



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS  
POLICÍCLICOS POR MICROALGAS VERDES BAJO DIFERENTES  
TEMPERATURAS**

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

**PRESENTA**

**EVELYN GEOVANA BELTRÁN CALVA**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



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:** JUAN MANUEL RODRIGUEZ  
**VOCAL:** MARTHA PATRICIA GARCIA CAMACHO  
**SECRETARIO:** GLORIA GARCIA RAMIREZ  
**1er. SUPLENTE:** SILVIA CITLALLI GAMA GONZALEZ  
**2° SUPLENTE:** JOSE DE JESUS OLMOS ESPEJEL

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 208, Edificio F, Facultad de Química, Circuito interior Ciudad Universitaria.

**ASESORA DEL TEMA:**

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

**SUSTENTANTE (S):**

**Evelyn Geovana Beltrán Calva** \_\_\_\_\_

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	3
<b>CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES</b> .....	4
1.1 Propiedades de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	4
1.1.1 Estabilidad de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	6
1.2 Fuentes.....	6
1.3 Formación.....	8
1.4 Liberación y rutas en el ambiente.....	9
1.5 Exposición y efectos tóxicos.....	10
1.6 Remediación de la contaminación ambiental por HAPs.....	12
1.6.1 Biorremediación.....	12
1.7 Efecto de la radiación UV sobre los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	15
1.8 Efecto de la temperatura sobre los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	16
1.9 Características de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	16
1.10 Métodos de Extracción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en matrices complejas.....	18
1.10.1 Extracción en Fase Sólida (EFS).....	20
1.10.2 Dispersión en Matriz de Fase Sólida (DMFS).....	22
1.11 Cromatografía de Líquidos.....	23
1.11.1 Definiciones y parámetros cromatográficos.....	24
<b>CAPÍTULO 2. MÉTODOS Y MATERIALES</b> .....	28
2.1 Materiales.....	28
2.1.1 Disolventes, reactivos y estándares analíticos.....	28
2.1.2 Sistema de extracción.....	28
2.1.3 Medios de cultivo y mantenimiento de las microalgas.....	28
2.1.4 Sistema cromatográfico.....	29
2.1.5 Otros equipos y materiales.....	29
2.1.6 Preparación de soluciones estándar.....	30
2.2 Metodología experimental.....	31
2.2.1 Análisis cromatográfico.....	32
2.2.1.1 Selección de la longitud de onda para la detección de los HAPs.....	32
2.2.1.2 Selección de la fase móvil para la separación de los HAPs.....	32

2.2.2 Validación del sistema cromatográfico.....	32
2.2.2.1 Linealidad del sistema.....	32
2.2.2.2 Repetibilidad y reproducibilidad del sistema.....	33
2.2.2.3 Límites de detección y cuantificación instrumentales.....	33
2.2.3 Métodos de extracción.....	34
2.2.3.1 Acondicionamiento del adsorbente.....	34
2.2.3.2 Extracción en Fase Sólida (EFS).....	34
2.2.3.3 Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).....	35
2.2.4 Evaluación del efecto de la luz natural sobre la remoción de Benzo(a)pireno por <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	36
2.2.5 Efecto de la temperatura sobre la remoción de HAPs por <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	37
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
3.1 Análisis cromatográfico.....	38
3.1.1 Selección de la longitud de onda para la detección de los HAPs.....	38
3.1.2 Selección de la fase móvil para la separación de los HAPs.....	38
3.1.3 Linealidad del sistema.....	39
3.1.4 Repetibilidad y reproducibilidad del sistema.....	40
3.1.5 Límites de detección y cuantificación instrumentales.....	41
3.2 Métodos de extracción.....	41
3.2.1 Extracción en Fase Sólida (EFS).....	41
3.2.2 Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).....	42
3.3 Evaluación del efecto de la luz natural sobre la remoción de Benzo(a)pireno por <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	42
3.4 Efecto de la temperatura sobre la remoción de HAPs por <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	44
3.4.1 Benzo(a)pireno.....	44
3.4.2 Antraceno.....	45
3.4.3 Pireno.....	47
3.4.4 Benzo(a)antraceno.....	49
<b>CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>60</b>

## Introducción

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) constituyen una clase de diversos compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos en varias configuraciones estructurales, los cuales aparecen de forma natural como productos de la combustión incompleta de la materia orgánica, también provenientes de la actividad humana como el tráfico por carretera, el fuego al carbón y el calentamiento durante diversos procesos industriales. Por lo anterior, estos compuestos están ampliamente diseminados en el ambiente y se consideran contaminantes ambientales frecuentes y difíciles de erradicar. Algunos miembros de este amplio grupo de contaminantes como el Benzo(a)pireno, son también fuertes y potentes carcinógenos. La contaminación por HAPs es una preocupación actual, y ha sido demostrado que la biorremediación es el medio más eficaz por el cual se puede restaurar los ecosistemas a sus condiciones originales. Se ha demostrado el poder de remoción de contaminantes que tienen diversos microorganismos, como son algas, bacterias y hongos, a través de oxidación, degradación y completa mineralización de estos contaminantes. Sin embargo, los HAPs de alto peso molecular, como por ejemplo el Pireno, Benzo(a)pireno y Benzo(b)fluoranteno, son generalmente recalcitrantes y resistentes al ataque microbiano debido a su baja solubilidad en agua y biodisponibilidad. Por lo cual, estos compuestos son altamente persistentes en el ambiente y tienden a ser bioacumulados en los organismos (Fernández, 2004).

Warshawsky (1995) estudió el efecto de diferentes fuentes de luz en el proceso fotoquímico incluido en la biotransformación del BaP y encontró que la fuente de luz tiene una fuerte influencia en el patrón metabólico del BaP. La exposición a la luz blanca favorece la producción de quinonas, estas pueden dar como resultado intermediarios reactivos de vida corta como oxígeno reactivo, peróxido de hidrógeno, hidroxilo o radicales semiquinonas formados durante los ciclos de óxido-reducción que involucran las quinonas, las hidroquinonas de BaP y el oxígeno molecular; influyendo de este modo en la viabilidad de las células.

La temperatura, tiene una gran influencia en los procesos de biodegradación. Mohn & Stewart (2000), han demostrado que aunque la biodegradación de los HAPs es más eficiente en el rango de 20-30°C; este proceso se puede dar en ambientes más fríos (menor

a los 5 °C). A bajas temperaturas la velocidad de difusión y la solubilidad y por lo tanto la biodisponibilidad de los HAPs disminuye; simultáneamente, el metabolismo microbiano se retarda (Simarro, 2012).

Desde una perspectiva aplicada, el calor parece ser un medio eficaz para acelerar la biorremediación de suelos contaminados por HAPs.

En el grupo de investigación se ha estudiado la capacidad de biodegradación de HAPs pesados y ligeros que presenta la microalga *Selenastrum capricornutum* y, en este trabajo se pretende conocer el efecto que tienen factores como la luz y la temperatura sobre la bioremovición de Benzo(a)pireno, Benzo(a)antraceno, Pireno y Antraceno. Se evaluó el efecto de la remoción bajo luz blanca natural y a temperaturas diferentes (20 °C, 25 °C y 30 °C), sobre dos de los hidrocarburos más pequeños y dos de los más grandes del conjunto de los 16 HAPs considerados prioritarios según la Agencia Protectora del Medio Ambiente de los Estados Unidos (US EPA).

Se evaluó la tasa de remoción de estos compuestos tóxicos monitoreando la desaparición de cada uno en el medio de crecimiento y en las células mismas a diferentes tiempos de exposición al contaminante y bajo la irradiación de la luz natural blanca o a diferentes temperaturas. La desaparición de los compuestos se siguió mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y detección espectrofotométrica UV. Para el aislamiento de los compuestos de interés se usaron dos diferentes técnicas cromatográficas de extracción con adsorbentes: Extracción de Fase Sólida (EFS), para el aislamiento de los compuestos del medio líquido donde crecen las algas y la Dispersión en Fase Sólida (DMFS), para el aislamiento de los compuestos de la biomasa. La EFS y la DMFS se seleccionaron por su sencillez y por el corto tiempo que requieren para la preparación de muestras así como el uso de pequeños volúmenes de disolvente lo que no disminuye la sensibilidad y capacidad de retención. En los bioensayos se decidió utilizar la luz natural blanca para verificar si se presentaba un efecto fototóxico como lo indicaban los datos presentados por Warshawsky et al, (1995). El intervalo de temperaturas se seleccionó por considerarse dentro del rango de crecimiento de los organismos utilizados (Reynolds, 1975).

## Objetivos

### General

- Evaluar la remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), por el alga *Selenastrum capricornutum* a diferentes condiciones de temperatura y bajo irradiación con luz blanca natural con ayuda de metodología analítica basada en las técnicas EFS, DMFS y CLAR.

### Particulares

- Establecer las condiciones cromatográficas para el análisis óptico de Antraceno, Pireno, Benzo(a)antraceno y Benzo(a)pireno en muestras provenientes de los cultivos de *Selenastrum capricornutum*.
- Utilizar la luz natural, para evaluar si existe fototoxicidad generada por la radiación UV presente en la luz blanca y ver el efecto en la remoción de Benzo(a)pireno por el alga *Selenastrum capricornutum* a diferentes tiempos de exposición.
- Comparar la capacidad de *Selenastrum capricornutum* para remover del medio de cultivo Pireno, Antraceno, Benzo(a)pireno y Benzo(a)antraceno a tres diferentes temperaturas: 20 °C, 25 °C y 30 °C, en un tiempo de exposición de 0.75 horas.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Propiedades de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) constituyen una clase de diversos compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos de benceno en varias configuraciones estructurales. Se les considera compuestos persistentes, pues presentan la capacidad de mantenerse en el ambiente por largos períodos de tiempo. Estos compuestos son semivolátiles, por lo cual viajan largas distancias antes de ser depositados. Debido a su alta persistencia y a su movilidad, estos compuestos son ubicuos, es decir estos contaminantes ambientales están ampliamente distribuidos y tienen efectos biológicos perjudiciales como toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. Debido a su ubicuidad, recalcitración, potencial de bioacumulación y actividad carcinogénica, los HAPs se han convertido en una significativa preocupación (Haritash & Kaushik, 2009).

Los HAPs son compuestos no polares o muy débilmente polares, que tienen afinidad por los medios orgánicos hidrofóbicos y presentan una baja solubilidad en agua. Por ser muy liposolubles tienden a bioconcentrarse, es decir que a medida que los organismos que se encuentran en la base de la cadena alimentaria los consumen, estas sustancias se absorben y se almacenan en el tejido graso a través de los diferentes niveles tróficos de las cadenas alimenticias. Este carácter lipofílico de los HAPs se incrementa con la complejidad de los compuestos y la masa molecular, es decir, cuanto más átomos y más anillos forman la molécula del hidrocarburo, mayor es su afinidad por las grasas. Son inestables fotoquímicamente (se degradan por la luz) cuando se encuentran en la atmósfera, pero son persistentes en los medios terrestres y acuáticos.

El naftaleno es el más sencillo de este grupo y estos compuestos aromáticos de interés llegan a presentar en sus estructuras hasta 5 y 6 anillos, los HAPs individuales difieren sustancialmente en sus propiedades físicas y químicas. Los HAPs de alto peso molecular (HMW-PAH, por sus siglas en inglés) como el Pireno, el Benzo(a)pireno y Benzo(b)fluoranteno, son generalmente recalcitrantes y resistentes al ataque microbiano, debido a su baja solubilidad y su baja biodisponibilidad (Simarro, et al, 2012).

Nombre (abreviaturas, en inglés)	Fórmula	P.M. g/mol	P.F. °C	P.E. °C	V <sup>M</sup> cm <sup>3</sup> /mol	F a 25 °C	P <sup>s</sup>	S g/mol	LogK <sub>ow</sub>	H
Naftaleno (NA)		128.19	80.5	218	148	0.2830	10.4	31	3.37	43.01
Acenaftileno (Ay)		152.20	95.0	270	—	—	0.89	—	—	—
Acenafteno (AE)		154.21	96.2	277	173	0.1980	0.30	3.8	4.00	12.17
Fluoreno (F)		166.20	116	295	188	0.1260	0.09	1.9	4.18	7.87
Fenantreno (PA)		178.20	101	339	199	0.1770	0.02	1.1	4.57	3.24
Antraceno (A)		178.20	216	340	197	0.0129	0.001	0.045	4.54	3.96
Pireno (P)		202.26	156	360	214	0.0506	0.0006	0.132	5.18	0.92
Fluoranteno (Fl)		202.26	111	375	217	0.1410	1.2 x 10 <sup>-3</sup>	0.26	5.22	1.03
Criseno (CH)		228.30	255	448	179	0.0053	5.3 x 10 <sup>-7</sup>	—	1.64	5.86
Benzo(a)antraceno (BaA)		228.30	160	435	248	0.0462	2.8 x 10 <sup>-5</sup>	0.0482	5.91	0.58
Benzo(b)fluoranteno (BbF)		252.32	168	481	268	0.0385	—	0.0015	5.80	—
Benzo(k)fluoranteno (BkF)		252.32	217	481	268	0.0126	5.2 x 10 <sup>-3</sup>	0.0008	6.00	0.016
Benzo(a)pireno (BaP)		252.32	175	495	263	0.0328	7 x 10 <sup>-7</sup>	0.0038	6.04	0.046
Benzo(ghi)perileno (BP)		276.34	277	525	277	0.0032	—	2.6 x 10 <sup>-4</sup>	6.50	0.075
Dibenz(a,h)antraceno (DA)		278.36	270	524	300	0.0040*	3.7 x 10 <sup>-10</sup>	0.0006	6.75	—
Indeno(1,2,3-cd)pireno (IP)		276.00	164	—	—	—	1.3 x 10 <sup>-8</sup>	5.3 x 10 <sup>-4</sup>	6.40	—

\* a 267 °C

P.M. = Peso molecular

V<sup>M</sup> = Volumen molar

S = Solubilidad

P.F. = Punto de fusión

F = Proporción de fugacidad

Log K<sub>ow</sub> = Coeficiente de partición octanol/agua

P.E. = Punto de ebullición

P<sup>s</sup> = Presión de vapor

H = Constante de la ley de Henry

Tabla 1.1.1. Propiedades de los principales 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (Peña et al, 2003).

Existen 16 HAPs considerados por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (EPA), Organización Mundial de la Salud (OMS) y Comunidad Económica Europea (CEE), como contaminantes prioritarios debido a sus efectos carcinogénicos. En la tabla 1.1.1 podemos ver sus características físicas y químicas las cuales permiten predecir su comportamiento en el ambiente.

Estos compuestos se encuentran generalmente formando parte de mezclas complejas, no como compuestos simples. Existen más de 100 clases diferentes de HAPs. En el medio ambiente se encuentran como compuestos volátiles (en la fase gaseosa) o unidos a partículas orgánicas e inorgánicas. Como sustancias químicas puras, estos existen generalmente como sólidos incoloros, blancos o verdes amarillosos pálidos y tienen un olor leve y agradable (Fernández, 2004).

#### 1.1.1 Estabilidad de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Los sistemas conjugados de orbitales  $\pi$  de los HAPs son los responsables de su estabilidad química. Son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es pequeña. Dependiendo de su carácter aromático los HAPs absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico. Son solubles en muchos disolventes orgánicos, pero prácticamente insolubles en agua, tanto menos cuanto mayor sea su peso molecular (Mastandrea, 2005).

Químicamente, los HAPs reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce la saturación, conservándose el sistema de anillos. La mayoría de los HAPs sufren fotooxidación, siendo este un mecanismo de eliminación en la atmósfera. La reacción de fotooxidación más frecuente es la formación de endo-peróxidos, que pueden convertirse a quinonas. Los HAPs reaccionan rápidamente con óxidos de nitrógeno o  $\text{HNO}_3$ . Por ejemplo, el antraceno puede oxidarse a antraquinona por acción del  $\text{HNO}_3$  o dar un derivado nitrogenado mediante una reacción de sustitución con  $\text{NO}_2$ .

#### 1.2 Fuentes.

El origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el medio ambiente es muy diverso, y las clasificaciones de estas fuentes son variadas, aquí presentamos una de las más comunes [NEFF, 1979]:

- **Origen pirogénico**, procedente de la combustión incompleta de la materia orgánica, reciente o fósil, bien por causas naturales (incendios de bosques, erupciones volcánicas, etc.) o antropogénicas (utilización de combustibles fósiles, incineración de residuos, emisiones de vehículos, procesos industriales de gasificación y licuefacción del carbón, craqueo del petróleo, etc.). Predominan los compuestos no alquilados sobre sus alquil homólogos.

- **Origen petrogénico**, producido por vertidos accidentales o intencionados de derivados del petróleo. Se caracterizan por ser mezclas complejas formadas por compuestos con cadenas alquílicas de hasta 5 ó 6 átomos de carbono, que predominan sobre sus homólogos no sustituidos.

- **Origen diagenético** de la materia orgánica sedimentaria, la cual puede sufrir una serie de procesos geoquímicos naturales, como son la descarboxilación, aromatización, desfuncionalización, etc., para convertirse en HAPs de origen natural. Entre éstos se encuentran ciertos derivados del criseno y del piceno, así como el reteno y el perileno, aunque estos dos últimos también pueden tener un origen pirolítico.

Algunos HAPs pueden formarse también como productos de la pirólisis de los carbohidratos, aminoácidos, y ácidos grasos. Así pues, muchos alimentos, especialmente carnes elaboradas a la parrilla o la barbacoa, en que la cocción se produce a elevadas temperaturas y en contacto directo con la llama, se forman hidrocarburos en la superficie del alimento. Lo mismo ocurre en los procesos de tostado a elevada temperatura de productos derivados de cereales como el pan y la piza. Finalmente también se adsorben en los procesos de ahumado de pescado o carnes.

Las emisiones de HAPs como resultado de las actividades humanas se pueden dividir en fuentes de combustión estacionaria y fuentes de combustión móvil. Las principales fuentes fijas que los emiten son instalaciones de generación de calor y energía (termo y carboeléctricas), calefacción con carbón y madera, quemadores de gas, incineración de residuos orgánicos municipales e industriales, quemas intencionales e incendios forestales y diversos procesos industriales (coque, cracking del petróleo, fundidoras, producción de asfalto, etc.). Las fuentes móviles son aquellas en donde se queman combustibles fósiles utilizados en medios de transporte terrestre, marítimo y aéreo.

La cantidad de hidrocarburo que se emite en cada proceso depende en gran medida de los materiales y de la tecnología de combustión. Un proceso dado con condiciones de combustión predeterminadas producirá una cantidad específica e invariable de compuesto.

### 1.3 Formación.

Estos pueden formarse naturalmente por reacciones a baja temperatura, alta presión o materia orgánica natural, y de este modo constituye una fracción significativa de hidrocarburos de petróleo. La combustión incompleta de productos procedentes de la madera y el petróleo, son responsables de una gran proporción de la formación de estos compuestos (WHO, 1998).

Los HAPs pueden sintetizarse de los hidrocarburos saturados bajo condiciones deficientes de oxígeno. Los hidrocarburos con masas moleculares muy bajas, incluyendo metano, pueden actuar como precursores para los compuestos aromáticos policíclicos. Los hidrocarburos de baja masa molar forman HAPs por pirosíntesis, esto sucede a temperaturas que exceden los 500 °C, a las cuales se rompen los enlaces carbono-hidrógeno y carbono-carbono para formar radicales libres. Estos radicales sufren deshidrogenación y se combinan químicamente para formar estructuras aromáticas de anillos que son resistentes a la degradación térmica. El proceso básico iniciado por el etano para la formación de este tipo de anillos por pirosíntesis, es el que da lugar a la formación de estructuras estables de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. La tendencia de los hidrocarburos a formar HAPs por pirosíntesis varía en el siguiente orden: aromáticos > cicloolefinas > olefinas > parafinas. La estructura de anillos existente en los compuestos cíclicos conduce a la formación de HAPs. Los compuestos insaturados son especialmente susceptibles a las reacciones de adición involucradas en la formación de los mismos. A partir de alquenos de elevado peso molecular, presentes en los combustibles y en el material vegetal, pueden formarse compuestos aromáticos policíclicos por el proceso de pirólisis, que consiste en el “ craqueo” de compuestos orgánicos para formar radicales y moléculas más pequeñas y menos estables. Los perfiles de HAPs resultantes de la quema de diversos materiales orgánicos dependen de la temperatura de combustión, duración del proceso, las condiciones de la flama y del tipo de material orgánico. A temperaturas por debajo de los 700 °C los productos de combustión van teniendo además de los HAPs padre cada vez mas HAPs alquilados, muchas veces derivados metilados. Mientras más baja la temperatura de combustión mayor el porcentaje

de HAPs alquilados que se forman, por debajo de 200 °C se han reportado las concentraciones más altas de alquilados (Fernández, 2004).

#### 1.4 Liberación y rutas en el ambiente.

La liberación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos al ambiente es, sobre todo, por vía atmosférica debido a todos los procesos de combustión de materiales orgánicos que los emiten en fase de vapor y forma particulada (hollín), aunque otros mecanismos de descarga mas localizados pueden ser también el depósito de residuos sólidos municipales e industriales, aguas residuales y lodos de plantas de tratamiento que pueden tener cantidades considerables de HAPs, los derrames y descargas directas de petróleo y sus derivados en cuyo caso el receptor primario de los HAPs es el suelo o el sistema acuático. La transferencia a otros compartimentos del ambiente y la degradación es más alta para los compuestos de bajo peso molecular que para los de alto peso molecular. Los HAPs de bajo peso molecular que son más volátiles dominan en el aire y se encontrarán principalmente en la fase de vapor. Los HAPs son susceptibles a la descomposición (foto y térmica) en el aire, lo que restringe sus tiempos de residencia en la atmósfera a un par de días. Los que no son degradados son transferidos a aguas superficiales o suelos por depositación húmeda o seca en donde también serán más susceptibles a la degradación los más ligeros, generalmente, mientras más anillos bencénicos presente la molécula, menor la solubilidad, movilidad y degradación; y mayor la adsorción, acumulación y persistencia en el ambiente.

En suelos la mayoría de los HAPs son fuertemente adsorbidos a la materia orgánica, reduciendo su disponibilidad tanto para ser biodegradados, como para ser absorbidos por las plantas y lixiviados al acuífero.

En el caso de derrames de petróleo o sus derivados en suelos, el producto derramado inmediatamente empieza a desaparecer por evaporación, dispersión y degradación microbiana. La fracción que desaparece en cada uno de los procesos de depende de las características de los compuestos derramados, tales como el coeficiente de distribución  $K_{ow}$ , la presión de vapor y la solubilidad en agua. También depende del ambiente, incluyendo la temperatura, la precipitación y las características del suelo, sobre todo, el potencial redox, el contenido de materia orgánica y la actividad microbiana. La mayoría de los contaminantes orgánicos no polares son adsorbidos a la materia orgánica del suelo, este proceso controla

en gran medida la distribución de los HAPs en las fases sólida y líquida, y por lo tanto determina su transferencia a otros compartimientos del ambiente.

### 1.5 Exposición y efectos tóxicos.

Los HAPs son altamente liposolubles y por tanto rápidamente absorbidos en el tracto intestinal de los mamíferos y otros organismos. Están fácilmente distribuidos en una amplia variedad de tejidos con una marcada tendencia para localizarse en tejidos adiposos. Los HAPs por sí mismos son químicos relativamente no reactivos con respecto a macromoléculas biológicas en condiciones fisiológicas. Sin embargo, requieren activación metabólica para manifestar genotoxicidad, incluyendo mutagenicidad y carcinogenicidad. Una vez que han entrado al cuerpo, el sistema de defensa celular trabaja para remover estas sustancias extrañas mediante el metabolismo. El metabolismo de los HAPs en los mamíferos se da principalmente en el hígado y es catalizado por el sistema enzimático del citocromo P450, aunque otras enzimas metabólicas también están incluidas. Iniciando el metabolismo, los HAPs se convierten en moléculas más polares y solubles en agua para ser excretados fuera del organismo, hasta completar su remoción o el proceso de detoxificación biológica. Sin embargo, el metabolismo de algunos HAPs también genera intermediarios reactivos que son capaces de formar enlaces covalentes (aductos) con ácidos nucleicos, resultando de esta manera genotóxicos.

El ejemplo más citado de hidrocarburos es el Benzo(a)pireno, el cual puede metabolizarse a una forma carcinogénica en el cuerpo (especialmente cuando proviene de la combustión de cigarrillos, tanto para el fumador activo como para los fumadores pasivos). El BaP es uno de los más importantes, este cancerígeno es bioactivado en el hígado y forma un epóxido que se liga al ADN como se indica en la figura 1.5.1.

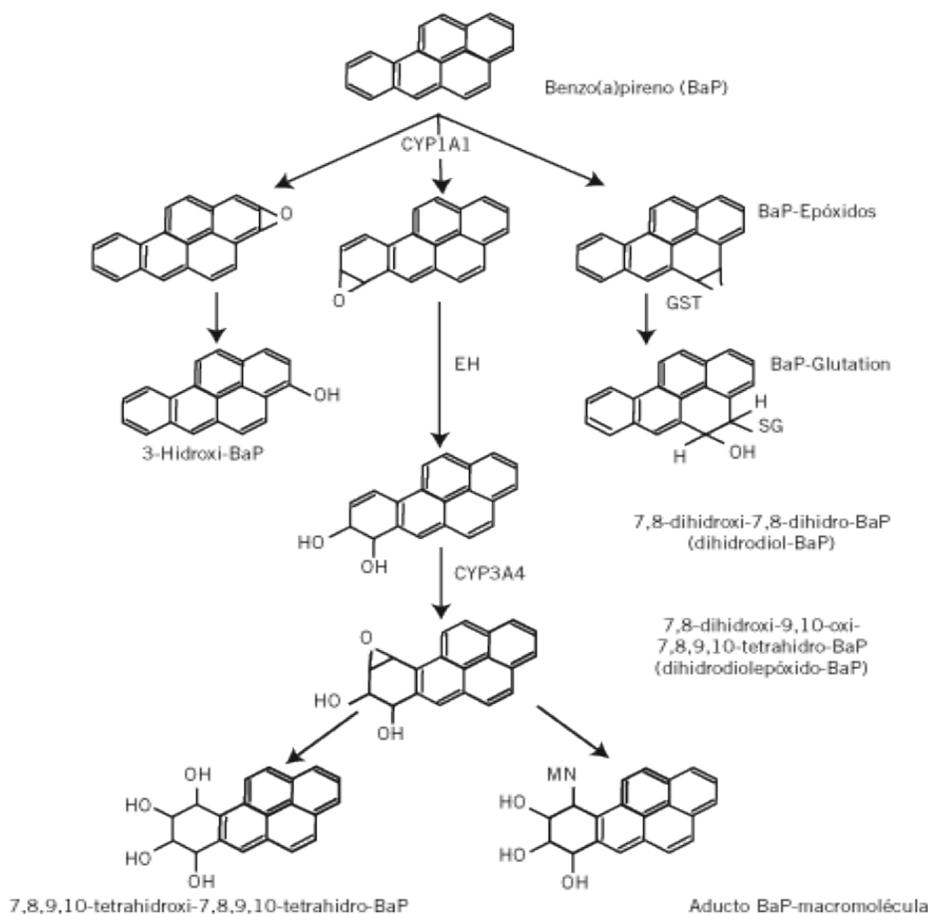


Figura 1.5.1. Representación esquemática del metabolismo del BaP en humanos (Mastandrea, 2005).

El metabolismo del Benzo(a)pireno es uno de los ejemplos más estudiados de los procesos de bi oactivación, en l os c uales l os pr oductos de m etabolismo s on m as t óxicos q ue l a molécula original. E ste e efecto l ateral d e l a bi otransformación ocurre c uando s e pr oducen especies químicas muy reactivas (compuestos electrofílicos) con gran afinidad por moléculas nucleofílicas como ácidos nucleicos, proteínas o lípidos.

Muchas de estas sustancias también tienen efecto negativo sobre el sistema inmunológico, característica que parece estar asociada a la capacidad carcinogénica.

Un es quema pr opuesto par a l a c arcinogenicidad por e xposición am biental c onsidera l as siguientes etapas: e xposición, activación m etabólica, formación d e a ductos e ntre H APs y ADN, mutaciones en genes críticos y sucesión de mutaciones en otros genes (Mastandrea, 2005).

## 1.6 Remediación de la contaminación ambiental por HAPs.

La remediación tiene por objetivo alterar la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (EPA, 2001). El uso de cualquier tecnología de remediación en particular depende, además de los factores específicos del sitio y de las propiedades fisicoquímicas del contaminante, de su disponibilidad, de la fiabilidad demostrada, de su estado de desarrollo y de su costo.

Una de las clasificaciones de estas tecnologías es por el tipo de tratamiento, la cual se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos (Instituto Nacional de Ecología):

- Tratamientos biológicos (biorremediación). Utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar (destrucción), transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.
- Tratamientos fisicoquímicos. Este tipo de tratamientos, utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.
- Tratamientos térmicos. Utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo.

### 1.6.1 Biorremediación.

Los peligros asociados con los hidrocarburos pueden ser superados por el uso de métodos convencionales que implican la eliminación, alteración o aislamiento del contaminante. Tales técnicas implican la excavación de suelo contaminado y su incineración o confinamiento. Estas tecnologías son caras, y en muchos casos transfieren el contaminante de una fase a otra. Por otro lado, la biorremediación es la herramienta para transformar los compuestos a formas menos peligrosas o no peligrosas, con menor necesidad de productos químicos, energía y tiempo. Aunque los HAPs pueden sufrir adsorción, volatilización, fotólisis y degradación química, la degradación microbiana es el principal proceso de degradación a nivel natural. Los microorganismos son conocidos por su actividad catabólica en la biorremediación, sin embargo, los cambios en las comunidades microbianas son todavía impredecibles. Los microorganismos pueden obtener como productos finales  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ , en

anaerobiosis y  $C O_2$  en aerobiosis, además de  $H_2O$  y  $N H_3$ . La mineralización de un compuesto orgánico es la degradación total del mismo, es decir cuando se generan los productos finales descritos anteriormente. Por el contrario, un compuesto es recalcitrante cuando no se transforma en absoluto. Por otro lado, se da cometabolismo cuando el microorganismo modifica la estructura del compuesto pero no obtiene energía del proceso ni incorpora ninguna parte de la molécula original. Hay algunos microorganismos que pueden obtener energía a partir del compuesto, aunque ninguno de ellos pueda degradarlo independientemente, este fenómeno se denomina metabolización por consorcio (sintrofia). A veces la presencia de un compuesto fácilmente asimilable aumenta la degradación del compuesto xenobiótico. Otras veces, la presencia de un segundo sustrato impide la utilización del compuesto. Que ocurra una cosa u otra depende del microorganismo, del compuesto a degradar y de las condiciones ambientales, este fenómeno se denomina utilización de un segundo sustrato o co-sustrato.

Este tipo de tratamiento puede ser muy efectivo en la eliminación de compuestos orgánicos tóxicos y biodegradables en suelos y aguas residuales. Una de las medidas biocorrectoras más empleadas es la utilización de microorganismos para la descontaminación de suelos. Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de las sustancias orgánicas por parte de dichos microorganismos, los cuales las utilizan como fuente de carbono necesaria para su crecimiento y de energía para sus funciones metabólicas. El proceso de biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico en los siguientes tipos:

- a. Fitorremediación. Consiste en el uso de plantas verdes para contener, remover o neutralizar compuestos orgánicos, metales pesados o radionucleidos.
- b. Biorremediación animal. Existen animales que actúan como agentes descontaminantes, y a que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener los metales pesados.
- c. Biorremediación microbiana. Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar compuestos orgánicos y metales pesados. La utilización de microorganismos que forman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, también se han

empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

La biorremediación de los contaminantes y su tasa depende de las condiciones ambientales, número y tipo de microorganismos, así como la naturaleza y estructura química del compuesto que se esté degradando. Los HAPs son fuertemente fotosensibles y termolábiles: en la presencia de luz y oxígeno son rápidamente degradados (lo que restringe sus tiempos de residencia en la atmósfera a un par de días), una vez que alcanzan el medio acuático, se vuelven menos susceptibles a la radiación solar. En el agua, ellos pueden ser incorporados dentro de sedimentos, donde pueden permanecer intactos por largos períodos de tiempo. El ciclo de los HAPs en el ambiente acuático es relativamente simple: Los HAPs de alto peso molecular son rápidamente absorbidos en la superficie de partículas orgánicas e inorgánicas, y se sedimentan. Ellos pueden ser removidos dentro de la columna de agua por actividad biológica, bioturbación y procesos mecánicos, como corrientes (Marsili, 2001).

El grado y velocidad de biodegradación depende de muchos factores, incluyendo pH, temperatura, oxígeno, población microbiana, grado de acilimatación, accesibilidad de los nutrientes, la estructura química del compuesto, propiedades de transporte celular y distribución química en el medio de crecimiento.

Warshawsky et al. (1995), encontraron que *Selenastrum capricornutum*, un alga verde de agua dulce tiene la capacidad de metabolizar B a P a c is-dihidrodiol usando el sistema enzimático di oxigenasa como se ha encontrado en procariontes heterótrofos. Se pudo observar que *Selenastrum capricornutum* produce predominantemente 11,12-dihidrodiol bajo luz amarilla y 9,10-dihidrodiol, bajo luz blanca.

El estudio de degradación de fluoranteno, pireno y una mezcla de fluoranteno y pireno, por *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* y *Selenastrum capricornutum* ha demostrado que la eliminación es específica de la especie de alga y tóxico-dependiente. La eliminación de los HAPs en el séptimo día de tratamiento fue de 78 % y 48 %, respectivamente por *S. capricornutum* y *C. vulgaris*. La eficiencia de eliminación del fluoranteno y pireno en la mezcla fue mayor que el respectivo a los compuestos solos, lo que sugiere que la presencia de un HAP estimula la eliminación de otros hidrocarburos aromáticos policíclicos (Haritash & Kaushik, 2009).

Las enzimas implicadas en la degradación de los HAPs son la oxigenasa, enzimas deshidrogenasas y lignolíticas. Las enzimas lignolíticas de los hongos son la lignina peroxidasa, lacasa y peroxidasa manganeso dependiente. Estas son extracelulares y catalizan la formación de radicales por oxidación para desestabilizar enlaces en una molécula. Estas enzimas son activas a diferentes temperaturas. La mayoría de las enzimas tienen una actividad óptima a temperaturas moderadas (20 a 40 °C); y disminuye a temperaturas muy altas y muy bajas. Algunas de las enzimas reportan ser activas incluso a temperaturas extremas. Únicamente la lacasa presenta actividad a 5 °C. La temperatura óptima es de 45 °C para la lacasa, pero su actividad disminuye un 30 % a 5 °C; mientras un 31 % de actividad se tiene a los 75 °C. Por otro lado, la actividad de la peroxidasa manganeso dependiente es alta incluso a 75 °C (Haritash & Kaushik, 2009).

#### 1.7 Efecto de la radiación UV sobre los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

La toxicidad de los HAPs para la vida acuática es superior cuando la biota es expuesta simultáneamente a la luz ultravioleta (fototoxicidad). Debido a su estructura química, los HAPs absorben la luz en el visible (400-700 nm) y en la región del ultravioleta (280-400 nm) y son especialmente sensibles a los efectos fotoquímicos de la radiación UV (Arfsten, et al., 1996), formándose especies reactivas que pueden dañar a los constituyentes celulares y terminar en un proceso de toxicidad aguda o genotoxicidad. La fototoxicidad inducida de los HAPs ha sido observada en diferentes especies, incluyendo peces, zooplancton, anfibios, células humanas y plantas; sin embargo, la respuesta fototóxica de los animales de laboratorio es dictada por la dosis de radiación UV, la concentración de HAPs y probablemente otros factores como la edad y la susceptibilidad genética (Arfsten, et al., 1996). Este fenómeno es afectado por factores físicos, químicos y biológicos; lo que hace que la relevancia ecológica de la fototoxicidad de los HAPs sea incierta.

Los factores, ya sea la exposición de los HAPs o la exposición a los rayos UV, influye en el impacto de la fototoxicidad inducida sobre los organismos acuáticos. En la naturaleza, varios factores ambientales pueden interactuar para influenciar tanto a la dosis de HAPs como la intensidad de la radiación UV. Materiales húmicos disueltos también pueden atenuar la toxicidad aguda fotoinducida en la biota acuática por la reducción de la bioacumulación de antraceno y al reducir la exposición a los rayos UV (Hatch & Burton Jr, 1999). Además de los factores ambientales, rasgos específicos de la especie que protegen a los organismos de la

luz solar, tales como la pigmentación o el comportamiento de enterrarse, también pueden proteger a los organismos de los efectos de la toxicidad fotoinducida (Hatch & Burton Jr, 1999).

#### 1.8 Efecto de la temperatura sobre los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Los HAPs son contaminantes recalcitrantes y que cuentan con el potencial para persistir por largos periodos de tiempo a temperatura ambiente, con una vida media superior a los 100 días según lo reportado por Coover & Sims (1987).

Sin embargo, la temperatura afecta directamente la tasa de degradación de los HAPs por microorganismos en los ecosistemas naturales. Varios investigadores han reportado fluctuaciones en la actividad heterotrófica y en la tasa de degradación de los HAPs con la mayor actividad en verano y la menor actividad en el invierno (Varanasi, 1989). Ha sido demostrado (Mohn & Stewart, 2000) que, aunque la biodegradación de los HAPs es más eficiente en el rango de 20 °C- 30 °C; esta puede continuar aún en ambientes más fríos (menor a 5 °C). A bajas temperaturas la velocidad de difusión y la solubilidad y por lo tanto la biodisponibilidad de los HAPs disminuye. Simultáneamente, el metabolismo microbiano se retarda, incrementando el periodo "lag" o de adaptación, esta es la fase del crecimiento en la cual la división celular se ve retardada, porque las células buscan adaptarse al nuevo ambiente.

#### 1.9 Características de *Selenastrum capricornutum*.

*Selenastrum capricornutum* es un alga verde, unicelular con forma de media luna, cuya fotografía se muestra en la figura 1.9.1 (Printz, 1913), no móviles y no polimórficas (es decir mantiene la misma forma durante todo el ciclo celular) y es representativa de los ambientes de agua dulce tanto eutróficos como oligotróficos; tiene un ancho promedio de 2-4  $\mu\text{m}$ , una longitud promedio de 10-15  $\mu\text{m}$ , y un volumen promedio de 40-60  $\mu\text{m}^3$ . En estudios de curvas de crecimiento, las células han mostrado ser más pequeñas de 15-20  $\mu\text{m}^3$  durante el crecimiento exponencial y más grande de 60-70  $\mu\text{m}^3$  cuando se alcanza la fase estacionaria (Blaise, 2006). La agregación de células es poco común en *S. capricornutum*, lo cual, superando sus otras características, hace que sea un alga muy adecuada para contabilizarse a través de contadores de partículas electrónicos (Blaise, 2006).

**Clasificación taxonómica:**

División: Chlorophyta

Sub - División: Chlorophycophyta

Clase: Chlophycea

Subclase: Chlorophycidea

Orden: Clorococales



Figura 1.9.1. *Selenastrum capricornutum*, bajo el microscopio de contraste de fases a 400x.

Las temperaturas mínimas y máximas a las cuales se da el crecimiento de *S. capricornutum* han sido reportadas 10 y 35 °C, respectivamente. La temperatura óptima de crecimiento, se ha reportado a 24 °C (Reynolds et al., 1975). Cuando las células son expuestas a muestras que contienen contaminantes tóxicos, su reproducción se afecta, alterando la tasa de crecimiento de la población de las algas.

El alga fue aislada, en 1959, en el condado de Noruega por el científico noruego Olav M. Skulberg. El alga ha sufrido dos cambios taxonómicos; su nombre se cambió primero a *Raphidocelis subcapitata* y más tarde se convirtió en *Pseudokircheneriella subcapitata*. Mientras que el último nombre es más frecuente en Europa, el nombre de *S. capricornutum* sigue siendo muy popular en América del Norte (Blaise, 2006).

Por último, su sensibilidad a una variedad de sustancias peligrosas favorece su uso como un indicador fiable de fitotoxicidad, esto aunado a su ubicuidad y su fácil crecimiento, y lo más importante, *Selenastrum capricornutum* ha reportado tener la habilidad de degradar HAPs individuales, como el pireno y el Benzo(a)pireno (Warshawsky, 1995, Díaz, 2013), lo cual hace ideal a la microalga para llevar a cabo este estudio.

### 1.10 Métodos de extracción y análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en matrices complejas.

La determinación de los contaminantes orgánicos persistentes en muestras ambientales comúnmente consta de tres pasos: i) extracción, ii) purificación/ fraccionamiento del extracto crudo y iii) identificación/ cuantificación (Suchan et al, 2004).

El análisis de micro-contaminantes orgánicos (como los HAPs) y metabolitos en muestras acuosas ambientales requiere de su identificación y cuantificación en matrices complejas (ej.: muestras biológicas, muestras ambientales) y a niveles muy bajos, de ultra traza. Por lo tanto, las técnicas analíticas tienen que ser selectivos para la determinación de estos analitos y ser lo suficientemente sensibles para permitir alcanzar bajos niveles de cuantificación. El análisis de contaminantes puede ser una tarea difícil ya que muchos son muy polares, tienen bajos pesos moleculares o son sensibles a la temperatura. En general, una baja selectividad del método de extracción implica cantidades considerables de impurezas, las cuales deben ser eliminadas antes de su análisis.

Uno de los procedimientos más comúnmente usado para el aislamiento de contaminantes orgánicos es la extracción Soxhlet. Este procedimiento se lleva a cabo con disolventes no polares y/o semi-polares; este procedimiento se basa en la extracción exhaustiva de compuestos orgánicos polares y no polares a través de un sistema en continuo. Algunas desventajas que tiene el método de Soxhlet es que requiere grandes volúmenes de disolventes orgánicos de alta pureza y un tiempo relativamente largo para completar la extracción total de los analitos (Suchan et al, 2004).

La Extracción Líquido- Líquido (LLE por sus siglas en inglés), se basa en la transferencia de los analitos desde la muestra acuosa hacia un disolvente inmisible en agua, es una técnica empleada habitualmente para la preparación de muestras acuosas. Por sus características, es una técnica especialmente apropiada para la extracción de HAPs, ya que son compuestos con un marcado carácter hidrofóbico y la extracción con un disolvente apolar resulta especialmente eficaz.

No obstante, LLE presenta ciertos inconvenientes, ya que se trata de una técnica lenta y laboriosa, con elevado consumo de disolventes, y con problemas adicionales, como la formación de emulsiones y/o la necesidad de etapas adicionales de evaporación de disolvente (Pena, 2010).

La Extracción por Fluido Supercrítico (SPE, por sus siglas en inglés) y la Extracción por Líquidos Presurizados (ELP), son técnicas las cuales permiten una extracción rápida y el uso de volúmenes pequeños de disolventes, sin embargo requieren de equipos cuyos costos de adquisición, mantenimiento y operación resultan ser más elevados (Suchan et al, 2004).

La Microextracción con Gota Suspendeda (SDME por sus siglas en inglés) fue desarrollada en la década de los 90, como un procedimiento de pretratamiento de muestra que minimiza el consumo de disolvente. La fase extractante es una microgota de un disolvente orgánico, suspendida del extremo de la aguja de una microjeringa, y expuesta a la muestra. Después del período de extracción, la gota se retrae hacia la aguja de la microjeringa, y finalmente se inyecta en el sistema de medición (Pena, 2010).

<b>Analitos</b>	<b>Métodos de extracción</b>	<b>Matriz</b>	<b>Análisis</b>	<b>Referencias</b>
<b>Contaminantes Orgánicos Persistentes</b>	ELP	Pescado	CG- DCE	Suchan et. al, 2004.
<b>HAPs</b>	Extracción Soxhlet	Suelo	CG- EM	Johnsen & Karlson, 2005
<b>HAPs</b>	Extracción Soxhlet	Algas	CLAR- Fluorescencia	Kirso & Irha, 1998
<b>HAPs</b>	Extracción Soxhlet	Sedimento de agua (0.5 m de profundidad)	CG- DFI	Hatch & Burton Jr., 1999
<b>HAPs</b>	Extracción Soxhlet	Cultivos de fibroblastos de pulmón	CG- EM	Calesso et. al., 2012
<b>HAPs</b>	Extracción Soxhlet, ELP, Extracción de Fluido Supercrítico.	Suelo contaminado de un área que era una planta de gas	CG- EM CG- DIF	Hawthorne et al., 2000
<b>HAPs</b>	Extracción de Fluido Supercrítico, ELL	Aceite lubricante de un automóvil de gasolina.	CG-EM	Wong & Wang., 2001

HAPs	Microextracción con gota suspendida.	Muestras de agua: grifo, arroyo y de río.	CLAR
------	--------------------------------------	---	------

Tabla 1. 10.1 Publicaciones relacionadas con la extracción de HAPs en diferentes matrices. HAPs: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos; ELP: Extracción de Líquidos Presurizados; ELL: Extracción Líquido-Líquido; CG: Cromatografía de Gases; CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución; CG-DCE: Cromatografía de Gases con Detector de Captura de Electrones; CG-EM: Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas; CG-DIF: Cromatografía de Gases con Detección de Ionización de Flama.

A continuación se describe más a detalle de las técnicas basadas en el uso de adsorbentes, para la extracción de los HAPs en los medios de cultivos que se efectuó en el presente trabajo.

### 1.10.1 Extracción en Fase Sólida (EFS).

El principio de la Extracción en Fase Sólida es similar al de la Extracción Líquido-Líquido (ELL) cuando se involucra un reparto de los solutos entre dos fases diferentes. Sin embargo, en lugar de dos fases líquidas inmiscibles, como en la ELL, la EFS implica la distribución de un compuesto entre un líquido (matriz de la muestra o disolvente con analitos) y una fase sólida (adsorbente). En la EFS también se involucran otros mecanismos de retención como la adsorción y el intercambio iónico. Esta técnica de tratamiento de la muestra permite la concentración y la purificación de los analitos al mismo tiempo. El procedimiento general consiste en cargar una solución en la fase sólida empacada en una columna o cartucho, lavar los componentes no deseados, y luego recuperar los analitos deseados con otro disolvente en un vial de recolección.

La retención de los analitos en la Extracción en Fase Sólida se basan en fuerzas de Van der Waals (interacciones no polares), enlaces de hidrógeno, fuerzas dipolo-dipolo (interacciones polares) y las interacciones catión-anión (interacciones iónicas).

Con ayuda de la EFS se pueden obtener muestras que están en solución, libres de componentes interferentes de la matriz y concentradas lo suficiente para la detección. La Extracción en Fase Sólida se logra a través de la interacción de tres componentes: el adsorbente, el analito y el disolvente. El analito debe ser atraído más fuertemente al adsorbente que a la matriz. El mejor mecanismo y procedimiento para la EFS, se definen por las características físico-químicas del analito en la muestra (Żwir-Ferenc, 2006).

El procedimiento de la EFS consta de tres o cuatro pasos sucesivos los cuales se ilustran en la figura 1.10.1.1. En primer lugar, el adsorbente sólido debe ser acondicionado usando un disolvente apropiado, en base a la estructura química del analito; seguido por el mismo disolvente de la muestra. Este paso es crucial, ya que permite la humectación del material de embalaje y solvatación de los grupos funcionales. Adicionalmente, elimina las posibles impurezas contenidas inicialmente en el adsorbente o en el embalaje. Además, este paso elimina el aire presente en la columna y se llena el volumen vacío con disolvente.

El segundo paso es el vertido de la muestra a través del adsorbente. La muestra puede ser pasada a través de la columna por gravedad, bombeo, aspiración por vacío o por un sistema automatizado.

El tercer paso (opcional) es el lavado del adsorbente sólido con un disolvente apropiado, el cual debe tener una fuerza baja de elución para eliminar componentes de la matriz que se han mantenido en el adsorbente, sin desplazar los analitos. La etapa de secado también puede ser aconsejable, especialmente para las matrices acuosas, para eliminar trazas de agua presente en el adsorbente.

El paso final, consiste en la elución de los analitos de interés con un disolvente apropiado, sin la eliminación de componentes de la matriz retenidas (interferentes). El volumen de disolvente a ocupar se debe ajustar de manera que el recobro sea cuantitativo (Camel, 2003).

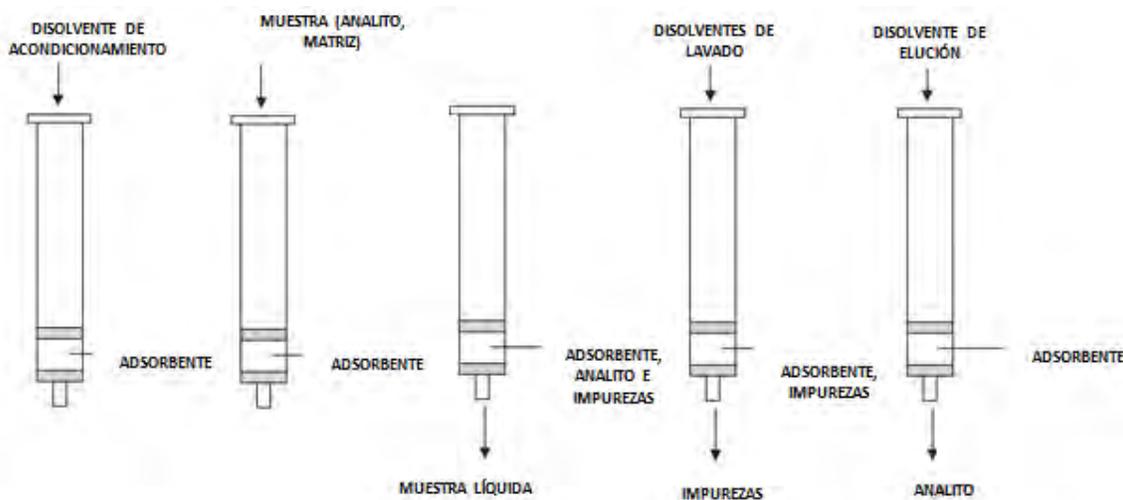


Figura 1.10.1.1. Pasos de Extracción en Fase Sólida (modificado de Žwir-Ferenc, 2006).

### 1.10.2. Dispersión en Matriz de Fase Sólida (DMFS).

En 1989, un nuevo proceso para la disgregación y extracción de muestras sólidas fue introducido. Este proceso llamado Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS), combina aspectos de diversas técnicas para la disgregación de la muestra en un adsorbente, mientras que también genera un material el cual posee, características cromatográficas únicas, para la extracción de compuestos a partir de una muestra dada. La DMFS se aplica a muestras viscosas, sólidas o semi- sólidas, comúnmente con un soporte sólido, como la sílice, la cual se ha derivatizado para producir una fase orgánica consolidada como los octadecil silano (C18) en su superficie; éstos materiales son los mismos utilizados para la EFS.

En el proceso de la DMFS, la muestra es colocada en un mortero de vidrio o de ágata, el cual contiene una fase enlazada apropiada o cualquier otro material de soporte sólido, tal como la sílice octadecil silano (ODS) derivatizada (C18) o de otro tipo de soporte adecuado. El sólido de soporte y la muestra se mezclan manualmente usando un pistilo de vidrio o de ágata, un paso que se lleva alrededor de 30 s. Los estándares internos, se pueden añadir antes de este paso. El material mezclado se transfiere y se empaqueta en una columna de material inerte, generalmente un cartucho de polipropileno, similar a los usados para la EFS; para llevar a cabo la elución secuencial con los disolventes, como se observa en la figura 1.10.2.1. La columna de dispersión se compone de la mezcla de componentes de la muestra distribuidos en la fase enlazada y el soporte, produciendo una nueva fase que exhibe características únicas para el fraccionamiento de la muestra. De esta manera, ya sea por simple gravedad, aplicando vacío o con equipos adecuados se hace pasar, un disolvente apropiado o una secuencia de disolventes pueden ser usados para limpiar la columna o para aislar directamente el compuesto(s) de elección. Co- columnas consistentes de otra fase sólida o soportes cromatográficos también pueden ser incorporados en la columna para asistir en el aislamiento o para una limpieza superior.

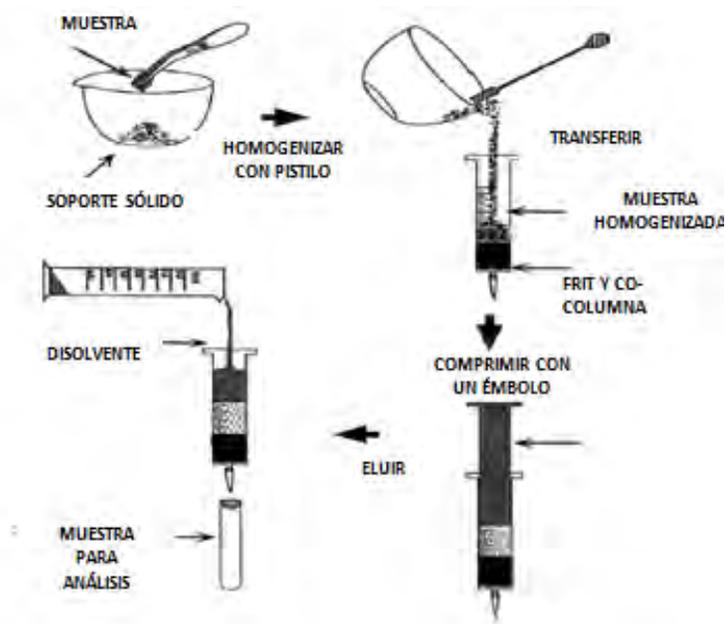


Figura 1.10.2.1. Pasos de Dispersión en Matriz de Fase Sólida (modificada de Baker, 2007).

El reparto (fase estacionaria líquida) o el equilibrio de adsorción (fase estacionaria sólida), similar al existente en una columna cromatográfica, es responsable de la distribución de los analitos, entre la muestra dispersada y el disolvente de elución. La eficiencia y selectividad en DMFS depende de varios factores entre los cuales destacan la selección del material dispersante, utilización de co-adsorbentes, el tipo de disolvente y la secuencia de elución.

### 1.11 Cromatografía de Líquidos.

La cromatografía es una técnica analítica de separación en la que una mezcla de compuestos se desplaza en una fase móvil líquida, a través de una fase estacionaria, fijada a una columna o a una superficie sólida. Es esencial escoger ambas fases, de tal modo que los componentes de la muestra se distribuyan de manera diferente entre ellas. Las moléculas fuertemente retenidas por la fase estacionaria se moverán lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que las que se unen débilmente a la fase estacionaria serán arrastradas con rapidez por la fase móvil. Debido a esta movilidad diferencial de los componentes de una muestra, dentro de la fase estacionaria empacada en una columna se van a separar en bandas o zonas discretas que podrán ser analizadas cualitativa o cuantitativamente al salir y dirigirse a un detector apropiado.

La cromatografía de líquidos tiene amplia aplicación porque la mayoría de los compuestos no son suficientemente volátiles para que se les pueda analizar por cromatografía de gases. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a que pase por una columna que contiene una fase estacionaria de partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. El equipo de HPLC generalmente consta de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y un ordenador para controlar el equipo y visualizar los resultados. Actualmente muchos equipos incluyen además un horno para controlar la temperatura de la columna.

Existen varios métodos cromatográficos que se pueden clasificar de distintas formas. Una clasificación general que se basa en la polaridad de la fase estacionaria se describe a continuación:

-Cromatografía fase normal:

La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, etc.).

-Cromatografía de fase reversa (inversa):

La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupo fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas (efecto solvóforo) (Harris, 2007; Alfonso, 2009).

#### 1.11.1 Definiciones y parámetros cromatográficos.

**Tiempo de retención:** Es el tiempo que transcurre desde la inyección de una muestra en la columna hasta que un componente llega al detector y se le da el símbolo  $t_R$ .

**Tiempo muerto:** Es el tiempo  $t_M$  para que una especie no retenida en la columna llegue al detector.

**Constante de distribución:** Los equilibrios de distribución implicados en cromatografía se describen por ecuaciones simples que suponen la distribución de un analito entre las fases estacionaria y móvil (Guía de cromatografía, Universidad Central de Venezuela).

$$K = \frac{C_s}{C_M}$$

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

**Factor de capacidad:** Es un parámetro ( $k'$ ) que se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna. Para una especie A, el factor de capacidad  $k'_A$  se define como (Guía de cromatografía, Universidad Central de Venezuela):

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

Donde  $K_A$  es la constante de distribución,  $V_S$  es el volumen de la fase estacionaria y  $V_M$  es el volumen de la fase móvil.

También puede ser descrito en términos experimentales los cuales pueden ser tomados de un cromatograma (Guía de cromatografía, Universidad Central de Venezuela):

$$k'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M}$$

Donde  $(t_R)_A$  es el tiempo de retención del componente A y  $t_M$  es el tiempo muerto obtenido para una especie no retenida.

**Factor de selectividad:** El factor de selectividad  $\alpha$  de una columna, como su nombre lo indica, es un término que define que tan selectiva es una columna para separar dos picos. Es de hacer notar, que la columna puede ser selectiva para una separación, que se identifica por un valor alto de este factor.

Entonces el factor de selectividad de una columna para dos especies A y B se define como (Guía de cromatografía, Universidad Central de Venezuela):

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Donde  $k'_B$  es el factor de capacidad del compuesto B, que es el más retenido y  $k'_A$  es el factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido.

Con esta definición  $\alpha$  siempre es mayor que la unidad.

En términos tomados a partir de un cromatograma  $\alpha$  se puede calcular:

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

**Eficiencia de una columna:** Como se dijo anteriormente, si no se toma en cuenta los factores que afectan el ancho de un pico para la separación cromatográfica no se podría lograr una buena separación aún cuando se tenga un factor de selectividad alto para estos picos en una columna particular. Es decir que mientras mayor es la capacidad de la columna de producir picos más estrechos mayor es su eficiencia.

La anchura de una banda aumenta a medida que se mueve a través de la columna, debido a que cuanto más tiempo transcurre mayor es la dispersión que puede tener lugar. Por ello la anchura de la zona está relacionada directamente con el tiempo de residencia en la columna, e inversamente con la velocidad a la que fluye la fase móvil.

Se utilizan dos términos afines con frecuencia como medida cuantitativa de la eficiencia de una columna cromatográfica: 1) la altura equivalente de plato teórico o  $H$  y 2) el número de platos teóricos  $N$ . Los dos están relacionados por la ecuación (Guía de cromatografía, Universidad Central de Venezuela):

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

Donde  $L$  es la longitud (normalmente en centímetros) del relleno de la columna. La eficiencia de la columna cromatográfica aumenta cuando mayor es el número de platos, y cuando menor es la altura de plato.

**Resolución de una columna:** La resolución  $R_s$  de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. Al pasar por una columna cromatográfica, los solutos tienden a difundirse según una curva gaussiana, de desviación

estándar  $\sigma$ . Cuanto más tiempo pasa el soluto en la columna, más ancha se hace la banda (Guía de cromatografía, Universidad Central de Venezuela).

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

Donde  $W_A$  y  $W_B$  son los anchos de banda de los solutos A y B respectivamente.

Estadísticamente se puede demostrar que una resolución de 1.5 permite una separación esencialmente completa de los dos componentes, mientras que no es así con una resolución de 0.75, por supuesto siempre y cuando las bandas sean gaussianas, es decir simétricas en ambos lados. Así con una resolución de 1.0; la zona A contiene aproximadamente 4 % de B, y la zona B contiene una cantidad similar de A, con una resolución de 1.5 el solapamiento es del orden de 0.3 %.

## CAPÍTULO 2. MÉTODOS Y MATERIALES

### 2.1 MATERIALES.

#### 2.1.1 Disolventes, reactivos y estándares analíticos.

- Metanol y acetonitrilo grado cromatográfico ( JT Baker, México)
- Agua ultrapurificada, obtenida en un sistema de purificación (microfiltración: Simplicity UV, Millipore, MA, USA).
- Isopropanol grado reactivo ( EM Science, NJ, USA)
- Sílice C18 Supelclean de 45  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula (Supelco, EUA).
- Estándares de B(a)P, B(a)A, Antraceno, Pireno de pureza >99 % (Chemservice, PA, USA).

#### 2.1.2 Sistema de Extracción.

- Espátula Cromo-Níquel, para pequeñas y grandes cantidades
- Micropipetas de 2-20, 20-200 y 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg, Alemania)
- Cartuchos Bond Elut de 1 y 6 mL con los “frits” correspondientes (Varian, CA, USA)
- Pipetas Pasteur
- Matraces Erlenmeyer de 125 y 250 mL
- Portaobjetos
- Jeringa de 20 mL con adaptador de propileno (Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Alemania)
- Mortero de ágata con pistilo de 20 mL
- Tubos de centrifuga de 15 mL (BD Biosciences, CA, EUA)
- Viales con tapón de rosca con capacidad de 2mL, 5mL, 10 mL y 40mL.
- Vasos de precipitados de 20, 50 y 100 mL grado laboratorio.

#### 2.1.3 Medios de cultivo y mantenimiento de las microalgas.

- La microalga eucariota *Selenastrum capricornutum* fue adquirida de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Texas ( TX, U SA) y cultivada en matraces Erlenmeyer con medio Bristol ( $\text{NaNO}_3$  2.94 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.17 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.43 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.29 mM,  $\text{NaCl}$  0.43 mM (JT Baker, DF, MEX)
- Proteosa peptona 1 g/L (MCD Lab, Edo. De México, MEX)
- Lámparas de luz fría 14 watts
- Autoclave All American 75X
- Autoclave eléctrica, Tuttnauer 2540EL

Para el crecimiento de los medios de cultivo, se sembró el alga *Selenastrum capricornutum*, de un medio de conservación sólido (compuesto por agar, medio bristol y peptona) con la ayuda de un asa estéril, en 200 mL de medio Bristol (tabla 2. 1); previamente esterilizado a

121 °C por 30 minutos, para evitar la contaminación con bacterias u hongos presentes en el medio.

Este organismo se cultivó con ciclos de iluminación de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad; agitación constante y temperatura ambiente, durante 15 días aproximadamente. De este medio de cultivo se tomaron aproximadamente 3 mL, al cual se le midió la absorbancia a 685 nm (longitud de onda de absorción de la clorofila) con un espectrofotómetro, hasta llegar a una absorbancia de 1.0 (lo que corresponde a aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por  $\text{mL}^{-1}$ ) según una curva de crecimiento previamente estandarizada en el laboratorio.

Componente	Disolución "Stock"	Concentración Final (mM)
<b>Proteosa-Peptona</b>	1g/1000 mL agua destilada	-----
<b>NaNO<sub>3</sub>/KNO<sub>3</sub>/Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	10g/400 mL agua destilada	2.94
<b>CaCl<sub>2</sub>*2H<sub>2</sub>O/CuCl<sub>2</sub>*2H<sub>2</sub>O</b>	1g/400 mL agua destilada	0.17
<b>MgSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O</b>	3g/400 mL agua destilada	0.3
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	7g/ 400 mL agua destilada	0.43
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	7g/400 mL agua destilada	1.29
<b>NaCl/KCl</b>	1g/400 mL agua destilada	0.43

Tabla 2.1. Composición de sales con las que se enriquece el medio Bristol, para conseguir un óptimo crecimiento del alga.

Los medios de conservación se prepararon de igual manera y adicionando 1 % de agar, para solidificarlos, estos medios se mantuvieron bajo luz blanca fría y a una temperatura de 4°C.

#### 2.1.4 Sistema cromatográfico.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Waters con bomba binaria 1525)
- Detector UV de arreglo de fotodiodos 2998 (Waters)
- "Software" de control y procesamiento de datos "Empower" versión 3.0
- Columna analítica de acero inoxidable Nucleosil 100, 5  $\mu\text{m}$  150 x 4.6 mm, empacada con sílice fase inversa Nucleosil C18, (Macherey-Nagel, Düren, Alemania)
- Precolumna de guarda de acero inoxidable Hichrom, de 13 X 4.5 mm, empacada con sílice fase inversa Nucleosil C18, (Phenomenex, Torrance, CA, EUA).
- Inyector manual, con bucle de inyección de 20  $\mu\text{L}$ .
- Jeringa de 50  $\mu\text{L}$  (Hamilton, EUA)

#### 2.1.5. Otros equipos y materiales.

- Balanza analítica, modelo AG 245 (Mettler Toledo, Suiza)
- Baño de ultrasonido Bransonic 1510 (Branson, CT EUA)
- Centrifuga marca SIGMA, Osterode am Harz, Alemania, modelo 2-5

- Matraces Erlenmeyer 50 mL estériles
- Micropipeta de volumen de 100-1000  $\mu$ L (Eppendorf, Alemania)
- Pipeta estéril de 10 mL
- Propipeta
- Agitador orbital para matraces de 250 mL, modelo 2346Q (ThermoScientific, EUA).
- Mechero Bunsen
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (ThermoScientific, EUA)

#### 2.1.6 Preparación de disoluciones estándar.

En todas las disoluciones utilizadas de BaP, BaA, ANT y PY; se partió de disoluciones madre con concentración de 100 ppm, preparada en acetonitrilo, almacenada posteriormente en frascos ámbar cerrados herméticamente a una temperatura de 4 ° C.

A partir de cada una de las disoluciones madre, se obtuvieron las correspondientes disoluciones de 40 ppm, las cuales se almacenaron bajo las mismas condiciones hasta ser utilizadas.

## 2.2.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

Con base en una metodología de extracción previamente validada para el aislamiento de BaP del medio de cultivo (Velasco, 2011; Díaz, 2013) se evaluó como afectan parámetros como la luz y la temperatura en los medios de cultivo, para así conocer las condiciones óptimas para la degradación de B(a)P, PY, ANT y B(a)A.

En la figura 2.2.1. Se describe la metodología general que se siguió para conseguir este objetivo.

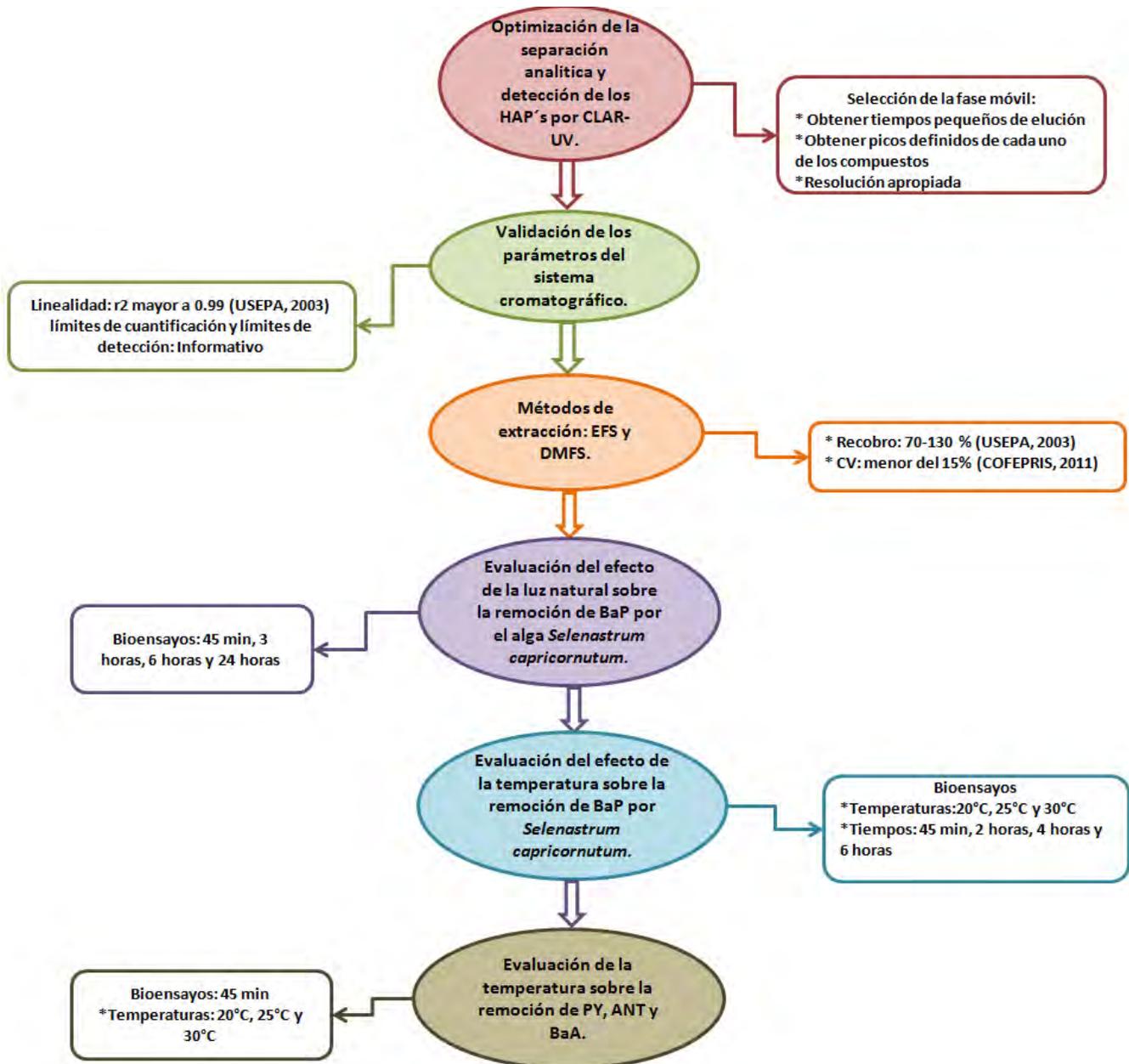


Figura 2.2.1. Esquema general de experimentación.

## 2.2.1 Análisis cromatográfico.

### 2.2.1.1 Selección de la longitud de onda para la detección de los HAPs.

Para llevar a cabo adecuadamente el análisis cromatográfico fue necesario seleccionar la longitud de onda donde se observó la mejor respuesta para cada uno de los analitos (ANT, PY, Ba A, Ba P); para esto se obtuvo el espectro de absorción de cada uno de los hidrocarburos individualmente, con ayuda del detector UV de arreglo de diodos.

### 2.2.1.2 Selección de la fase móvil para el análisis de los HAPs.

Para encontrar las condiciones óptimas de la separación cromatográfica, se inyectaron seis veces disoluciones de cada uno de los cuatro compuestos: Pireno, Antraceno, Benzo(a)antraceno y Benzo(a)pireno, con concentraciones de entre 0.1 y 2.5 ppm, variando la composición de la fase móvil constituida por metanol/ agua. Las variaciones fueron 100 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 % de MeOH a un flujo de 1 mL/min, obteniendo los correspondientes tiempos de retención en los cromatogramas.

Con los tiempos de retención ( $t_R$ ), los tiempos muertos ( $t_M$ ) de cada fase y con la ayuda de la ecuación 2.2.1, se pudo calcular el factor de capacidad ( $k'$ ). Con estos datos se obtuvo el gráfico del log  $k'$  en función del %MeOH.

$$k'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M} \dots\dots\dots(\text{Ec. 2.2.1})$$

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención del compuesto, y  $t_M$  es el tiempo muerto.

Con estos resultados se seleccionó la mejor fase móvil para el análisis cromatográfico.

## 2.2.2 Validación del sistema cromatográfico

### 2.2.2.1 Linealidad del sistema

Para la linealidad del sistema se realizaron inyecciones por triplicado de soluciones de BaP, BaA, Pireno y Antraceno, en concentraciones de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\mu\text{g/mL}$ , partiendo de una solución madre de 40  $\mu\text{g/mL}$ , con la integración a través del software “Empoware” 3.0 fue posible obtener el área, y con esto se realizaron curvas de calibración de la misma en función de la concentración, se realizó la regresión lineal a cada una de las curvas, la linealidad se evaluó a través del coeficiente de relación  $r^2$  de cada curva.

La USEPA (2003), para fines cuantitativos, la  $r^2$  obtenida de la regresión lineal debe ser superior a 0.99.

### 2.2.2.2 Repetibilidad y Reproducibilidad del Sistema.

La repetibilidad y la reproducibilidad son dos medidas de la precisión dentro del sistema, para conocer el grado de concordancia entre nuestros datos, cuando se generan bajo las mismas condiciones (repetibilidad) y bajo condiciones diferentes como día, analista o equipos (reproducibilidad).

Para determinar la precisión del sistema durante tres días diferentes se realizaron 5 inyecciones de soluciones de estándares individuales de cada uno de los compuestos, con una fase móvil de 95 % MeOH, y con un flujo constante de 1 mL/min. Posteriormente, se obtuvieron las áreas integradas, para poder calcular el coeficiente de variación (CV) entre corridas del mismo día, evaluando de este modo la repetibilidad y con el CV entre muestras de los tres días diferentes, se evaluó la reproducibilidad. El coeficiente de variación se calculó a través de la ecuación 2.2.2.2.1 (Velasco, 2011).

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \dots\dots\dots(Ec. 2.2.2.2.1)$$

Donde S, es la desviación estándar y  $\bar{X}$ , la media o el promedio.

Los criterios de aceptación que brinda COFEPRIS (2011) para contaminantes en agua, con una concentración entre 0.1 y 100 mg/L, son para repetibilidad un CV menor o igual al 15% y para reproducibilidad un CV menor o igual al 23%.

### 2.2.2.3 Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales.

Para la determinación del Límite de Detección (LD) y el Límite de Cuantificación (LC), se utilizaron las curvas de calibración de cada uno de los compuestos, por medio de métodos estadísticos, usando la pendiente de la recta (obtenida por un ajuste de mínimos cuadrados) y la desviación estándar, se utilizaron la ecuación 2.2.2.3.1 y la ecuación 2.2.2.3.2 (Velasco, 2011) para poder calcular el LD y LC, correspondientemente.

$$LD = (3.3 * S_{y/x}) / b_1 \dots\dots\dots(Ec. 2.2.2.3.1)$$

$$LC = (10 * S_{y/x}) / b_1 \dots\dots\dots(Ec. 2.2.2.3.2)$$

Donde b1 es la pendiente y  $S_{y/x}$  es la desviación estándar de la regresión de “y” en “x”.

### 2.2.3 Métodos de extracción.

#### 2.2.3.1 Acondicionamiento del adsorbente.

Para solventar las moléculas del adsorbente de modo tal que se vieran favorecidas las interacciones con los analitos, fue necesario acondicionar la sílice C18 Supelclean, con metanol al 100 %, en una relación de 1 mL de metanol por cada gramo de adsorbente y dejándola secar al vacío. Este procedimiento también nos permitió eliminar impurezas procedentes del embalaje.

#### 2.2.3.2 Extracción en Fase Sólida (EFS).

Para llevar a cabo la extracción en fase sólida (EFS) se usó una metodología previamente optimizada en el laboratorio para hidrocarburos de alto peso molecular como son BaP, BaA, BkF, BbF (Velasco, 2011; Díaz, 2013). En base a esta optimización evaluamos el recobro de los cuatro compuestos estudiados en el presente trabajo (antraceno, pireno, BaA y BaP). El método de extracción tiene varias etapas: primero se hace un acondicionamiento de la columna de extracción con 3 mL de ACN al 100 % y posteriormente 10 mL de agua tipo I. La columna consiste de un cartucho de polipropileno (6 mL) en el cual se empacaron 300 mg de sílice C18 (previamente activada) la cual se encuentra presionada entre dos “frits” de tamaño adecuado. Posteriormente se aplican 15 mL de cultivo del alga *Selenastrum capricornutum*, el cual es ta a dicionado con una concentración de 0.266 µg/mL en el medio (4 µg de hidrocarburo) antraceno, pireno, BaA y BaP, a estos 15 mL previamente se les agregó isopropanol para obtener el 20% en la muestra, y se dejó equilibrar durante 5 min.

Con vacío, se hizo pasar la muestra, para después comenzar con la aplicación de los eluentes de lavado: 5 mL de agua, 4 mL de ACN: Agua 10:90, 3 mL de ACN: Agua 55:45 y finalmente se eluyó con 4 mL de ACN al 100 %, siendo éste eluato la fracción que se analizó por CLAR-UV-DAD. El procedimiento completo de extracción se ilustra en la figura 2.2.3.2.1. Para evaluar la eficiencia y la confiabilidad de la metodología se utilizó como parámetro el factor de recuperación o recobro, el cual para ser considerado aceptable se evalúa en función de la concentración utilizada, así como el propósito del análisis. Para calcular el porcentaje de recobro; se comparó con el área de pico que correspondía a un estándar de concentración de 8 µg/mL, un triplicado de área del pico correspondiente a cada compuesto proveniente de inyecciones de extractos de muestras reales. Así se evaluó la precisión con el % CV (ecuación 2.2.3.2.1) entre las tres muestras realizadas el mismo día, y posteriormente entre muestras realizadas en días diferentes.

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \dots\dots\dots (Ec. 2.2.3.2.1)$$

Donde s es la desviación estándar y  $\bar{x}$  la media aritmética.



Figura 2.2.3.2.1. Procedimiento de Extracción en Fase Sólida.

### 2.2.3.3 Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).

Se optimizó una metodología previamente validada en el laboratorio para hidrocarburos de alto peso molecular, BaP, BaA, BkF y BbF (Velasco, 2011; Díaz, 2013) para la extracción de los cuatro compuestos que se utilizaron en este trabajo, para ello se utilizó el recobro como parámetro de cuantitatividad y reproducibilidad.

En un mortero de ágata se colocaron 5 mg de biomasa previamente seca, proveniente de cultivos de *Selenastrum capricornutum*, a los que se le agregaron 100 mg de sílice derivatizada con C18. A esta mezcla se le agregaron 100  $\mu$ L de antraceno, pireno, BaA y BaP a 40  $\mu$ g/mL, correspondientes a 4  $\mu$ g de hidrocarburo; una vez que el disolvente se evaporó, la mezcla se homogenizó con ayuda del pistilo. Posteriormente la fase dispersa se empacó entre dos "frits" para un cartucho de polipropileno de 1 mL, a través del cual y con ayuda del vacío se hicieron pasar 10 mL de agua, 5 mL de ACN al 20 %, 1.5 mL de ACN al 40 % y, finalmente se eluyó la fracción con 0.5 mL de ACN al 100 % en el cual se recuperaron los analitos. Esta fracción final se analizó por CLAR-UV-DAD. El procedimiento completo de este método de extracción se ilustra en la figura 2.2.3.2.1.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de recobro al comparar un triplicado de muestras reales con un estándar, para poder evaluar la precisión con el % CV (ecuación 2.2.3.3.1) entre las tres muestras realizadas el mismo día, y posteriormente entre muestras realizadas en días diferentes.

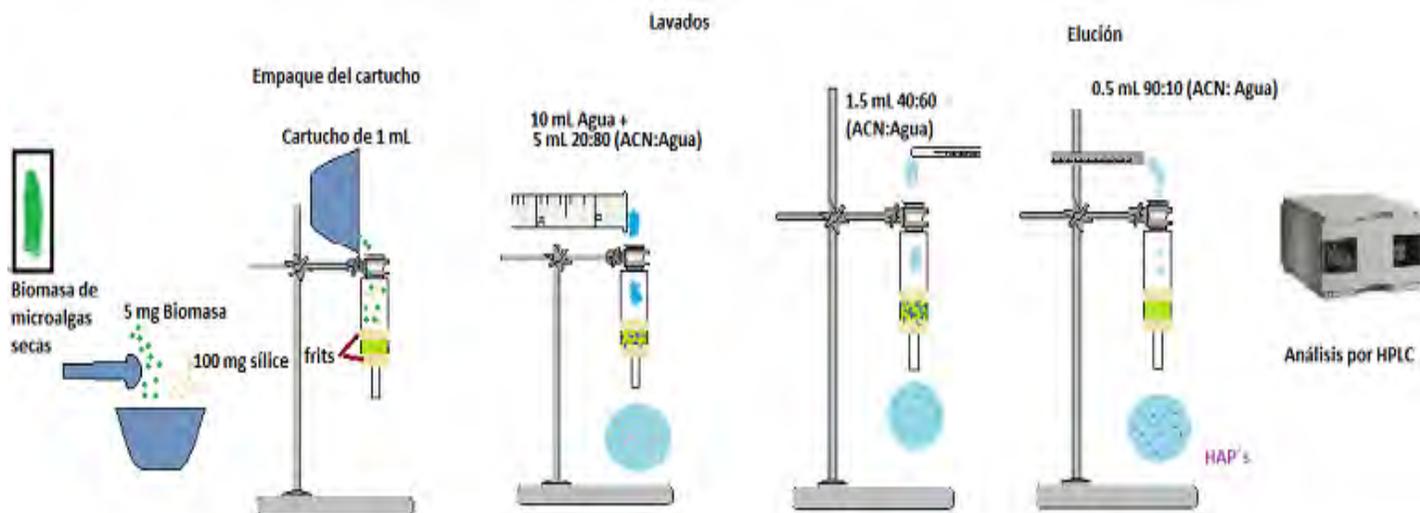


Figura 2.2.3.3.1. Procedimiento de Dispersión en Matriz de Fase Sólida.

#### 2.2.4 Evaluación del efecto de la luz natural sobre la remoción de Benzo(a)pireno por *Selenastrum capricornutum*.

Para evaluar el efecto de la luz natural sobre la capacidad de degradación de la microalga, se realizaron ensayos de exposición en luz natural frente a BaP, a diferentes tiempos, para de esta manera poder comparar estos resultados, con datos previamente generados en el laboratorio usando luz amarilla (Díaz, 2013).

En condiciones asépticas se tomaron alícuotas de 15 mL de un medio de cultivo de *Selenastrum capricornutum* con absorbancia espectrofotométrica de 1.0, a 685 nm (absorción de la clorofila), colocando esta alícuota en matraces Erlenmeyer de 50 mL. Estos cultivos fueron fortificados con BaP a una concentración en el medio de 0.266 µg/mL. Posteriormente los matraces se colocaron a agitación constante y se dejaron expuestos a la luz natural, por el tiempo de exposición definido. Se utilizaron tiempos de exposición de 0.75, 3, 6 y 24 horas.

Terminado el tiempo de exposición, el medio fue transferido a tubos de centrifuga para centrifugarse a una velocidad de 3900 rpm por 15 minutos, para así obtener el medio líquido sin microalgas y un botón celular, mismo que se colocó en portaobjetos de vidrio para permitir que se secan a temperatura ambiente. El sobrenadante se sometió al método de extracción en fase sólida, mientras que el botón celular, una vez seco, se sometió al método de dispersión de matriz en fase sólida, como se muestra en la figura 2.2.3.2.1 y 2.2.3.3.1, respectivamente.

Posteriormente los extractos fueron almacenados a 4 °C hasta su análisis por CLAR con detector UV de arreglo de diodos, con el fin de cuantificar el hidrocarburo agregado en el correspondiente ensayo de exposición.

### 2.2.5 Efecto de la temperatura sobre la remoción de HAPs por *Selenastrum capricornutum*.

Para conocer el efecto de la temperatura en la remoción del BaP del medio de cultivo, se evaluaron tres temperaturas, 20 °C, 25 °C y 30 °C a 0.75, 2, 4 y 6 horas, de este modo se generaron 3 curvas de degradación, a cada una de las temperaturas.

En condiciones asépticas se tomaron alícuotas de 15 mL de cultivos de *Selenastrum capricornutum* (con una absorbancia espectrofotométrica de 1.0 a 685 nm), y se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 50 mL. Estos cultivos fueron fortificados a una concentración en el medio de 0.266 µg/mL del hidrocarburo. Posteriormente los matraces se colocaron en un agitador con temperatura controlada, agitación constante (50 rpm) y se dejaron expuestos por los tiempos establecidos.

Una vez terminado el tiempo de exposición, el volumen total de los matraces de cultivo fue transferido a tubos de centrifuga; centrifugándose por 15 min a una velocidad de 3900 rpm, una vez que se obtuvo el medio líquido libre de al gas, a éste se le realizó la extracción en fase sólida, como se muestra en la figura 2.2.3.2.1, y al botón celular se le colocó en un portaobjetos de vidrio y se le dejó secar a temperatura ambiente, una vez seco, se llevó a cabo la dispersión de matriz en fase sólida, como se explica en la figura 2.2.3.3.1.

Los extractos fueron almacenados a 4 °C hasta su análisis por CLAR con detector UV, con arreglo de diodos, con el fin de cuantificar el BaP residual después del tiempo de ensayo de exposición.

Para el resto de los compuestos (antraceno, pireno y BaA) se decidió utilizar solamente un tiempo de 0.75 horas, esto en base a los datos obtenidos para BaP en los cuales se observó una marcada diferencia en los ng de hidrocarburo recuperado a las diferentes temperaturas, siguiendo para estos compuestos la misma metodología previamente descrita para BaP a diferentes temperaturas de exposición.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Análisis cromatográfico.

#### 3.1.1 Selección de la longitud de onda para la detección de los HAPs.

En cada uno de los espectros obtenidos (Anexo I) se seleccionaron las longitudes de onda de máxima absorción.

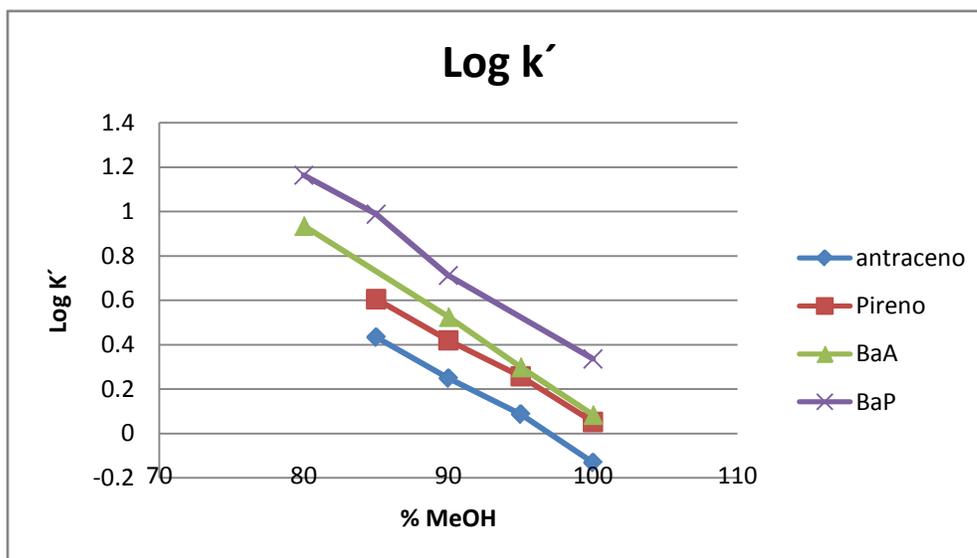
En la Tabla 3.1.1.1 se puede observar las longitudes de onda seleccionadas para cada compuesto.

Compuesto	$\lambda$ nm
Pireno	239
Antraceno	250
Benzo(a)antraceno	286
Benzo(a)pireno	295

Tabla 3.1.1.1 Longitudes de onda con mayor respuesta de los HAPs estudiados

#### 3.1.2 Selección de la fase móvil para la separación de los HAPs

En la Gráfica 3.1.2.1. Se puede observar el comportamiento en retención de los cuatro hidrocarburos, conforme se va variando la composición de fase móvil en el sistema cromatográfico, sabiendo que a mayor factor de capacidad ( $k'$ ), es menor la velocidad de migración de los compuestos. De esta manera se puede observar que el compuesto menos retenido es el antraceno.



Grafica 3.1.2.1. Variación del logaritmo del factor de capacidad  $k'$  de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.

En base a la gráfica 3.1.2.1 y tomando en cuenta los interferentes de la matriz, que pudieran presentarse en el cromatograma a tiempos de retención cercanos al tiempo muerto, se decidió utilizar una fase móvil con un contenido de 95 % MeOH, manteniendo corridas cromatográficas cortas para los cuatro compuestos como se observa en la figura 3.1.2.1 pero evitando las interferencias observadas en blancos de muestras reales para los extractos, ya sea por Extracción en Fase Sólida (medio líquido) o por Dispersión de Matriz en Fase Sólida (biomasa).

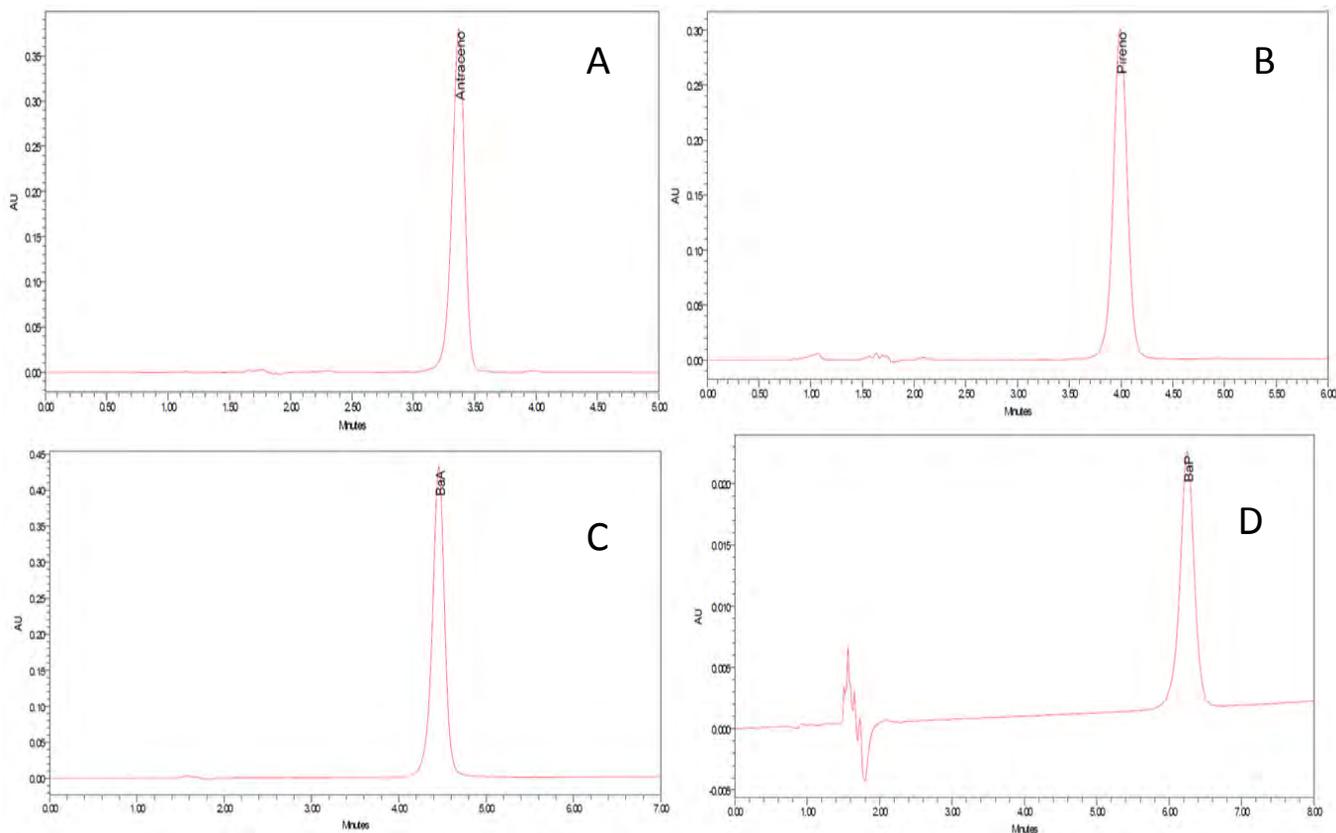


Figura 3.1.2.1. Cromatograma de Antraceno 1.5 µg/mL (A), Pireno 1.5 µg/mL (B), Benzo(a)antraceno 1.5 µg/mL (C) y Benzo(a)pireno 1 µg/mL (D). Condiciones: Columna analítica Nucleosil C18, con tamaño de partícula de 10 µm, bucle de inyección de 20 µL; MeOH 95 % 1mL/min, detección UV λ= 250, 239, 286 y 295 respectivamente.

### 3.1.3 Linealidad del sistema

En la Gráfica 3.1.3.1, se puede observar el área obtenida de los picos en función de concentraciones en un rango entre 0.5- 10 µg/mL para cada uno de los hidrocarburos, donde se puede observar que las cuatro curvas presentan una  $r^2$  superior a 0.99, cumpliendo de este modo con lo recomendado por la USEPA (2013) y por lo cual podemos decir que el sistema presenta una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas.

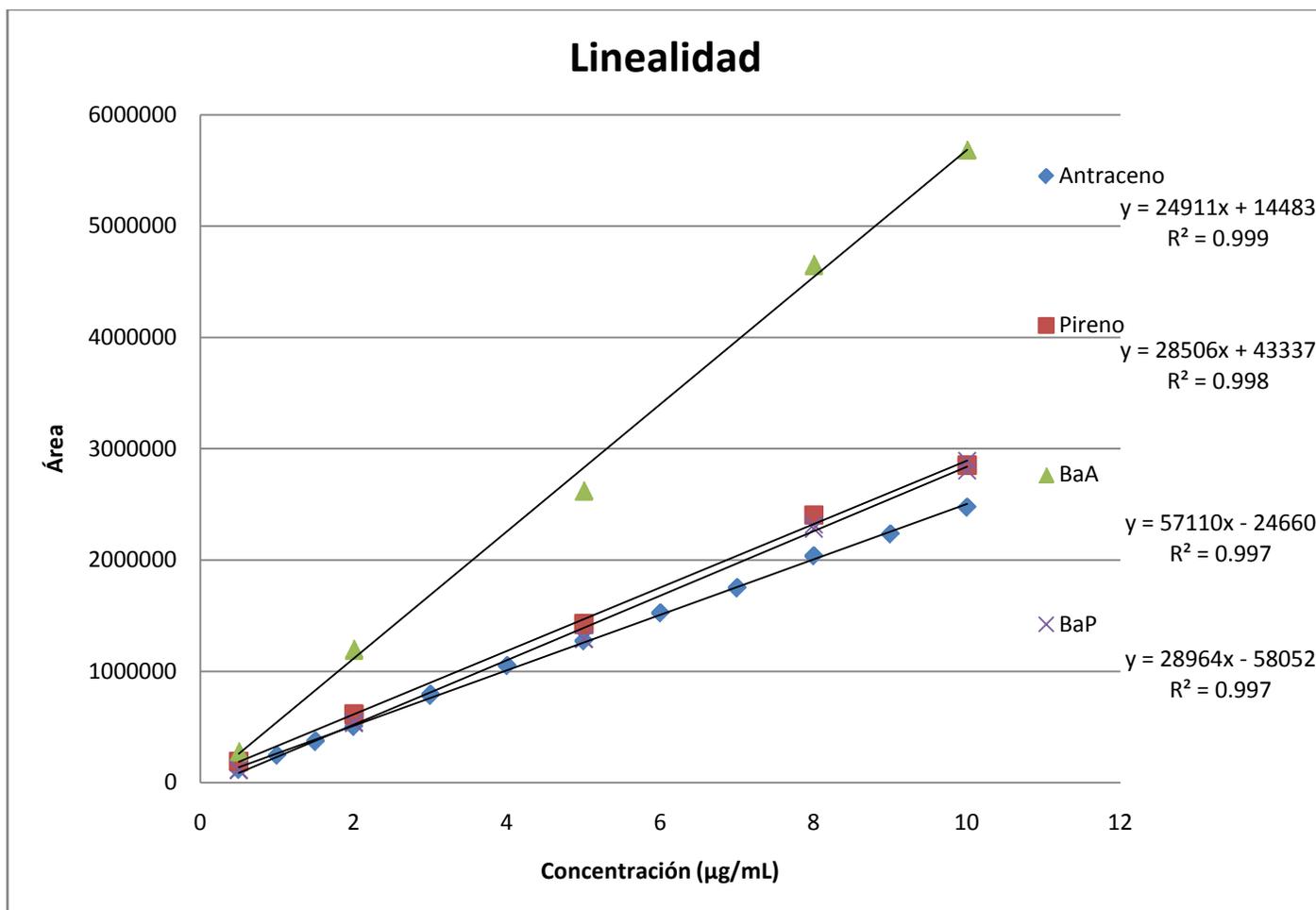


Gráfico 3.1.3.1. Curvas de calibración de ANT, PY, BaA y BaP, en un intervalo de concentración de 0.5 a 10 µg/mL

#### 3.1.4 Repetibilidad y reproducibilidad del sistema.

En la Tabla 3.1.4.1. se puede observar la repetibilidad y reproducibilidad en la inyección de una disolución estándar de 1.5 µg/mL para cada compuesto.

Compuesto	Repetibilidad (% CV)	Reproducibilidad (CV)
<b>Antraceno</b>	0.4	1.5
<b>Pireno</b>	1.3	1.9
<b>BaA</b>	1.6	1.8
<b>BaP</b>	1.1	1.6

Tabla 3.1.4.1. Repetibilidad y Reproducibilidad, al inyectar un estándar de 1.5 µg/mL (n=6).

Como se puede ver se tiene una reproducibilidad (diferentes días) con un coeficiente de variación menor al 1.9 %, y la repetibilidad presenta valores menores por lo tanto podemos decir que el sistema es repetible y reproducible.

### 3.1.5 Límites de detección y cuantificación instrumentales.

En base al comportamiento individual de los cuatro compuestos, y de sus diferencias fisicoquímicas, se obtuvieron los límites de detección y cuantificación instrumental (Tabla 3.1.5.1) de los hidrocarburos, para de este modo verificar que las concentraciones en las que trabajamos se encontrarán por arriba de estos límites, y así generar datos confiables.

Compuesto	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
<b>Antraceno</b>	0.014	0.049
<b>Pireno</b>	0.086	0.286
<b>Benzo(a)antraceno</b>	0.124	0.412
<b>Benzo(a)pireno</b>	0.079	0.265

Tabla 3.1.5.1. Límites de cuantificación y detección instrumental de los hidrocarburos estudiados.

### 3.2 Métodos de extracción.

Se utilizaron dos métodos de extracción previamente desarrollados para HAPs pesados (Velasco, 2011; Díaz, 2013) y optimizados para los compuestos estudiados en los medios de cultivo líquidos provenientes de los bioensayos de exposición. El primero basado en la técnica de Extracción en Fase Sólida, el cual permitió aislar a los HAPs presentes del medio líquido y el segundo, basado en la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida para extraer a los HAPs presentes en la biomasa de las microalgas.

Para evaluar el correcto funcionamiento de estas dos metodologías, así como su eficiencia y confianza, se utilizó como parámetro el recobro, el cual se calculó con ayuda de la ecuación 2.2.3.2.1.

#### 3.2.1 Extracción en Fase Sólida (EFS).

En la tabla 3.2.1.1 se presentan los recobros obtenidos y los coeficientes de variación para los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en estudio.

Compuesto	% Recobro	Repetibilidad % CV	Reproducibilidad % CV
<b>Antraceno</b>	94	3.3	4.4
<b>Pireno</b>	91	3.3	4.7
<b>Benzo(a)antraceno</b>	81	6.1	8.8
<b>Benzo(a)pireno</b>	87	5.5	5.6

Tabla 3.2.1.1. Porcentajes de recobro y coeficiente de variación de Antraceno, Pireno, BaA y BaP, extraídos por el método de EFS.

En todos los casos los porcentajes de recobro están por arriba del 81 %. El hecho de no obtener el 100 %, se explica porque estos compuestos tienden a adsorberse en las paredes del material de vidrio, sin embargo los valores obtenidos son aceptables para el objetivo de nuestro trabajo y cumpliendo con lo recomendado por la USEPA para muestras acuosas, al tener recobros entre 70 %-130 % (USEPA, 2003), y el % CV se encuentra entre valores de

3.3-8.8, cumpliendo con los criterios de aceptación de COFEPRIS (2011) para contaminantes en agua, al tener un CV menor al 23%.

### 3.2.2 Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).

En la Tabla 3.2.2.1, se muestran los porcentajes de recobro, y coeficientes de variación obtenidos en matrices reales adicionadas.

<b>Compuesto</b>	<b>% Recobro</b>	<b>Repetibilidad % CV</b>	<b>Reproducibilidad % CV</b>
<b>Antraceno</b>	85	3.7	3.4
<b>Pireno</b>	86	3.3	4.8
<b>BaA</b>	92	2.1	4.3
<b>BaP</b>	89	2.9	4.6

Tabla 3.2.2.1. Porcentajes de recobro y coeficientes de variación de Antraceno, Pireno, BaA y BaP, extraídos por el método de DMFS en muestras reales.

Para este método se cuenta con porcentajes de recobro mayores al 85 %, cumpliendo las recomendaciones de la USEPA (USEPA, 2003) y presenta CV menor al 3.7 % para la repetibilidad, un CV menor al 4.8 % para la reproducibilidad, siendo estos valores aceptables según los criterios de aceptación de la COFEPRIS (COFEPRIS, 2011); se considera que el método es preciso.

### 3.3 Evaluación de efecto de la luz natural sobre la remoción de Benzo(a)pireno por *Selenastrum capricornutum*.

Debido al sistema del orbital  $\pi$ , los HAPs absorben fuertemente en las regiones ultravioleta y regiones del espectro solar (Mallakin, 2000) motivo por el cual al ser expuestos a la luz solar, sufren una rápida modificación estructural, generalmente vía oxidación (Alves, 2005); generando moléculas de alta toxicidad (singulete excitado y moléculas en estado triplete) para el alga. Por este motivo para evaluar la degradación de los HAPs se ha recomendado utilizar una fuente de luz amarilla (Wharshawsky, 1995), la cual también ha demostrado no ser tóxica para *Selenastrum capricornutum* en trabajos previos en el laboratorio (Velasco, 2011; Olmos, 2013; Díaz, 2013). Sin embargo, en el presente trabajo se pudo demostrar que el exponer a las microalgas a la luz blanca natural no resultó afectarles negativamente durante los tiempos de exposición manejados. Como podemos observar en la Figura 3.3.1. la degradación bajo una fuente de luz amarilla y bajo la exposición a la luz blanca natural o solar no presentan una diferencia estadística significativa (ANOVA Simple,  $n=6$ ;  $\alpha= 0.05$ ; obtenidos con el programa Statgraphics Centurion XV, versión 15.2.06), exceptuando el punto de 24 horas, esta diferencia se puede deber a la variación por la baja concentración de los hidrocarburos con este tiempo de exposición.

Las microalgas siguieron creciendo normalmente, sin presentar muerte celular y la remoción siguió su curso de manera muy similar a como lo efectuaron en presencia de luz amarilla.

Una posible explicación se encuentra en las condiciones de exposición, la exposición más larga al BaP fue de 24 horas, de las cuales 16 horas fueron de luz y 8 de oscuridad, según la Ley de Bunsen-Roscoe y el efecto fototóxico, depende directamente de la cantidad de hidrocarburo y la intensidad de radiación absorbida (Ankley, 1995) siempre y cuando haya ausencia de defensa biológica; en nuestro caso, la exposición al hidrocarburo no fue constante, y durante estas 8 horas de oscuridad se pudo presentar la reparación de algunos de los daños generados por la suma de la radiación UV y el BaP. Si se trabajarán tiempos más largos de exposición es probable que se pudiera observar el efecto fototóxico, pues los daños que no se pueden reparar se acumularían; sin embargo a estas 24 horas las algas metabolizaron activamente y se degradó 93 % de BaP, haciendo innecesario aumentar el tiempo de exposición en las condiciones manejadas (0.266 µg/mL de hidrocarburo en el medio y por triplicado) de los bioensayos.

Otros dos puntos muy importantes de mencionar son el tipo de microorganismo usado y la intensidad de la luz. En la investigación hecha por Gala, 1993, se menciona el efecto protector que confieren la alta concentración de pigmentos carotenoides presentes en *Selenastrum capricornutum*, actuando sobre el singulete excitado y protegiendo a la microalga de la toxicidad foto-inducida por antraceno; es probable que del mismo modo estos pigmentos actúen como una defensa natural frente a la exposición de otros hidrocarburos, entre ellos el Benzo(a)pireno.

Por otro lado la intensidad de la luz, puede variar no solo estacionalmente, sino también espacialmente (Ankley, 1995), siendo muy probable que la cantidad de radiación UV presente en la fecha en la que realizó y la zona, no permitiera alcanzar el efecto genotóxico, según lo reportado por otros autores, para alcanzar este efecto es necesario estar expuesto a las cantidades adecuadas de radiación UV y de hidrocarburo (Arfsten, et.al, 1996).

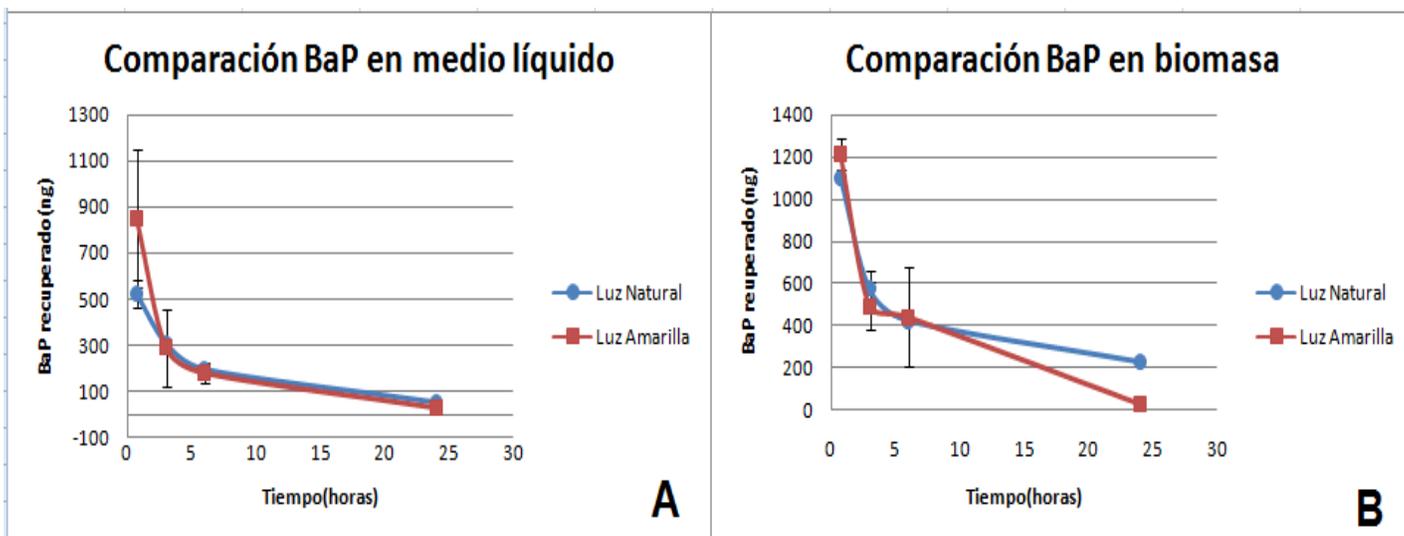


Figura 3.3.1. Comparación de la recuperación de BaP en el medio (A) y en la biomasa (B), en luz amarilla y en luz natural.

### 3.4 Efecto de la temperatura sobre la remoción de HAPs por *Selenastrum capricornutum*

#### 3.4.1 Benzo(a)pireno.

Para conocer el efecto de la temperatura en la remoción de los HAPs del medio de cultivo, se utilizaron 3 temperaturas que se encuentran dentro del rango de crecimiento de *Selenastrum capricornutum*: 20 °C, 25 °C y 30 °C (Reynolds et. al, 1975) y en las cuales los hidrocarburos aromáticos policíclicos han demostrado ser recalcitrantes (Coover & Sims, 1987). En el Gráfico 3.4.1.1 se presenta la cantidad de BaP total (suma de BaP presente en medio y BaP presente en la biomasa) y en la figura 3.4.1.1 se presentan la cantidad de BaP recuperado en el medio y en la biomasa; encontrada durante un intervalo de diferentes horas de exposición en los cultivos a las temperaturas mencionadas.

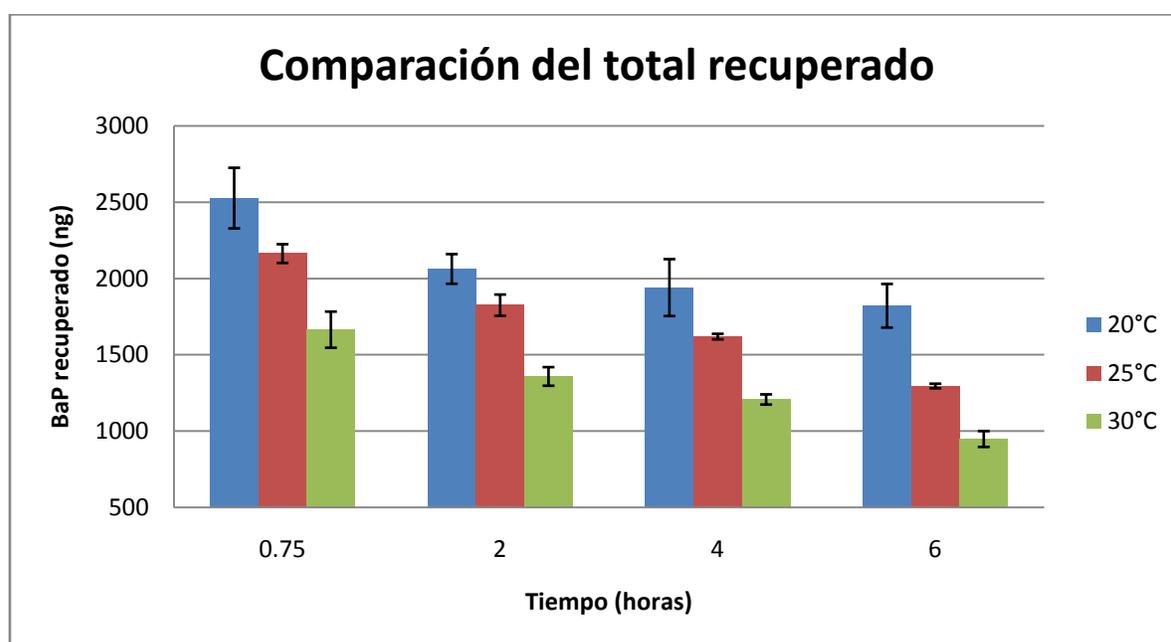


Gráfico 3.4.1.1. Comparación del total del BaP recuperado en ng, a las temperaturas de 20 °C, 25 °C y 30 °C. n=3

Al comparar la cantidad de ng recuperados a cada temperatura se pudo notar que existe una diferencia significativa entre las tres temperaturas (ANOVA Simple, prueba de rangos múltiples, n=9;  $\alpha = 0.05$ ; obtenidos con el programa Statgraphics Centurion XV, versión 15.2.06), tratándose del mismo compuesto y los mismos tiempos, se nota que conforme se aumenta la temperatura, la cantidad de BaP recuperada es menor, poco menos de 900 ng (6 horas en una temperatura de 30 °C) del hidrocarburo, representando menos de la tercera parte (22.5%) de lo expuesto inicialmente (4000 ng). Cabe hacer notar que conforme menor es la cantidad de hidrocarburo recuperada, mayor es la tasa de remoción.

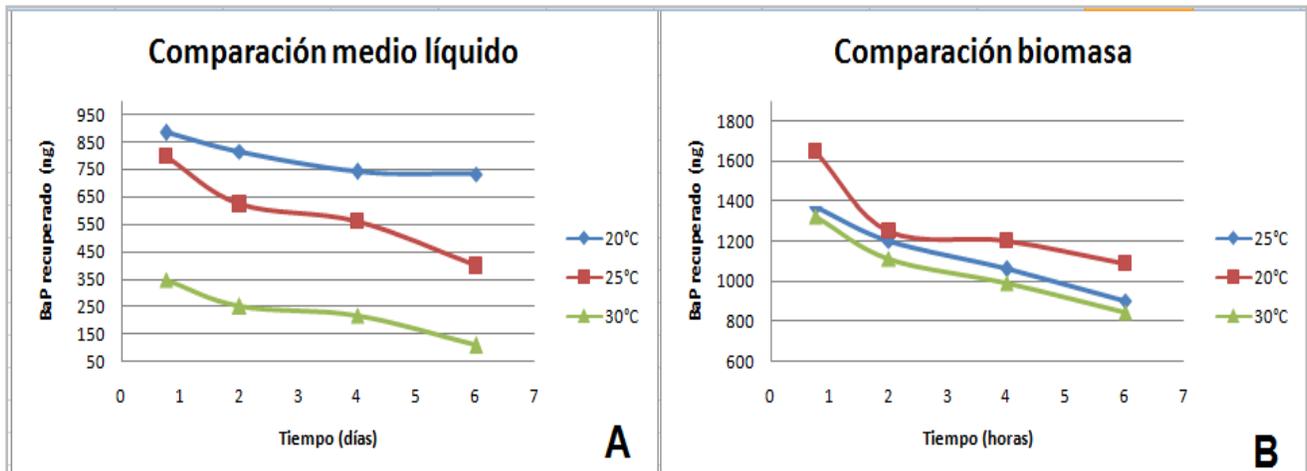


Figura 3.4.1.1. Comparación de BaP presente a diferentes horas en el medio líquido (A) y presente en la biomasa (B) a temperaturas de 20 °C, 25 °C y 30 °C.

En la tabla 3.4.1.1 se presentan las cantidades recuperadas a diferentes temperaturas con un tiempo de exposición de 0.75 horas, y se puede notar que a 20 °C se tiene un 37 % de remoción en los primeros 45 minutos (0.75 horas); cuando aumentamos la temperatura a 25 °C obtenemos una remoción del 47 % aumentando un 10 % la degradación del alga; al aumentar de 20 °C a 25 °C. La degradación se aumenta en un 12 % con la temperatura de 30 °C. Este comportamiento en la remoción parece darse de manera lineal como se observará más adelante en la Gráfica 3.4.2.

BaP			
Temperatura	ng recuperados	% BaP recuperado	% removido
20 °C	2527	63	37
25 °C	2163	53	47
30 °C	1665	41	59

Tabla. 3.4.1.1. BaP recuperado (ng), porcentaje de BaP recuperado y porcentaje de BaP removido a un tiempo de exposición de 0.75 horas.

Al efectuar la comparación de la remoción a diferentes temperaturas por separado en el medio líquido y en la biomasa representados en la figura 3.4.1.1 para el BaP se observa que la remoción va aumentando aproximadamente un 10 % conforme se aumentan 5 °C (tabla 3.4.1.1). Al aumentar la temperatura, aumentamos la remoción por *Selenastrum capricornutum* efecto que se ve ilustrado con estos datos, sabiendo que los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentan alta estabilidad en este rango de temperaturas (Coover & Sims, 1987; Weinger & Stermitz, 1988).

### 3.4.2 Antraceno.

Para este compuesto y con base a lo obtenido para BaP se comparó únicamente el efecto de la temperatura al tiempo de 0.75 horas. En la Figura 3.4.2.1. Se puede observar la comparación de la cantidad de antraceno recuperada en medio líquido (A) y la recuperada en la biomasa (B).

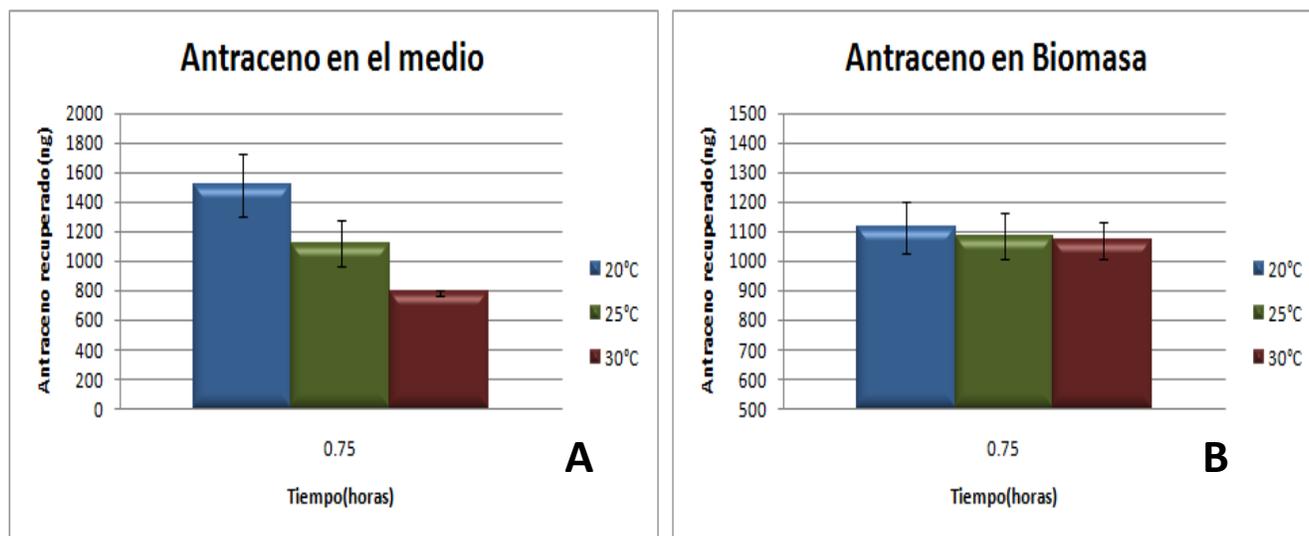
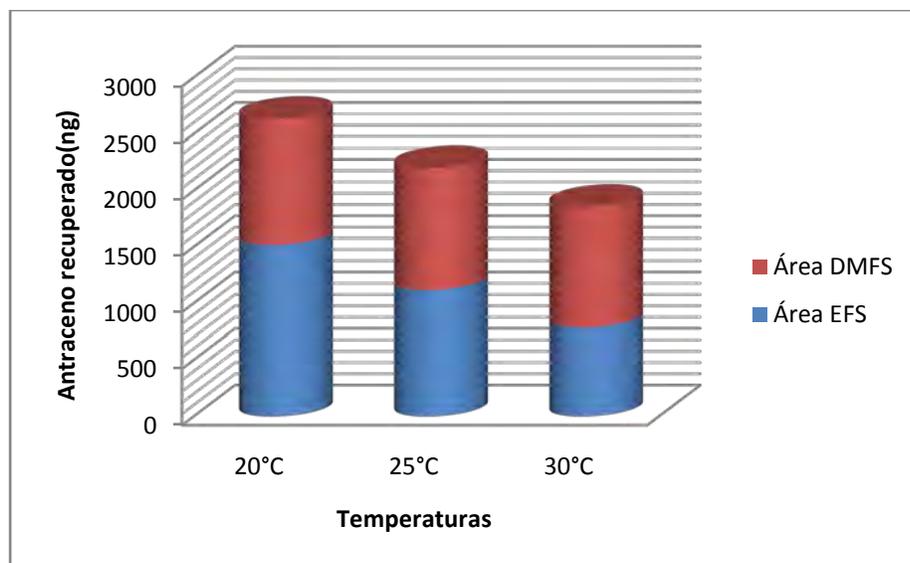


Figura 3.4.2.1. Comparación de Antraceno presente a las 0.75 hrs en el medio líquido (A) y presente en la biomasa (B), a 20 °C, 25 °C y 30 °C.

En la Gráfica 3.4.2.1 podemos observar que al igual que en el BaP se ve una marcada diferencia entre el antraceno presente en el medio a las tres diferentes temperaturas (ANOVA Simple, prueba de rangos múltiples,  $n=9$ ;  $\alpha=0.05$ ; obtenidos con el programa Statgraphics Centurion XV, versión 15.2.06), se recupera 2633 ng de Antraceno a 20 °C, 2202 ng de Antraceno a 25 °C y 1857 ng de Antraceno a 30 °C, esto se debe al aumento en el metabolismo del hidrocarburo, así como al aumento en la biodisponibilidad del mismo. Por otra parte, la concentración del hidrocarburo presente en la biomasa también disminuye con el tiempo en las tres temperaturas pero muy lentamente, por lo tanto se podría suponer que se concentra la misma cantidad del hidrocarburo en la célula y lentamente se va desapareciendo; esto podría indicar que la acumulación del hidrocarburo se da primero en las células y posteriormente se va degradando poco a poco, siendo las 0.75 hrs un tiempo demasiado corto para que la microalga se deshaga en buena proporción del hidrocarburo retenido.



Gráfica 3.4.2.1. Antraceno total recuperado (Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida).

Antraceno			
Temperatura	ng recuperados totales	% ANT recuperado	% removido
20 °C	2633	64	36
25 °C	2202	55	45
30 °C	1857	45	55

Tabla. 3.4.2.1. Antraceno total recuperado (ng), porcentaje de Antraceno recuperado y porcentaje de Antraceno removido a un tiempo de exposición de 0.75 horas.

Para el Antraceno se vio un claro aumento en la cantidad recuperada con la disminución de la temperatura; cuando se expuso a las algas a una temperatura de 20 °C, como se observa en la tabla 3.4.2.1 se recuperó el 35 % del antraceno en el medio, mientras que al aumentar la temperatura a 25 °C la cantidad que se removió aumentó en casi un 10 % (44 %), siendo superior esta remoción (aproximadamente del 20 %) al aumentar la temperatura a 30 °C (54 %). Dando evidencia, de que si bien, el hidrocarburo se está reteniendo en la célula, el calor parece ser un medio eficaz para acelerar la biorremoción (Mohn & Stewart, 2000).

### 3.4.3 Pireno.

El Pireno presenta una tendencia similar al Antraceno, pues la cantidad de hidrocarburo presente en la biomasa disminuye lentamente al aumentarse la temperatura (Figura 3.4.3.1-B), viéndose más notoria esta disminución en el hidrocarburo presente en el medio líquido (Figura 3.4.3.2); esto puede deberse a las propiedades de los hidrocarburos de unirse a la materia orgánica, siendo en este caso la pared celular o las membranas de las microalgas, uniéndose a él, hasta llegar a un punto de saturación; posteriormente el alga (*Selenastrum capricornutum*) remueve poco a poco lo que quedó disponible en el medio para ser degradado y después lo que

quedó retenido en las células, efecto que no podemos observar, debido a los tiempos con los que se trabajó.

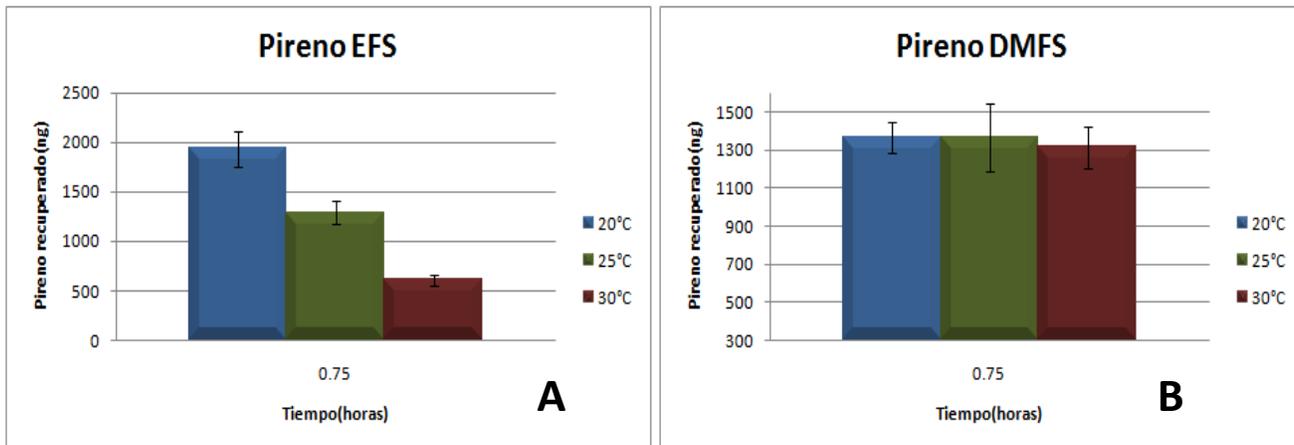
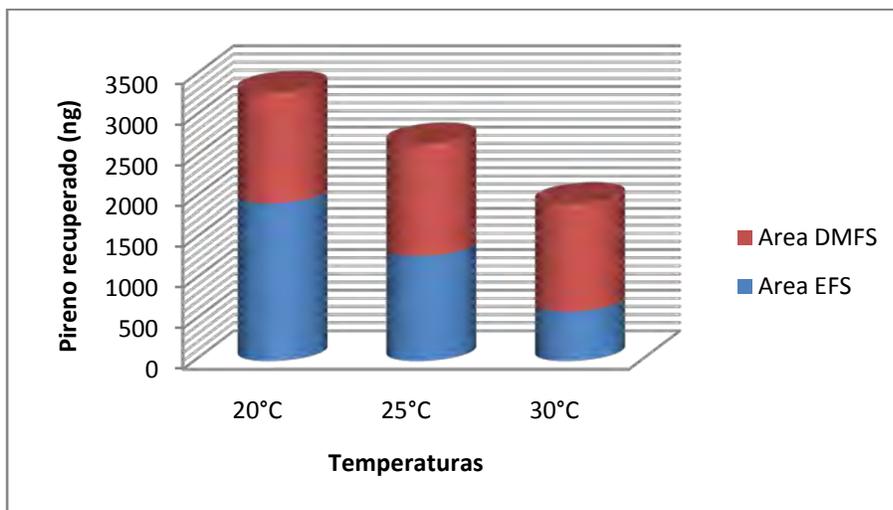


Figura 3.4.3.1. Comparación de Pireno presente en el medio (A) y presente en la biomasa (B), a 20 °C, 25 °C y 30 °C.

Del mismo modo que con el BaP y el Antraceno, se ve una tendencia de recuperar menos hidrocarburo conforme aumenta la temperatura, en este caso se recuperaron 1924 ng de hidrocarburo a la temperatura de 30 °C, con ensayos de exposición de 0.75 horas, mientras que al mismo tiempo a temperatura de 25 °C (similar a la temperatura ambiente) se recupera 2658 ng del hidrocarburo y a 20 °C se recuperan 3296 ng de pireno (Gráfica 3.4.3.1).



Gráfica 3.4.3.1. Pireno total recuperado (Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida).

Pireno			
Temperatura	ng recuperados	% PY recuperado	% removido
20 °C	3296	82	18
25 °C	2658	66	34
30 °C	1924	48	52

Tabla. 3.4.3.1. Pireno recuperado (ng), porcentaje de Pireno recuperado y porcentaje de Pireno removido a un tiempo de exposición de 0.75 horas.

En el Pireno se ve una tendencia similar a las antes presentadas, por los otros compuestos como se puede observar en la tabla 3.4.3.1, notándose una disminución de aproximadamente un 10 %, cuando se utiliza una temperatura cercana a la temperatura ambiente, se degrada un 33 % del hidrocarburo, en los primeros 45 minutos, y cuando subimos la temperatura a 30 °C, se puede ver que la degradación aumenta al 51 %.

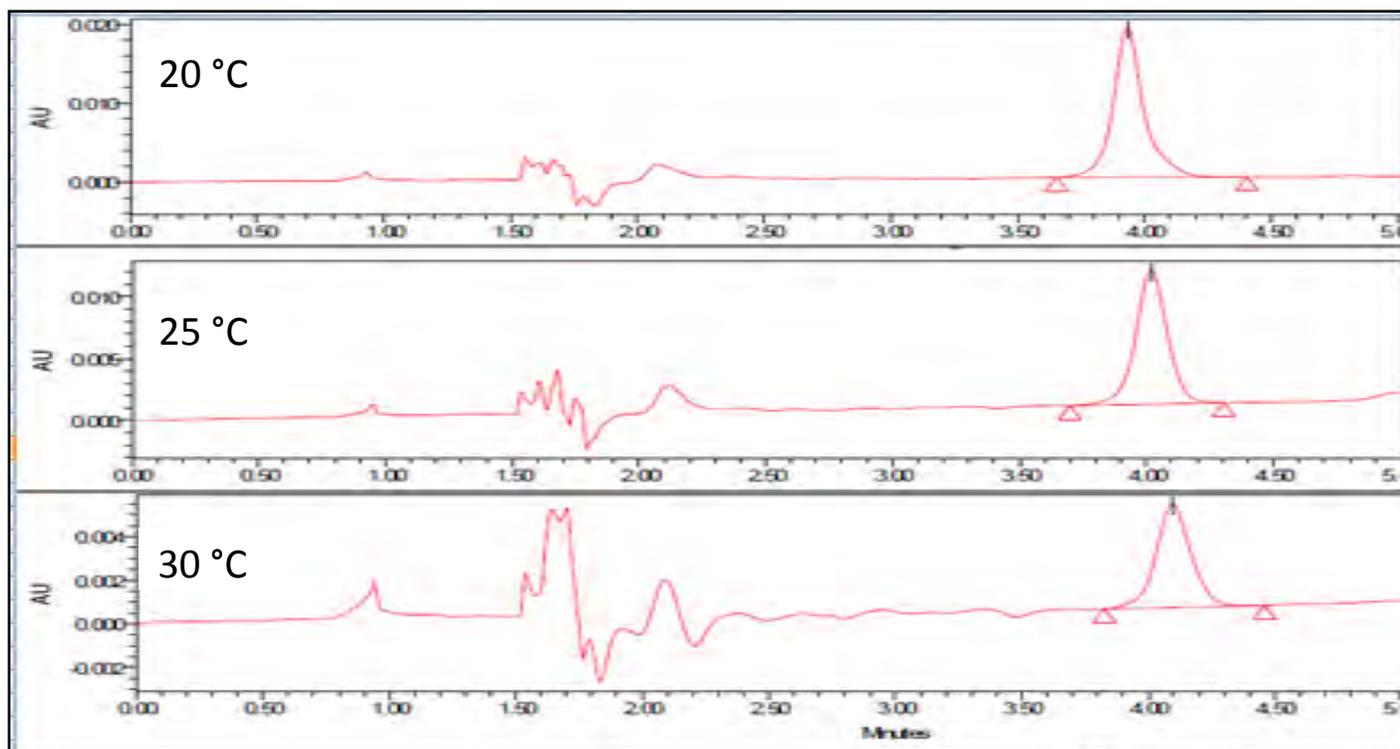


Figura 3.4.3.2. Cromatogramas de Pireno extraído del medio líquido a 0.75 horas, en temperaturas diferentes. Condiciones: Columna analítica Nucleosil C18, con tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$ , bucle de inyección de 20  $\mu\text{L}$ ; fase móvil MeOH 95 % 1mL/min, detección UV  $\lambda=239$  nm.

### 3.4.4 Benzo(a)antraceno.

Como observamos en la Figura 3.4.4.1, si bien en las tres temperaturas se ve una disminución gradual de la cantidad medida de hidrocarburo de 20 a 30 °C, en el medio líquido, a una temperatura de 30 °C, se puede notar que aquí se da una baja notoria de hidrocarburo recuperado en la biomasa a diferencia de lo que ocurrió con los demás HAPs

(Figura 3.4.4.1-B), esto es a causa de la naturaleza del compuesto, siendo este más apolar que los compuestos previamente analizados (pireno y antraceno) y compartiendo más características con el BaP.

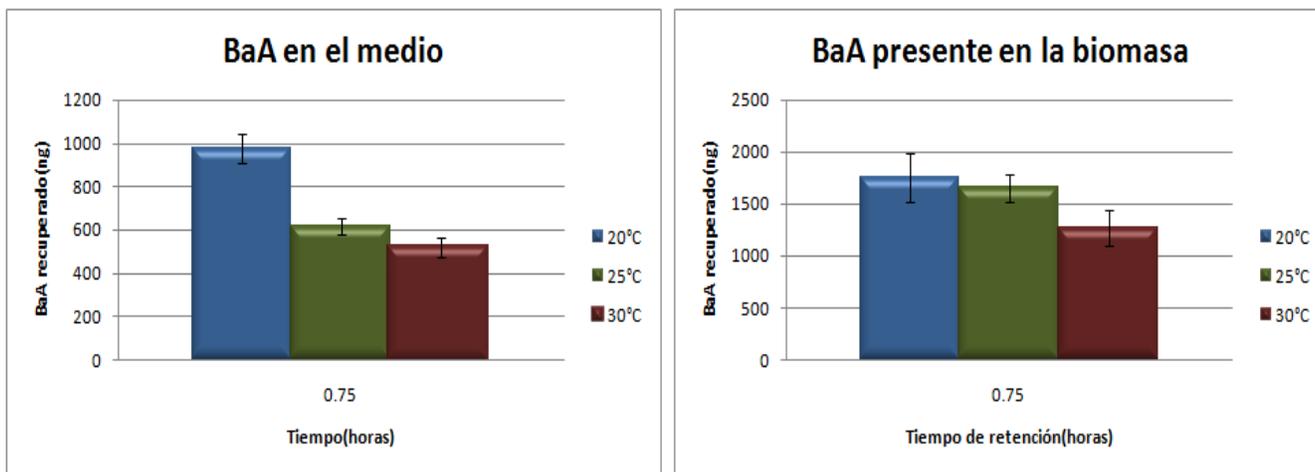
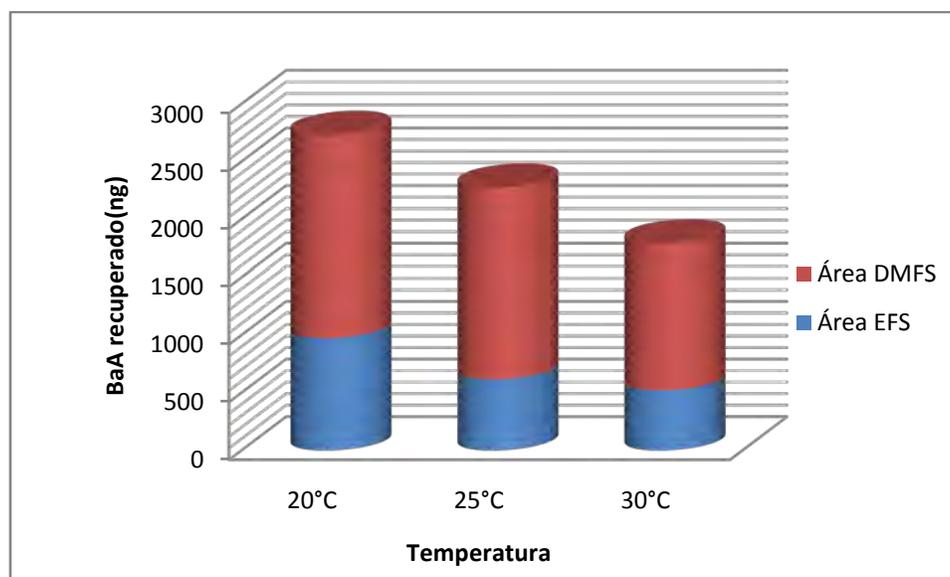


Figura 3.4.4.1. Comparación de BaA presente en el medio (A) y presente en la biomasa (B), a 20 °C, 25 °C y 30 °C.

Sin embargo la proporción total de hidrocarburo recuperado; cómo podemos observar en la Gráfica 3.4.4.1, sigue presentando una tendencia muy similar a la de los anteriores tres compuestos, obteniendo menor cantidad de hidrocarburo remanente conforme aumentamos la temperatura. De este modo se tiene la menor cantidad de hidrocarburo a 30 °C (1790 ng de BaA total), y del mismo modo que con los anteriores la mayor cantidad se expresa en una temperatura de 20 °C (2730 ng de BaA total).



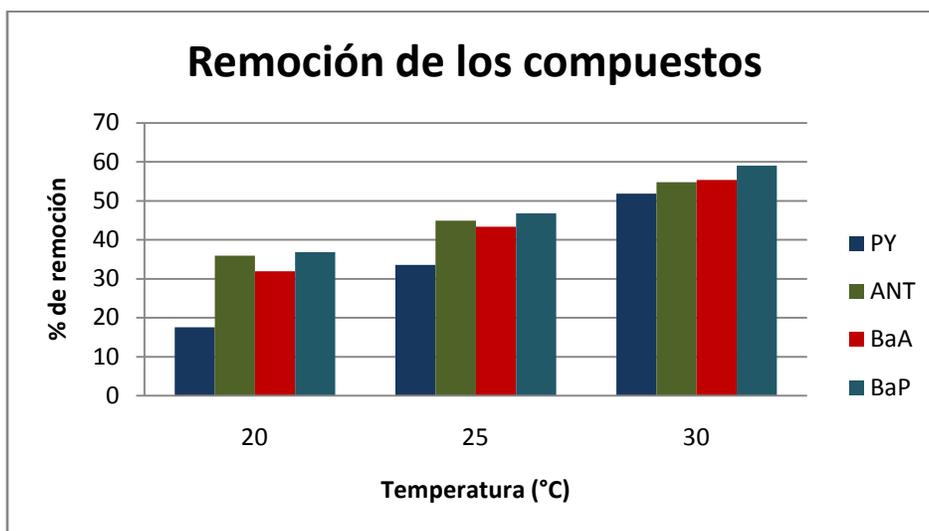
Gráfica 3.4.4.1. BaA total recuperado (Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida).

Al hacer una comparación con el comportamiento de los demás compuestos podemos ver, que el BaA, no solo presenta una tendencia similar a la de Antraceno, Pireno y BaP, es decir que al aumentar la temperatura 5 °C vemos que la degradación se ve aumentada aproximadamente de un 10 a un 18 % como se puede observar en la tabla 3.4.4.1; sino que también vemos que los cuatro compuestos en una temperatura de 30 °C degradan más del 50 % del hidrocarburo inicial, es decir en 45 minutos es tan degradando la mitad del hidrocarburo.

BaA			
Temperatura	ng recuperados	% BaA recuperado	% removido
20 °C	2730	68	32
25 °C	2273	57	43
30 °C	1790	45	55

Tabla. 3.4.4.1. BaA recuperado (ng), porcentaje de BaA recuperado y porcentaje de BaA removido a un tiempo de exposición de 0.75 horas.

Del mismo modo al ver los datos de los cuatro hidrocarburos podemos ver en la Gráfica 3.4.1 que aunque se reporta que el crecimiento de las microalgas no es óptimo a una temperatura de 20 °C, *Selenastrum capricornutum*, ha demostrado tener capacidad de degradar Antraceno, Pireno, BaP y BaA, bajo estas condiciones de temperatura, siendo con Pireno, con quien se muestra una degradación más pobre (17 %), y del mismo modo, se ve que en 30 °C se mejora en aproximadamente un 20 % la degradación, en comparación con la temperatura de 20 °C. También se observa que a una temperatura de 30 °C, *Selenastrum capricornutum*, tiene la capacidad de remover más del 50 % de antraceno, pireno, Benzo(a)antraceno y Benzo(a)pireno, en los primeros 45 minutos de exposición a cada uno de los compuestos.

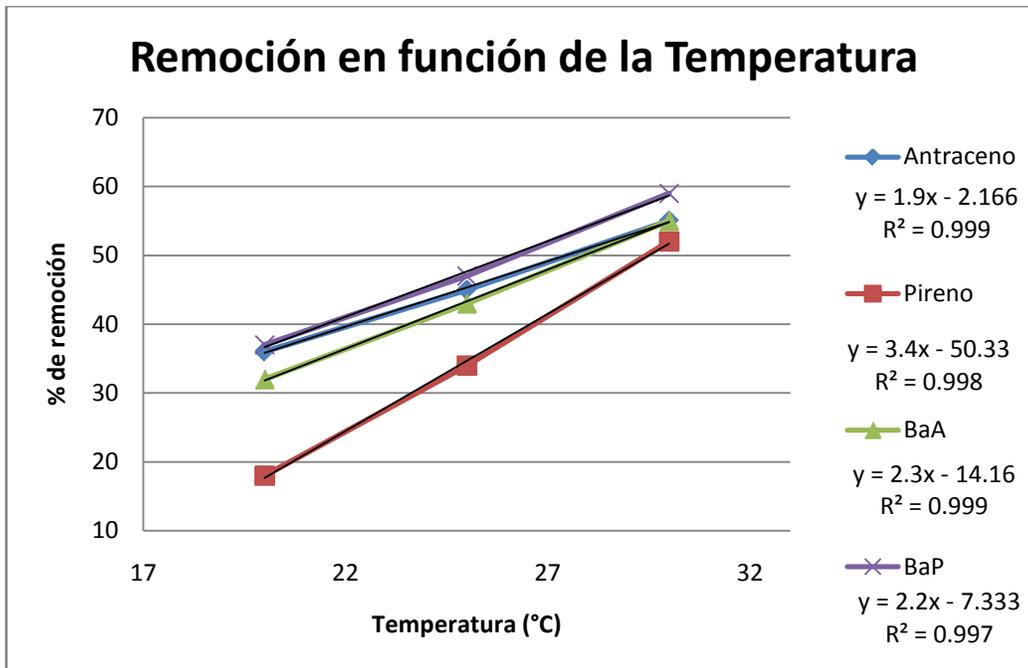


Gráfica 3.4.1. Remoción total a las 0.75 horas (Biomasa y medio) de los cuatro HAPs usados, a 20 °C, 25 °C y 30 °C.

En anteriores trabajos se ha demostrado que un rango eficiente para la degradación de los HAPs se encuentra entre los 20-30 °C (Mohn & Stewart), por lo cual era importante conocer la capacidad de *Selenastrum capricornutum*, para degradar a 20 °C, 25 °C y 30 °C. El aumento en la temperatura demuestra tener un efecto positivo sobre la degradación de los hidrocarburos pues como se ve en la Gráfica 3.4.1 hay una diferencia estadísticamente significativa para los cuatro compuestos (ANOVA Simple, prueba de rangos múltiples, n=9;  $\alpha=0.05$ ; obtenidos con el programa Statgraphics Centurion XV, versión 15.2.06), y hay una disminución de las concentraciones de estos compuestos al ir aumentando la temperatura, este efecto se debe a una serie de factores, entre ellos la solubilidad de los hidrocarburos la cual se ve aumentada a temperaturas más altas; al aumentar la solubilidad, se incrementa la biodisponibilidad de los hidrocarburos, por que los HAPs disueltos son más fácilmente tomados por las células que aquellos adsorbidos (Marsili, 2001).

Como bien sabemos, los HAPs son compuestos de alta persistencia en el medio ambiente, y no son compuestos que se degraden fácilmente bajo condiciones naturales (Eriksson, 2001), al aumentar la temperatura, estamos facilitando la actividad metabólica de *Selenastrum capricornutum*, la velocidad de difusión y la transferencia de masa (Eriksson, 2001; Simarro et. al, 2012).

Otro factor importante en la biodegradación de los HAPs son las enzimas implicadas en este proceso, si bien las enzimas son propias de cada microorganismo, se sabe que algunas de las enzimas implicadas en la degradación de los HAPs son la oxigenasa, la deshidrogenasa y la enzimas lignolíticas (Haritash, 2009), y estas enzimas son activas a diferentes temperaturas, la mayoría de las mismas tienen un óptimo a temperaturas moderadas (20-40 °C) (Haritash, 2009). Las temperaturas que se usaron en este trabajo se encuentran dentro de este rango.



Gráfica 3.4.2. Porcentaje de remoción de Antraceno, Pireno, BaA y BaP, en función de la temperatura (20 °C, 25 °C y 30 °C).

En la gráfica 3.4.2 se puede observar la tendencia perfectamente lineal del porcentaje de remoción en función de la temperatura para todos los HAPs estudiados en el intervalo de temperaturas en el que se trabajó de 20-30 °C; volviéndose interesante conocer el comportamiento de esta remoción a temperaturas por encima de los rangos trabajados y por debajo de los mismos.

Se observa que el cambio más grande (mayor pendiente) se da en el pireno, seguido por el BaA, el BaP y el antraceno en ese orden.

## CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.

Se pudo demostrar reproducibilidad y linealidad en los dos métodos de extracción acoplados a la cromatografía de líquidos y detección UV utilizados en este trabajo: Extracción en Fase Sólida, para los compuestos en el medio y Dispersión de Matriz en Fase Sólida, para los compuestos retenidos en la biomasa.

La cromatografía de líquidos de alta resolución, fue eficiente para la detección y cuantificación de Antraceno, Pireno, Benzo(a)antraceno y Benzo(a)pireno, mostrando límites de detección, cuantificación y linealidad del sistema aceptables.

Con la ayuda de las metodologías anteriores, fue posible dar un seguimiento detallado del comportamiento de *Selenastrum capricornutum*, en presencia de los hidrocarburos, bajo exposición a luz blanca y bajo diferentes temperaturas.

No se observó diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje removido al utilizar una luz natural y la luz amarilla, posiblemente para que se observara el efecto fototóxico debió exponerse a las algas a tiempos mayores y sin las 8 horas de oscuridad del ciclo de exposición.

A las 24 horas de exposición con luz natural se degradó el 93 % de Benzo(a)pireno, sin mostrarse el efecto fototóxico y al mismo tiempo permitiendo la remoción del hidrocarburo casi por completo.

La temperatura tuvo un efecto marcado en los cuatro hidrocarburos (Antraceno, Pireno, Benzo(a)antraceno y Benzo(a)pireno), pues se observó que conforme se aumenta se favorecen las interacciones y los hidrocarburos aumentan su solubilidad, quedando más disponibles para ser removidos.

*Selenastrum capricornutum* demostró tener capacidad para remover los cuatro hidrocarburos a 20 °C, degradando del 17-36 % en las primeras 0.75 horas de exposición.

Se demostró la capacidad de la microalga, *Selenastrum capricornutum* para remover los cuatro hidrocarburos a temperaturas superiores a la temperatura ambiente estándar (25 °C), mejorando la remoción en un 10 %, removiendo más de la mitad del hidrocarburo en los primeros 45 minutos de exposición (51-59 % degradado).

## BIBLIOGRAFÍA.

### A

- 1.- Alfonso Méndez C. (2009). Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y la acuicultura: tesis doctoral. Universidad de Santiago Compostela. PP. 42-50.
- 2.- Alves de Lima Ribeiro F., Castro Ferreira M.M. (2005). QSAR model of the phototoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 719, 191-200.
- 3.- Ankley G.A., Erickson R.J., Phipps G.L., Mattson V.R., Kosian P.A., Sheedy B.R., Cox J.S. (1995). Effects of light Intensity on the Phototoxicity of Fluoranthene to a Benthic Macroinvertebrate. *Environmental Science & Technology* 29, 2828-2833.
4. - 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.

### B

5. –Baker S.A. (2000). Review. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A* 880, 63-68.
6. – Barker S.A. (2007). Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *Journal of biochemical and biophysical methods* 70, 151- 162.
- 7.- Blaise C., Féraud J.F. (2006). Small- scale Freshwater Toxicity Investigations: Volume 1 Toxicity test Methods. Editorial Springer. PP. 142-143.

### C

- 8.- Cabrera Silva S., Lissi Gervaso E., Honeyman Mauro J. (2005). Radiación Ultravioleta y Salud. Santiago de Chile. Editorial Universitaria. PP. 92- 109.
- 9.-Calessio E., Pra D., Idalgo D., Pegas J.A., Wiegand F.(2012). DNA- damage effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from urban area, evaluated in lung fibroblast cultures. *Environmental Pollution* 162, 430-438.
10. - Camel V. (2003). Review. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B* 58, 1177-1233.
- 11.-Canosa Rodríguez M.P. (2008). Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales: Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. PP. 39-40.
- 12.-Castillo Morales G. (2004). Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. IDRC. PP. 80-81.
- 13.- Castillo Rodríguez F. (2005). Biotecnología ambiental. España, Editorial Tebar. PP 366- 367.

14.- COFEPRIS (2011). Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. Clave: CCAYAC-P-058. México D.F.

15.-Consolider- tragua. Protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios. Consulta 19 Febrero 2014. En línea: [http://www.consolider-tragua.com/documentos/protocolo\\_muestreo\\_analisis.pdf](http://www.consolider-tragua.com/documentos/protocolo_muestreo_analisis.pdf).

16.- Coover M.P., Sims R.C. (1987). The effect of temperature on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Persistence in an Unacclimated Agricultural Soil. *Hazardous waste & Hazardous materials* 4, 69-82.

17.- Cruz- Guzmán Alcalá M. (2007). La contaminación de suelos y aguas. Su prevención con nuevas sustancias naturales. Volume 74 of ciencias, Universidad de Sevilla. PP 95-97.

18.- Culturecollection of alga and protozoa. *Selenastrum capricornutum*. Consulta: 23 Enero 2014. En línea: [http://www.ccap.ac.uk/strain\\_info.php?Strain\\_No=278/4](http://www.ccap.ac.uk/strain_info.php?Strain_No=278/4).

## D

19.-Díaz G. (2013) Evaluación de la biodegradación de hidrocarbros aromáticos Policíclicos por la microalga *Selenastrum capricornutum* mediante metodología de Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida Acoplado a CLAR-UV. Tesis, Facultad de Química, UNAM.

## E

20.- Eriksson M., Ka J., Mohn W.W. (2001). Effects of Low Temperature and Freeze-Thaw Cycles on Hydrocarbon Biodegradation in Artic Tundra Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5107-5112.

## F

21.- Fernández Bremauntz A., Yarto Ramírez M., Castro Díaz J., (2004). Las sustancias tóxicas persistentes. México. Instituto Nacional Ecología. PP. 173-188.

22.- Fu P.P., Xia Q., Sun X., Yu H. (2012). Phototoxicity and Environmental Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HAPs)- Light- Induced Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and DNA Damage. *Journal of Environmental Science and Health Part C*. 30, 1-41.

## G

23. - Gala W.R., Giesy J.P. (1992). Photo-Induced Toxicity of Anthracene to the Green Alga, *Selenastrum capricornutum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23, 316-323.

24. - Gala W.R., Giesy J.P. (1993). Using the carotenoid biosynthesis inhibiting herbicide, Fluridone, to investigate the ability of carotenoid pigments to protect algae from the photo-induced toxicity of anthracene. *Aquatic Toxicology* 27, 61-70.

## H

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

26.- Harris D.C. (2007). Análisis Químico Cuantitativo Tercera Edición. Barcelona. Editorial Reverté. PP. 553-571.

27. - Hatch A.C., Burton Jr G.A. (1999). Photo-induced toxicity of PAHs to *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*: effects of mixtures and behavior. *Environmental Pollution* 106, 157-167.

28.-Hawthorne S.B., Grabanski C.B., Martin E., Miller D.J. (2000). Comparisons of Soxhlet Extraction, Pressurized Liquid Extraction, Supercritical Fluid Extraction and Subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A* 892, 421-433.

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

## I

30.- Instituto Catalán de Oncología. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Consulta: 10 Agosto 2013. En línea: <http://www.ugt.es/saludlaboral/Hidrocarburos.pdf>.

31.- Instituto Nacional de Ecología. Técnicas de remediación. INE. Consulta: 27 Enero 2014. En línea: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/tecnolog.html>.

## J

32.- Johnsen A.R., Karlson U. (2005). PAH Degradation capacity of soil microbial communities- Does it depend on PAH exposure. *Microbial Ecology* 50, 488-495.

## K

33.- Kirso U., Irha N. (1998). Role of Algae in fate of carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 83-89.

## L

34.- Lin Ke, Lijuan Luo., Ping Wang., Tiangang Luan., Nora Fung-Yee Tam. (2010). Bioresource Technology: Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology* 101, 6950-6961.

## M

35. - Mallakin A., Dixon D.G., Greenberg B.M. (2000). Pathway of anthracene modification under simulated solar radiation. *Chemosphere* 40, 1435- 1441.

36.- Man Ngai Chan S., Luan T., Wong M.H., Fung Yee Tam N. (2006). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1772-1779.

37.- Marsili L., Caruso A., Fossi M.C., Zanardelli M., Politi E., Focardi S. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in subcutaneous biopsies of Mediterranean cetaceans. *Chemosphere* 44, 147-154.

38.- 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.

39.- Mohn W.W., Stewart G.R. (2000). Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1161-1172.

## **N**

40.- Nadal M., Wargent J.J., Jones K.C., Paul N.D., Schuhmacher M., Domingo J.L. (2006). Influence of UV-B Radiation and Temperature on Photodegradation of PAHs: Preliminary Results. *Journal of Atmospheric Chemistry* 55, 241-252.

## **O**

41.- Olmos Espejel J.J. (2013). Metodologías cromatográficas en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microorganismos. Tesis, Facultad de Química, UNAM.

## **P**

42.-Pena M.T. (2010). Desarrollo de nuevas metodologías de preparación de muestra para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices medioambientales y alimentarias. Tesis. Facultad de Química. Universidad Santiago Compostela.

43.- Peña A., Morales J., Labastida C., Capella S. (2003). Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 19, 13-23.

## **R**

44.- Reynolds J.H., Middlebrooks E.J., Porcella D.B., Grenney W.J. (1975). Effects of Temperature on Growth Constants of *Selenastrum capricornutum*. *Water Pollution Control Federation* 47, 2420-2436.

## **S**

45.- Simarro R., González N., Bautista L.F., Molina M.C. (2013). Biodegradation of high- molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a wood- degrading consortium at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology* 83, 438-449.

46.-Suchan P., Pulkrabová J., Hajšlová J., Kocourek V. (2004). Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples. *Analytica Chimica Acta* 520, 193–200.

## U

47.- UNAM (2007). Química Analítica Instrumental II, Técnicas Cromatográficas. Facultad de Química, México D.F. Consulta: 27 de Enero 2014. En línea: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)

48.-Universidad Central de Venezuela. Guía de Cromatografía. Consulta: 10 Enero 2014. En línea: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf>.

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

## V

50.- Varanasi U., (1989). Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Editorial CRC Press. PP 60-63.

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

## W

52.-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, 131- 148.

53.- Weininger S.J., Stermitz F.R., (1988). Química Orgánica. Barcelona. Editorial Reverté. PP 573-574.

54. - Wong P.K., Wang J. (2001). The accumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in lubricating oil over time- a comparison of Supercritical Fluid and Liquid- Liquid Extraction methods. *Environmental Pollution* 112, 407-415.

## Y

55. - Yao C., Pitner W.R., Anderson J.L. (2009). Ionic liquids containing the tris (pentafluoroethyl) trifluorophosphate anion: a new class of highly selective and ultra hydrophobic solvents for the extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using single Drop Microextraction. *Analytical Chemistry* 81, 5054-5063.

## Z

56. - Żwir-Ferenc A., Biziuk M. (2006). Review. Solid Phase Extraction Technique-trends, opportunities and applications. *Polish J. of Environ Stud* vol. 15, No5, 677-690.

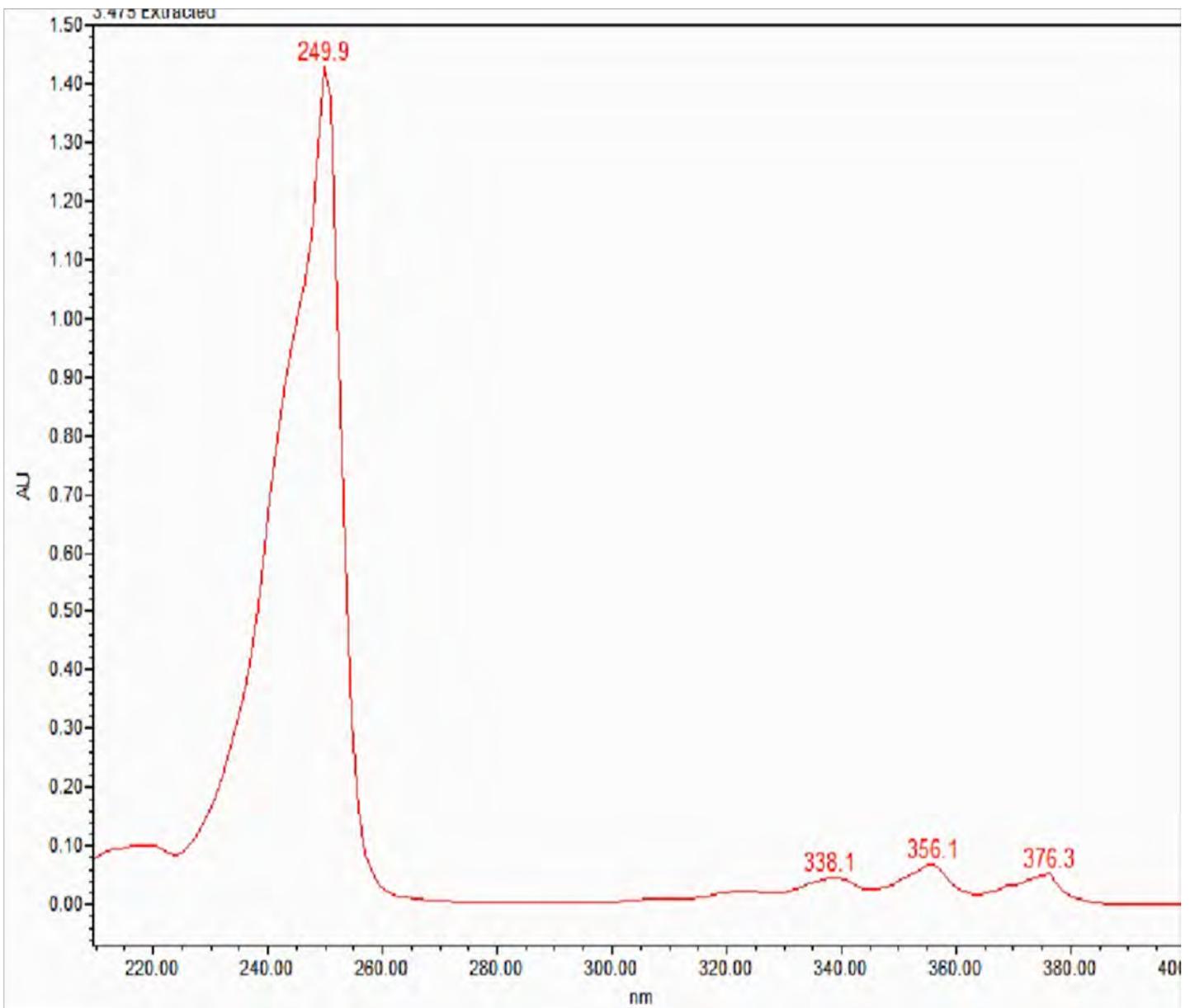
## ANEXO I

Espectros de absorción UV de los cuatro hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizados en este trabajo.

Los siguientes espectros fueron obtenidos con ayuda del detector UV de arreglo de fotodiodos 2998 (Waters), con un barrido de 200-400 nm.

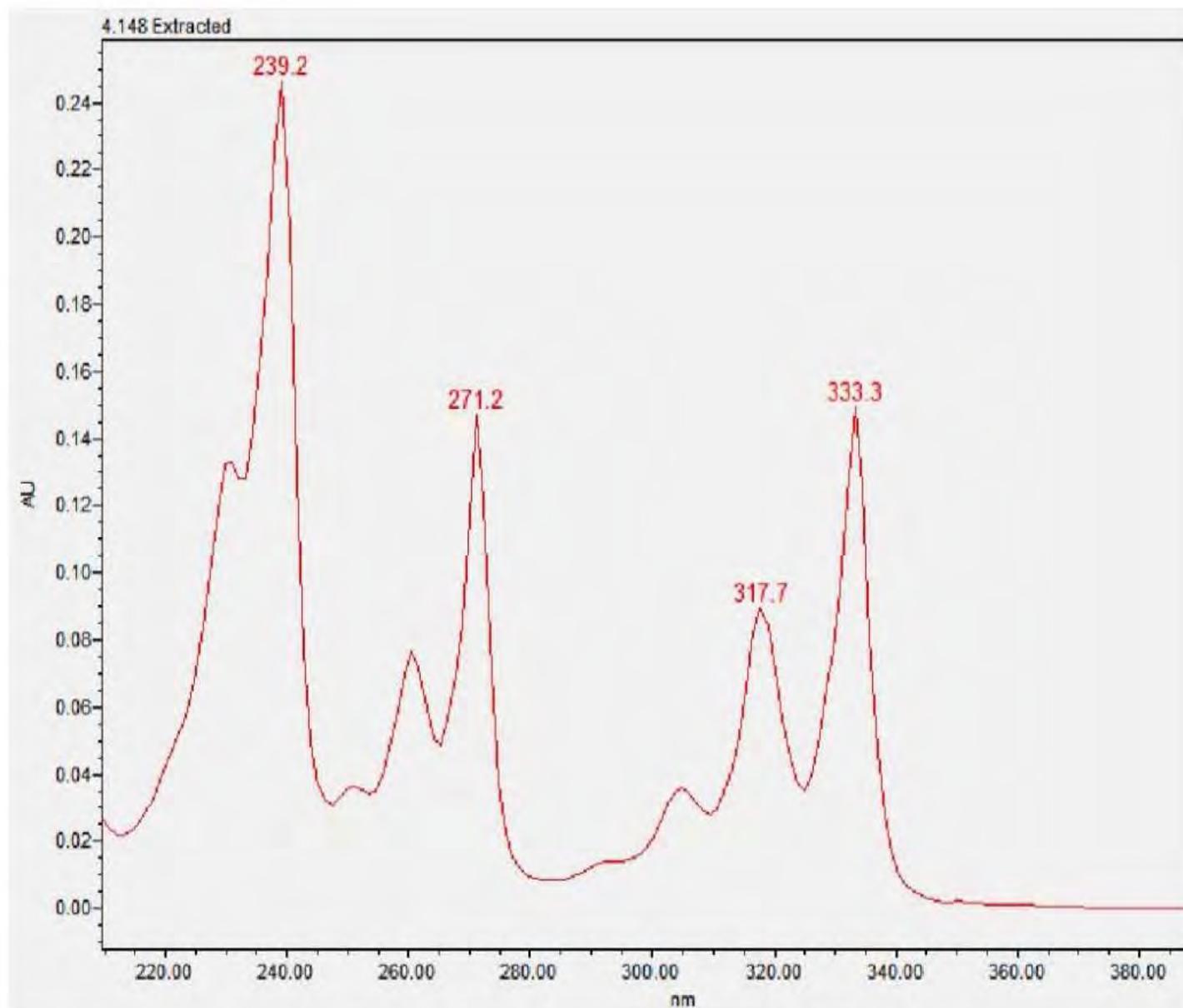
### Antraceno.

Disolución inyectada 1.5 µg/mL. Fase móvil isocrática: MeOH 95%, flujo: 1 mL/ min.



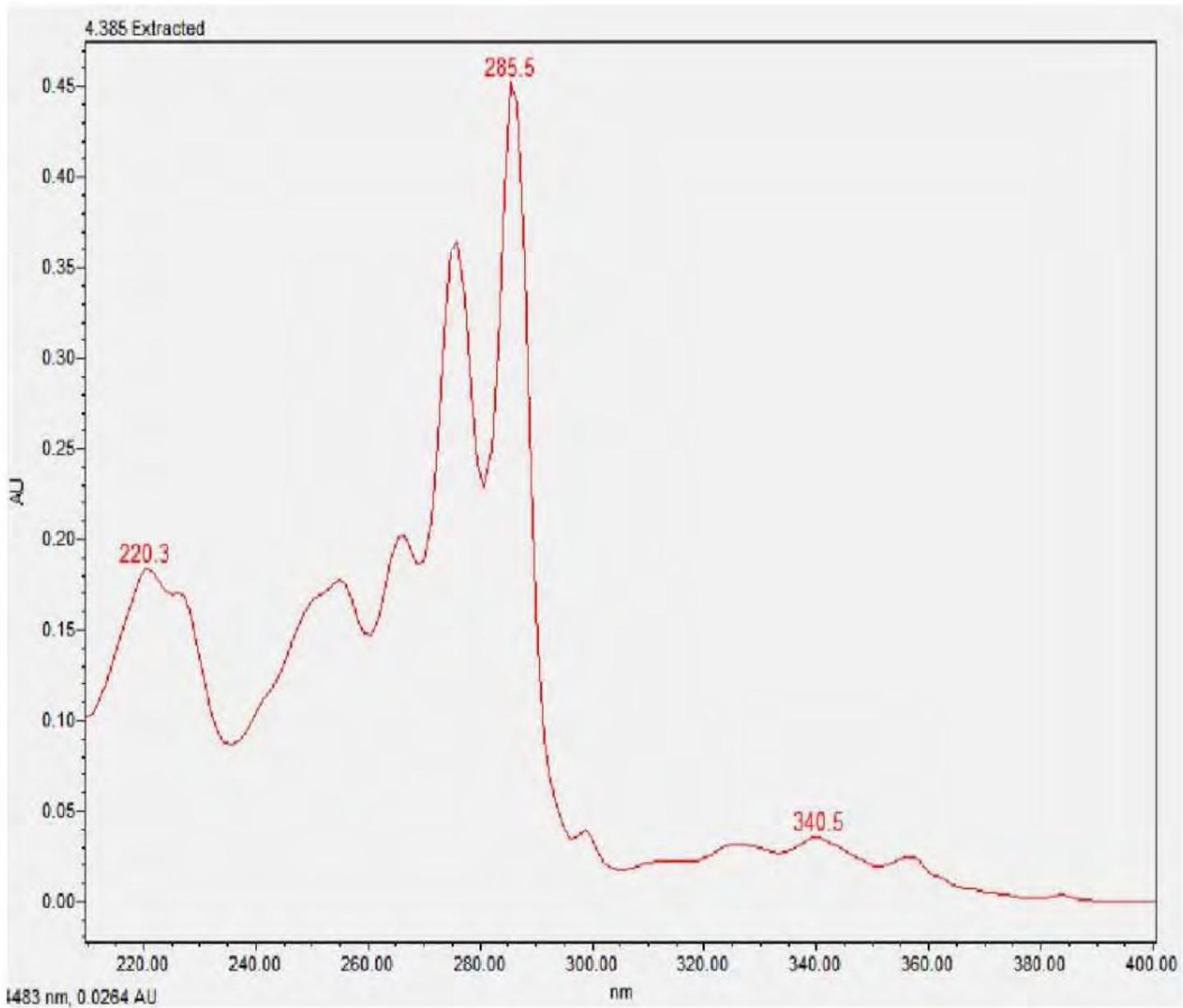
## Pireno.

Disolución inyectada 1.5 µg/mL. Fase móvil isocrática: MeOH 95%, flujo: 1 mL/ min.



**Benzo[a]antraceno.**

Disolución inyectada 1.5 µg/mL. Fase móvil isocrática: MeOH 95%, flujo: 1 mL/ min.



## Benzo[a]pireno.

Disolución inyectada 1.5 µg/mL. Fase móvil isocrática: MeOH 95%, flujo: 1 mL/ min.

