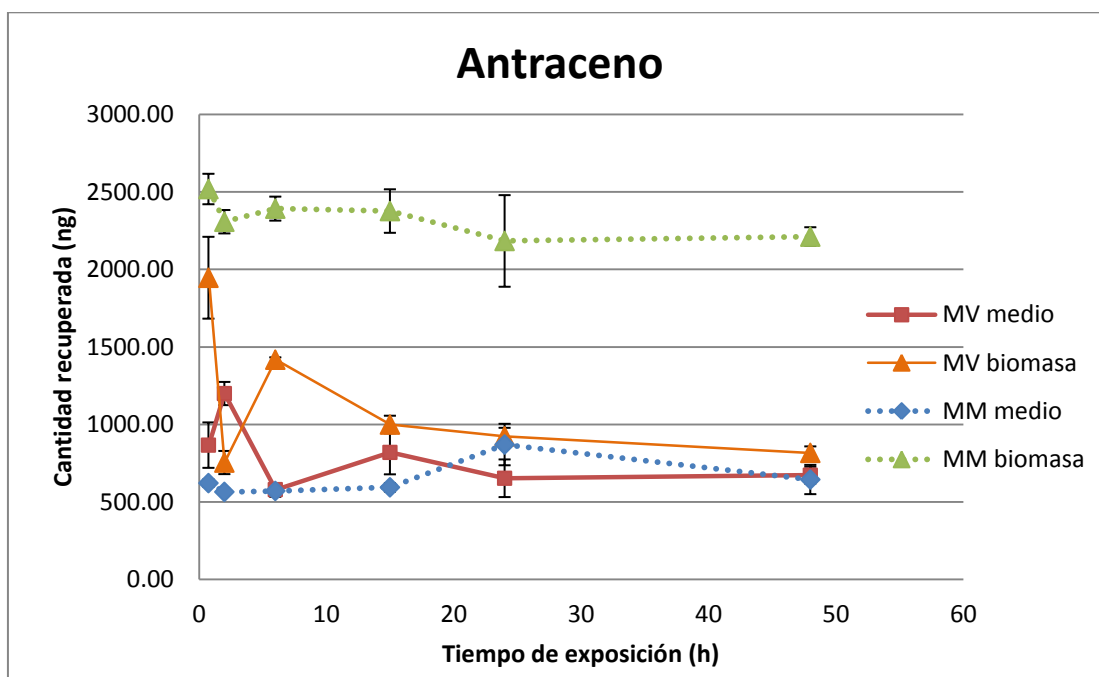
Tabla 4.4.1.1. Porcentaje removido de HAPs en el medio de cultivo líquido después de 48 h de exposición.

A continuación se presentan la distribución de cada HAP en cada uno de los componentes del cultivo (medio líquido y biomasa) con sus respectivos controles de MM.

4.4.1.1. Antraceno.

La gráfica 4.4.1.1.1 muestra la distribución del antraceno en la biomasa y el medio líquido de las MV y MM.

En MM la remoción de antraceno se da principalmente por la adsorción del hidrocarburo en la biomasa, la cual mantiene un nivel promedio de 60% (2332 ng) sin diferencia significativa hasta las 48 horas; por el contrario la biomasa de MV muestra una acumulación inicial del 50% (1946 ng) a las 0.75 h seguida de una reducción de antraceno indicando que la célula elimina el HAP por efecto de su metabolismo. Las células vivas remueven continuamente el antraceno hasta que llegar a un 21% (817ng) a las 48 h.



Gráfica 4.4.1.1.1. Distribución del antraceno extraído de los componentes del cultivo de *S. acutus*.

La cantidad de antraceno recuperada del medio líquido de MV (en promedio 798 ng) no presenta una diferencia significativa ($\alpha= 0.05$) a lo largo de los tiempos analizados, por lo tanto la disminución observada en la gráfica de antraceno total (Gráfica 4.4.1.1) se debe a la reducción gradual del HAP en la biomasa.

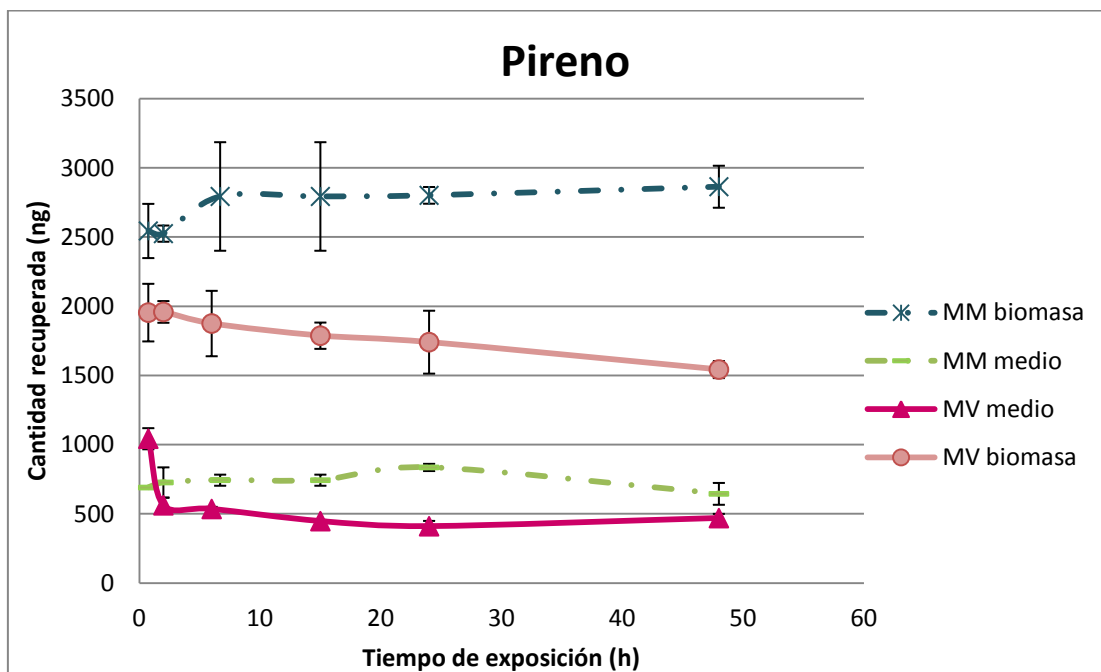
4.4.1.2. Pireno.

La Gráfica 4.4.2.1 marca una diferencia entre la cantidad de pireno en la biomasa y la cantidad en el medio líquido tanto en algas vivas como en muertas. Estos resultados sugieren que la adsorción es el proceso inicial en la remoción de pireno tanto en MM como MV posteriormente sólo las MV degradan el hidrocarburo (*Ke et al* 2010).

La biomasa de MM no presenta una diferencia significativa en la cantidad de pireno a lo largo de los tiempos de estudio de acuerdo al análisis de varianza al 95% de confianza. De igual manera la cantidad de pireno en medio líquido de MM permanece sin variación significativa de las 0.75 a 24 h. Las MM muestran un nivel promedio de pireno del 18% (731 ng) en medio líquido y del 67%(2721 ng) en la biomasa.

En las MV se puede apreciar una disminución significativa de pireno en el medio de cultivo de 0.75 a 2 h y posteriormente se mantiene un nivel sin variaciones, en contraste con la biomasa donde se observa una disminución posterior a las 2 horas de exposición. La disminución temprana del pireno en el medio líquido puede atribuirse al proceso de sorción que se presenta de forma rápida y pasiva en MV.

En los datos anteriores se puede observar que la mayor parte de la remoción de pireno del medio de cultivo se debe a la acumulación del hidrocarburo en la biomasa algal. *Lei et al* (2002) indican que la acumulación de pireno en la biomasa está determinada por el área superficial de la célula, la estructura, el volumen y la forma de la microalga.



Gráfica 4.4.1.2.1. Distribución del Pireno en el medio líquido y biomasa de MV y MM expuestas.

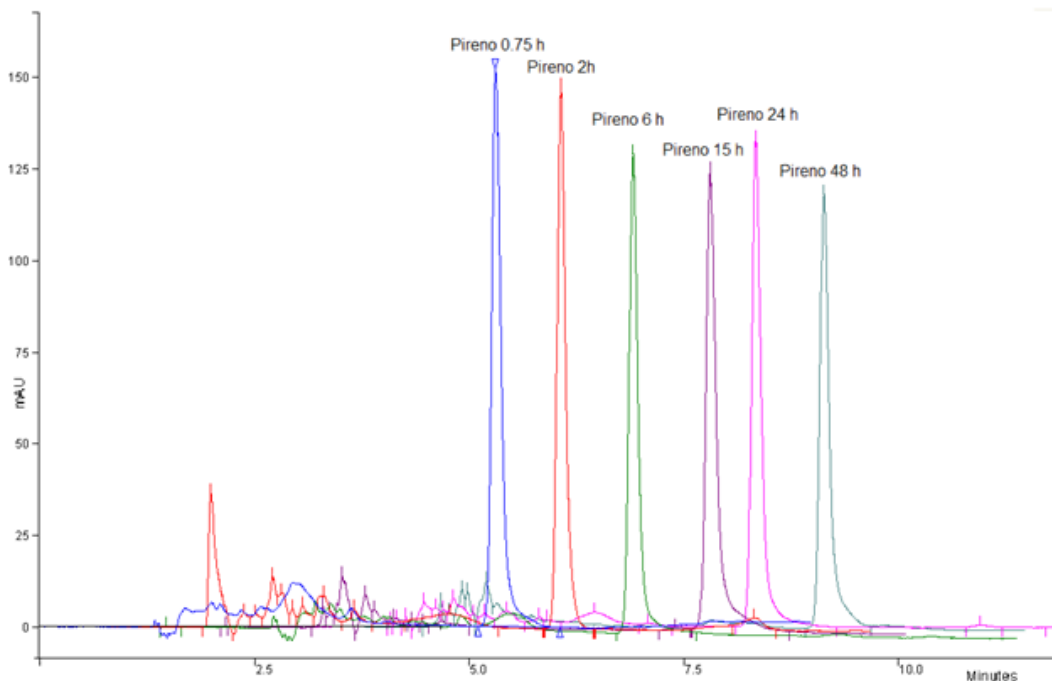


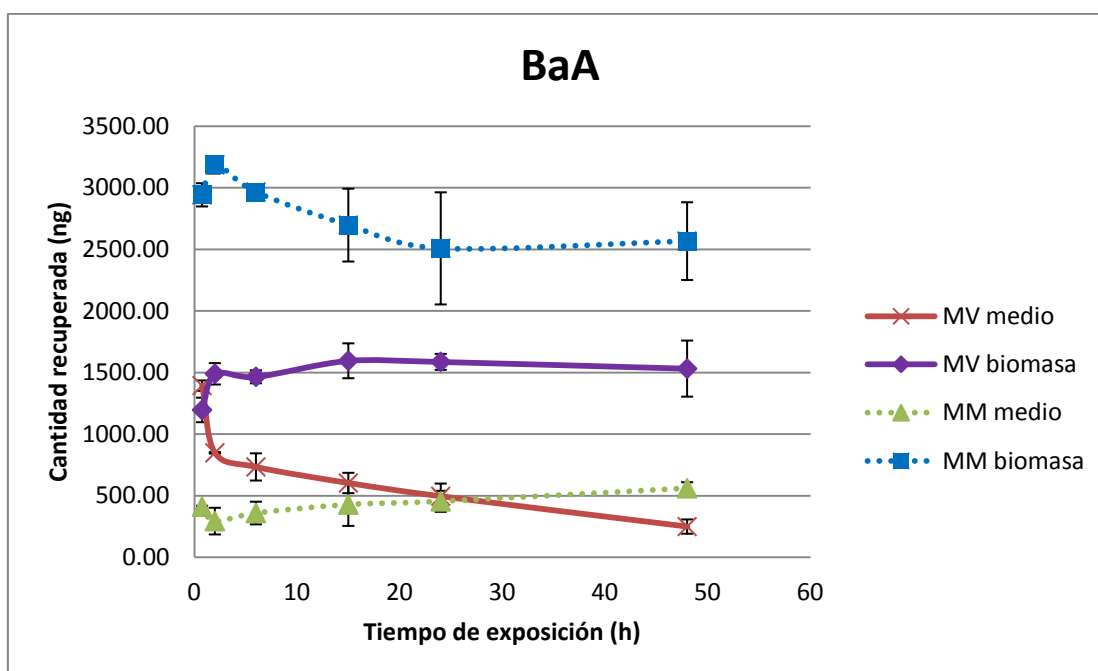
Fig. 4.4.1.2.1. Cromatogramas del pireno extraído de la biomasa de *S. acutus*. Condiciones: columna C18, MeoH 90% 1mL/min, detección UV-DAD $\lambda = 239$ nm.

El pireno en biomasa de MV muestra una ligera disminución de 24 a 48 h como se observa en los cromatogramas de la Figura 4.4.1.2.1 y en la Gráfica 4.4.1.2.1, esto último podría relacionarse con la reducción del antraceno en tiempos cortos insinuando que la reducción del pireno es menos favorecida por poseer un anillo

bencénico más. Aunque las MV remueven pireno y antraceno, la reducción del pireno se da en mayor tiempo.

4.4.1.3. BaA

En la gráfica 4.4.1.3.1 se puede observar que la cantidad de BaA en medio líquido de MM a lo largo de los tiempos estudiados no indica una diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$), con excepción de las 2 h, lo mismo ocurre para el BaA extraído de la biomasa de MM.



Gráfica 4.4.1.3.1. BaA extraído de la biomasa y medio líquido de cultivos algales previamente expuestos.

Al igual que los otros HAPs estudiados, la mayor cantidad del BaA se extrajo de la biomasa; en MV se observa un incremento de las 0.75 a las 2 h y un nivel sin diferencia significativa en los tiempos subsecuentes, por el contrario en el medio de cultivo la cantidad de BaA decrece significativamente en las primeras 2 horas de exposición, indicando que el HAP se adsorbe rápidamente a las células; en tiempos mayores, de 6 a 48 h, la reducción del BaA en el medio fue continua aunque en menor cantidad hasta los 249 ng (6%), como se aprecia en la Figura 4.4.1.3.1, sugiriendo que el BaA fue lentamente acumulado dentro de las células y metabolizado como se mencionó en el apartado 4.4.1.

Con los datos de la gráfica 4.4.1.3.1 se puede inferir que el proceso de adsorción se da en forma rápida y a continuación el BaA alcanza una concentración de saturación en la biomasa por lo que se aprecia una cantidad prácticamente constante, similar al proceso que ocurre con metales (*Zhou et al. 1998*).

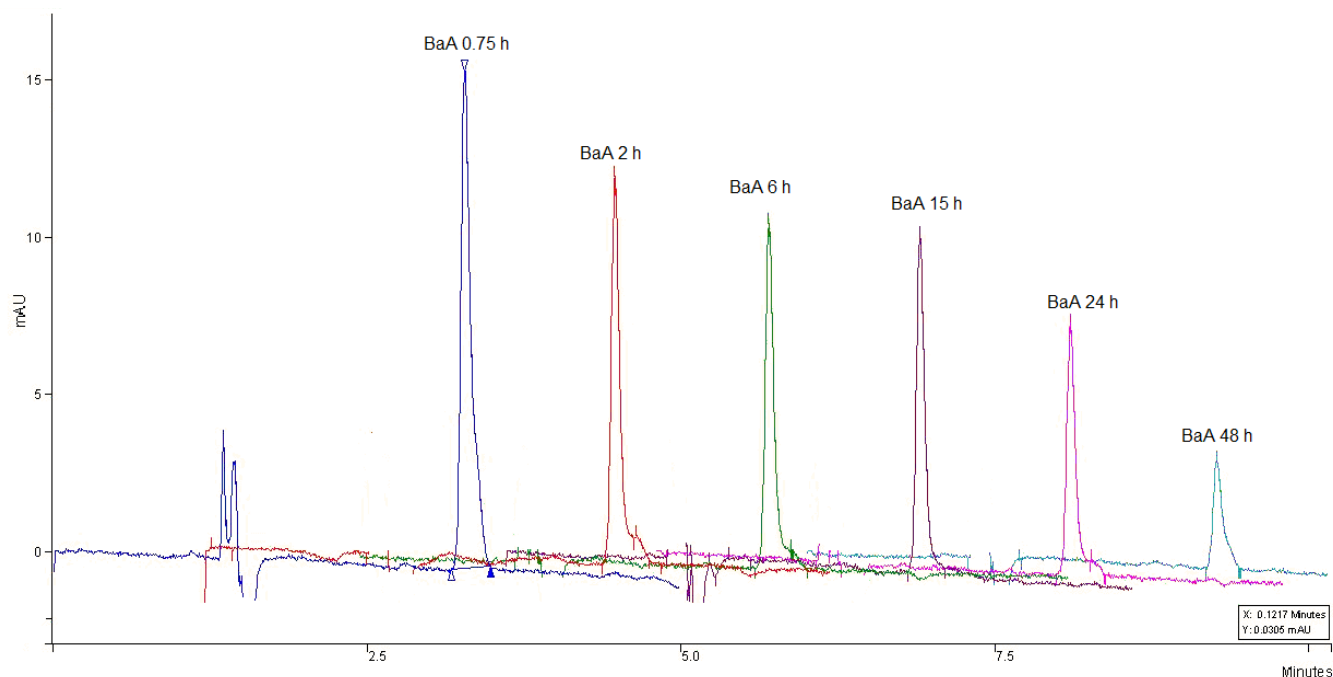


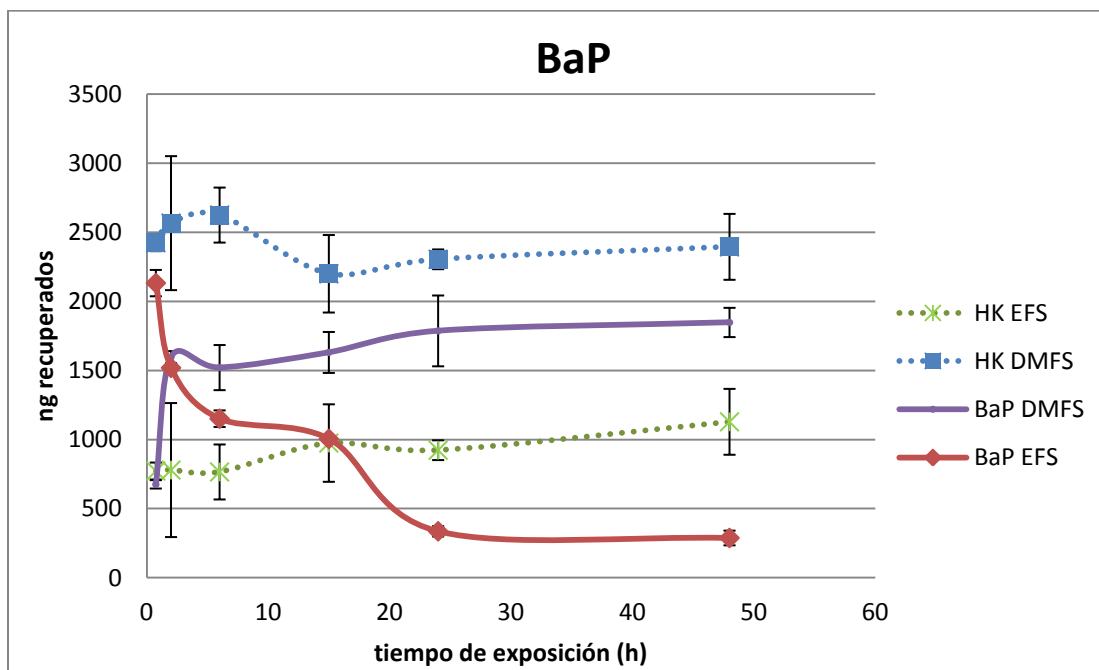
Figura 4.4.1.3.1. Cromatogramas del BaA extraído del medio de cultivo a diferentes tiempos de exposición. Condiciones: C18, fase móvil MeOH 1ml/min, detección UV-DAD $\lambda = 287$ nm.

La presencia en la biomasa del BaA y de los otros HAPs estudiados, se ve favorecida por procesos pasivos puesto que los HAPs presentan mayor afinidad por las células algales que por el medio líquido debido a la naturaleza lipofílica de la membrana celular (*Ergene et al. 2009; Olmos-Espejel et al. 2012*).

Adicional a la adsorción y absorción se presume también un proceso de biodegradación por la reducción del BaA en los componentes del cultivo de microalgas vivas en comparación con el control correspondiente de MM.

4.4.1.4. BaP

En la Gráfica 4.4.1.4.1 se observa que en el control MM la cantidad de BaP aumenta en el medio líquido al mismo tiempo que disminuye en biomasa, principalmente después de 15 h; pero al comparar la cantidad total, como se muestra en la Gráfica 4.4.1.1, se observa que el nivel de MM permanece entre 80-86 % sin diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$).



Gráfica 4.4.1.4.1. Distribución del BaP en el medio líquido y biomasa de MV y MM, expuestas al HAP.

En la Gráfica 4.4.1.4.1 se aprecia que en cultivos de MV la mayor cantidad de BaP se presenta en el medio a las 0.75 h, cantidad que disminuye gradualmente hasta mantener un nivel sin variaciones significativas desde las 24 h (337 ng). Por el contrario, en la biomasa la cantidad del HAP aumenta rápidamente de los 45 minutos (676 ng) a las 2 h (1520 ng) sin posteriores cambios estadísticamente significativos. A las 48 horas de exposición se alcanza el menor nivel de BaP agregado inicialmente, distribuido en la biomasa 47%(1848 ng), y en el medio de cultivo 7%(288 ng).

Los resultados sugieren que en tiempos menores a 2 horas el BaP se une a las células por fenómenos físicos y de forma pasiva, mientras que en tiempos mayores predominan procesos dependientes de energía como la absorción y degradación (*Zhou et al.* 1998).

En el medio de cultivo de MV el BaP y BaA presentan una reducción temprana relacionada con un aumento en la biomasa antes de las 2 horas, a diferencia del pireno que sólo muestra una ligera disminución del HAP en el medio de cultivo y el antraceno que no exhibe ninguna variación significativa de la cantidad en el medio en tiempos cortos. Asimismo en medio líquido la cantidad del HAP de cinco anillos muestra un descenso paulatino, alcanzando el menor nivel a las 48 h, en cambio los HAPs de menores anillos obtienen el mínimo nivel en tiempos menores, como es el caso del antraceno el medio de cultivo que presentó la mínima cantidad desde los 45 minutos.

Estas diferencias no implican que los 4 HAPs tengan un proceso diferente de remoción, es posible que se siga el mismo proceso de adsorción, absorción y degradación a diferentes velocidades y por ello las gráficas muestran tales diferencias a los mismos tiempos de muestreo.

La remoción de HAPs del medio de cultivo se da principalmente por adsorción tanto en MV como en MM y a continuación los compuestos acumulados en las células sólo pueden ser degradados por las MV. Se debe considerar que la unión HAPs-biomasa se da de forma inespecífica en las células por lo que no se puede suponer que todo el compuesto adsorbido se internalice y llegue a metabolizarse, asimismo los procesos de absorción y transformación cuentan con otras variables como la necesidad de energía, el número de enzimas, la especificidad de las mismas y su concentración de saturación.

4.4.2. Ensayos de exposición a pares de HAPs.

En el medio ambiente los HAPs se encuentran como parte de mezclas de varios compuestos y esto podría tener algún efecto sobre la selectividad en la remoción de los mismos. Por ello se decidió monitorear la remoción de los hidrocarburos polinucleares por pares de compuestos, relacionando antraceno y pireno, con sus derivados BaA y BaP.

Al igual que la exposición individual, los HAPs por pares se acumulan en mayor cantidad en la biomasa. En la Tabla 4.4.2.1. se resumen los porcentajes totales de HAPs en MV y MM después de 24 h de exposición a pares de compuestos.

HAP	Antraceno	Pireno	BaA		BaP	
Combinación	Antraceno-BaA	Pireno-BaP	BaA-antraceno	BaA-BaP	BaP-pireno	BaP-BaA
MV	30%	60%	43%	50%	48%	45%
MM	62%	79%	80%	84%	70%	88%

Tabla. 4.4.2.1. Porcentaje de HAPs remanentes en la biomasa+medio de cultivo de *S. acutus* después de 24 h de exposición.

Se observa que en todos los casos el porcentaje remanente en MV es menor que en MM, evidenciando que existe una degradación por parte de los microorganismos vivos.

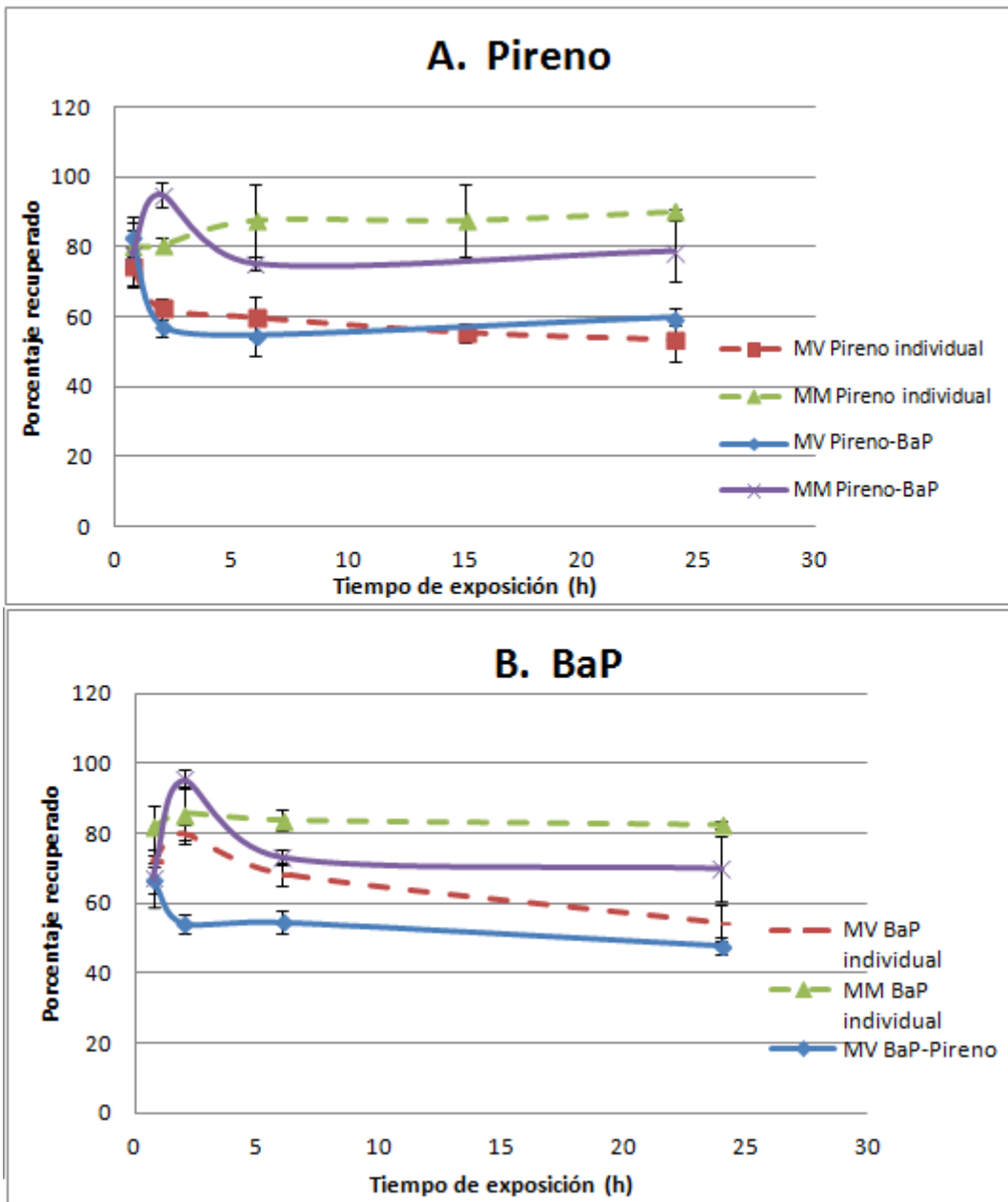
A continuación se exponen las gráficas con las cantidades totales, es decir la suma de la cantidad de HAPs recuperada del medio líquido más la cantidad extraída de la biomasa, porque en estas gráficas se aprecia mejor la diferencia entre la remoción de los ensayos combinados y de los ensayos individuales.

4.4.2.1. BaP-Pireno

Los datos de la remoción de pireno en MV exposición individual y en conjunto con el BaP no muestran diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza, en los tiempos analizados (Gráfica 4.4.2.1.1.A).

La remoción del BaP de forma individual y en combinación con pireno, Gráfica 4.4.2.1.1. B, manifiesta variaciones significativas en 0.75, 2 y 6 horas, obteniendo a las 24 h una cantidad sin diferencias significativa de acuerdo al análisis de varianza. La diferencia en la cantidad de BaP en tiempos cortos propone una remoción más rápida favorecida por la presencia de pireno, se presenta así un fenómeno de sinergismo en la remoción.

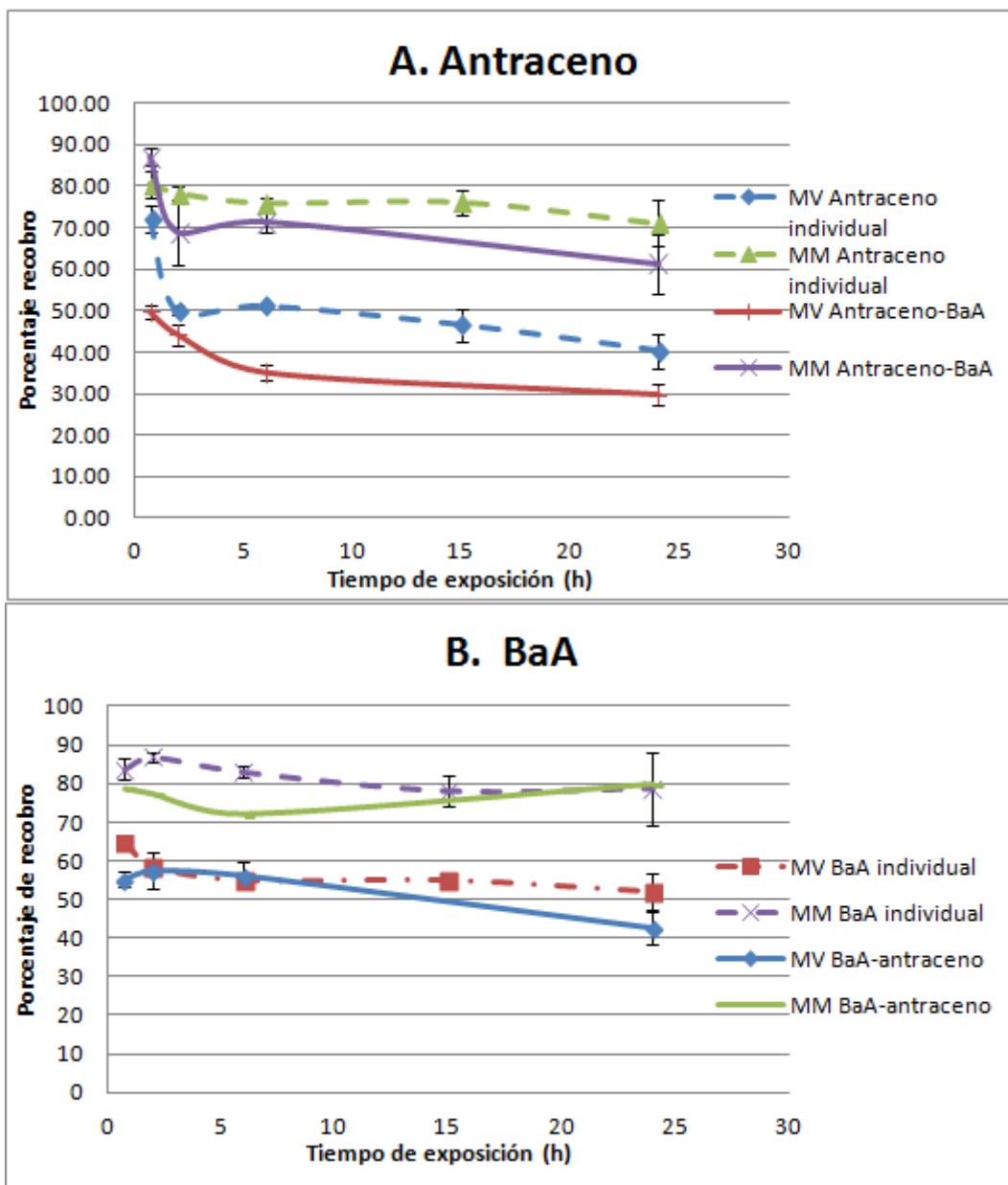
La degradación de HAPs puede ser análoga con la eliminación de metales pesados, donde de forma natural los microorganismos producen fitoquelatinas y éstas aumentan su producción en respuesta a concentraciones elevadas de varios metales (*Ahner et al.* 1995). Asimismo, estudios anteriores han demostrado un comportamiento semejante por parte de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, la cual presentó mejor degradación de pireno en presencia de otros dos HAPs, fenantreno y fluoranteno (*Sidney Man Ncgai, et al.* 2006).



Gráficas 4.4.2.1.1. Comparación de la remoción de BaP y pireno de forma individual y en mezcla.

4.4.2.2. BaA-Antraceno

El comportamiento de las MV mostrado en la Gráfica 4.4.2.1.1.A señala que en tiempos cortos el antraceno recuperado de la exposición por pares es menor que la cantidad recuperada de la exposición en forma individual, sin embargo a las 24 horas los tratamientos no presentan diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 4.4.2.2.1. Comparación de la remoción de antraceno y BaP en ensayos de exposición de forma individual y en mezcla.

Por su parte en la Gráfica 4.4.2.1.1.B el BaA sólo exhibe variación significativa a las 0.75 h de exposición, donde la cantidad recuperada de BaA es menor al exponerlo en mezcla (64 % BaA y 55% BaA-antraceno).

La cantidad de BaA extraída de los cultivos de MV expuestos a antraceno-BaA se mantiene sin diferencias significativas de 0.75 a 6 h con una disminución a las 24 horas.

A este tiempo los cultivos expuestos a la mezcla antraceno-BaA (43 %) y al BaA de forma individual (52 %) exponen una cantidad sin diferencias significativas.

Con los resultados de la exposición a pireno-BaP y antraceno-BaA se presume que la presencia de más de un HAP en el cultivo promueve la remoción rápida de los compuestos.

4.4.2.3. BaP-BaA

Una vez analizadas las mezclas de antraceno y pireno con sus derivados, se decidió examinar la exposición a BaA-BaP.

En la Gráfica 4.4.2.3.1.A se aprecia que el BaA extraído de cultivos vivos expuestos a BaA-BaP mantiene una cantidad sin cambios significativos a los largo de los tiempos estudiados.

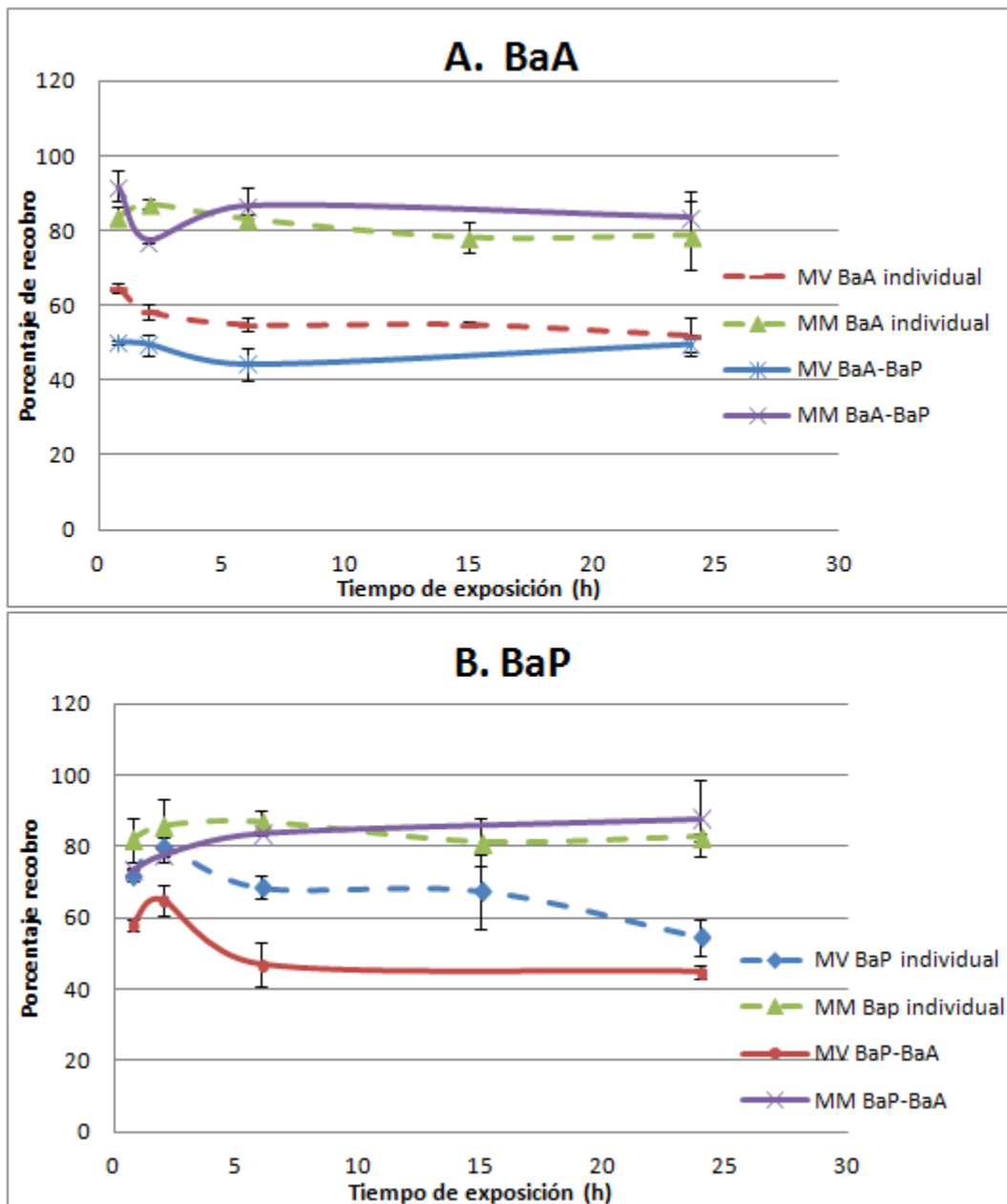
En MV a las 0.75, 2 y 6 h las cantidades extraídas de cultivos expuestos al BaA individual y en mezcla con BaP tienen diferencias significativas, siendo mayor la remoción del BaA en aplicado en mezcla. A las 24 horas ambos tratamientos exhiben cantidades similares: 52% BaA y 50% BaA-BaP.

En ensayos de exposición a pares de HAPs la menor cantidad de BaA se obtuvo antes de las 24 horas en contraste con el comportamiento observado en la exposición individual, esto sugiere que la remoción de BaA es beneficiada por la presencia de otros HAPs.

La Gráfica 4.4.2.3.1.B ilustra que el BaP en combinación con BaA en MV disminuye significativamente antes de las 6 horas recuperando a este tiempo 47% de BaP, este porcentaje es similar a la cantidad recuperada (54%) después de 24 h de exposición individual.

A las 2 horas de exposición en los cultivos tratados con BaP-BaA se obtuvo el 65 % de BaP y en los cultivos expuestos a BaP-pireno se extrajo un porcentaje menor (54%), sin embargo a las 24 horas de exposición se obtuvieron cantidades similares en las exposiciones por pares: 45 % BaP-BaA y 48 % BaP-pireno.

En la exposición individual la menor cantidad de BaA y BaP se extrajo a tiempos de exposición mayores a 24 horas, en contraste los ensayos de exposición a pares de compuestos exhibieron cantidades semejantes en menos de 24 h, tal comportamiento es evidencia de una remoción favorecida por la presencia de más de un HAP.



Gráfica 4.4.2.3.1. Exposición de MV y MM a la mezcla BaA-BaP.

CONCLUSIONES

La metodología analítica optimizada en este trabajo demostró ser eficiente, selectiva y reproducible para la extracción de antraceno, pireno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno de los componentes del cultivo de *S. acutus* basada en la extracción en fase sólida y la dispersión de matriz en fase sólida.

El método empleó la cromatografía de líquidos de alta resolución para detectar a los 4 HAPs estudiados mostrando límites de cuantificación, detección y linealidad del sistema aceptables.

La aplicación de estas metodologías permitió el seguimiento detallado del comportamiento de la microalga dulceacuícola al ser expuesta a los hidrocarburos de informa individual y por pares.

En este trabajo se pudo comprobar que *Scenedesmus acutus* fue capaz de remover antraceno, pireno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno del medio de cultivo, fundamentalmente por adsorción de los compuestos en las células vivas y muertas. Aunque las microalgas vivas fueron significativamente más eficientes en la remoción de HAPs por la capacidad de metabolizar los compuestos, dicha capacidad ha sido comprobada al encontrar metabolitos de estos HAPs en las muestras de *S. acutus* (trabajo aun no publicado, que actualmente se desarrolla en el laboratorio de análisis de trazas).

Principalmente la remoción de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno se ve favorecida al agregarse en combinación con otro HAP. En los ensayos de exposición de forma individual la recuperación total del BaA a las 48 h fue de 45% en cambio al exponerlo en combinación con el antraceno (BaA-antraceno) se obtuvo una recuperación del 43% en sólo 24 horas. Igualmente la recuperación de BaP después de 48 h fue del 55%, misma cantidad que se recuperó después de 6 h de exposición a la combinación BaP-pireno.

REFERENCIAS

A

ACS Committee on Environmental Improvement (1980). Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry. *Analytical Chemistry* 52, 2242-2249.

Agudo A. (2010). *Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Acercamiento a su problemática como riesgo laboral*. Secretaría de Salud Laboral y Medio Ambiente MCA-UGT Federación de industria. España. Consulta 10/12/12. En línea: <http://www.ugt.es/saludlaboral/Hidrocarburos.pdf>.

Ahmed F.E. (2003). Analysis of polychlorinated biphenyls in food products. *Trends in Analytical Chemistry*. 22(3), 170-185.

Ahner Beth A., Kong S., Morel F. M. (1995). Phytochelatin production in marine algae. An interspecies comparison. *Limnology and Oceanography* 40 (4) 649-657.

Alga base. *Scenedesmus acutus f. alternans Hortobagyi*. Consulta: 20 Agosto 2012. En línea: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=51861.

Arfsten D.P., Schaeffer D.J., Mulveny D.C. (1996). The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety* 33, 1–24.

ASTDR. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (1996). Consulta: 20 junio de 2012. En línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html.

B

Barker S. (2007). Review. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 151–162.

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, 33-40.

Brum D., Cassella R., Pereira Netto A. (2008). Multivariate optimization of a liquid–liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*, 74, 1392-1399.

Busetti F., Heitz A., Cuomo M., Badoer S., Traverso P. (2006). Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography A*, 1102, 104-115.

C

Cameán A., Moreno I. M., Ruiz M. J., Picó Y. (2004). Determination of microcystins in natural blooms and cyanobacterial strain cultures by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380, 537-544.

Camel V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B* 58, 1177–1233.

Cerniglia C.E. (1993) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Option in Biotechnology* 4, 331-338.

Chaichalem, S., Pokethitiyook, P., Yuan, P., Meetam, M., Sritong, K., Pugkaew, W. Kungvansaichol, K., Kruatrachue, M., Damrongphol, P. (2012). Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand, in various enriched media. *Applied Energy*. 89 (1), 296–302.

D

Díaz-Báez M. C., Bustos M., Espinosa A. (2004) *Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos*. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. PP. 24-26.

E

Ergene A., Ada K., Tan S., Katircioğlu H. (2009) Removal of Remazol Brilliant Blue R dye from aqueous solutions by adsorption onto immobilized *Scenedesmus quadricauda*: Equilibrium and kinetic modeling studies. *Desalination* 249, 1308–1314.

F

Fidalgo-Used N., Blanco-González E., Sanz-Medel A. (2007). Review: Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chimica Acta* 590, 1–16.

G

García Cruz N., Vaca Rodríguez J.G. (2009). *Crecimiento parabólico del alga como alimento*. Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Consulta: 12 Agosto 2013. En línea: <http://oceanologia.ens.uabc.mx/~matematicas/algebralineal/III%20Dets/aplcadets.htm>.

García de Llasera M. P., Olmos-Espejel J.J. (2011). Methodology for Quantitative Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Protozoa Cultures. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55 (2), 113-119.

Ghasemi Y., Rasoul-Amini S., Fotooh-Abadi E. (2011). The Biotransformation, Biodegradation and Bioremediation of Organic Compounds by Microalgae. *Journal of Phycology* 47, 969–980.

Gómez L. M., Ramírez Z. (2004). Microalgas como biomonitores de contaminación. *Revista Cubana de química*. 16 (2) 34-48.

Guiraud F., Guiraud 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 (17) 4126-4136.

H

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

Harris D.C. (2010). *Análisis Químico Cuantitativo*. 3° ed. Barcelona. Editorial Reverté. PP 556-571.

Harvey R.G. (Ed.) (1991), *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity*, New York: Cambridge University Press. PP. 11-46, 50-56.

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

I

Instituto Nacional de Ecología. Tecnologías de remediación. INE. Consulta: 2 Septiembre 2013. En línea: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/tecnolog.html>.

J

Jánská M., Tomaniová M., Hajšlová J., Kocourek V. (2004). Appraisal of "classic" and "novel" extraction procedure efficiencies for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives from biotic matrices. *Analytica Chimica Acta*, 520, 93–103.

K

Ke L., Luo L., Wang P., Luan T., Fung-Yee Tam N. (2010). Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology* 101, 6950–6961.

L

Lawerys R. R. (1994). *Toxicología Industrial e Intoxicaciones Profesionales. Cánceres de Origen Profesional*. Barcelona, Madrid: Masson S.A. pp. 553-76.

Lei A. P., Wong Y. S., Fung-Yee Tam N. (2002). Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Science and Technology* 46, 195–201.

Liguori L., Heggstad K., Hove H.T., Julshamn K. (2006). An automated extraction approach for isolation of 24 polyaromatic hydrocarbons (PAHs) from various marine matrixes. *Analytica Chimica Acta*, 181 (8), 573–574.

Lindquist B. y Warshawsky D. (1985). Identification of the 11,12-dihidro-11,12-dihidroxy benzo(a)pyrene as a major metabolite produced by green alga, *Selenastrum capricornutum* (1985). *Biochemical and biophysical research communications* 1 (130) 71-75.

López S. J., Barrientos R.C. (2005). *La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán*. Mérida: UADY. PP. 13-22.

M

Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquímica clínica Latinoamérica* 1 (39) 27-36.

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 (6) 985-990.

O

Olmos-Espejel J.J., García de Llasera M.P., Velasco-Cruz M. (2012). Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* (1262) 138–147.

P

Pena T., Pensado L., Casais C., Mejuto C., Phan-Tan-Luu R., Cela R. (2006). Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1121 (2) 163-169.

Pena T., Casais C., Mejuto 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 (2), 155-165.

Pena T., Casais C., Mejuto 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 (36), 6356-6364.

Pensado L., Casais M.C., Mejuto M.C., Cela R. (2005). Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A* 1077 (2), 103–109.

Pérez E., Comas A., San Pedro A., Veitía, E. (2003). Métodos biológicos para el monitoreo de aguas superficiales. Su aplicación en el Río San Juan. *Tecnología Química*, 23 (3). 35-44.

Pointet K. y Milliet A. (2000). PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camargue by GC/MS. *Chemosphere*, 40 (3), 293-299.

R

Ratola N., Lacorte S., Alves A., Barceló D. (2006). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles by gas chromatography-mass spectrometry: comparison of different extraction and clean-up procedures. *Journal of Chromatography A*, 1114, 198-204.

Rodríguez-San Martín P., Moreda-Piñeiro A., Bermejo-Barrera A. (2005). Ultrasound-assisted solvent extraction of total polycyclic aromatic hydrocarbons from mussels followed by spectrofluorimetric determination. *Talanta*, 66 (3), 683–690.

S

Sabatini S. E., Juárez A. B., Eppis M. R., Bianchi L., Luquet C. M., Ríos de Molina M.C. (2009). Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 4 (72), 1200–1206.

Scheidegger C., Behra R., Sigg L. (2011). Phytochelatin formation kinetics and toxic effects in the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* upon short- and long-term exposure to lead (II). *Aquatic Toxicology* 10 (2) 423-429.

Sidney Man, C., Luan, T., Wong, M., Fung-Yee Tam N. (2006). Removal and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (7) 1772–1779.

Sistema de Información de Biodiversidad Argentina. *Scenedesmus acutus*. Consulta: 06 Agosto 2012. En línea: http://www.sib.gov.ar/ficha/PLANTAE*Scenedesmus*acutus#_TIERRA DEL FUEGO.

Skoog D, Holler F., Nieman T., (2001). *Principios de análisis instrumental*. 5 ed. Madrid: Mc Graw hill. PP. 734-749.

Skupinska K., Misiewicz I., Kasprzycka-Guttman T. (2004) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Physicochemical Properties, Environmental Appearance and Impact on Living Organisms. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 3 (61) 423-436.

Stanier R., Ingraham J., Wheelis M., Painter P. (1992). *Microbiología*. Editorial Reverté. PP 199-200.

Stockes P.M., Hutchison K.K. (1973). Heavy-metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario. *Canadian Journal of Botany*, 51(11); 2155-2168.

U

USEPA. National Primary Drinking Water Regulations. United States Environmental Protection Agency. Consulta: 11 Junio 2013. En línea: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm>.

USEPA (2003). Método 8000C, Determinative Chromatographic Separations. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C.

UTEX. The Culture Collection of Algae. *Scenedesmus acutus f. alternans*. The University of Texas at Austin. Consulta: 16 Agosto 2012. En línea: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=2613>.

V

Velasco M. (2011) Metodología Analítica Cromatográfica para la determinación de metabolitos de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Tesis, Facultad de Química, UNAM.

Vighi M. Calamari, D. (1993) Prediction of the environmental fate of chemicals. *Annali del Istituto Superiore di Sanita* 2 (29), 209-223.

Vives I. y Grimalt J.O. (2002). Method for integrated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in fish liver. *Journal of Chromatography B*, 768, 247-254.

W

Warshawsky D., Cody T., Radike M., Reilman R., Schumann B., LaDow K., Schneider J. (1995) Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-Biological Interactions* 97 (13) 1 – 148.

Z

Zhang S., Niu H., Liu J., Shi Y., Zhang X., Cai Y.(2012). Biocompatible phosphatidylcholine bilayer coated on magnetic nanoparticles and their application in the extraction of several polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water and milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1238, 38-45.

Zhou J.L., Huang P.L., Lin R.G. (1998) Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae microalgae. *Environmental Pollution* 101, 67-75.

ANEXO I

ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los espectros mostrados en este anexo fueron obtenidos con el detector UV-DAD Polychrom 9065, con un barrido de 190-360 nm.

Benzo(a)pireno

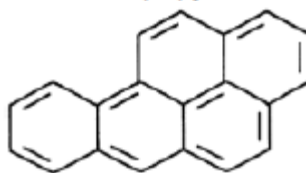


Fig. 1. Espectro de absorción UV del Benzo[a]pireno. λ elegida= 263 nm. Disolución inyectada 1 mg/L.

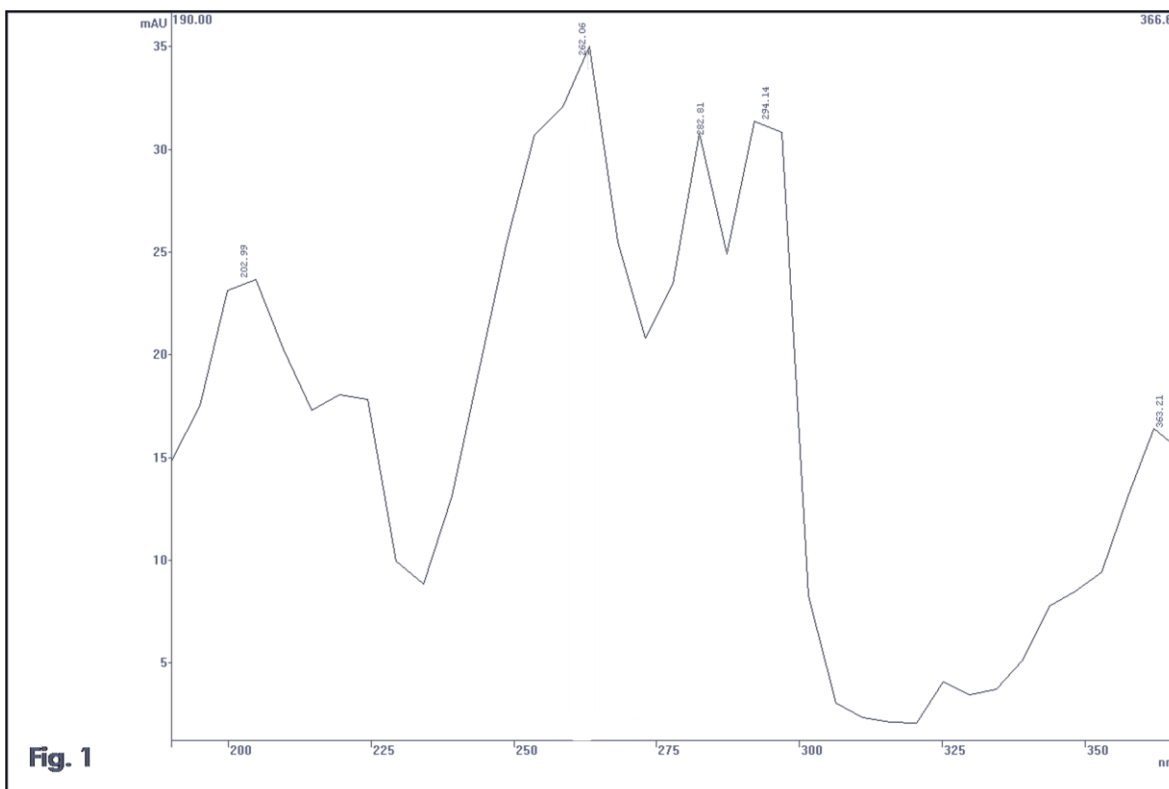


Fig. 1

Benzo(a)antraceno

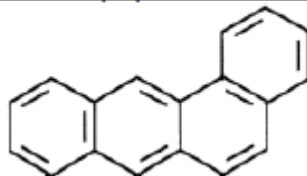


Fig. 2. Espectro de absorción UV del Benzo[a]antraceno. λ elegida= 287 nm.
Disolución inyectada 1 mg/L.

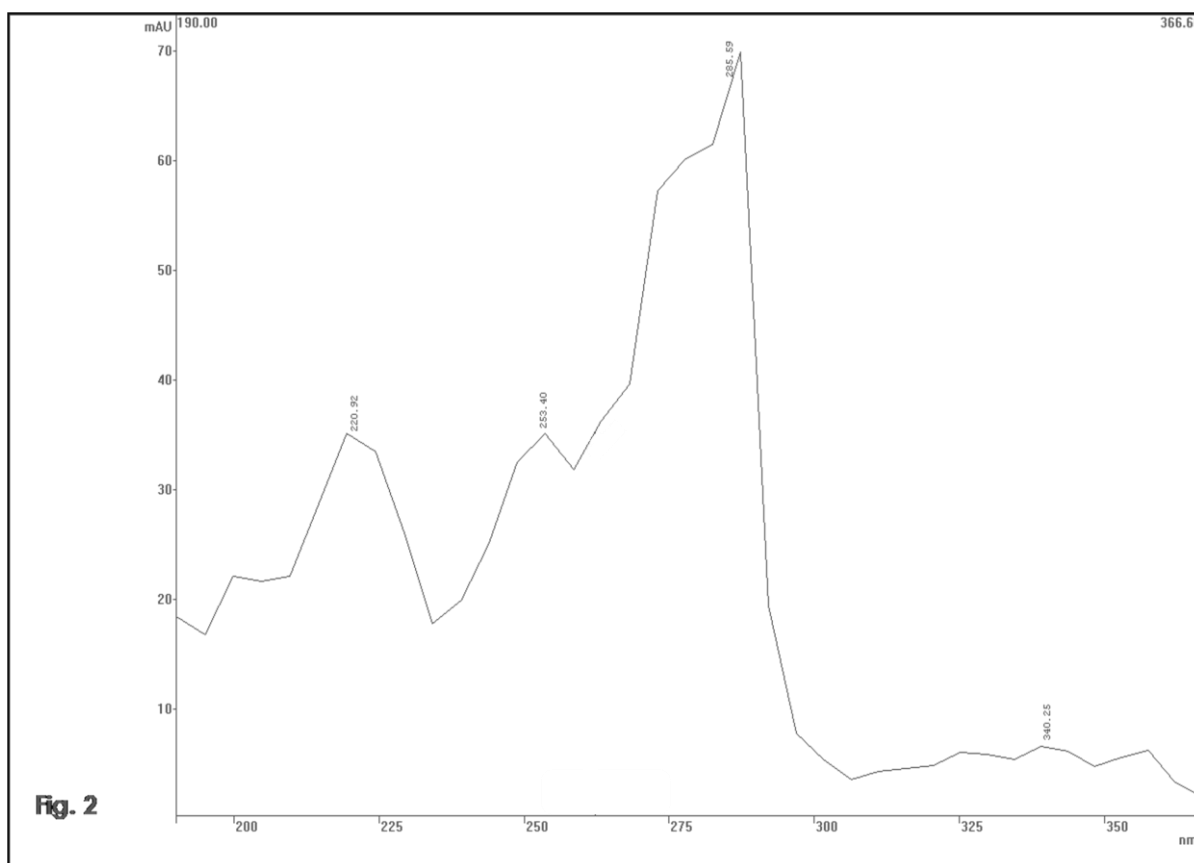


Fig. 2

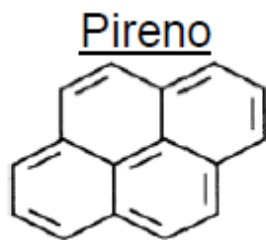
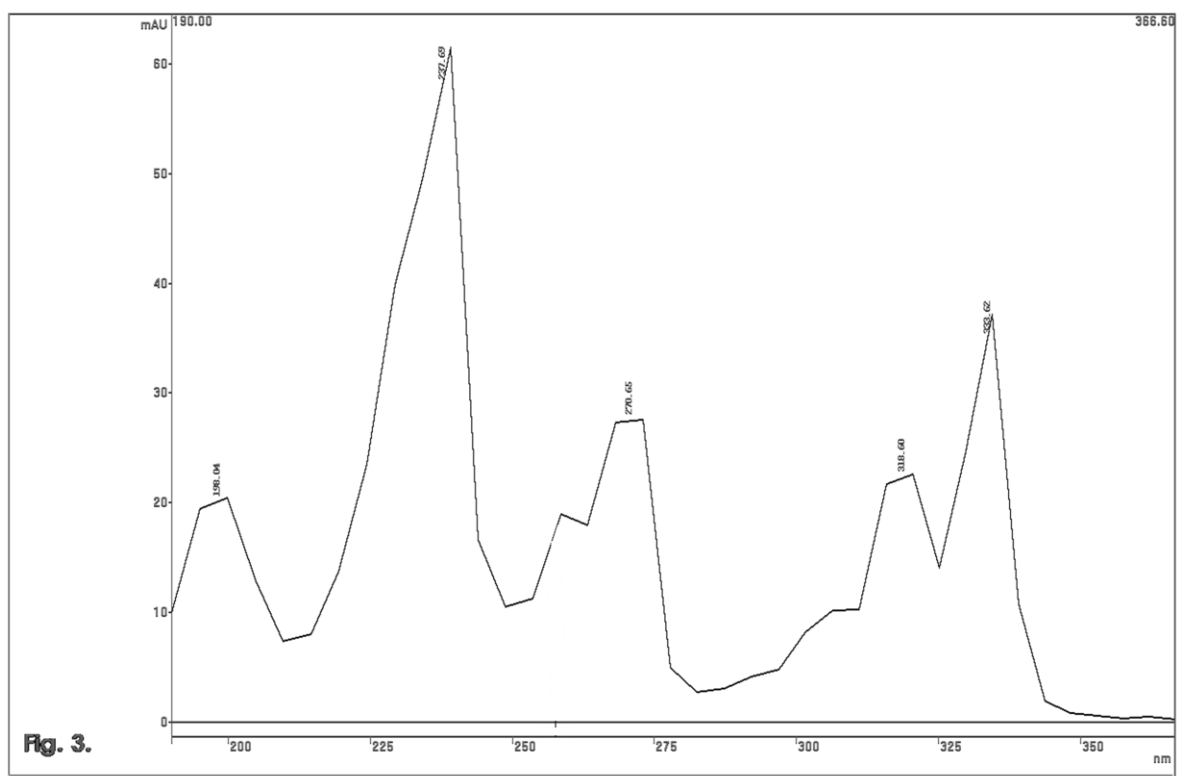


Fig. 3. Espectro de absorción UV del Pireno. λ elegida = 239 nm. Disolución inyectada 1 mg/L.



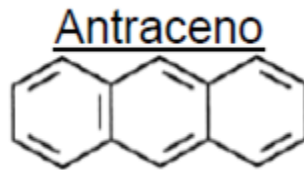


Fig. 4. Espectro de absorción UV del Antraceno. λ elegida= 249 nm. Disolución inyectada 1 mg/L

