



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EXTRACCIÓN SELECTIVA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS
PRESENTES EN CULTIVOS DE MICROALGAS VERDES POR MEDIO DE TÉCNICAS
BASADAS EN EL USO DE ADSORBENTES**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
Q. IRAN OCAÑA RIOS

TUTOR
DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE DE 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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por el apoyo otorgado en mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el proyecto de Ciencia Básica 166389 y la beca de maestría otorgada (No. de Becario 273473).

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el proyecto PAPIIT IT203214-3.

A mi tutora la Dra. Martha Patricia García Camacho, por su orientación, seguimiento y supervisión continua del trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Fernando Hernández, Jessica Valdés, Maribel Hernández, Alan García, Miriam Díaz, Evelyn Beltrán y Adriana Montaña, por su amistad y colaboración.

A mis amigos Félix Araujo, Jesús Olmos, Zaira Castañeda, Alejandra Millán, Alejandra Núñez y Pilar Espinosa, por darme momentos tan memorables y divertidos, por su cariño, amistad y apoyo.

A los miembros del jurado, por los valiosos comentarios y sugerencias realizados al presente trabajo.

Presidente	Dr. Rafael de Jesús Villalobos y Pietrini
Vocal	Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
Vocal	Dra. Josefina Barrera Cortés
Vocal	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
Secretario	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

Dedicado a mi mamá Silvia y a mi hermana Silvia Iris, que han estado en los momentos más importantes de mi vida, por el invaluable amor y apoyo que siempre me han dado, sin ustedes nada de esto sería posible.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de la

Dra. Martha Patricia García Camacho

en el Laboratorio 208 de Análisis de Trazas, edificio F, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, UNAM

Presentación del trabajo en Congreso:

XXVII Congreso Nacional de Química Analítica, realizado en la ciudad de Puebla, Puebla del 25 al 27 de junio de 2014. Título: *Extracción selectiva con adsorbentes de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en cultivos de microalgas*. Modalidad: Cartel.

Índice de Tablas	1
Índice de Figuras	4
Abreviaturas	7
Resumen	9
Introducción	11
Objetivos	13
Capítulo 1. Antecedentes	14
1.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's)	14
1.1.1. Estructura	14
1.1.2. Propiedades fisicoquímicas	15
1.1.3. Fuentes de producción y toxicología	16
1.1.4. Degradación de HAP's por microorganismos.....	17
1.2. Características de la microalga verde <i>Selenastrum capricornutum</i>	22
1.3. Técnicas de extracción	23
1.3.1. Extracción en fase sólida (EFS)	24
1.3.1.1. Volumen de fuga y recobro	25
1.3.1.2. Tipos de adsorbentes	27
1.3.1.3. Tipos de eluyentes	27
1.3.1.4. Proceso de la EFS	28
1.3.1.5. Aplicaciones de EFS para la extracción de HAP's	29
1.3.2. Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)	30
1.3.2.1. Tipos de adsorbentes	30
1.3.2.2. Tipos de eluyentes	31
1.3.2.3. Proceso de la DMFS	31
1.3.2.4. Aplicaciones de DMFS para la extracción de HAP's	33
1.4. Métodos de análisis de HAP's	33
1.5. Calibración	36
1.6. Validación de métodos	41

Capítulo 2. Desarrollo experimental	44
2.1. Materiales y equipos	44
2.1.1. Disolventes y reactivos	44
2.1.2. Cultivo de microalgas y técnicas de extracción de HAP's	44
2.1.3. Sistema cromatográfico	46
2.2. Preparación de disoluciones estándar	47
2.3. Preparación de medio bristol	47
2.4. Cultivos de microalgas	48
2.5. Experimentación	48
2.5.1. Separación cromatográfica de los HAP's por CLAR/DAD	48
2.5.2. Precisión, linealidad y límite de detección del sistema cromatográfico....	50
2.5.3. Desarrollo del método por extracción en fase sólida (EFS)	51
2.5.4. Repetibilidad del método de EFS con muestras de agua	52
2.5.5. Repetibilidad del método por EFS con muestras de medio de cultivo líquido	53
2.5.6. Linealidad, LD y LC del método por EFS con muestras de medio de cultivo líquido	53
2.5.7. Desarrollo del método de dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)....	54
2.5.8. Repetibilidad del método por DMFS con muestras de microalgas fortificadas	54
2.5.9. Linealidad, LD y LC del método por DMFS con muestras de microalgas fortificadas	55
2.5.10. Evaluación de interferentes	55
2.6. Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a los HAP's	56
2.6.1. Bioensayos de exposición a fenantreno y dibenzo[a,h]antraceno	56
2.6.2. Ensayos de exposición de cultivos a 8 HAP's	56
Capítulo 3. Resultados y discusión	58
3.1. Separación cromatográfica de los HAP's por CLAR/DAD	58
3.2. Precisión, linealidad y límite de detección del sistema cromatográfico	64

3.3. Desarrollo del método por extracción en fase sólida (EFS)	65
3.3.1. Optimización de la carga y elución de los HAP's	66
3.3.2. Optimización de las condiciones de evaporación	68
3.4. Repetibilidad del método de EFS con muestras de agua	70
3.5. Repetibilidad del método por EFS con muestras de medio de cultivo líquido.....	71
3.6. Linealidad, LD y LC del método por EFS con muestras de medio de cultivo líquido	72
3.7. Desarrollo del método de DMFS	73
3.8. Repetibilidad del método por DMFS con muestras de microalgas fortificadas.....	74
3.9. Linealidad, LD y LC del método por DMFS con muestras de microalgas fortificadas	75
3.10. Evaluación de interferentes	77
3.11. Ensayos de exposición de cultivos a fenantreno y dibenzo[a,h]antraceno	79
3.12. Ensayos de exposición de cultivos a 8 HAP's	82
Conclusiones	101
Anexos	102
Referencias	128

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de algunos HAP's	15
Tabla 2. Ejemplos de determinación de HAP's en agua	17
Tabla 3. Estudios de degradación de HAP's por diferentes microorganismos en agua y suelo	21
Tabla 4. Determinación de HAP's usando como técnica de extracción la EFS	29
Tabla 5. Determinación de HAP's usando como técnica de extracción la DMFS	33
Tabla 6. Métodos EPA para determinar HAP's	34
Tabla 7. Curvas de calibración lineal más frecuentes	39
Tabla 8. Componentes para la preparación del medio Bristol	47
Tabla 9. Concentraciones de los HAP's evaluadas en la linealidad	51
Tabla 10. Tiempos de retención (t_R), valores de k' y $\log k'$ de los HAP's obtenidos utilizando diferentes proporciones de metanol.....	58
Tabla 11. Resultados obtenidos para las condiciones de elución A-E.....	60
Tabla 12. Programa de elución final utilizado para la separación de los HAP's	61
Tabla 13. Longitudes de onda de máxima absorbancia y seleccionada para obtener los cromatogramas de cada uno de los HAP's en estudio	62
Tabla 14. Resultados de la validación del sistema cromatográfico.....	65
Tabla 15. Recobros obtenidos para el método de EFS adicionando a la muestra	66
Tabla 16. Recobros para el ensayo de EFS adicionando a la muestra el 30 % de isopropanol.....	67
Tabla 17. Recobro acumulado obtenido en cada fracción de acetonitrilo.....	67
Tabla 18. Recobros obtenidos al evaporar a sequedad disoluciones de los HAP's en 8 mL de acetonitrilo y reconstitución en 1 mL.....	69
Tabla 19. Recobros al evaporar a 1-1.5 mL las disoluciones de los HAP's en 8 mL de acetonitrilo.....	70
Tabla 20. Resultados para la repetibilidad de la EFS con muestras de agua fortificada	70
Tabla 21. Repetibilidad de la EFS con muestras de medio de cultivo líquido fortificado proveniente de las microalgas.	71
Tabla 22. Resultados de la prueba de linealidad del método por EFS	72

Tabla 23. LC y LD experimentales obtenidos para EFS	73
Tabla 24. Recobros para cada fracción de los dos últimos eluentes de la secuencia de DMFS	73
Tabla 25. Repetibilidad de la DMFS con muestras de microalga seca fortificada.	75
Tabla 26. Resultados de la prueba de linealidad del método por DMFS	76
Tabla 27. LC y LD experimentales obtenidos para DMFS	76
Tabla 28. Resultados obtenidos para la degradación y remoción de Fen y DB[a,h]A en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 6, 24 y 48 horas ..	79
Tabla 29. Prueba de Rangos Múltiples (LSD) de Fisher para μg Totales de HAP por Temperatura.....	88
Tabla 30. Cantidad promedio recuperada de fenantreno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición	106
Tabla 31. Cantidad promedio recuperada de antraceno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición	107
Tabla 32. Cantidad promedio recuperada de pireno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición	108
Tabla 33. Cantidad promedio recuperada de benzo[a]antraceno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición	109
Tabla 34. Cantidad promedio recuperada de benzo[b]fluoranteno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición	110
Tabla 35. Cantidad promedio recuperada de benzo[k]fluoranteno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición	111

Tabla 36. Cantidad promedio recuperada de benzo[a]pireno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición 112

Tabla 37. Cantidad promedio recuperada de dibenzo[a,h]antraceno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición 113

Figura 1. Estructuras de los HAP's en estudio.....	14
Figura 2. Posibles rutas usadas por microorganismos para degradar HAP's.....	18
Figura 3. Transformación de naftaleno por algas.....	20
Figura 4. Microalga <i>Selenastrum Capricornutum</i>	22
Figura 5. Pasos en la preparación de muestras.....	24
Figura 6. Diagrama de un dispositivo para EFS.....	25
Figura 7. Representación típica de una curva de volumen de fuga.	26
Figura 8. Pasos a seguir en una extracción por DMFS típica	32
Figura 9. Condiciones de elución probadas para la optimización de la separación cromatográfica	49
Figura 10. Variación del log del factor de capacidad (k') con el porcentaje de metanol de la fase móvil	59
Figura 11. Cromatograma obtenido con la disolución estándar de una mezcla de HAP's cada uno a concentración de 2 µg/mL, utilizando el gradiente B	60
Figura 12. Cromatograma obtenido con una mezcla de HAP's todos a concentración de 4 µg/mL, utilizando el gradiente final..	63
Figura 13. Recobros acumulados para los 8 HAP's en estudio.....	68
Figura 14. Cromatogramas de una inyección del blanco de DMFS a tres diferentes longitudes de onda.....	77
Figura 15. Cromatogramas de una inyección del blanco de EFS a tres diferentes longitudes de onda.....	78
Figura 16. Cantidad de fenantreno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición a 1 y 6 horas a temperatura ambiente	80
Figura 17. Cantidad de dibenzo[a,h]antraceno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición a 1, 6, 24 y 48 horas a temperatura ambiente.....	80
Figura 18. Cantidades totales recuperadas a diferentes tiempos de exposición de cada uno de los 8 HAP's en los ensayos control de algas muertas a 25 °C	83
Figura 19. Cromatogramas a diferentes longitudes de onda de los extractos de EFS que muestran la desaparición de los 8 HAP's en el medio líquido en los ensayos de exposición a temperatura ambiente.....	86

Figura 20. Cromatogramas a diferentes longitudes de onda de los extractos de DMFS que muestran la desaparición de los 8 HAP's de la biomasa en los ensayos de exposición a temperatura ambiente.	85
Figura 21. Cantidades recuperadas de fenantreno en medio líquido, biomasa y total en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas	89
Figura 22. Cantidades recuperadas de antraceno en medio líquido, biomasa y total en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas	90
Figura 23. Cantidades recuperadas de pireno en biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas	91
Figura 24. Cantidades recuperadas de benzo[a]antraceno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas	92
Figura 25. Cantidades recuperadas de benzo[b]fluoranteno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas	93
Figura 26. Cantidades recuperadas de benzo[k]fluoranteno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas	94
Figura 27. Cantidades recuperadas de benzo[a]pireno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas	95
Figura 28. Cantidades recuperadas de dibenzo[a,h]antraceno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas	97
Figura 29. Porcentajes degradados de los HAP's en los ensayos de exposición a 6 h a diferentes temperaturas	98

Figura 30. Porcentajes de remoción del medio líquido de los HAP's en los ensayos de exposición a 6 h a diferentes temperaturas 99

Figura 31. Cantidades recuperadas de los 8 HAP's en medio líquido, biomasa y totales en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a 25°C 100

Ant	Antraceno
B[a]A	Benzo[a]antraceno
B[b]F	Benzo[b]fluoranteno
B[k]F	Benzo[k]fluoranteno
B[a]P	Benzo[a]pireno
CE	Calibración externa
CG	Cromatografía de gases
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CM	Calibración con matriz igualada
DAD	Detector de arreglo de diodos
DB[a,h]A	Dibenzo[a,h]antraceno
DE	Desviación estándar
DER	Desviación estándar relativa
DMFS	Dispersión de matriz en fase sólida
EI	Estándar interno
EFS	Extracción en fase sólida
ELL	Extracción líquido-líquido
EPA	Agencia de Protección Ambiental
FC	Factor de calibración
Fen	Fenantreno
FID	Detector de ionización de llama
FL	Fluorescencia
FN	Factor de normalización
FR	Factor de respuesta
HAP's	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
K _{OW}	Coefficiente de distribución 1- octanol - agua
LC	Límite de cuantificación
LCE	Límite de cuantificación experimental

LD	Límite de detección
LDE	Límite de detección experimental
MELLD	Micro extracción líquido-líquido dispersiva
MS	Espectrometría de masas
Pir	Pireno
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son un grupo de moléculas orgánicas que tienen dos o más anillos aromáticos fusionados y se forman de la combustión incompleta. Debido a su persistencia, toxicidad, bioacumulación y que algunos son carcinógenos, en la actualidad existe una necesidad de monitorear y disminuir la exposición a los HAP's. La bioremediación de este tipo de compuestos con microorganismos, especialmente con bacterias y hongos, ha sido ampliamente estudiada en matrices ambientales como suelo y agua, mientras que de las microalgas existen pocos estudios.

Es por esto que en el presente trabajo de investigación se desarrollaron y validaron métodos de extracción y análisis de ocho hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP's (fenantreno, antraceno, pireno, benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[k]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno y dibenzo[a,h]antraceno) en cultivos de microalgas utilizando la técnica de extracción en fase sólida (EFS) para el medio de cultivo líquido y la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) para la biomasa, así como la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para el análisis de los HAP's en los extractos.

En la validación del sistema cromatográfico se obtuvieron valores de DER menores que 1.9%, los valores de r^2 fueron mayores que 0.99 para todos los analitos y los límites de detección (LD) estuvieron entre 0.16 y 0.96 $\mu\text{g/mL}$ y los límites de cuantificación (LC) entre 0.49 y 2.90 $\mu\text{g/mL}$. En la validación del método EFS-CLAR la prueba de precisión presentó valores de DER menores que 8.6 %, el valor promedio del recobro estuvo en un intervalo de 76 a 94 % y la linealidad tuvo valores de r^2 mayores que 0.99 para todos los compuestos de interés. En la validación del método DMFS-CLAR los valores de DER fueron menores que 7.1 %, el valor promedio del recobro estuvo en un intervalo del 81 a 93 % y en la linealidad el valor de r^2 fue mayor que 0.98 para los 8 HAP's. Los métodos desarrollados y validados se aplicaron en bioensayos de exposición a los HAP's con la microalga *Selenastrum Capricornutum* a 1, 3, 6, 24 y 48 horas y cuatro diferentes temperaturas: temperatura ambiente, y temperatura controlada a 20, 25 y 30 °C.

Se observó dependencia de la temperatura en la desaparición de los compuestos del cultivo y de las tres temperaturas evaluadas después de 48 horas a temperatura ambiente es donde notó una mayor disminución de la concentración de los HAP's. Además se observó que después de un tiempo de exposición de 3 horas los HAP's se acumulan más en la biomasa que en el medio de cultivo líquido, esto debido a la naturaleza no polar de los analitos, a excepción del DB[a,h]A, el cual después de 6 horas alcanza cantidades similares en el medio líquido y la biomasa.

Con la mezcla de los 8 HAP's la remoción de los compuestos más pesados fue más rápida cuando se tenía uno solo, ésta fue favorecida por la presencia de los HAP's más ligeros, ya que se presentó un fenómeno de sinergismo en la remoción.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son compuestos que tienen dos o más anillos aromáticos fusionados y no tienen heteroátomos. Los HAP's que tienen hasta cuatro anillos aromáticos fusionados son conocidos como ligeros y los que contienen más de cuatro anillo se conocen como pesados. La mayoría de los HAP's en el ambiente se derivan de la combustión incompleta de materiales que contienen carbono. Como algunos HAP's (especialmente los ligeros) son solubles en agua, también se pueden encontrar en ríos, agua subterránea y agua potable.^{1,2} En la actualidad es necesario monitorear y disminuir la exposición a los HAP's debido a que son contaminantes orgánicos persistentes y en gran parte son carcinógenos químicos conocidos, ya que producen mutaciones en las células.³ Debido a esto, sus formas de remoción por diferentes tipos de microorganismos han sido investigadas, sobre todo se ha estudiado la degradación de HAP's con bacterias⁴ y hongos.⁵ Otros microorganismos menos estudiados capaces de degradar HAP's son las microalgas; en los estudios reportados se utilizan HAP's de 3 y 4 anillos aromáticos, con los cuáles se ha observado remoción de 1, 2, 3 ó 5 HAP's a la vez. Por el contrario, para los HAP's de cinco anillos sólo hay estudios para el benzo[a]pireno (B[a]P), en uno de estos se usó la microalga verde *Selenastrum capricornutum*, la cual en condiciones de crecimiento fotoautótrofas metaboliza benzo[a]pireno a cis-dihidrodióles y quinonas.⁶ En la mayoría de los trabajos reportados con microalgas se estudia un HAP a la vez, y hay muy pocos con la mezcla de 2, 3 ó 5 de estos compuestos. Por ejemplo en un estudio se evaluó la eficiencia en la degradación de varias especies de microalgas con la mezcla de fluoranteno y pireno,⁷ en otro estudio se observó la remoción de la mezcla de fluoranteno, fenantreno y pireno con la microalga verde *Selenastrum capricornutum*,⁸ y en otro trabajo se evaluó el efecto de la presencia de metales en la degradación de la mezcla de fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno y benzo[a]pireno también con la microalga *Selenastrum capricornutum*.⁹ En la naturaleza, es común encontrar una mezcla de HAP's como contaminantes, en donde interactúan uno con otro, es por esto que en el presente trabajo de investigación tiene por objetivo evaluar el desempeño de *Selenastrum*

Capricornutum en la remoción de una mezcla de 8 HAP's (tanto ligeros como pesados) considerados como prioritarios por la EPA.

Por otro lado, dado que en los estudios reportados, la extracción de los analitos se efectúa generalmente por la extracción líquido-líquido clásica, siendo desconsiderada la extracción con adsorbentes que resulta ser muy práctica para el aislamiento de los compuestos de matrices biológicas complejas como lo son los cultivos, en el presente trabajo se utilizarán las técnicas: Extracción en Fase sólida (EFS) y Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS).

Cuando se tienen muestras líquidas se puede usar la Extracción en Fase Sólida (EFS), la cual es procedimiento común de preparación de muestras que usa un material sólido para retener compuestos específicos de una disolución. La retención se lleva a cabo al pasar la solución a través de una cantidad específica de adsorbente, usualmente empacada en un cartucho. Los compuestos retenidos se pueden eluir con un disolvente apropiado. La Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) es una técnica de preparación de muestra utilizada para la extracción de analitos de muestras sólidas o viscosas; su principio es parecido al de la EFS ya que se basa en el uso de los mismos adsorbentes con la diferencia de que son macerados con la misma muestra y así provocar su disgregación y dispersión. Durante este procedimiento el adsorbente actúa como abrasivo, y la muestra se dispersa en su superficie. El material macerado se transfiere a un cartucho; donde los analitos se lavan y eluyen con un disolvente o mezclas de disolventes apropiados.¹⁰ Se ha demostrado en estudios previos del grupo de investigación en el que se realizó el presente trabajo de investigación que ambas técnicas son apropiadas para la extracción de B[a]P y sus metabolitos en microalgas y sus medios de cultivo, es por esto que se aplicaron aquí para la extracción de los 8 HAP's en estudio.

El primer objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar métodos de extracción y análisis de 8 HAP's (fenantreno, antraceno, pireno, benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[k]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno y dibenzo[a,h]antraceno) en cultivos de microalgas utilizando la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, la extracción en fase sólida (EFS) para manejar el medio de cultivo líquido y la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) para la biomasa.

El segundo objetivo fue realizar bioensayos de exposición a diferentes tiempos y temperaturas en donde se aplicarán las metodologías desarrolladas para la determinación simultánea de los 8 HAP's presentes en las microalgas y sus medios de cultivo con el fin de evaluar su remoción.

1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP's)

1.1.1 ESTRUCTURA

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son compuestos que tienen dos o más anillos aromáticos fusionados y no tienen heteroátomos. Los HAP's que contienen hasta cuatro anillos aromáticos fusionados son conocidos como ligeros y los que tienen más de cuatro anillos de benceno se conocen como pesados. Los HAP's pesados son más estables y más tóxicos que los ligeros.^{1,2} Los anillos de benceno pueden estar de forma lineal, angular o de inclusión. La estructura más simple consiste en 2 anillos (naftaleno) pero se forman estructuras más complejas con más de 6 anillos y grupos alquilo. A pesar de que por definición sólo contienen carbono e hidrógeno, átomos de N, S y O pueden sustituir fácilmente el anillo de benceno para formar compuestos aromáticos heterocíclicos.¹¹

Las estructuras de los 8 HAP's estudiados en el presente trabajo se presentan a continuación:

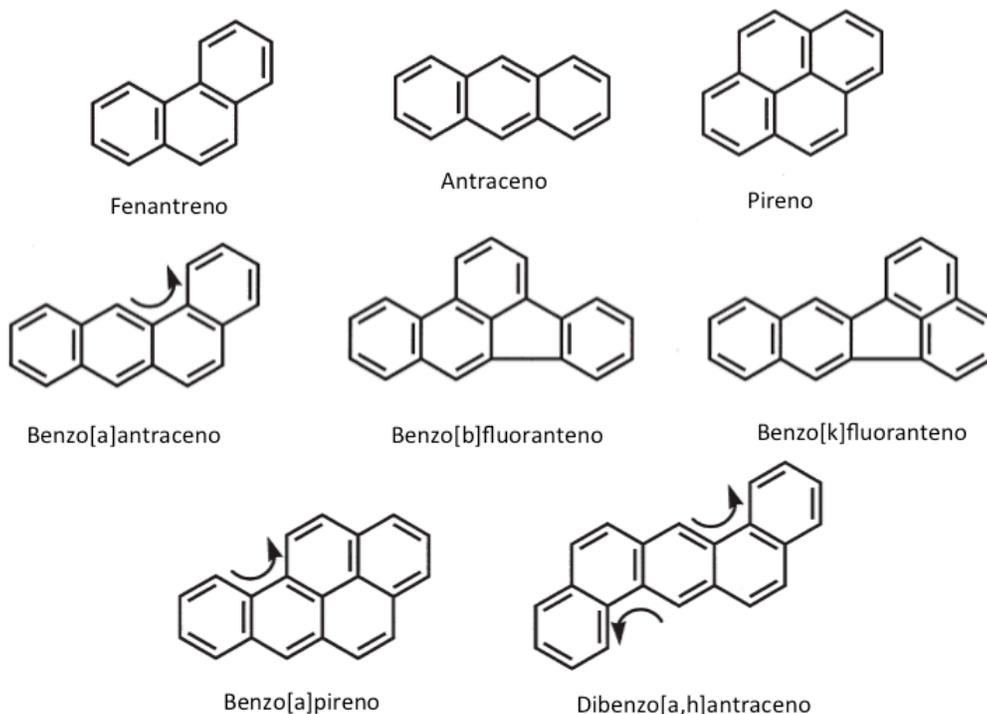


Figura 1. Estructuras de los HAP's en estudio

1.1.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

A temperatura ambiente los HAP's son sustancias sólidas cristalinas, cuyos puntos de ebullición aumentan al incrementar el peso molecular y al crecer el número de anillos condensados. En contraste sus puntos de fusión no están directamente relacionados con el número de anillos o el peso molecular, para la mayoría son superiores a 100 °C. La presión de vapor de los compuestos no es muy alta y a excepción de los HAP's con 2 y 3 anillos no tienen tendencia a volatilizarse. Su solubilidad en agua disminuye más de cinco veces del naftaleno al dibenzo[a,h]antraceno y es muy baja para la mayoría de los HAP's, con valores menores a 1 mg/L, aunque este parámetro depende de la temperatura y el contenido de sal del agua. Un incremento en la temperatura de 10-20 °C casi duplica la solubilidad en agua. El coeficiente de distribución 1-octanol – agua K_{OW} es un parámetro estandarizado que indica la proporción entre las concentraciones de un HAP en las fases de 1-octanol y agua en contacto directo una con la otra. La concentración del respectivo HAP en el equilibrio está por debajo de su solubilidad en agua y el parámetro K_{OW} se va incrementando conforme aumenta el peso molecular, es decir la concentración de los HAP's en la fase acuosa va disminuyendo.¹²

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de algunos HAP's

Compuesto	Peso molecular	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Presión de vapor (mPa) ^a	Solubilidad en agua (mg/L) ^b	Log K_{OW}
Naftaleno	128	80	218	10.8×10^3	30.00	3.37
Acenafteno	154	96	279	1.16×10^3	3.47	4.33
Fluoreno	166	116	298	4.5×10^2	1.8	4.18
Fenantreno	178	101	340	9.3×10^1	1.29	4.46
Antraceno	178	218	342	1.1×10^1	0.0073	4.45
Fluoranteno	202	110	375	2.4×10^2	0.26	5.33
Pireno	202	150	404	1.6	0.135	5.32
Benzo[a]antraceno	228	159	435	1.0×10^{-1}	0.014	5.61
Criseno	228	256	448	1.5×10^{-3}	0.0006	5.86

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Benzo[b]fluoranteno	252	168	-	2.9×10^{-2}	0.0012	6.57
Benzo[k]fluoranteno	252	217	480	1.8×10^{-2}	0.00055	6.84
Benzo[a]pireno	252	179	495	3.8×10^{-3}	0.0038	6.04
Dibenzo[a,h]antraceno	278	267	524	6.7×10^{-6}	0.0005	6.75
Benzo[g,h,i]perileno	276	278	-	1.8×10^{-4}	0.00026	7.23
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	276	162	-	-	0.062	7.66

^a 25°C

^b 20°C

1.1.3 FUENTES DE PRODUCCIÓN Y TOXICOLOGÍA

Los HAP's son contaminantes orgánicos persistentes y comprenden una gran clase de carcinógenos químicos conocidos. Están presentes como componentes naturales de los combustibles fósiles, y son parte de los miles de componentes de los productos del petróleo.¹³ Se forman de la combustión incompleta de combustibles fósiles (por ejemplo carbón, madera y aceite) usados en la generación de energía y calor. Como los HAP's son contaminantes persistentes, se pueden encontrar en alimentos, aire, agua, suelo y sedimentos, con lo cual entran en la cadena alimenticia. Los alimentos también pueden estar contaminados por la producción de HAP's cuando son procesados y cocinados, por ejemplo al cocinar carne y pescado ahumados, o al preparar alimentos al carbón. Debido a que hay múltiples fuentes de exposición humana, es difícil asegurar que sólo provienen de la ingesta de comida.^{1,2} Los que se encuentran en el ambiente provienen principalmente de actividades antropogénicas. En el agua generalmente los HAP's tienen concentraciones en un intervalo de 0.1-830 ng/L (2.5-9 ng/L en agua potable, 1-10 ng/L en agua del subsuelo, 2.7-7.3 ng/L en agua de lluvia y 10-830 ng/L en agua superficial), adicionalmente se han detectado en aguas residuales domésticas e industriales. Los compuestos de alto peso molecular (4 anillos aromáticos o más) tienden a ser menos solubles en agua, menos volátiles y más lipofílicos que los de bajo peso molecular (3 anillos aromáticos o menos); la solubilidad en agua de los de alto peso molecular va de 0.003-0.26 mg/L mientras que para los de bajo peso molecular es de 0.07-32 mg/L.^{14,15} En agua potable los HAP's detectados en más altas concentraciones son

fluoranteno, fenantreno, pireno y antraceno.¹⁶ Debido a esto se han reportado diversos estudios para determinar la concentración de HAP's en agua como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de determinación de HAP's en agua

Matriz	HAP's analizados	Técnica de Extracción	Separación/ Detección	Referencia
Agua potable de Tehrán	16	EFS	CG/MS	15
Agua potable y superficial (ríos y lagos) de Polonia	16	EFS	CLAR/UV	14
Agua del mar Báltico	15	ELL (con n-hexano)	CLAR/FL	17
Agua de la bahía de Daya, China	16	EFS	CG/FID, MS	18
Agua superficial (ríos y lagos) de Taiwan	11	MELLD	CG/MS	19

EFS: Extracción en fase sólida; ELL: Extracción líquido-líquido;

MELLD: Micro extracción líquido-líquido dispersiva

Actualmente existe una necesidad de monitorear y disminuir la exposición a los HAP's debido a que se ha demostrado en roedores que son carcinógenos cuando se administran oralmente, ya que causan mutaciones en las células.²⁰

Los HAP's también pueden ser degradados por algunos hongos y microorganismos cuando se encuentran en suelo y pueden ser metabolizados por una amplia variedad de organismos terrestres y acuáticos,²¹ aunque se espera que se bioacumulen en organismos (terrestres y acuáticos) que no pueden metabolizarlos.²²

1.1.4 DEGRADACIÓN DE HAP's POR MICROORGANISMOS

Como los HAP's son conocidos por producir efectos carcinogénicos y debido a que son considerados contaminantes persistentes del ambiente, sus formas de degradación por diferentes tipos de microorganismos han sido ampliamente investigadas, aunque la mayoría de los estudios se centran en bacterias y hongos, así como en organismos superiores como los mamíferos. Otros microorganismos

capaces de degradar HAP's son las algas, y en especial las microalgas, aunque de éstas existen pocos estudios reportados.

Una amplia variedad de microorganismos tienen la capacidad de metabolizar los HAP's, generalmente la velocidad de degradación es inversamente proporcional al número de anillos aromáticos en la molécula del HAP, por lo que los de bajo peso molecular son degradados más rápido que los de alto peso molecular.²³ Un esquema propuesto para la degradación de HAP's por microorganismos (hongos, algas y bacterias) se muestra en la Figura 2.

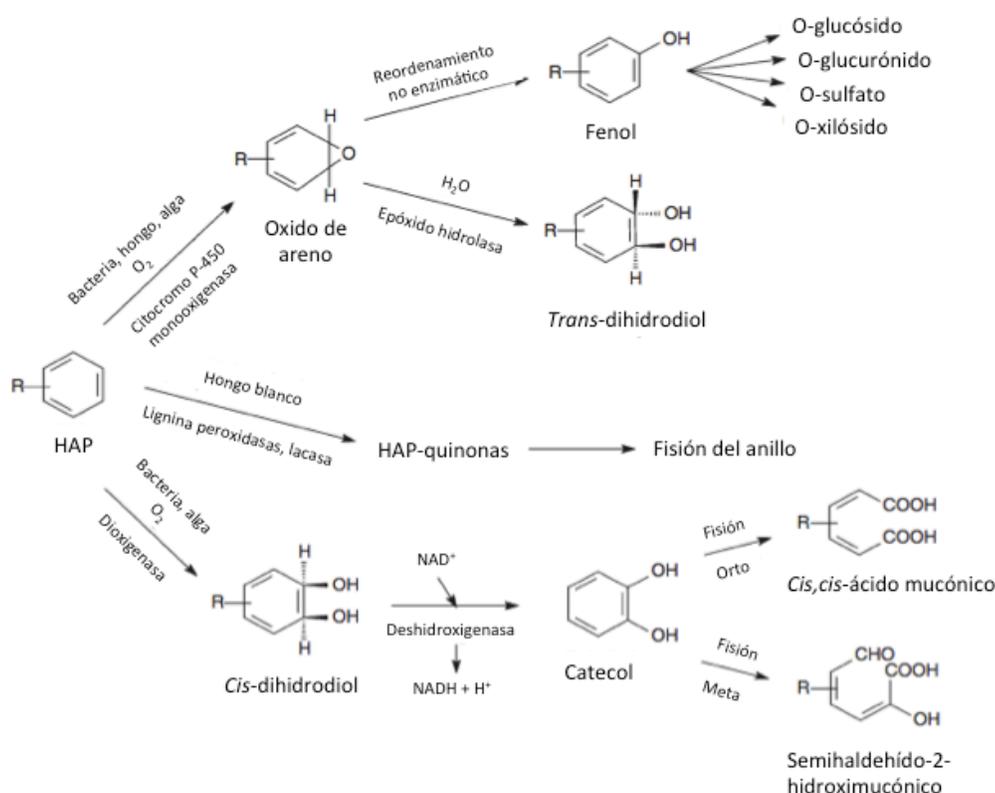


Figura 2. Posibles rutas usadas por microorganismos para degradar HAP's.²³

Los hongos oxidan los HAP's para degradarlos como paso inicial en su asimilación.²⁴ Generalmente oxidan estos compuestos por medio de mono oxigenasas citocromo P450, que resulta en la producción de un óxido de areno que es posteriormente hidrolizado por una epóxido hidrolasa a un *trans*-dihidrodiol. Mientras muchos hongos pueden transformar los HAP's a *trans*-dihidrodiol y otros productos de oxidación como fenoles, tetralonas, quinonas, epóxidos de dihidrodiol y varios compuestos

conjugados de los intermediarios hidroxilados, muy pocos tienen la habilidad de mineralizar los HAP's.²⁵ Los metabolitos producidos por los hongos son con frecuencia más solubles en agua y químicamente más reactivos que los compuestos de los que provienen, con lo cual se incrementa su mineralización potencial por bacterias endógenas en el suelo.²⁶

En contraste con los anteriores las bacterias y las algas metabolizan los HAP's a *cis*-dihidrodióles a través de dioxigenasas.²⁷

La degradación de estos compuestos por bacterias usualmente es por medio de una oxidación inicial del HAP a catecol, el cual es subsecuentemente hidrolizado a intermediarios del ciclo de ácidos tricarbónicos. Las bacterias incorporan típicamente dos moléculas de oxígeno en los anillos de benceno a través de la acción de dioxigenasas intracelulares, formando un *cis*-dihidrodiol que es posteriormente convertido a catecol. Una ruptura *orto* o *meta* del catecol lleva a productos alifáticos. Una vez que el primer anillo aromático es degradado, el segundo anillo es atacado de la misma manera.^{28,29}

Dado que algunas clases de algas son capaces de realizar un crecimiento heterotrófico con diferentes fuentes de carbono, se ha observado que el alga en presencia de un contaminante muchas veces es capaz de degradarlo. Las algas procariontes y eucariontes también oxidan los HAP's a partir de intermediarios hidroxilados. Por ejemplo se han realizado estudios con el alga *Prototheca zopfii* en los cuales se encontró que es capaz de degradar un gran porcentaje de hidrocarburos aromáticos del petróleo crudo y aceite de motor.³⁰ También se ha demostrado que tanto las cianobacterias como las microalgas eucariontes son capaces de biotransformar naftaleno en cuatro metabolitos principales, 1-naftol, 4-hidroxi-4-tetralona, y los dihidrodióles *cis*- y *trans*-naftaleno.³¹ De igual modo se ha demostrado que la microalga verde *Selenastrum capricornutum*, en condiciones de crecimiento fotoautótrofas metaboliza benzo[a]pireno en *cis*-dihidrodióles y quinonas.³² Un esquema propuesto para la biotransformación de naftaleno con algas se muestra en la Figura 3.³³

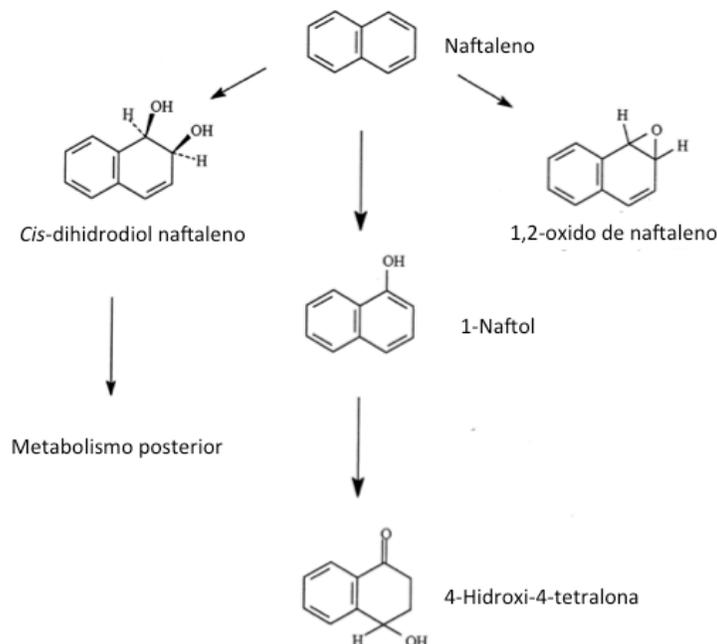


Figura 3. Transformación de naftaleno por algas.³³

Se ha observado que cuando las microalgas no son capaces de degradar a los contaminantes, tienden a acumularlos como se verificó en un estudio realizado con cultivos del alga *Chlamydomonas angulosa* a los cuales se les adicionó naftaleno, lo cual provocó la pérdida casi por completo de su capacidad fotosintética inhibiendo así su crecimiento, el cual se normalizó después de 3 días debido a que las células del alga fueron capaces de quitar el naftaleno de su medio al acumularlo dentro de las células, pues no fueron capaces de degradarlo.³⁴

En la Tabla 3 se muestran referencias de diversos estudios de la degradación de HAP's por microorganismos, la biorremediación con bacterias y hongos ha sido ampliamente estudiada,^{35, 36} principalmente en suelo para HAP's de bajo peso molecular; por otra parte los estudios de degradación en agua son muy pocos para bacterias y hongos, y sólo existen algunos para la degradación con microalgas los cuales se centran en los compuestos de bajo peso molecular como pireno, antraceno y fluoranteno. En la mayoría de los trabajos reportados para algas se utilizan HAP's de 3 y 4 anillos aromáticos, y de cinco sólo hay estudios para el benzo[a]pireno,³² con los cuáles se ha observado la remoción con 2, 3 ó 5 HAP's a la vez.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Tabla 3. Estudios de degradación de HAP's por diferentes microorganismos en agua y suelo

Matriz	Microorganismo	Nombre	HAP	Referencia
Suelo	Hongos	<i>Bjerkandera adusta</i>	Dibenzotiofeno, Fluoranteno Pireno, Criseno	37
		<i>Phanerochaete velutina</i>	16 HAP's prioritarios de la EPA	38
		<i>Pleurotus ostreatus</i>	Benzo[a]pireno	39
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Acenafteno, Fluoreno Fenantreno, Fluoranteno Pireno, Criseno Benzo[a]pireno Dibenzo[a,h]antraceno Benzo[g,h,i]perileno	40
		<i>Dichomitus squaelns,</i> <i>Pleurotus ostreatus,</i> <i>Coprinus comatus</i>	Fenantreno, Antraceno, Indeno[1,2,3- c,d]pireno, Fluoreno, Fluoranteno Pireno, Criseno, Benzo[a]antraceno Benzo[k]fluoranteno, Benzo[b]fluoranteno Benzo[a]pireno Dibenzo[a,h]antraceno Benzo[g,h,i]perileno	41
	Bacterias	Varias	Naftaleno, Fenantreno	42
		Varias	Pireno, Fenantreno	43
		Varias	Acenafteno, Fenantreno, Fluoranteno, Pireno	44
		Beta proteobacterias	Fenantreno	45
		<i>Pseudomonas putida</i>	Fluoranteno, Antraceno	46
	Agua	Hongos	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Naftaleno, Benzo[a]pireno
Varios			Antraceno, Fluoranteno	48
Bacterias		Varias	16 HAP's prioritarios de la EPA	49
		Varias	Naftaleno, Fenantreno, Antraceno	50
Microalgas		Varias	Fluoranteno, Pireno	51
		<i>Skeletonema costatum</i> <i>Nitzschia sp</i>	Fenantreno, Fluoranteno	52
		Varias	Pireno	53
		<i>Chlorella vulgaris</i>	Naftaleno	54
		<i>Selenastrum Capricornutum</i>	Fenantreno, Fluoranteno, Pireno	55
		<i>Prototheca zopfii</i>	Fenantreno, Pireno	56
<i>Selenastrum Capricornutum</i>	Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]pireno	57		

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA MICROALGA VERDE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

Las microalgas se encuentran de forma natural en el agua y son un grupo muy importante de microorganismos. A través de su actividad fotosintética ayudan a proporcionar el oxígeno necesario para la supervivencia de especies animales encontradas en el ambiente acuático. Además contribuyen a la purificación de ríos lagos y estuarios, por lo que es factible utilizarlas para biorremediación.⁵⁸

Selenastrum capricornutum fue renombrada *Raphidocelis subcapitata* y más recientemente *Pseudokirchneriella subcapitata*, y fue aislada por primera vez en el río Nitelva en Noruega por Olav M. Skulverg en 1959. Es una microalga verde de agua dulce que forma células en forma de media luna como se muestra en la Figura 4,⁵⁹ pertenece a la división *Chlorophyta* y a la clase *Trebouxiophyceae*.⁶⁰ Es muy utilizada en estudios de laboratorio debido a que puede sobrevivir en agua de diversas composiciones (con exceso o deficiencia de nutrientes) y tiene una gran tolerancia a diversas condiciones ambientales, además habitualmente se encuentra en forma unicelular y no es móvil, por lo cual es factible contar el número de células en los cultivos.⁵⁸



Figura 4. Microalga *Selenastrum Capricornutum*⁶¹

1.3. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

El propósito de un estudio analítico es obtener información acerca de alguna sustancia. Esta sustancia puede ser un sólido, un líquido, un gas o un material biológico. La información que se obtiene puede ser acerca de su composición química o física, así como sus propiedades estructurales o de superficie. A pesar de todos los métodos analíticos tan sofisticados con los que se cuenta en la actualidad, la mayor parte de éstos no han sido desarrollados para el análisis directo de la muestra, de modo que debe ser tratada previamente.⁶² De manera particular, el análisis de contaminantes en muestras animales, vegetales y de alimentos es obstaculizado por la presencia de interferentes presentes en las matrices complejas. El reto para los analistas es maximizar el recobro del analito y minimizar las interferencias que lo acompañan por medio de una extracción y limpieza apropiados.² La preparación de muestras se debe adaptar al análisis final, considerando la instrumentación que se va a usar y el grado de exactitud requerida, ya sea de forma cuantitativa o cualitativa; de manera general es dependiente tanto de la matriz como de las propiedades fisicoquímicas del analito (peso molecular, carga, solubilidad, hidrofobicidad, polaridad, volatilidad). Es necesario optimizar la preparación de muestras no solo para reducir el tiempo de análisis, sino porque cada paso es una fuente potencial de error, además es crítica para la identificación inequívoca, confirmación y cuantificación de analitos. Este error se hace más crítico con las bajas concentraciones manejadas en el análisis de trazas, por lo que este tipo de análisis requiere una preparación de muestra más rigurosa que un análisis de componentes mayoritarios. Una vez que se completa la preparación de la muestra, el análisis puede realizarse en el instrumento que se haya elegido. Existen diferentes técnicas de preparación de muestras cada una adecuada a diferentes analitos y tipos de matrices.^{62,63,64} En la Figura 5 se muestran los posibles pasos a seguir durante la preparación de muestras.⁶²

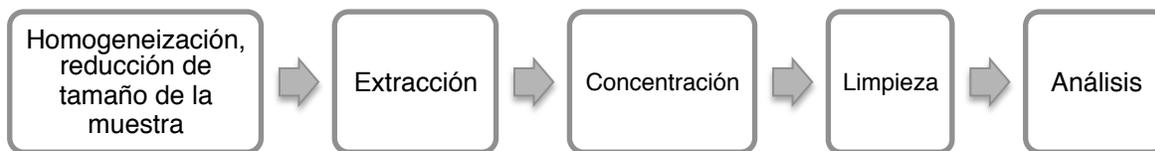


Figura 5. Pasos en la preparación de muestras

Algunas veces adicionalmente se incluye un paso de derivatización ya sea para incrementar la volatilidad de un compuesto o para adicionar grupos funcionales que mejoran el análisis instrumental.⁶³

En el presente trabajo de investigación se utilizaron las técnicas de extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida, los cuales se llevan a cabo por diferentes mecanismos de retención en fases sólidas como la adsorción y el reparto, ya que primero atrapan a los analitos en fases inmobilizadas, y los analitos retenidos son eluidos posteriormente con un disolvente apropiado.⁶⁴ A continuación se da una descripción detallada de ambas técnicas.

1.3.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)

La extracción en fase sólida es una técnica de preparación de muestra en la cual los solutos son extraídos de una fase líquida a una fase sólida. La fase sólida en la cual son extraídos los analitos consiste típicamente en pequeñas partículas porosas de sílice con una fase orgánica unida o un polímero inorgánico, como el poliestireno; generalmente el tamaño de partícula es de 50-60 μm .⁶⁵

En el análisis químico es común empacar el extractante sólido en un cartucho de polipropileno (si existen interferencias es posible usar una columna de vidrio) y pasar la muestra líquida a través de éste. Actualmente los cartuchos están disponibles comercialmente. Un filtro circular de polipropileno sostiene el sólido de extracción en el fondo, y después de empacar se coloca un segundo filtro encima del extractante para mantenerlo en su lugar y prevenir la entrada de líquido que pueda alterar las partículas empacadas. La EFS no está limitada solamente a extraer solutos de una muestra líquida; aire u otras muestras gaseosas también pueden pasar a través del

cartucho empacado para extraer vapores orgánicos u otras sustancias presentes en la muestra.⁶⁵

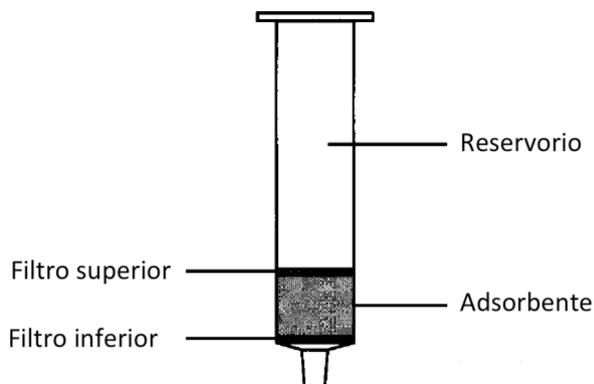


Figura 6. Diagrama de un dispositivo para EFS

Algunas de las ventajas de esta técnica son las siguientes: es rápida, de bajo costo, de fácil manipulación, se usan cantidades pequeñas de disolvente orgánico y tiene altos factores de concentración.

1.3.1.1. VOLUMEN DE FUGA Y RECOBRO

La mayoría de los parámetros que describen la extracción en fase sólida tienen principios teóricos derivados de la teoría para cromatografía de líquidos. Las concentraciones de los analitos son generalmente bajas y el tipo y cantidad de adsorbente requerido para aislar el analito para su determinación apropiada está dado por el volumen de fuga. El volumen de fuga es el parámetro más importante, éste se establece a partir de una curva de fuga como se muestra en la Figura 7. En un inicio una muestra de una concentración fija, y usualmente a velocidad constante, entra en el cartucho. Los analitos son retenidos cuantitativamente por el adsorbente hasta un punto en el cual el volumen de la muestra excede la capacidad de retención del adsorbente. Si se adiciona más muestra el adsorbente no retendrá cuantitativamente a los analitos y eventualmente se hace idéntica la concentración de analitos que entran y salen del cartucho. El punto de la curva en el cual una cantidad arbitraria de analito se detecta a la salida del cartucho es el volumen de fuga (V_B).

Generalmente se usa un valor de 1 % para la relación entre la concentración de entrada y de salida para definir el volumen límite de muestra que puede ser procesada con una pérdida mínima del analito. En condiciones ideales la curva de fuga tiene una forma bilogarítmica. El punto $V_{m\acute{a}x}$ corresponde al volumen de la muestra en el cual la capacidad de retención del adsorbente se satura y la concentración del analito que entra y sale del cartucho es igual. El punto de inflexión de la curva de fuga corresponde al volumen de retención cromatográfica, V_R , ya que la primera derivada de la curva de fuga es una distribución gaussiana similar al pico de respuesta observado durante la elución cromatográfica. El recobro está definido como la proporción entre la cantidad de analito extraída y la aplicada. El volumen de fuga representa el volumen máximo de muestra que puede ser aplicado con un recobro teórico del 100 %; sin embargo la cantidad máxima de los compuestos extraída corresponde a la aplicación de un volumen igual a $V_{m\acute{a}x}$, el cual tiene un recobro menor del 100 %.^{66,67}

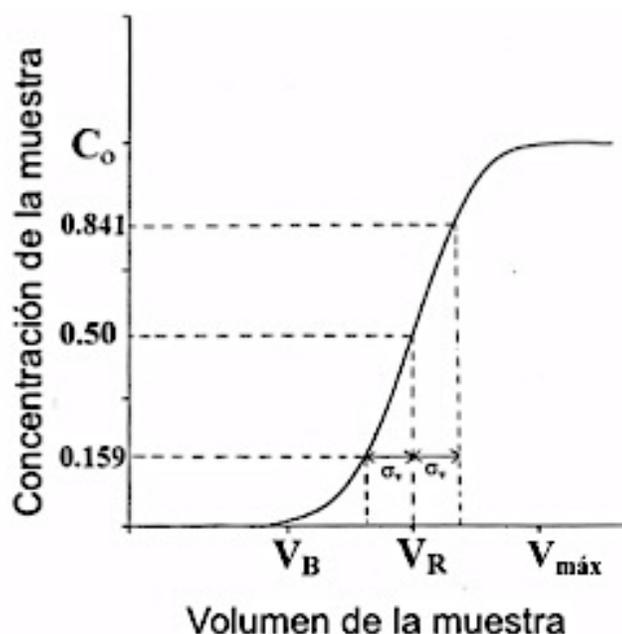


Figura 7. Representación típica de una curva de volumen de fuga. V_B es el volumen de fuga, V_R es el volumen de elución cromatográfica, $V_{m\acute{a}x}$ es el volumen de la muestra correspondiente al aislamiento de la máxima cantidad de analito, C_o es la concentración del analito en la muestra y σ_v la desviación estándar de la curva derivada para la gráfica.⁶⁶

1.3.1.2. TIPOS DE ADSORBENTES

Se han usado gran cantidad de partículas sólidas para realizar EFS de compuestos orgánicos de muestras acuosas en su mayoría, éstas se clasifican en:

- a) EFS en fase reversa: se usan partículas adsorbentes relativamente hidrofóbicas, como sílice unida a grupos octadesilsilano o a un polímero orgánico con anillos de benceno. Las sustancias extraídas son eluidas con pequeños volúmenes de disolvente orgánico. Sirve para aislar analitos relativamente no polares de una muestra polar como el agua.
- b) EFS en fase normal: se usan partículas sólidas polares para extraer analitos polares de una muestra no polar. Los analitos extraídos se eluyen finalmente con un disolvente polar.
- c) EFS de intercambio iónico: se usan partículas que contienen grupos intercambiadores de cationes o aniones, se usa para extraer analitos iónicos o analitos que pueden convertirse a su forma iónica cuando se ajusta el pH. Las sustancias se eluyen con un solvente orgánico después de convertirlas a su forma molecular o con un disolvente que tenga una relativamente alta concentración de un ion desplazante.⁶⁵

1.3.1.3. TIPOS DE ELUYENTES

Las sustancias que han sido extraídas por las partículas sólidas se pueden recuperar al lavar usando un disolvente apropiado. Por ejemplo, la mayoría de los analitos orgánicos se pueden eluir con un disolvente orgánico como acetona, acetonitrilo o metanol. Generalmente el volumen de disolvente que se necesita para eluir completamente los analitos es mucho más pequeño que el volumen original de la muestra. Con esto se logra concentrar a los analitos.⁶⁵

1.3.1.4. PROCESO DE LA EFS

El proceso de EFS se puede dividir en cuatro pasos principales:

- a) Acondicionamiento: el adsorbente debe ser preparado para hacerlo compatible con la muestra. Por ejemplo, en una extracción de sustancias hidrofóbicas de un medio acuoso debe haber contacto cercano entre a fase apolar (como sílice C₁₈) y la solución polar. Si no se realiza ningún pretratamiento el líquido polar fluye en pequeños canales a través de la fase sólida sin hacer necesariamente contacto cercano. El pre-tratamiento necesario involucra el uso de un disolvente intermediario que promoverá una mayor superficie de contacto entre las fases.
- b) Adsorción: la muestra líquida que se va a extraer pasa a través de la columna empacada con ayuda de vacío, presión aplicada o una bomba. El flujo debe pasar a una velocidad constante y depende tanto de las dimensiones de la columna como del tamaño de partícula del extractante sólido.
- c) Lavado: un líquido de lavado escogido cuidadosamente sirve para eliminar de la columna de EFS sustancias de la matriz coadsorbidas con los analitos. Esta solución de lavado no debe contener porcentajes altos de solvente orgánico debido a que puede eluir parcialmente los analitos de la muestra.
- d) Elución: en este paso los analitos adsorbidos son removidos del extractante sólido y se regresan a una fase líquida que es apropiada para la medición analítica. Comúnmente el eluyente es un disolvente orgánico, aunque también es posible desorber térmicamente a los analitos con ayuda de un flujo de gas. El eluyente se debe escoger cuidadosamente, se debe seleccionar un líquido que eluya los analitos completamente de la fase sólida usando el menor volumen posible del eluyente.

En la actualidad el gran desarrollo en la tecnología EFS se ha llevado a cabo, incluye nuevos formatos (discos, puntas de pipeta, placas, etc), nuevos adsorbentes (adsorbentes basados en polímeros, adsorbentes mixtos) y el desarrollo de la automatización, ha incrementado su uso y productividad debido a que se pueden realizar extracciones múltiples simultáneas.⁶⁵

1.3.1.5. APLICACIONES DE EFS PARA LA EXTRACCIÓN DE HAP's

La EFS es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para extraer HAP's de muestras líquidas como agua y café soluble. En la Tabla 4 se muestran ejemplos de estudios en los cuales se ha utilizado la EFS para extraer HAP's.

Tabla 4. Determinación de HAP's usando como técnica de extracción la EFS

Muestra	HAP's analizados	Modalidad/ Adsorbente	Separación/ Detección	Referencia
Agua superficial	Naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, fluoranteno, criseno, benzo[e]acenaftirileno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno	Disco/ C ₁₈	CG/MS	68
Agua de mar	16 HAP's prioritarios de la EPA	Cartucho/ Polímero molecular impreso	CG/MS	69
Agua residual	16 HAP's prioritarios de la EPA	EFS automatizada con cartuchos/ C ₁₈	CLAR/UV, Fluorescencia	70
Agua desmineralizada y residual	Naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[k]fluoranteno	Cartucho/ C ₈ y copolímero estireno divinilbenceno	CLAR/UV	71
Café disuelto	Fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno	Cartucho/ C ₁₈ y copolímero estireno divinilbenceno	CLAR/ Fluorescencia	72
Agua superficial y de lagos, café disuelto	antraceno, pireno, criseno, benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno	Cartucho/ Polímero molecular impreso	CLAR/ Fluorescencia	73

1.3.2. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (DMFS)

La DMFS es una técnica de preparación de muestras que se aplica a la extracción de gran cantidad de compuestos orgánicos de matrices sólidas, semi-sólidas e incluso líquidas. En un primer paso las muestras se maceran con un adsorbente sólido en un mortero utilizando un pistilo para romper la estructura de la matriz y lograr una distribución homogénea alrededor de las partículas del adsorbente. El material macerado se transfiere a un cartucho, normalmente de polipropileno, y los analitos se eluyen con un solvente orgánico apropiado. La delgada y homogénea capa de muestra alrededor de las partículas del dispersante lleva a un proceso de transferencia de masa muy eficiente.

Algunas ventajas de la DMFS son que reduce el consumo de disolventes, la manipulación de la muestra y el tiempo total de análisis.⁷⁴

1.3.2.1. TIPOS DE ADSORBENTES

La clasificación de los adsorbentes es la misma mencionada anteriormente para EFS. Las aplicaciones clásicas de DMFS emplean adsorbentes en fase reversa como dispersantes, siendo el más usado la sílice octadecil (C_{18}); además también se han utilizado materiales C_8 y C_{30} . En teoría, las partículas de sílice rompen la estructura de la muestra mientras que las cadenas alquílicas unidas contribuyen a disolver sus componentes, proporcionando extractos relativamente limpios cuando se usan solventes polares como extractantes. También se han utilizado como adsorbentes sílice con amino-propil o aminas primarias y secundarias cuando se tienen muestras con grasa. Los adsorbentes de fase normal florisil, alúmina y sílice también se han usado como dispersantes, éstos interaccionan con los componentes de la muestra únicamente por adsorción y no son capaces de disolver la matriz de la muestra. También se han utilizado materiales inertes como arena, tierra de diatomeas o celita, aunque éstos tienen una menor selectividad.

Con frecuencia DMFS no produce analitos listos para analizar, es por esto que muchas veces se puede integrar en el proceso de preparación de muestras un paso

de limpieza en línea. La purificación del extracto se puede lograr al colocar en el fondo del cartucho un co-adsorbente, el cual tiene un comportamiento de adsorción diferente al dispersante. Los materiales de fase normal se emplean como co-adsorbentes para retener interferencias polares eluidas de matrices dispersas en C₁₈ u otro adsorbente de sílice funcionalizada.⁷⁵

1.3.2.2. TIPOS DE ELUYENTES

La selección de los disolventes de extracción que se van a usar en combinación con los dispersantes de fase normal es función de la polaridad del analito. Las sustancias no polares se pueden recuperar usando disolventes apolares, por ejemplo hexano, diclorometano o mezclas de ambos. Cuando los analitos tienen una polaridad intermedia o alta, se utiliza acetonitrilo, acetona, acetato de etilo, o mezclas de agua con etanol o metanol.

1.3.2.3. PROCESO DE LA DMFS

a) Macerar: una muestra líquida, viscosa, semi-sólida o sólida se coloca en un mortero ágata o de vidrio y se macera junto con un soporte sólido (adsorbente), usualmente un material C₈ ó C₁₈, usando un pistilo para obtener una completa ruptura y dispersión de la muestra en un soporte sólido. El proceso de macerado no requiere de un esfuerzo vigoroso, diferentes analistas pueden aplicar diferentes cantidades de presión o pueden obtener diferentes grados de dispersión de la muestra, sin embargo de manera general se obtienen resultados muy similares y poca variabilidad. La cantidad de adsorbente depende del tipo de muestra. Típicamente las proporciones de muestra/adsorbente van de 1:1 a 1:4.

b) Transferir y empacar: una vez completado el proceso de macerado, la muestra se puede empacar en un cartucho de EFS u otro dispositivo apropiado (como una columna de vidrio) que contiene en el fondo un filtro de polipropileno, el cual sirve como filtro y para retener la muestra. Se puede colocar un segundo filtro encima de la muestra antes de su compresión. Se comprime para formar un empaque de columna

1.3.2.4. APLICACIONES DE DMFS PARA LA EXTRACCIÓN DE HAP's

La DMFS es una de las técnicas utilizada para extraer HAP's de muestras sólidas y semisólidas como algas, tejido animal y miel. En la Tabla 5 se muestran ejemplos de estudios en los cuales se ha utilizado la DMFS para extraer HAP's.

Tabla 5. Determinación de HAP's usando como técnica de extracción la DMFS

Muestra	HAP's analizados	Adsorbente	Separación/ Detección	Referencia
Microalgas	Benzo[a]antraceno, benzo[k]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno y sus metabolitos	C18-PAH	CLAR/ Fluorescencia	76
Bivalvos	Antraceno, fluoranteno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno	C ₁₈	CLAR/ Fluorescencia	77
Tejido de pescado	benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-cd]pireno	C ₁₈ y como co-columna sulfato de sodio anhidro	CLAR/ Fluorescencia	78
Miel	16 HAP's prioritarios de la EPA	Florisil y como co-columna sulfato de sodio anhidro	CG/MS	79
Alimento para trucha	Dibenzo[a,l]pireno	C ₁₈ y como co-columna florisil	CLAR/ Fluorescencia	80

1.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE HAP's

En el caso de los HAP's, los métodos más comunes son la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). La mayor sensibilidad y selectividad se ha logrado al combinar la CG con espectrometría de masas y CLAR

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

con detección de fluorescencia. La CLAR en fase reversa es la que se aplica generalmente, con una columna típicamente de 25 cm de longitud empacada con partículas de 5 μm de un material C_{18} , con una elución de gradiente usando mezclas de agua con acetonitrilo o metanol,⁸¹ también se han utilizado fases C_8 e incluso diversos fabricantes ofrecen columnas específicamente para el análisis de este tipo de compuestos como Waters PAH C18, Supelcosil LC-PAH y Pinnacle II PAH.^{82,83,84} La CLAR se ha usado en algunos casos para determinar HAP's de alto peso molecular con puntos de ebullición elevados debido a que la volatilidad de los compuestos no es una limitante. Existen análisis de HAP's con CLAR en fase normal donde se utilizan columnas que tienen una fase polar químicamente enlazada (nitrilo, amino y nitro).⁸⁵

La EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) menciona la determinación de HAP's en los métodos 525.3, 550.1, 610, 8100, 8270D, 8272 y 8310, en estos los métodos de separación más comunes son CLAR (con los detectores de UV y fluorescencia) y CG (con los detectores FID y MS), como se puede observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Métodos EPA para determinar HAP's

Método EPA	Título	Tipo de HAP's	Separación	Detección
525.3	Determination of semivolatile organic chemicals in drinking water by solid phase extraction and capillary column gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS)	Acenaftileno, antraceno, criseno, pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-c,d]pireno	CG	MS

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Método EPA	Título	Tipo de HAP's	Separación	Detección
550.1	Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection	Acenaftileno, acenafteno, antraceno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, naftaleno, fenantreno, pireno	CLAR	UV y Fluorescencia
610	Methods for organic chemical analysis of municipal and Industrial wastewater Polynuclear aromatic hydrocarbons	Acenaftileno, acenafteno, antraceno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, naftaleno, fenantreno, pireno	CG CLAR	FID UV y Fluorescencia
8100	Polynuclear aromatic hydrocarbons	Acenaftileno, acenafteno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, dibenzo[a,e]pireno, dibenzo[a,h]pireno, dibenzo[a,i]pireno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, naftaleno, fenantreno, pireno	CG	FID

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Método EPA	Título	Tipo de HAP's	Separación	Detección
8270D	Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)	Acenaftileno, acenafteno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, dibenzo[a,e]pireno, fluoranteno, fluoreno, naftaleno, pireno	CG	MS
8272	Parent and alkyl polycyclic aromatics in sediment pore water by Solid-phase microextraction and gas chromatography/mass Spectrometry in selected ion monitoring mode	Naftaleno, 1-metilnaftaleno, 2-metilnaftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno	CG	MS
8310	Polynuclear aromatic hydrocarbons (in ground water and wastes)	Acenaftileno, acenafteno, antraceno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, naftaleno, fenantreno, pireno	CLAR	UV y Fluorescencia

1.5. CALIBRACIÓN

El objetivo del análisis químico de un material es obtener información analítica de éste representada por una *cantidad analítica de entrada*, X, a través de la medida de una magnitud fisicoquímica, Y, conocida como una *cantidad analítica de salida*. Es

por esto que es necesario tener una función de medida $Y=f(X)$, la cual nos permite relacionar los valores de X con sus correspondientes de Y . esta es una función de cantidades, cuando se usan valores conocidos de las cantidades de entrada en un modelos de medida, es posible medir la cantidad de salida. En la mayoría de los casos, esa relación, siempre basada en un principio fisicoquímico, no se puede expresar de manera general con una función matemática, es entonces cuando se emplean modelos empíricos adaptados a cada sistema analítico. La IUPAC define la calibración analítica como la operación que determina la relación funcional entre los valores medidos (intensidades de la señal), variable y , y las cantidades analíticas características de los tipos de analitos y su cantidad (contenido, concentración), variable x . Esta definición distingue dos clases de funciones de calibración. La primera para la identificación de especies y análisis cualitativo, y la segunda para análisis cuantitativo, siendo el principal propósito de esta última obtener una función que permita calcular las cantidades de un analito como función de una señal instrumental (función de cuantificación).

Estas funciones de calibración son características sólo para los estándares usados y dependen del instrumento y de las condiciones de operación. El principal objetivo de la calibración es establecer una función matemática de las medidas de los estándares la cual es después aplicada para inferir información analítica de las muestras analizadas. Para tener una cuantificación libre de errores, es necesario satisfacer dos requerimientos básicos: (1) la composición de los estándares y de las muestras deben ser similares y (2) los estándares y muestras deben tener un comportamiento idéntico en el sistema de medida. Aunque el primer requerimiento es deseable, con cubrir el segundo es suficiente para lograr representatividad.⁸⁶

La manera más sencilla de escribir una función de medida para cada calibración/cuantificación analítica es:

$$Y = \Phi(x,m) \cdot X$$

Donde X representa la cantidad del analito, Y la señal analítica y $\Phi(x,m)$ es el factor de medida, el cual depende del valor x de la magnitud X y el tipo de material (matriz) m donde se encuentra. En una situación ideal, el factor de medida solo sería

característico del tipo de analito e independiente de la cantidad del analito y/o matriz, en este caso el proceso químico de medida sería selectivo. La IUPAC define la selectividad como el grado en el cual el método se puede usar para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con comportamiento similar.

Una de las maneras más fáciles de escribir la función de medida para un analito (sin tomar en consideración la matriz) es:

$$Y = Y_0 + Y_{\text{anal}} = Y_0 + S(x) \cdot X$$

Donde Y_0 es la señal del blanco, y Y_{anal} es la señal neta generada por el analito, la cual es un producto de la sensibilidad del sistema de medida ($S(x)$) y X la cantidad/concentración del analito. Si se reacomoda la ecuación se obtiene que:

$$Y = \left[\frac{Y_0}{X} + S(x) \right] X$$

Donde el término entre paréntesis es el factor de medida:

$$\Phi = \frac{Y_0}{X} + S(x)$$

La sensibilidad se define como el cociente del cambio en la señal y el correspondiente cambio en el valor de la cantidad que va a ser medida. La función de medida puede ser escrita de manera general como: $y = f(x)$, usualmente es obtenida ajustando los diferentes pares (x,y) , al aplicar un algoritmo de regresión apropiado. Para cualquier cantidad estándar de analito, el factor de medida puede ser estimado por medio de un factor de respuesta (FR) de la siguiente ecuación:

$$FR = \frac{y}{x}$$

También cada cantidad de analito en la muestra se puede caracterizar por medio del factor del factor de calibración (FC) definido como:

$$FC = \frac{1}{FR}$$

En la Tabla 7 se muestran posibilidades de la curva de calibración lineal así como su FR asociado.⁸⁶

Tabla 7. Curvas de calibración lineal más frecuentes

Función de calibración	Señal del blanco	Sensibilidad	Factor de respuesta (FR)
$y = bx$	0	b (constante)	b (constante)
$y = a + bx$	a	b (constante)	$a/x + b$ (depende de x)

Para que la función de calibración, previamente establecido con los estándares, pueda ser aplicada a las muestras se pueden usar diferentes metodologías de calibración. Los estándares de calibración son preparados de materiales de referencia que contienen el analito o un sustituto, que es una sustancia pura (compuesto o elemento) similar al analito de interés en composición química, separación y medida que es representativo del analito nativo. Los estándares de calibración se pueden medir en una preparación separada de la muestra (metodología externa) o en una incluyendo la muestra (metodología interna). Usualmente un sustituto es usado en una metodología interna y, en este caso, se le llama estándar interno (EI). El estándar interno es químicamente distinto de los analitos y no tiene propiedades químicas idénticas. Sin embargo, usualmente se selecciona de tal manera que tenga una relación cercana con los analitos y pueda representar su comportamiento analítico.

La calibración externa (CE) es la metodología de calibración más usada, en esta los estándares de calibración no forman parte de la muestra que se va a analizar, son preparados y analizados por separado. Cuando se sospecha que puede haber problemas con la matriz, una calibración más confiable se puede obtener usando como estándar de calibración un material de referencia de la matriz o un material de referencia de la sustancia pura en conjunto con la matriz sin analito; a esta metodología se le llama calibración con matriz igualada (CM). La CM es un tipo particular de CE en el cual los estándares de calibración se preparan en una muestra simulada que no contiene inicialmente el analito. Para que la matriz no contenga los analitos como se requiere en CM estos deben ser componentes exógenos de la muestra, pero si los analitos son endógenos y se ha verificado el efecto de matriz, es necesario aplicar un método de adición estándar, llamado calibración por adición

estándar (CA). El método CA es una metodología de calibración interna, en el cual se adicionan cantidades crecientes del analito estándar a varias alícuotas de la muestra.⁸⁶

La confiabilidad de las metodologías de calibración interna se basa en la habilidad del EI de actuar como un surrogado. En términos de metrología, este hecho implica que el factor de respuesta (o sensibilidad) del EI es constante e igual a los factores de calibración de cada uno de los analitos, en el intervalo de aplicación del método. Esto es cierto para los detectores universales no específicos los cuales responden directamente a la cantidad de sustancia (masa o concentración). La calibración interna permite compensar la pérdida del analito durante la preparación de muestra y, de forma moderada, el efecto de matriz. Una de sus principales limitaciones es la disponibilidad de un EI adecuado. Como medida adicional de precaución, la cantidad del EI debe ser tal que su señal analítica (área o altura de pico) sea del mismo orden que la correspondiente al analito, de otra forma se pueden encontrar errores significativos en la cuantificación, sobre todo si la señal del estándar interno no es completamente lineal.

Cuando la medida de la sensibilidad de un sistema cambia de un analito a otro, la aplicación de la calibración por estándar interno requiere normalizar las señales analíticas medidas determinando el factor de normalización (FN) para cada analito con relación a un compuesto de referencia (usualmente, un estándar interno). Esta metodología de calibración se llama calibración por normalización interna o calibración por señal normalizada. Esta es propiamente una doble calibración interna-externa aplicada en dos pasos: (1) en un principio, una medida de estándares externos múltiples para determinar los factores de calibración de todos los componentes (analitos y estándar interno) y, los factores de normalización de los analitos en relación con el estándar interno, (2) en un segundo paso, el factor de calibración del estándar interno, previamente adicionado a la muestra, se determina y los analitos son cuantificados. Los valores del FN de los analitos dependen del detector empleado, así que es necesario estimarlo para cada sistema de medida.⁸⁶

1.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS

La validación del método establece que las características de desempeño del método cumplen los requerimientos para la aplicación analítica que se le quiere dar en todo el intervalo de concentraciones del analito en las cuales es aplicado. La validación del método proporciona una medida de la confiabilidad durante el uso cotidiano, que es obtener resultados analíticos con un nivel aceptable de incertidumbre. La validación está basada en parámetros estadísticos del procedimiento. El tipo de método y el uso que se le pretende dar indica que parámetros de validación se deben investigar, el laboratorio debe decidir que parámetros de desempeño necesitan ser caracterizados para validar el método. En la práctica, la validación de métodos se realiza evaluando una serie de parámetros de desempeño del método, como son:

- Exactitud es la medida de que tan cercano es el valor encontrado en la muestra con un valor aceptado de referencia, se mide como el porcentaje del analito recuperado en el ensayo (porcentaje de recobro del ensayo de una cantidad conocida adicionada del analito) o como la diferencia entre la media y el valor aceptado como verdadero. Nos permite estimar el grado en el cual los errores sistemáticos afectan un método en particular.
- La precisión se define como la concordancia (grado de dispersión) en los resultados de ensayos individuales de repeticiones del análisis de una muestra homogénea. Generalmente se expresa como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones. En la precisión se realizan tres diferentes mediciones: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad es la capacidad del método para generar los mismos resultados en un intervalo corto de tiempo en condiciones idénticas. La precisión intermedia se refiere a la concordancia entre resultados obtenidos con variaciones dentro del laboratorio debidas a eventos aleatorios que puedan que puedan ocurrir normalmente durante el uso del método, como los diferentes días, el analista y el equipo. Finalmente la reproducibilidad se soporta con la coincidencia de resultados producto de estudios colaborativos

entre diferentes laboratorios, se usa para la estandarización de la metodología.

- La selectividad se refiere a la medida en la cual un método puede determinar un analito en particular en una muestra compleja sin interferencia de los otros componentes de la mezcla.
- La especificidad es la capacidad de medir con exactitud y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes que se espera estén presentes en la muestra.
- El límite de detección (LD) se define como la concentración mínima de un analito en una muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado, por otro lado el límite de cuantificación (LC) se define como la concentración más baja de un analito en la muestra que puede ser cuantificado por el método con una exactitud y precisión adecuada. El LD es el punto en el cual un valor medido es más grande que su incertidumbre asociada, mientras que el LD es un parámetro para ensayos cuantitativos para bajos niveles de compuestos en muestras. Por ejemplo en cromatografía, el LD es la cantidad inyectada que resulta en un pico con una altura la menos tres veces mayor que la altura del ruido al nivel de la línea base. Para calcular el LD y LC se han utilizado diferentes enfoques: inspección visual, la desviación estándar (DE) de la respuesta y la pendiente (S) de la curva de calibración ($3.3 \cdot DE/S$ para el LD y $10 \cdot DE/S$ para el LC) y la relación señal-ruido convencional (3:1 para LD y 10:1 para LC), entre otras.
- La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcionales (o por medio de transformaciones matemáticas bien definidas) a la concentración (cantidad) del analito en la muestra en un intervalo dado. La linealidad se puede demostrar directamente en la sustancia de prueba (por dilución de una solución estándar *stock*) o por pesadas separadas de las sustancias de prueba. Se aplica una ecuación de regresión lineal a los resultados la cual debe tener un intercepto no significativamente

diferente de cero, si se obtuviera lo contrario se debe demostrar que no tiene efecto en la exactitud del método.^{87,88,89}

2.1. MATERIALES Y EQUIPOS

2.1.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS

- Metanol, grado cromatográfico, J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- Acetonitrilo, grado cromatográfico, J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- Isopropanol, grado cromatográfico, J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- Agua grado cromatográfico proveniente de un purificador Millipore modelo simplicity UV (Bedford, MA, USA)
- Estándares de HAP's, CHEMSERVICE (West Chester, PA, USA), pureza > 99%: fenantreno, antraceno, pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno
- Nitrato de sodio (NaNO_3), J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- Cloruro de sodio (NaCl), J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
- Proteosa peptona, MCD Lab (Tlalnepantla, MEX)
- Agar bacteriológico, MCD Lab (Tlalnepantla, MEX)
- Alcohol etílico Protect, (Morelos, MEX) diluido con agua al 75 % v/v

2.1.2. CULTIVO DE MICROALGAS Y TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE HAP's

- Sílice C18, Supelclean LC-18, Supelco (Bellefonte, PA, USA), tamaño de partícula de 45 μm
- Cepa pura de la microalga *Selenastrum capricornutum* provenientes de *The culture collection of algae* (UTEX), Universidad de Texas (Austin, TX, USA)
- Balanza analítica marca OHAUS (Pine Brook, NJ, USA) modelo Adventurer Pro AV114C

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

- Balanza semi-microanalítica OHAUS (Pine Brook, NJ, USA), modelo Discovery DV215CD
- Jeringa de polipropileno de 25 mL con adaptador para reservorios de 1 a 6 mL
- Viales de 2 y 4 mL de capacidad con tapón de rosca
- Reservorios de polipropileno de 1.5 y 8 mL, Varian (Palo Alto, CA, USA)
- Filtros para reservorios de 1.5 y 8 mL, Macherey-Nagel (Bethlehem, PA, USA)
- Mortero de ágata de 30 mL con pistilo
- Matraces 50 mL, PYREX (Corning, NY, USA)
- Frasco de vidrio de 1L
- Matraz kitasato 250 mL, PYREX (Corning, NY, USA)
- Agitador orbital Thermo Scientific (Dubuque, IA, USA), modelo 2346
- Incubadora con agitación, Lab Companion, Jeiotech (Seoul, Korea), modelo SI-600R
- Lámparas fluorescentes de 14W, modelo T5
- Lámparas incandescentes 4W de luz cálida
- Temporizador para controlar los ciclos de luz/obscuridad
- Espátula de acero inoxidable
- Tubos de ensayo de 20 x 200 mm (capacidad de 43 mL)
- Matraces erlenmeyer de 250 mL
- Asa bacteriológica
- Pinzas de disección
- Mecheros bunsen
- Algodón y gasas
- Tubos de plástico para centrífuga de 15 mL
- Portaobjetos
- Pipeta pasteur de 2.5 mL con bulbo
- Autoclave semi-automática, marca Tuttnauer (Hauppauge, NY, USA), modelo 2540EL
- Centrífuga, marca Sigma (Osterode am Harz, Germany), modelo 2-5

- Pipetas graduadas de 10 mL
- Perilla de succión
- Espectrofotómetro UV/Vis, marca Thermo Scientific (Dubuque, IA, USA), modelo Genesys 10S

2.1.3. SISTEMA CROMATOGRÁFICO

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia, con bomba binaria modelo 1525 y un módulo de control de temperatura de la columna modelo 1500, acoplado con un detector de arreglo de fotodiodos modelo 2998, marca Waters (PA, USA)
- Software de control y procesamiento de datos Breeze 2 y Empower 3, Waters (PA, USA)
- Columna analítica de acero inoxidable Zorbax Eclipse XDB-C18, dimensiones de 150 mm x 4.6 mm d. i., tamaño de partícula 5 μm , Agilent (Santa Clara, PA, CA, USA)
- Precolumna de guarda de acero inoxidable, dimensiones de 13 x 4.5 mm d.i., empacada con sílice fase inversa nucleosil C18, marca Phenomenex (San Francisco, CA, USA), tamaño de partícula 10 μm
- Jeringa de 50 μL , marca Hamilton (Reno, NV, USA)
- Baño de ultrasonido para degasificación de fases móviles, marca Branson (Danbury, CT, USA), modelo 1210
- Micropipeta de volumen variable de 2-20 μL , marca Transferpette, Brand (Germany)
- Micropipeta de volumen variable de 50-200 μL , marca Eppendorf (Hamburg, Germany)
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 μL , marca Eppendorf (Hamburg, Germany)

2.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES ESTÁNDAR

Las disoluciones se prepararon usando como disolvente metanol y se guardaron en viales ámbar en refrigeración a 4 °C.

Se preparó una disolución con fenantreno, antraceno, pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno y dibenzo[a,h]antraceno, cada uno a una concentración de 100 µg/mL.

Se realizaron las diluciones necesarias para realizar la calibración del sistema y para realizar los ensayos de exposición.

2.3. PREPARACIÓN DE MEDIO BRISTOL⁹⁰

Se colocaron en un frasco de 1L de capacidad 900 mL de agua destilada y se agregaron en el orden mostrado en la Tabla 8, 10 mL de cada una de las disoluciones *stock*, mientras se agitaba la mezcla:

Tabla 8. Componentes para la preparación del medio Bristol

Componente	Concentración de la disolución <i>stock</i> ^a	Concentración final el 1L de cultivo (mM)
NaNO ₃	10 g / 400 mL	2.94
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 g / 400 mL	0.17
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g / 400 mL	0.3
Na ₂ HPO ₄	3 g / 400 mL	0.43
KH ₂ PO ₄	7 g / 400 mL	1.29
NaCl	1 g / 400 mL	0.43

^a Las disoluciones *stock* se prepararon en agua destilada

Posteriormente se adicionó 1g de proteosa peptona y se llevó a un volumen de 1L con agua destilada (cuando se preparó medio sólido se adicionó además 1.5 % p/v de agar bacteriológico). Tapar y esterilizar en autoclave. Se almacenó en refrigeración.

2.4. CULTIVOS DE MICROALGAS

La cepa de la microalga *Selenastrum capricornutum* se sembró en tubos de ensayo que contenían aproximadamente 10 mL de medio Bristol sólido, se resembraron periódicamente para mantener la cepa.

Los medios de cultivo con microalgas usados en los ensayos se mantuvieron en crecimiento en 150 mL de medio Bristol líquido colocados en matraces erlenmeyer de 250 mL. Para lo anterior, en condiciones de esterilidad se tomaron 3 asadas de biomasa del cultivo sólido y se transfirió al matraz erlenmeyer con el medio líquido. Los cultivos líquidos se agitaron 4 veces al día durante dos horas con un agitador orbital, se mantuvieron a temperatura ambiente e iluminados con lámparas fluorescentes de luz fría con periodos de luz/oscuridad 16/8 horas.

Se tomó una alícuota de 5 mL del medio de cultivo y se le midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV/Vis a 685nm, se usó como blanco medio Bristol. Una vez que el medio de cultivo tenía una absorbancia de 1.00 con una densidad de células entre 2×10^6 y 6×10^6 células mL⁻¹, fue posible usarlo en los ensayos de exposición, ya que con esta absorbancia a partir de 15 mL de cultivo se obtienen aproximadamente 5 mg de biomasa, como fue documentado en un estudio previo.⁹¹

2.5. EXPERIMENTACIÓN

2.5.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS HAP's POR CLAR/DAD

Para conocer el orden de elución de los compuestos se analizó una disolución estándar que tenía a los 8 HAP's en estudio, cada uno a una concentración de 1 µg/mL, utilizando diferentes proporciones de metanol-agua como fase móvil. El flujo fue de 1 mL/min, volumen de inyección de 20 µL y longitud de onda de 254 nm. De este análisis se documentaron los tiempos de retención.

Para lograr una separación adecuada de los analitos se probaron la fase móvil isocrática 80:20 metanol:agua (A) y los gradientes que se muestran en la Figura 9. En todos los casos se utilizó un estándar con los HAP's de interés a concentración de

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1 µg/mL de cada uno, el flujo fue de 1 mL/min, el volumen inyectado de 20 µL y la longitud de onda de 254 nm.

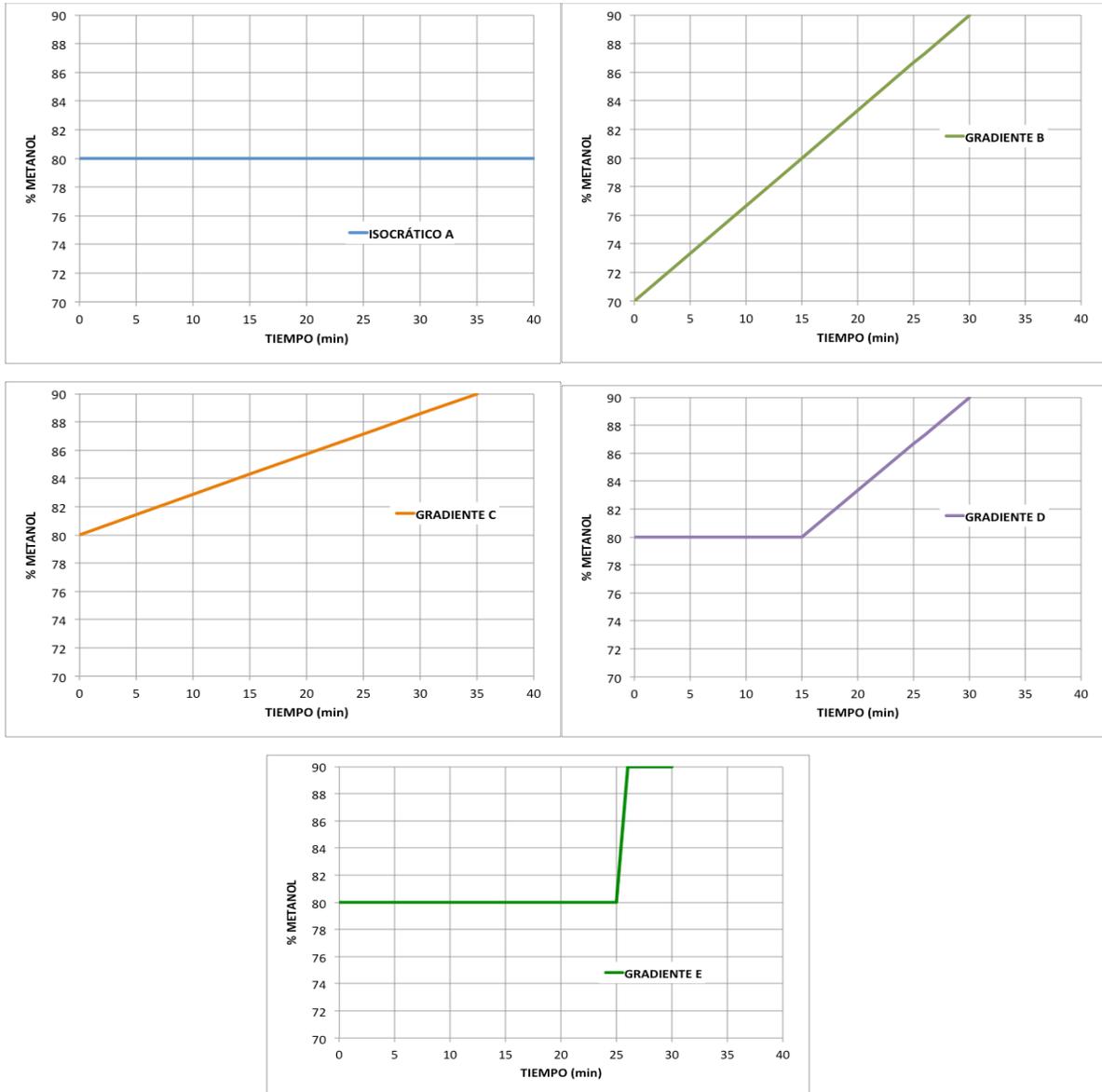


Figura 9. Condiciones de elución probadas para la optimización de la separación cromatográfica

A continuación se describen las condiciones de elución presentadas en la Figura 9.

Isocrático A:

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	80	20
40	80	20

Gradiente B:

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	70	30
30	90	10

Gradiente C:

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	80	20
35	90	10

Gradiente D:

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	80	20
15	80	20
30	90	10

Gradiente E:

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	80	20
25	80	20
26	90	10
30	90	10

2.5.2. PRECISIÓN, LINEALIDAD Y LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Para realizar la prueba de precisión del sistema cromatográfico se inyectó 5 veces una disolución estándar a concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ de manera consecutiva y se evaluó la desviación estándar relativa de las áreas.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la prueba de linealidad se inyectaron por triplicado al sistema disoluciones con diferentes concentraciones de los compuestos de interés como se muestra en la Tabla 9. Con el ajuste de mínimos cuadrados se evaluó la linealidad del sistema con el coeficiente de correlación (r^2).

Tabla 9. Concentraciones de los HAP's evaluadas en la linealidad

Compuesto	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)
Fenantreno Antraceno Benzo[a]antraceno Dibenzo[a,h]antraceno	0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10
Pireno Benzo[b]fluoranteno Benzo[k]fluoranteno Benzo[a]pireno	0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10

Adicionalmente se determinó el límite de detección experimental (LDE) inyectando disoluciones estándar de concentraciones 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.05 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los compuestos de interés. Se consideraron las señales de los picos que fueran parecidas a tres veces la señal del ruido. También se determinaron para cada uno de los HAP's los límites de detección y cuantificación teóricos con base en la curva de calibración y con la desviación estándar de la regresión, para estimar éstos límites se utilizaron las fórmulas siguientes:

$$LD \text{ teórico} = \frac{3.3 * S_{y/x}}{b} \quad LC \text{ teórico} = \frac{10 * S_{y/x}}{b}$$

Donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la regresión y b es la pendiente de la curva.

2.5.3. DESARROLLO DEL MÉTODO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)

Para desarrollar el método de EFS se utilizaron 3 compuestos de diferentes polaridades y por ende, diferente orden de elución (primero, intermedio y último): fenantreno, B[a]A y DB[a,h]A. Lo primero que se hizo fue optimizar el volumen y la fuerza de los eluentes de lavados; para esto se utilizó una muestra agua fortificada a

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

0.266 µg/mL de cada uno de los compuestos. Se realizó la extracción con 300 mg de sílice C18 empacada en un cartucho de polipropileno, que se le cargó con 15 mL de la muestra y después se le aplicó la siguiente secuencia basada en estudios previos realizados en el laboratorio para la extracción de B[a]A, B[b]F, B[k]F y B[a]P. Se adicionó un 15 % de isopropanol para evitar la adherencia de los HAP's a los materiales, lo cual no causó que se fugaran los compuestos más polares (fenantreno y pireno). Esta prueba se realizó por duplicado aplicando la siguiente secuencia de disolventes previamente optimizada por el grupo de investigación:

- 3 mL acetonitrilo → activación
- 10 mL agua → acondicionamiento
- Muestra de agua fortificada con un 15 % de isopropanol
- 5 mL de agua
- 4 mL acetonitrilo-agua (10:90) → primer lavado
- 3 mL acetonitrilo-agua (55:45) → segundo lavado
- 4 mL acetonitrilo → elución de los compuestos

Como se observará más adelante (sección 2.5.4), esta secuencia se modificó posteriormente en:

1. El % de isopropanol
2. La fuerza eluyente del segundo lavado
3. El volumen de acetonitrilo para la elución de los compuestos.

Los recobros individuales de los HAP's se evaluaron comparando el área obtenida con el área que se obtuvo al inyectar una disolución estándar a la misma concentración, se utilizó la siguiente fórmula:

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

2.5.4. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO DE EFS CON MUESTRAS DE AGUA

Para esta prueba se utilizó como muestra 15 mL de agua desionizada fortificada con 0.266 µg/mL de cada uno de los HAP's en estudio, a la muestra se le agregó un 30 %

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

de isopropanol como modificador orgánico, dejando equilibrar la muestra durante 10 min una vez agregado el isopropanol.

Para la EFS se empacaron cartuchos de polipropileno de 8 mL con 300 mg de sílice C18, la sílice se empacó entre dos filtros. Posteriormente se cargó la muestra de agua fortificada y se realizó la siguiente secuencia de elución:

- 3 mL acetonitrilo → activación
- 10 mL agua → acondicionamiento
- Muestra de agua fortificada con un 30 % de isopropanol
- 5 mL de agua
- 4 mL acetonitrilo-agua (10:90) → primer lavado
- 3 mL acetonitrilo-agua (40:60) → segundo lavado
- 8 mL acetonitrilo → elución de los compuestos

Los 8 mL de acetonitrilo se recuperaron en un vaso de precipitado de 10 mL, se evaporaron hasta un volumen aproximado de 1-1.5 mL en un baño María a 60-62 °C, se dejó enfriar y se completó con acetonitrilo a un volumen de 2 mL.

La repetibilidad se evaluó mediante la realización de 3 extracciones y se obtuvo la desviación estándar relativa.

2.5.5. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO POR EFS CON MUESTRAS DE MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO

Para estos ensayos se utilizaron muestras de 15 mL de medio de cultivo líquido a los cuales se les separó la biomasa por centrifugación. Esta prueba se evaluó realizando 9 extracciones en 3 diferentes días con una concentración de HAP's en la muestra de 0.266 µg/mL y evaluando la desviación estándar relativa obtenida. El procedimiento con el que se realizó la EFS es el mismo de la sección 2.5.4.

2.5.6. LINEALIDAD, LD Y LC DEL MÉTODO POR EFS CON MUESTRAS DE MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO

La linealidad se realizó con 5 ensayos fortificando el medio de cultivo a 0.066, 0.133, 0.2, 0.266 y 0.333 µg/mL de cada uno de los 8 HAP's y realizando el proceso de

extracción de la sección 2.5.4. Para determinar el límite de cuantificación y detección experimentales se fortificó medio de cultivo a 0.008, 0.016, 0.0266, 0.04, 0.053, 0.066, 0.08 y 0.133 $\mu\text{g/mL}$, y se consideraron las señales de los picos que presentaran una relación señal/ruido de 3:1 como límite de detección experimental (LDE) y de 10:1 como límite de cuantificación experimental (LCE), de acuerdo con lo establecido por las guías ICH.^{92,93}

2.5.7. DESARROLLO DEL MÉTODO DE DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (DMFS)

Para optimizar el método de DMFS se realizaron pruebas para determinar el volumen y fuerza de los disolventes de limpieza, así como el volumen necesario de acetonitrilo para eluir cuantitativamente a los 8 compuestos del cartucho. Inicialmente se probó con lavados similares a los del método de EFS y fortificando primero solamente la sílice C18 (ensayos sin muestra). Se empacó un cartucho con 100 mg de sílice C18, que fue previamente acondicionada con 1 mL de metanol por cada gramo de sílice C18 y secada al vacío. Los 100 mg de sílice C18 se fortificaron con cada uno de los compuestos a 0.04 μg de HAP/mg de sílice y la secuencia de elución fue la siguiente:

- 10 mL agua
- 10 mL acetonitrilo-agua (10:90)
- 5 mL acetonitrilo-agua (80:20)
- 5 x 1 mL acetonitrilo-agua (40:60)
- 3 x 1 mL acetonitrilo-agua (90:10)

Para evaluar la efectividad de los dos últimos eluentes de la secuencia, se realizó el análisis de cada una de la fracciones de dichos eluentes.

2.5.8. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO POR DMFS CON MUESTRAS DE MICROALGAS FORTIFICADAS

Para estos ensayos se utilizaron muestras de 5 mg de algas secas fortificadas con cada uno de los compuestos de interés a 0.8 μg de HAP/mg de muestra. Las

muestras se maceraron en un mortero ágata con 100 mg de sílice C18 y el macerado se empacó en un cartucho de polipropileno de 1.5 mL. La sílice C18 fue previamente acondicionada con 1 mL de metanol por cada gramo de sílice C18. Una vez empacado el cartucho se procedió a realizar la siguiente secuencia de elución:

- 10 mL agua
- 10 mL acetonitrilo-agua (10:90)
- 5 mL acetonitrilo-agua (80:20)
- 2 mL acetonitrilo-agua (30:70)
- 1 mL acetonitrilo-agua (90:10)

Se realizaron 6 extracciones en dos diferentes días y se evaluó la desviación estándar relativa obtenida.

2.5.9. LINEALIDAD, LD Y LC DEL MÉTODO POR DMFS CON MUESTRAS DE MICROALGAS FORTIFICADAS

La linealidad se realizó con 5 ensayos, fortificando la muestra de microalgas secas a 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de muestra, con cada muestra se realizó el proceso de extracción descrito en la sección 2.5.8. Para determinar el límite de cuantificación y detección experimentales se fortificó biomasa seca a 0.2, 0.12, 0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.024 y 0.012 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de muestra, y se consideraron las señales de los picos que presentaran una relación señal/ruido de 3:1 como LD y de 10:1 como LC, de acuerdo a lo establecido por las guías ICH.^{92,93}

2.5.10. EVALUACIÓN DE INTERFERENTES

Para ver que no existieran interferentes en el método analítico debido a compuestos provenientes de la matriz, se hizo una inyección de extractos provenientes de muestras sin fortificar, es decir un blanco de EFS (medio de cultivo) y un blanco de DMFS (biomasa seca) en ambas técnicas. Para verificar la ausencia de interferentes se evaluaron los cromatogramas obtenidos de cada uno de los blancos, en las mismas condiciones de análisis.

2.6. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE CULTIVOS DE MICROALGAS A LOS HAP's

2.6.1. BIOENSAYOS DE EXPOSICIÓN A FENANTRENO Y DIBENZO[a,h]ANTRACENO

Para definir los tiempos a los que se iban a exponer los cultivos cuando se trabajara la mezcla de los 8 HAP's, se decidió inicialmente evaluar por separado la curva de degradación del HAP más polar (fenantreno) y del menos polar (dibenzo[a,h]antraceno). Estos ensayos se realizaron por triplicado en 15 mL de cultivo con 2×10^6 células iniciales a una concentración de 0.266 $\mu\text{g/mL}$ de cada HAP, se hicieron con luz amarilla con periodos de luz/oscuridad de 16/8 horas y a temperatura ambiente. Para el fenantreno se eligieron tiempos de exposición de 1, 6 y 24 horas, mientras que para el dibenzo[a,h]antraceno de 1, 6, 24 y 48 horas.

Las concentraciones de los HAP's tanto en el medio de cultivo como en la biomasa fueron monitoreadas con las metodologías de EFS-CLAR-UV y DMFS-CLAR-UV finalmente optimizadas (secciones 2.5.4 y 2.5.8, respectivamente). Se calcularon tanto el % degradación como el % residual con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Degradado} = \frac{\mu\text{g estándar} - (\mu\text{g medio líquido} + \mu\text{g biomasa})}{\mu\text{g estándar}} \times 100$$

$$\% \text{ Residual} = 100 - \% \text{ Degradado}$$

2.6.2. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE CULTIVOS A 8 HAP's

Cuatro matraces erlenmeyer de 50 mL, cada uno con 15 mL de cultivo, se dividieron en 2 grupos:

- Tres cultivos de microalgas expuestos (CME), a los cuales se les adicionó 0.266 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los HAP's en estudio (Fen, Ant, Pir, B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A)
- Un blanco de cultivo de microalgas (BCM) que es medio de cultivo líquido que no fue expuesto a los HAP's.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los matraces se mantuvieron en agitación con un agitador orbital a 90 rpm. Uno de los ensayos se hizo a temperatura ambiente, la cual fue monitoreada en diferentes horas del día y se encontró que variaba entre 23 y 29 °C, por lo que adicionalmente se realizaron otros tres ensayos a temperatura controlada. Se usaron tres diferentes temperaturas: 20 °C, 25 °C, 30 °C. También se hizo un ensayo control con algas muertas por temperatura (esterilizadas en autoclave) a temperatura de 25 °C. Se iluminaron con lámparas de luz amarilla con periodos de luz/oscuridad 16/8 horas. Se utilizó la luz amarilla para evitar la formación de compuestos tóxicos, como se reportó en un estudio previo.³² Los tiempos de exposición fueron de 1, 3, 6, 24 y 48 horas. Las concentraciones de los HAP's tanto en el medio de cultivo como en la biomasa fueron monitoreadas con las metodologías optimizadas de EFS-CLAR-UV y DMFS-CLAR-UV descritas en las secciones 2.5.4 y 2.5.8, respectivamente. Se calcularon tanto el %degradación como el %residual con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Degradado} = \frac{\mu\text{g estándar} - (\mu\text{g medio líquido} + \mu\text{g biomasa})}{\mu\text{g estándar}} \times 100$$

$$\% \text{ Residual} = 100 - \% \text{ Degradado}$$

También se calculó el % recuperación y el % de remoción en el medio líquido:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\mu\text{g medio líquido}}{\mu\text{g estándar}} \times 100$$

$$\% \text{ Remoción} = 100 - \% \text{ Recuperación}$$

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS HAP's POR CLAR-DAD

Para conocer el orden de elución de los compuestos se obtuvieron los tiempos de retención utilizando diferentes proporciones de metanol-agua como fase móvil; con estos datos (mostrados en la Tabla 10) y el valor de t_M se calculó el valor de k' , y finalmente se graficó $\log k'$ contra el porcentaje de metanol, como se observa en la Figura 10.

Tabla 10. Tiempos de retención (t_R), valores de k' y $\log k'$ de los HAP's obtenidos utilizando diferentes proporciones de metanol

Parámetro	% MeOH	HAP							
		Fen	Ant	Pir	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[a]P	DB[a,h]A
t_R (min)	70	15.987	18.113	26.712	46.636	-	-	-	-
	77	8.227	8.978	12.716	19.03	28.308	29.840	31.935	44.640
	85	4.394	4.696	6.212	7.956	10.993	11.356	12.42	15.139
	90	3.449	3.572	4.645	5.687	7.517	7.740	7.751	9.669
	100	2.173	2.221	2.611	2.752	3.292	3.320	3.642	3.693
k' ^a	70	12.323	14.094	21.260	37.863	-	-	-	-
	77	5.856	6.482	9.597	14.858	22.590	23.867	25.613	36.200
	85	2.662	2.913	4.177	5.630	8.161	8.463	9.350	11.616
	90	1.874	1.977	2.871	3.739	5.264	5.450	5.459	7.058
	100	0.811	0.851	1.176	1.293	1.743	1.767	2.035	2.078
Log k'	70	1.091	1.149	1.328	1.578	-	-	-	-
	77	0.768	0.812	0.982	1.172	1.354	1.378	1.408	1.559
	85	0.425	0.464	0.621	0.751	0.912	0.928	0.971	1.065
	90	0.273	0.296	0.458	0.573	0.721	0.736	0.737	0.849
	100	-0.091	-0.070	0.070	0.112	0.241	0.247	0.309	0.318

^a Para obtener el valor de k' se tomó un t_M de 1.2 minutos

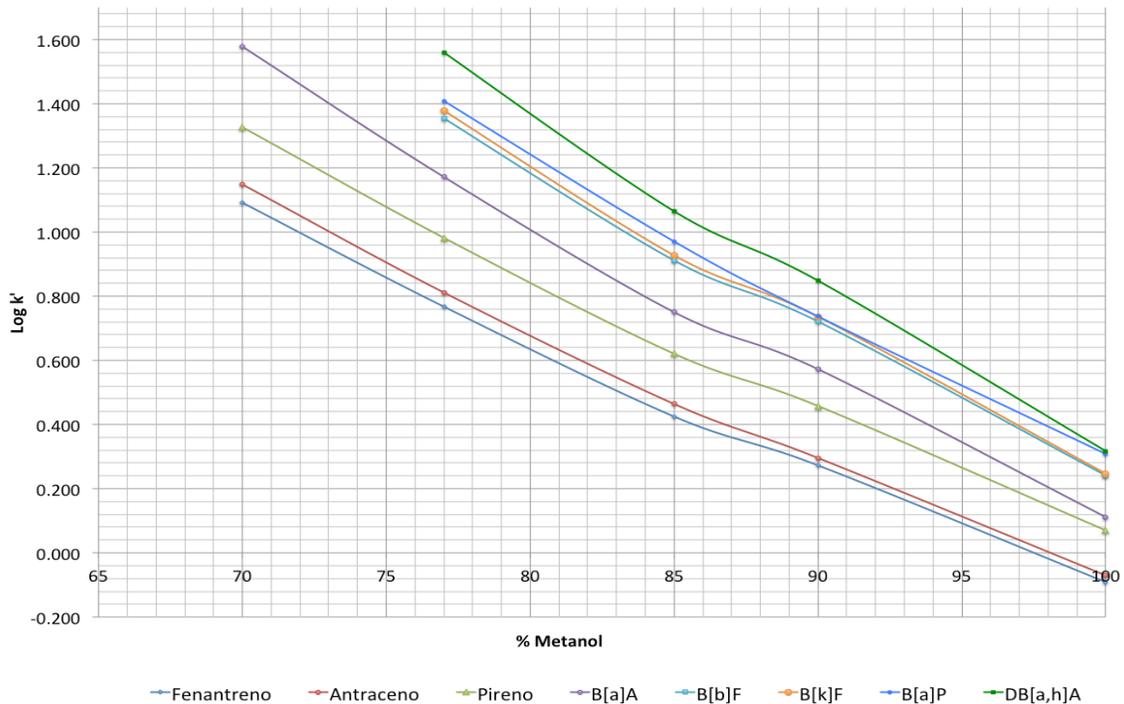


Figura 10. Variación del log del factor de capacidad (k') con el porcentaje de metanol de la fase móvil

En la gráfica se puede observar que los primeros compuestos en eluir son fenantreno y antraceno (formados por 3 anillos), seguidos del pireno y B[a]A (formados por 4 anillos), y después eluyen B[b]F, B[k]F, B[a]P y dibenzo[a,h]antraceno (formados por 5 anillos), esto se debe a que al aumentar el número de anillos los compuestos se vuelven más hidrófobos lo que aumenta su retención en la columna ya que es una fase reversa.

Con base a estos resultados se observó que los valores de k' para B[b]F y B[k]F son muy similares, lo que causaría cierta dificultad en la separación, por lo cual se probaron los diferentes gradientes y el isocrático descritos en la metodología de la sección 2.5.1 para la separación de los 8 HAP's en estudio.

Los valores de la resolución y el factor de coelución para los picos cromatográficos de estos dos compuestos se muestran en la Tabla 11.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11. Resultados obtenidos para las condiciones de elución A-E

Condición de elución	Resolución entre B[b]F y B[k]F ^a	Factor de coleo B[a]P ^a	Factor de coleo DB[a,h]A ^a	Tiempo de retención del DB[a,h]A (min)
Isocrático A	1.299	1.223	1.205	33.732
Gradiente B	1.343	1.056	0.976	29.548
Gradiente C	1.066	1.037	1.048	21.356
Gradiente D	1.211	0.979	1.105	26.640
Gradiente E	1.223	1.007	1.062	28.812

^a Valor de resolución y factor de coleo obtenido con el software Breeze 2

Se decidió elegir el gradiente B, pues aunque la resolución que da entre B[b]F y B[k]F es muy parecida a la del isocrático A, éste da picos menos coleados y más finos, debido a que se aumenta el porcentaje de metanol para la elución de los últimos compuestos, al mismo tiempo que disminuye el tiempo total de análisis. En la Figura 11 se muestra un cromatograma típico con el gradiente B.

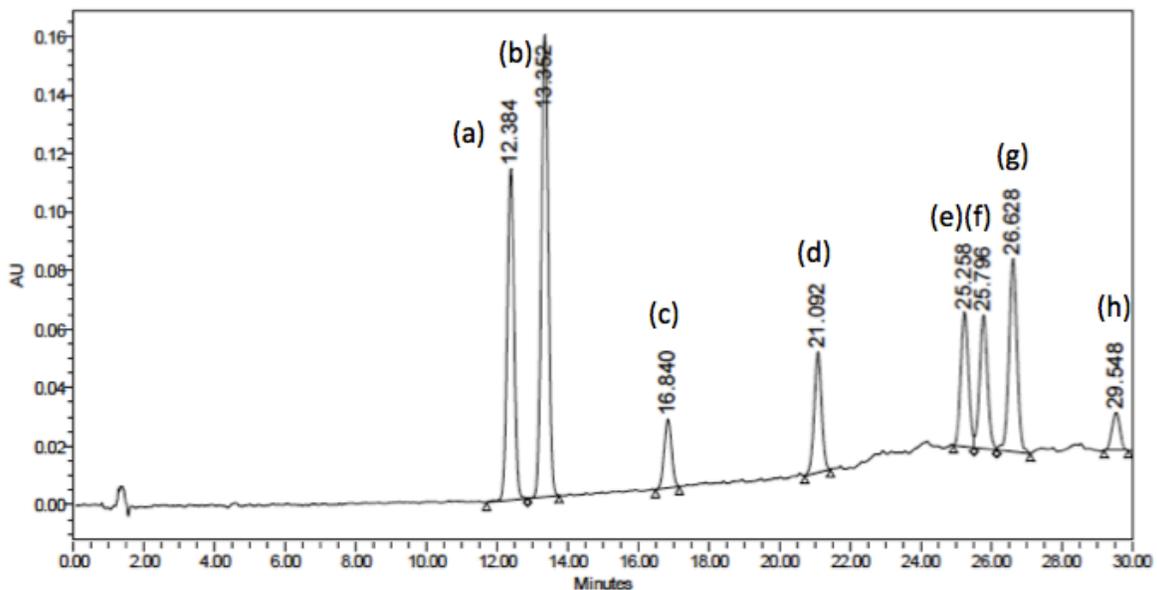


Figura 11. Cromatograma obtenido con la disolución estándar de una mezcla de HAP's cada uno a concentración de 2 µg/mL, utilizando el gradiente B. Flujo de 1 mL/min. Columna Zorbax eclipse XDB-C18. Detector DAD a 254 nm. Volumen de inyección de 20 µL.
 (a) = Fen, (b) = Ant, (c) = Pir; (d) = B[a]A, (e) = B[b]F, (f) = B[k]F, (g) = B[a]P, (h) = DB[a,h]A

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 11 se observa que el último compuesto termina de eluir a los 30 minutos. Finalmente se agregó un paso más al programa de elución para que la columna se estabilizara en la composición final (2 minutos más). Para poder regresar a las condiciones iniciales y así efectuar la siguiente inyección se programaron otros dos pasos para regresar a la composición inicial en 1 minuto y después mantener así durante 4 minutos para equilibrarse. Este tiempo de estabilización fue el mínimo que se requirió para que los tiempos de retención no se recorrieran. Entonces, el programa de elución completo que se usó se presenta en la Tabla 12.

Tabla 12. Programa de elución final utilizado para la separación de los HAP's

Tiempo (min)	% Metanol	% Agua
0	70	30
30	90	10
32	90	10
33	70	30
37	70	30

Otro de los parámetros que se optimizaron fue la longitud de onda a la que se obtendrían los cromatogramas, para lo cual se hizo un barrido de 200 a 400 nm de cada uno de los compuestos con el detector espectrofotométrico de arreglo de diodos; así se obtuvieron los espectros de absorción UV, dando los máximos de absorción presentados en la Tabla 13.

Tabla 13. Longitudes de onda de máxima absorbancia y seleccionada para obtener los cromatogramas de cada uno de los HAP's en estudio

Compuesto	Longitudes de onda de máxima absorbancia (nm) ^a	Longitud de onda seleccionada (nm)
Fen	249.9	250
Ant	251.0	
B[b]F	254.6, 299.8	
B[k]F	295.0, 305.8	
Pir	239.2, 271.2, 333.3	275
B[a]A	286.7, 376.0	
B[a]P	264.1, 295.0	295
DB[a,h]A	286.7, 296.2	

^a Valores obtenidos con el software Breeze 2

En el anexo 1 se muestran los espectros de absorción UV obtenidos para los 8 HAP's. Con base en estos resultados se decidió que, por medio del *software Empower 3*, en la misma corrida se obtuvieran los cromatogramas a tres longitudes de onda seleccionadas, para que en cada uno de ellos se detectaran de manera óptima los diferentes compuestos en estudio como se muestra en la Tabla 13.

Los cromatogramas a cada longitud de onda se presentan a continuación, en la Figura 12.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

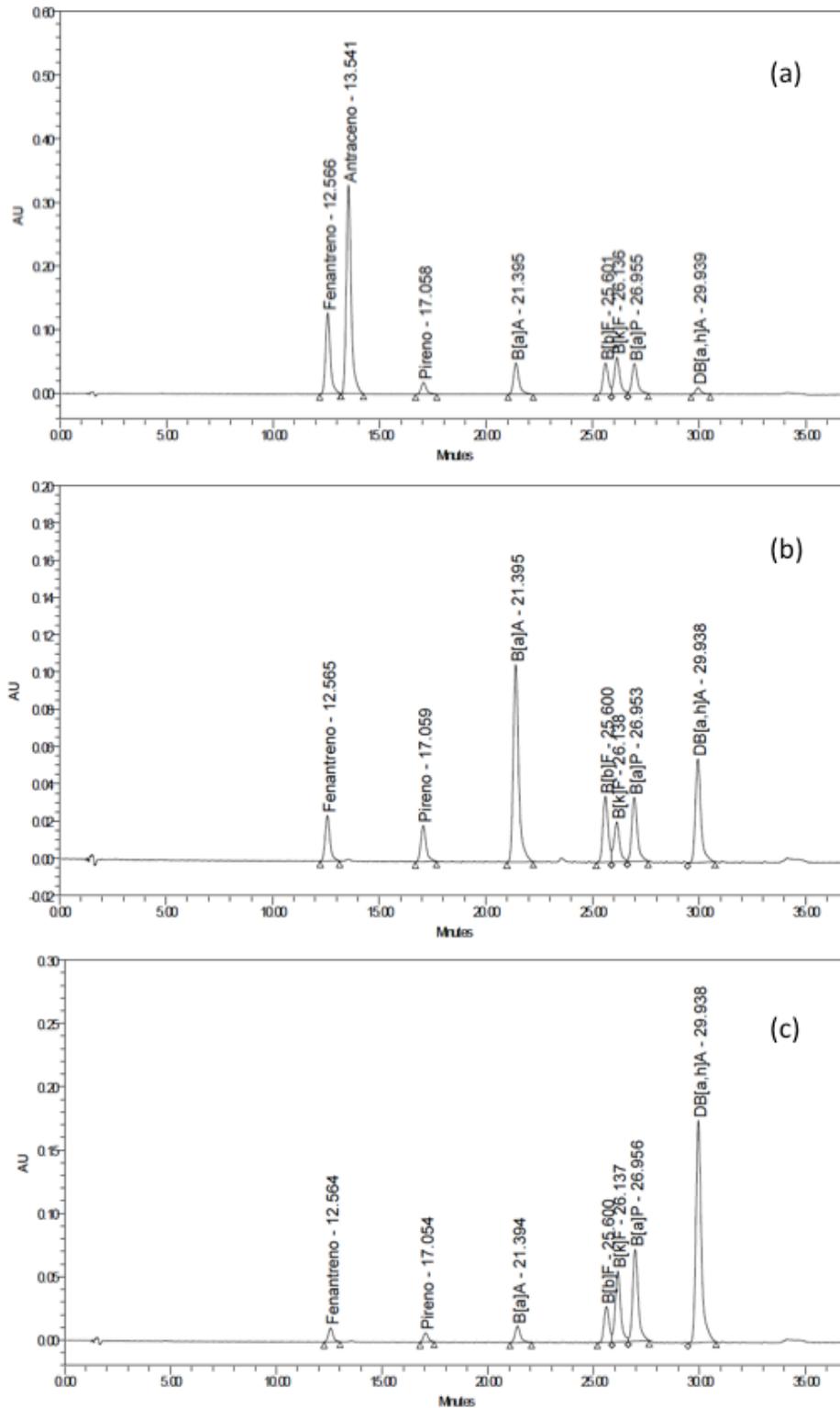


Figura 12. Cromatograma obtenido con una mezcla de HAP's todos a concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$, utilizando el gradiente final. Flujo de 1 mL/min. Columna Zorbax eclipse XDB-C18. Volumen de inyección de 20 μL . Detector DAD: (a) = 250 nm, (b) = 275 nm, (c) = 295 nm.

3.2. PRECISIÓN, LINEALIDAD Y LÍMITE DE DETECCIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Para la prueba de precisión del sistema cromatográfico se realizó la repetibilidad, haciendo 5 inyecciones consecutivas de una solución estándar a 4 $\mu\text{g/mL}$ de cada HAP y obtuvieron los valores de la desviación estándar relativa (DER) presentados en la Tabla 14.

En la prueba de linealidad se hicieron curvas de calibración para los 8 HAP's de interés en el rango de 10 – 0.5 $\mu\text{g/mL}$ para Pir, B[b]F, B[k]F y B[a]P; y en un intervalo de 10 – 0.1 $\mu\text{g/mL}$ para Fen, Ant, B[a]A y DB[a,h]A. Como resultado para todos los compuestos se obtuvieron coeficientes de correlación (r^2) mayores a 0.99 lo que indica que en este intervalo la respuesta del detector DAD es lineal con respecto a su concentración.

Se calcularon los límites de detección de manera experimental inyectando estándares con concentraciones de los HAP's de interés cercanas al límite de detección del instrumento, se realizaron inyecciones de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.03 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los compuestos y se consideraron las concentraciones con relación señal ruido mayor que 3, además también se calcularon de forma teórica el límite de detección y el de cuantificación con los datos de la desviación estándar de regresión y la pendiente de la curva obtenidos después de ajustar la curva con el método de mínimos cuadrados, dando los resultados de la Tabla 14.

Los límites de detección calculados fueron mayores al valor experimental para todos los compuestos a excepción del pireno, en donde se obtuvo el caso contrario con el valor teórico y experimental del límite de detección aunque ambos son cercanos.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Resultados de la validación del sistema cromatográfico

Compuesto	Precisión n=5 (%DER)	Ecuación de la recta μg adicionados (x) vs μg recuperados (y)	Coefficiente de correlación (r^2)	LC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a	LD ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a	LDE ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^b
Fen	0.67	$y = 441516x - 15244$	0.9993	0.9948	0.3283	0.05
Ant	1.34	$y = 1000000x - 19816$	0.9992	1.0895	0.3595	0.03
Pireno	1.85	$y = 102277x + 3022.5$	0.9999	0.8136	0.2685	0.3
B[a]A	0.96	$y = 482660x - 38156$	0.9967	2.1710	0.7164	0.1
B[b]F	0.37	$y = 248167x - 25683$	0.9966	2.1667	0.7150	0.2
B[k]F	1.05	$y = 195470x - 21404$	0.9939	2.8995	0.9568	0.2
B[a]P	1.15	$y = 277806x - 25580$	0.9955	2.5058	0.8269	0.2
DB[a,h]A	0.49	$y = 465594x - 24944$	0.9974	1.8976	0.6262	0.05

^a LC y LD teóricos, calculados con base en la desviación estándar y la pendiente de la curva de calibración

^b LD experimental, concentración que proporciona una señal 3 veces mayor que el ruido de fondo

3.3. DESARROLLO DEL MÉTODO POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)

En la Tabla 15 se muestran los recobros obtenidos para las pruebas del método por EFS utilizando como modificador un 15 % de isopropanol y la siguiente secuencia de elución:

- 3 mL acetonitrilo → activación
- 10 mL agua → acondicionamiento
- Muestra de agua fortificada con un 15 % de isopropanol
- 5 mL de agua
- 4 mL acetonitrilo-agua (10:90) → primer lavado
- 3 mL acetonitrilo-agua (55:45) → segundo lavado
- 4 mL acetonitrilo → elución de los compuestos

Tabla 15. Recobros obtenidos para el método de EFS adicionando a la muestra 15 % de isopropanol

Compuesto	% Recobro	
	Primera extracción	Segunda extracción
Fen	55	61
B[a]A	49	56
DB[a,h]A	6	6

3.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA CARGA Y ELUCIÓN DE LOS HAP's

Debido a que los recobros fueron muy bajos, se inyectó el eluato correspondiente al segundo lavado (acetonitrilo-agua 55:45) y se confirmó que en éste se perdía aproximadamente 30 % de fenantreno y 20 % de B[a]A, por lo que se repitió la prueba disminuyendo el volumen de éste segundo lavado de 3 a 1.5 mL. Sin embargo, en esta prueba también se observó que se perdía más del 20 % de los compuestos antes mencionados, por lo que se decidió disminuir la fuerza del disolvente correspondiente al segundo lavado, cambiando la proporción de acetonitrilo-agua 55:45 a acetonitrilo-agua 40:60. Se realizó nuevamente la carga de la muestra con agua fortificada a 0.266 µg/mL de cada uno de los compuestos mencionados anteriormente con 30 % de isopropanol y se aplicó y la siguiente secuencia de elución después de acondicionar el cartucho con 3 mL de acetonitrilo y 10 mL de agua:

- 5 mL de agua
- 4 mL acetonitrilo-agua (10:90) → primer lavado
- 3 mL acetonitrilo-agua (40:60) → segundo lavado
- 4 mL acetonitrilo → elución de los compuestos

La proporción de isopropanol en la muestra, se aumentó hasta un 30 %, para que los recobros del DB[a,h]A se incrementaran. Los resultados obtenidos de este ensayo se presentan en la Tabla 16.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 16. Recobros para el ensayo de EFS adicionando a la muestra el 30 % de isopropanol

Compuesto	% Recobro	
	Segundo lavado 3 mL MeCN-Agua (40:60)	4 mL MeCN
Fen	2.5	93
B[a]A	ND ^a	69
DB[a,h]A	ND ^a	55

^a ND: No detectado

Debido a que el DB[a,h]A y el B[a]A aún tenían recobros bajos, se procedió a realizar un ensayo con aplicación de un mayor volumen con 4 mL de acetonitrilo como eluente de todos los 8 HAP's. Entonces se aplicaron 10 x 1 mL de acetonitrilo y cada fracción se recolectó y se analizó cromatográficamente. Los valores de recobros acumulados se presentan en la Tabla 17 y graficados en la Figura 13.

Tabla 17. Recobro acumulado obtenido en cada fracción de acetonitrilo

mL acetonitrilo	% Recobro acumulado (n=1)							
	Fen	Ant	Pireno	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[a]P	DB[a,h]A
1	89	88	82	74	64	61	57	49
2	95	96	92	90	89	88	87	83
3	96	96	92	91	91	90	90	86
4	96	97	92	92	91	90	90	88
5	96	97	92	94	91	90	90	90
6	97	98	92	94	91	90	90	91
7	97	98	92	94	91	90	90	93
8	97	99	92	94	91	90	90	94
9	97	99	92	94	91	90	90	95
10	97	99	92	94	91	90	90	95

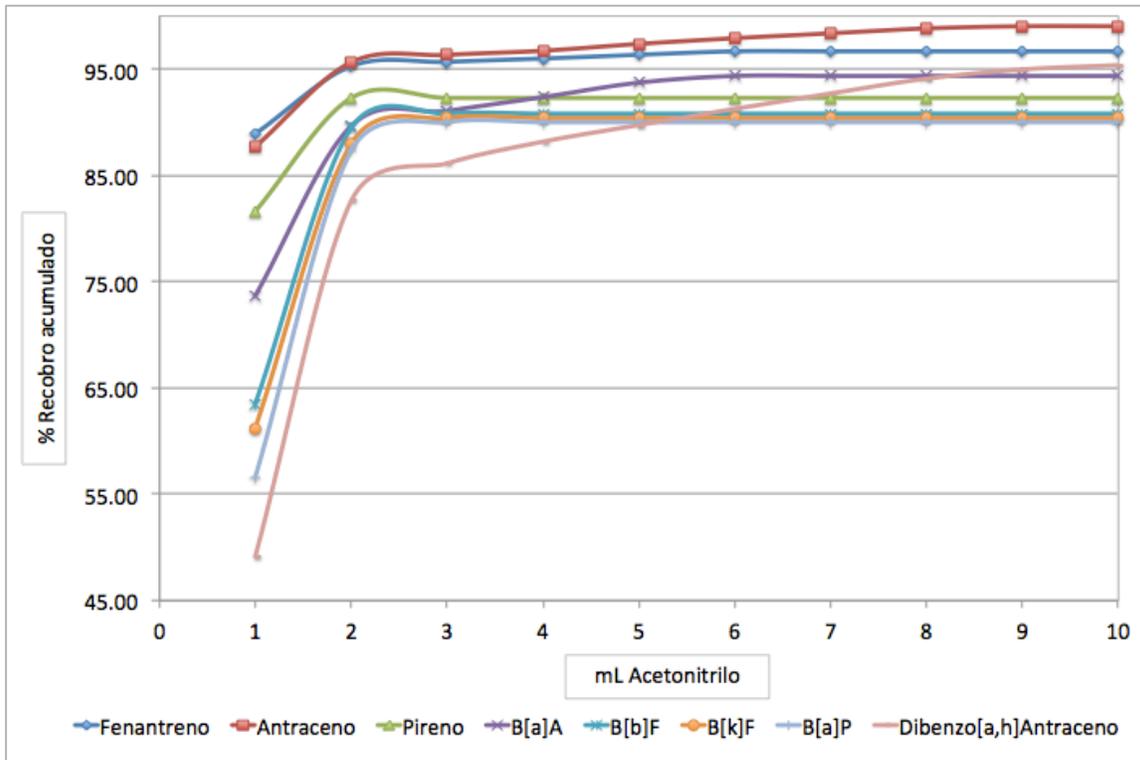


Figura 13. Recobros acumulados para los 8 HAP's en estudio.

Elución con acetonitrilo 100 %.

En la Tabla 17 se observó que se necesitan al menos 6 mL para eluir un 91 % del dibenzo[a,h]antraceno, por lo cual se decide dejar como volumen de elución 8 mL de acetonitrilo, pues con este volumen todos los compuestos tienen un recobro superior al 90 %. Debido a que el volumen de elución fue grande diluyendo el extracto, para concentrarlo se evaporó a sequedad en un baño maría a 75 °C, para luego reconstituir en 1 mL de acetonitrilo para su inyección.

3.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EVAPORACIÓN

Para evaluar el efecto de la evaporación en los recobros de los HAP's se efectuó por triplicado un experimento en donde se evaporaron a sequedad 8 mL de una disolución de HAP's a 80 °C y se reconstituyó en 1 mL de acetonitrilo. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 18.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 18. Recobros obtenidos al evaporar a sequedad disoluciones de los HAP's en 8 mL de acetonitrilo y reconstitución en 1 mL

Extracción	% Recobro							
	Fen	Ant	Pir	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[a]P	DB[a,h]A
1	47	54	76	79	89	84	84	90
2	15	21	50	83	72	93	90	91
3	29	40	56	76	88	88	88	93
Promedio	30	38	61	79	83	88	87	91
DE	16	17	14	4	10	5	3	2
DER	53	43	22	4	11	5	3	2

De estos resultados se observó que al evaporar a sequedad no se tuvo buena reproducibilidad para los compuestos más pequeños y volátiles (fenantreno, antraceno y pireno). Como los recobros de los compuestos más volátiles no fueron reproducibles, se decidió evaporar a temperatura más suave de 60-62 °C. Entonces, se realizaron 2 pruebas diferentes evaporando disoluciones, la primera fue fortificando 8 mL de acetonitrilo solo con fenantreno y antraceno, y la segunda fortificando 8 mL con los 8 HAP's de interés; la fortificación se realizó con 4 µg y cada prueba se realizó por duplicado. El tiempo de evaporación fue de 1.5 horas y las muestras no se llevaron a sequedad, se dejaron hasta un volumen entre 1 y 1.5 mL y finalmente se completaron a 2 mL con acetonitrilo. Los resultados son los mostrados en la Tabla 19.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 19. Recobros al evaporar a 1-1.5 mL las disoluciones de los HAP's en 8 mL de acetonitrilo

Prueba	Muestra	% Recobro							
		Fen	Ant	Pir	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[a]P	DB[a,h]A
1	1	95	93	-	-	-	-	-	-
	2	90	96	-	-	-	-	-	-
2	1	101	97	99	100	101	99	98	98
	2	92	90	92	92	97	95	99	95

Como se observa en la Tabla 19, los resultados ya fueron reproducibles, por lo que se decidió evaporar los extractos en baño maría a 60-65 °C hasta 1-1.5 mL y completar a un volumen de 2 mL con acetonitrilo para su análisis. También se puede concluir que la evaporación en condiciones suaves no tiene efecto significativo en el recobro de los HAP's.

3.4. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO DE EFS CON MUESTRAS DE AGUA

Para evaluar la repetibilidad se realizaron 3 extracciones usando muestras sintéticas constituidas por agua millipore fortificada con los HAP's, y se evaluó la desviación estándar relativa que se obtuvo, cuyos valores se presentan en la

Tabla 20.

Tabla 20. Resultados para la repetibilidad de la EFS con muestras de agua fortificada

Muestra	%Recobro							
	Fen	Ant	Pir	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[a]P	DB[a,h]A
1	90	95	99	93	86	86	83	73
2	88	91	96	88	82	82	85	73
3	88	91	98	88	79	80	82	68
Promedio	89	92	98	90	82	83	83	71
DE ^a	1	2	2	3	4	3	2	3
DER ^b	1	3	2	3	4	4	2	4

^a

Desviación estándar, ^b Desviación estándar relativa

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los resultados de la tabla anterior se observó una buena repetibilidad del método con valores de desviación estándar relativa menores o iguales al 4%.

3.5. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO POR EFS CON MUESTRAS DE MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO

En esta prueba se utilizó medio de cultivo proveniente de las microalgas fortificado con los HAP's, se realizaron 9 extracciones en 3 días diferentes para la repetibilidad, se determinó el recobro y se evaluó la desviación estándar relativa obtenida. Estos resultados se presentan a continuación:

Tabla 21. Repetibilidad de la EFS con muestras de medio de cultivo líquido fortificado proveniente de las microalgas.

Día	Muestra	%Recobro							
		Fen	Ant	Pir	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[a]P	DB[a,h]A
1	1	82	86	89	85	85	82	86	74
	2	82	85	86	88	87	85	89	79
	3	88	92	91	85	85	84	86	75
2	1	75	80	95	84	88	82	81	71
	2	75	79	95	85	89	82	80	72
3	1	92	94	94	92	93	89	85	81
	2	93	92	95	89	89	83	82	75
	3	94	94	98	90	93	90	87	80
	4	83	83	97	86	84	81	79	77
1	Promedio	84	88	89	86	86	84	87	76
	DE ^a	3	4	3	2	1	2	2	3
	DER ^b	4	4	3	2	1	2	2	3
1-3	Promedio	85	87	93	87	88	84	84	76
	DE ^a	7	6	4	3	3	3	3	4
	DER ^b	9	7	4	3	4	4	4	5

^a DE: desviación estándar, ^b DER: desviación estándar relativa

En la Tabla 21 se puede observar buena repetibilidad con mayor variabilidad en los resultados obtenidos para fenantreno y antraceno, los cuales son los compuestos

más volátiles y más difíciles de controlar, ya que el mayor valor de desviación estándar relativa fue 9 % y los recobros obtenidos fueron mayores al 70 % para los 8 HAP's en estudio, aún cuando la muestra que se analiza es un medio de cultivo líquido de las microalgas, que se considera compleja por la variedad de componentes que contiene.

3.6. LINEALIDAD, LD Y LC DEL MÉTODO POR EFS CON MUESTRAS DE MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO

La linealidad del método se realizó con 5 ensayos usando como muestra medio de cultivo fortificado a diferentes concentraciones, las cuales se mencionaron en la sección 2.5.6. En la Tabla 22 se muestran los resultados obtenidos para esta prueba.

Tabla 22. Resultados de la prueba de linealidad del método por EFS

Compuesto	Ecuación de la recta μg adicionados (x) vs μg recuperados (y)	Coefficiente de correlación (r ²)
Fenantreno	$y = 0.8275x + 0.1486$	0.9956
Antraceno	$y = 0.8773x + 0.1111$	0.9957
Pireno	$y = 0.9099x + 0.1513$	0.9957
Benzo[a]antraceno	$y = 0.9087x - 0.1014$	0.9924
Benzo[b]fluoranteno	$y = 0.9046x + 0.0860$	0.9913
Benzo[k]fluoranteno	$y = 0.8701x - 0.0895$	0.9904
Benzo[a]pireno	$y = 0.8619x - 0.1100$	0.9901
Dibenzo[a,h]antraceno	$y = 0.7714x + 0.0396$	0.9904

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede considerar buena la linealidad del método por EFS, ya que para todos los compuestos el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99. Al multiplicar el valor de la pendiente por 100 se obtiene un valor promedio de recobro, el cual tiene valores entre 77 y 91 %, cercanos al valor promedio de recobro de la prueba de repetibilidad.

Por experiencias preliminares se determinó el límite de cuantificación y detección experimental, para esto se fortificó el medio de cultivo a concentraciones

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

decrecientes de 0.133, 0.08, 0.066, 0.053, 0.04, 0.0266, 0.016 y 0.008 $\mu\text{g/mL}$, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 23.

Tabla 23. LC y LD experimentales obtenidos para EFS

Compuesto	LD experimental ($\mu\text{g/mL}$) ^a	LC experimental ($\mu\text{g/mL}$) ^b
Fenantreno	0.016	0.040
Antraceno	0.008	0.016
Pireno	0.040	0.133
Benzo[a]antraceno	0.016	0.040
Benzo[b]fluoranteno	0.026	0.080
Benzo[k]fluoranteno	0.026	0.080
Benzo[a]pireno	0.026	0.066
Dibenzo[a,h]antraceno	0.016	0.040

^a LD experimental, concentración que proporciona una relación señal/ruido de 3

^b LC experimental, concentración que proporciona una relación señal/ruido de 10

3.7. DESARROLLO DEL MÉTODO DE DMFS

Del análisis de las fracciones de los dos últimos eluentes de la secuencia de elución descrita en la sección 2.5.7: 5 x 1 mL acetonitrilo-agua (40:60) y 3 x 1 mL acetonitrilo-agua (90:10), se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 24.

Tabla 24. Recobros para cada fracción de los dos últimos eluentes de la secuencia de DMFS

Compuesto	% Recobro							
	Fracciones de 1 mL de la mezcla acetonitrilo-agua (40:60)					Fracciones de 1 mL de acetonitrilo-agua (90:10)		
	1	2	3	4	5	1	2	3
Fen	12	19	19	13	6	84	1	ND
Ant	10	15	16	12	8	85	1	ND
Pir	6	11	13	11	10	90	ND	ND
B[a]A	3	6	6	6	ND	89	ND	ND
B[b]F	2	2	4	3	ND	89	ND	ND
B[k]F	1	2	3	3	ND	88	ND	ND
B[a]P	ND	3	5	4	ND	85	ND	ND
DB[a,h]A	ND	1	1	1	ND	90	ND	ND

ND: No detectado

Con base en los resultados obtenidos se determinó que con 1 mL de la mezcla acetonitrilo-agua (90:10) era suficiente para eluir los 8 HAP's de interés, mientras que fue necesario disminuir la fuerza del lavado, ya que desde la primera fracción se observó que los primeros dos compuestos se pierden en más del 10 %. Se decidió probar con 2 mL de una mezcla de acetonitrilo-agua con menor fuerza eluyente (30:70), se recuperó un mL a la vez y se analizó. Se observó que el volumen con el que se perdió menos del 5 % de los compuestos más polares (fenantreno y antraceno) es de 2.0 mL, por lo que se tomó este volumen y la secuencia para DMFS que se utilizó finalmente es la siguiente:

- 10 mL agua
- 10 mL acetonitrilo-agua (10:90)
- 5 mL acetonitrilo-agua (80:20)
- 2 mL acetonitrilo-agua (30:70)
- 1 mL acetonitrilo-agua (90:10)

3.8. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO POR DMFS CON MUESTRAS DE MICROALGAS FORTIFICADAS

Para evaluar la repetibilidad se realizaron 6 extracciones en diferentes días. Se obtuvieron los recobros y se evaluó la desviación estándar relativa obtenida. Los resultados se muestran en la Tabla 25.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 25. Repetibilidad de la DMFS con muestras de microalga seca fortificada.

Día	Muestra	%Recobro							
		Fen	Ant	Pir	B[a]A	B[b]F	B[k]F	B[a]P	DB[a,h]A
1	1	79	81	84	88	89	91	93	89
	2	88	89	91	95	97	100	98	97
	3	83	84	89	91	93	96	96	91
2	1	79	78	85	87	91	89	93	90
	2	77	76	85	85	86	86	91	87
	3	82	83	87	92	95	94	79	96
1	Promedio	83	85	88	91	93	96	96	92
	DE ^a	5	4	4	4	4	5	3	4
	DER ^b	5	5	4	4	4	5	3	5
1-2	Promedio	81	82	87	90	92	93	92	92
	DE ^a	4	5	3	4	4	5	7	4
	DER ^b	5	6	3	4	4	5	7	4

^a DE: desviación estándar, ^b DER: desviación estándar relativa

De la tabla anterior se observa que la precisión es buena, ya que los valores de desviación estándar relativa son menores o iguales que 7 % para todos los compuestos y los recobros obtenidos fueron mayores al 75 % para los 8 HAP's en estudio, aún cuando la muestra que se analiza es de biomasa la cual se considera como altamente compleja.

3.9. LINEALIDAD, LD Y LC DEL MÉTODO POR DMFS CON MUESTRAS DE MICROALGAS FORTIFICADAS

En la Tabla 26 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de linealidad.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 26. Resultados de la prueba de linealidad del método por DMFS

Compuesto	Ecuación de la recta μg adicionados (x) vs μg recuperados (y)	Coefficiente de correlación (r ²)
Fenantreno	$y = 0.9400x - 0.0431$	0.9871
Antraceno	$y = 0.8788x + 0.0874$	0.9914
Pireno	$y = 0.9592x - 0.0926$	0.9895
Benzo[a]antraceno	$y = 0.9798 - 0.0518$	0.9858
Benzo[b]fluoranteno	$y = 0.9456 - 0.0160$	0.9868
Benzo[k]fluoranteno	$y = 0.9709x + 0.0564$	0.9927
Benzo[a]pireno	$y = 0.9553x + 0.1057$	0.9911
Dibenzo[a,h]antraceno	$y = 0.9723 - 0.0041$	0.9906

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede considerar buena la linealidad del método por DMFS, ya que para todos los compuestos el coeficiente de correlación fue mayor a 0.98. Los recobros globales se encuentran entre 88 y 97 %.

Se determinó el límite de cuantificación y detección experimentales, para esto se fortificó la biomasa seca a concentraciones decrecientes de 0.2, 0.12, 0.1, 0.08, 0.06, 0.04, 0.024 y 0.012 μg/mg, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. LC y LD experimentales obtenidos para DMFS

Compuesto	LDE (μg/mg) ^a	LCE (μg/mg) ^b
Fenantreno	0.024	0.060
Antraceno	0.012	0.024
Pireno	0.060	0.200
Benzo[a]antraceno	0.024	0.060
Benzo[b]fluoranteno	0.040	0.120
Benzo[k]fluoranteno	0.040	0.120
Benzo[a]pireno	0.040	0.100
Dibenzo[a,h]antraceno	0.024	0.060

^a LD experimental, concentración que proporciona una relación señal/ruido de 3

^b LC experimental, concentración que proporciona una relación señal/ruido de 10

3.10. EVALUACIÓN DE INTERFERENTES

En la Figura 14 se muestran los cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda (250, 275 y 295 nm) para el blanco de DMFS (microalga seca sin fortificar) y en la Figura 15 los cromatogramas del blanco de EFS (medio de cultivo sin fortificar) a las mismas longitudes de onda mencionadas anteriormente.

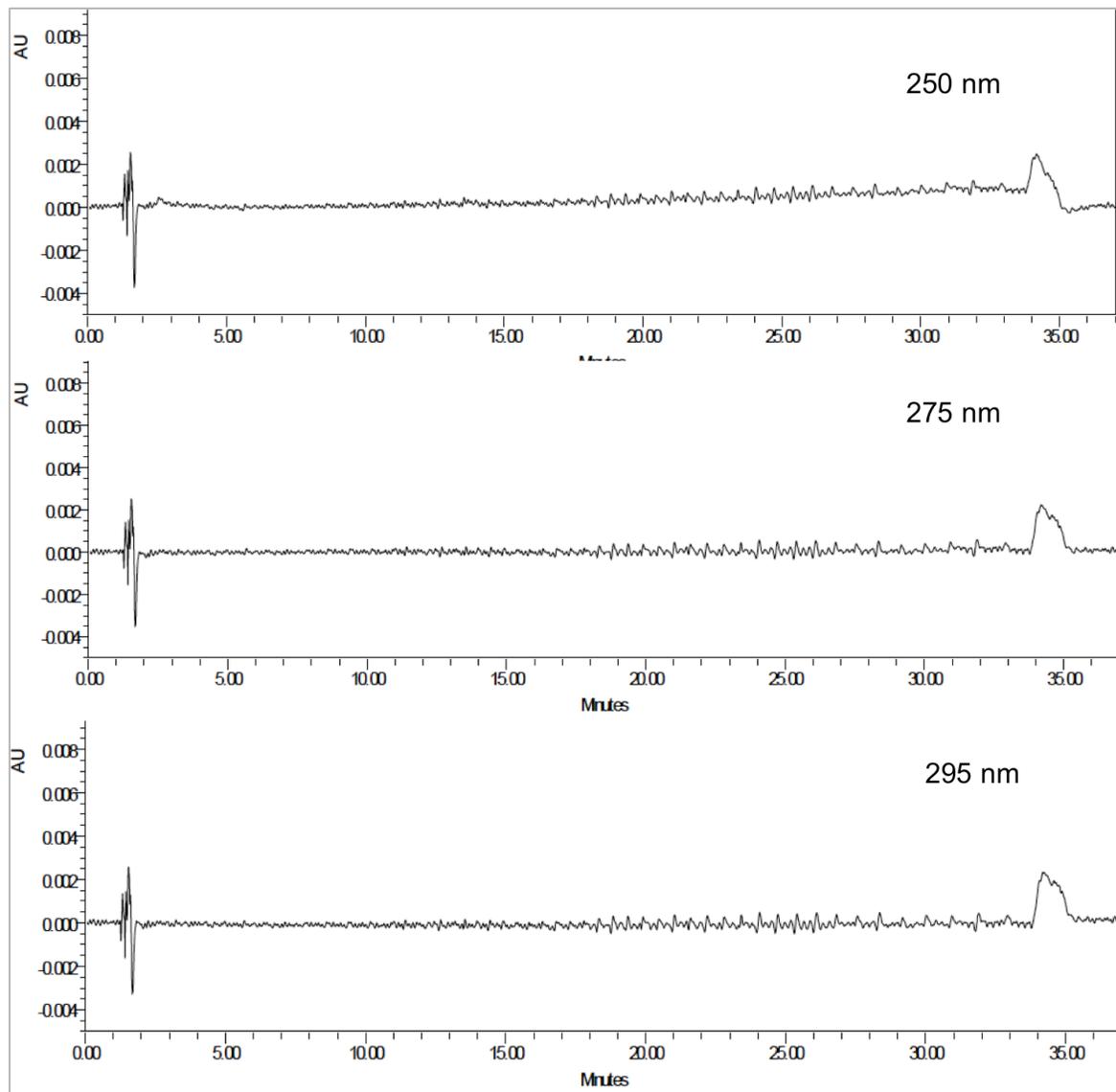


Figura 14. Cromatogramas de una inyección del blanco de DMFS a tres diferentes longitudes de onda. Gradiente con metanol-agua. Flujo de 1 mL/min. Volumen de inyección de 20 μ L. Columna Zorbax eclipse XDB-C18. Detector DAD.

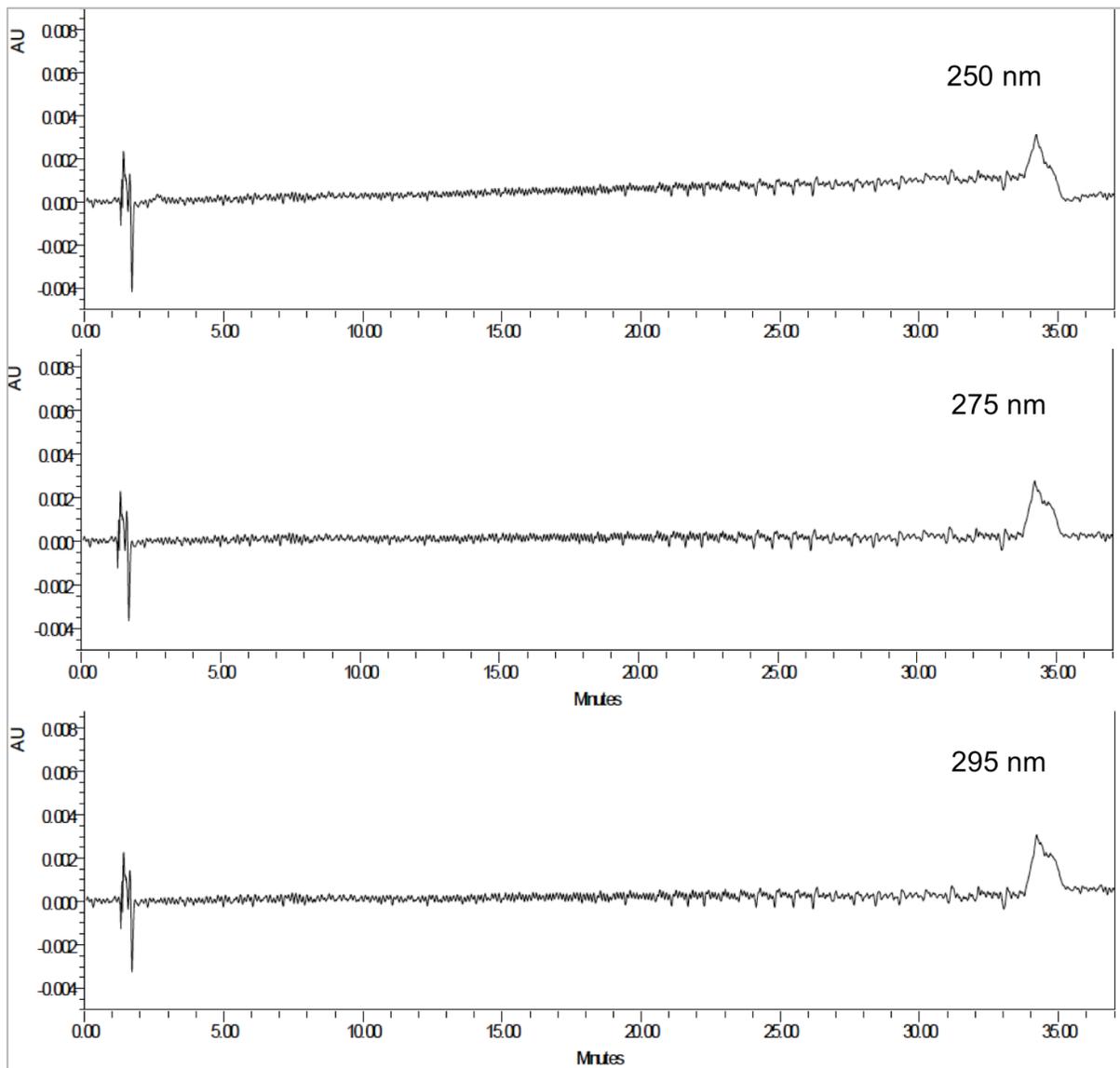


Figura 15. Cromatogramas de una inyección del blanco de EFS a tres diferentes longitudes de onda. Gradiente con metanol-agua. Flujo de 1 mL/min. Volumen de inyección de 20 μ L. Columna Zorbax eclipse XDB-C18. Detector DAD.

Los cromatogramas demuestran que en los extractos obtenidos con los métodos de extracción por EFS y DMFS no existieron interferencias de la matriz (microalgas y medio de cultivo) para la cuantificación de los 8 HAP's.

3.11. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE CULTIVOS A FENANTRENO Y DIBENZO[a,h]ANTRACENO

Los bioensayos de exposición a diferentes tiempos se realizaron por triplicado y las cantidades recuperadas y los porcentajes de degradación y remoción para el compuesto más polar (fenantreno) y el menos polar (DB[a,h]A) se muestran en la Tabla 28.

Las Figuras 16 y 17 representan la disminución de las cantidades de fenantreno y dibenzo[a,h]antraceno respectivamente en el tiempo tanto en el medio líquido como en la biomasa a temperatura ambiente.

Tabla 28. Resultados obtenidos para la degradación y remoción de Fen y DB[a,h]A en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 6, 24 y 48 horas

HAP	Tiempo de exposición (horas)	µg recuperados		% Degradado	% Residual	% Remoción (medio líquido)
		Medio líquido	Biomasa			
Fen	1	0.79 ± 0.04	1.12 ± 0.14	54.14 ± 2.33	45.86 ± 2.33	80.97 ± 1.01
	6	< LC	0.78 ± 0.02	< 67.32	< 33.55	< 85.58
	24	ND	ND	-	-	-
DBA	1	2.83 ± 0.20	0.35 ± 0.03	20.47 ± 5.18	79.53 ± 5.18	29.18 ± 4.91
	6	2.80 ± 0.18	0.31 ± 0.01	22.14 ± 4.38	77.86 ± 4.38	29.94 ± 4.61
	24	2.08 ± 0.10	< LC	< 42.27	< 62.58	47.77 ± 2.52
	48	0.58 ± 0.05	< LC	< 79.18	< 23.15	85.39 ± 1.19

^a DE: Desviación estándar, ^b DER: Desviación estándar relativa, ND: no detectado

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

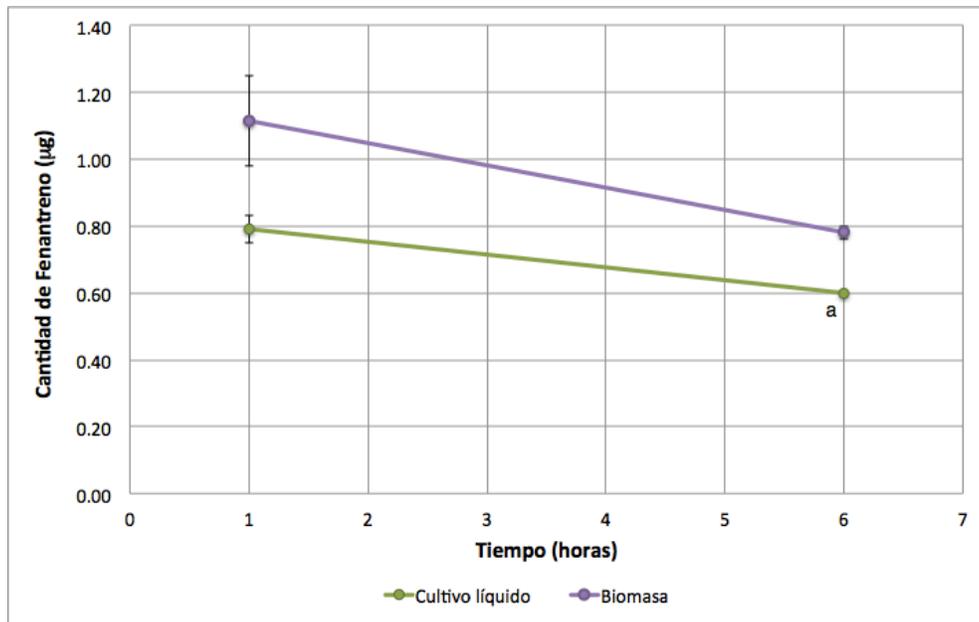


Figura 16. Cantidad de fenantreno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición a 1 y 6 horas a temperatura ambiente
a: < LC

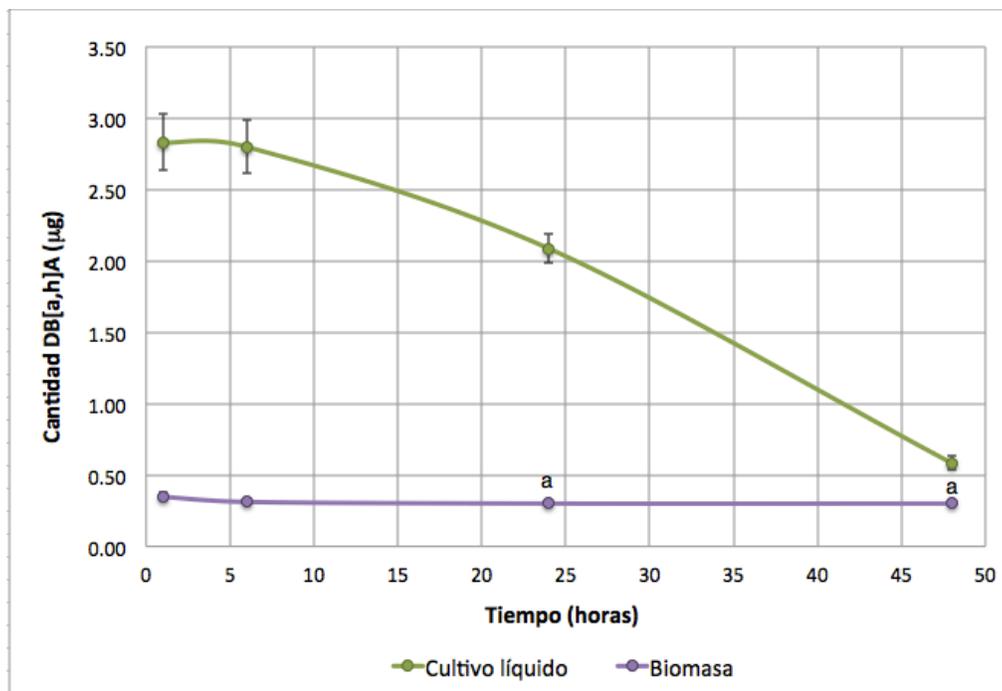


Figura 17. Cantidad de dibenzo[a,h]antraceno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición a 1, 6, 24 y 48 horas a temperatura ambiente
a: < LC

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó una degradación rápida de las microalgas hacia el fenantreno, que es el compuesto más polar, ya que en una hora se metabolizó en promedio 54.14 %, y se remueve a las seis horas más del 85%, mientras que el metabolismo es mucho más lento para el DB[a,h]A pues en una hora sólo en promedio 20.47 % se había degradado. Lo anterior se confirma con los ensayos realizados con un tiempo de exposición de 24 horas, ya que en este tiempo ya no se detecta el fenantreno en el medio líquido y la biomasa (límite de detección experimental en medio líquido 0.016 $\mu\text{g/mL}$ y en biomasa de 0.024 $\mu\text{g/mg}$), mientras que para el DB[a,h]A se detectan en promedio 2.08 μg en el medio líquido (% remoción de 47.77) y en la biomasa una cantidad menor al límite de cuantificación experimental (% remoción de 7.43). Debido a la lenta degradación del DB[a,h]A se efectuaron los ensayos con los 8 HAP's con un tiempo de exposición de 48 horas. Adicionalmente en la Tabla 28 se puede observar que el fenantreno tiende a presentarse en mayor cantidad en la biomasa que en el medio líquido, mientras que pasa lo contrario para el DB[a,h]A, esto puede deberse a las diferencias en polaridad y de tamaño de estos dos HAP's. Así el fenantreno que es el compuesto de menor tamaño se adsorbe en mayor cantidad en la superficie de la célula y al ser más polar es más afín al medio acuoso lo que le permite estar más en contacto con las microalgas, mientras que el DB[a,h]A al ser más hidrofóbico y voluminoso tiende a quedarse menos en la superficie celular y más retenido en la pared de vidrio del matraz en el cual se realiza el ensayo lo que limita su contacto con las microalgas, su adsorción es menor y aparece una mayor cantidad en el medio líquido debido a que se recupera de la pared del vidrio cuando al medio de cultivo líquido se le adiciona el modificador orgánico antes de aplicarlo al cartucho de extracción (un 30 % de isopropanol), esto se puede confirmar con los resultados obtenidos durante el desarrollo del método de EFS de la sección 3.3 en donde con un 15 % de isopropanol sólo se recuperaba el 6 % de este compuesto.

3.12. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE CULTIVOS A 8 HAP's

Los ensayos de exposición de cultivos de microalgas se realizaron a diferentes temperaturas fortificando al medio de cultivo con 0.266 µg/mL de cada uno de los 8 HAP's en estudio, es decir se adicionaron inicialmente 4 µg de cada compuesto. También se realizaron ensayos a 25 °C con algas muertas fortificando el medio a la misma concentración como control de la degradación no biótica de los HAP's, ya sea por adsorción o fotodegradación.

Como se observa en la Figura 18 en los ensayos realizados a 25 °C con cultivos de las algas muertas por calor, la cantidad de Pir, B[a]A, B[b]F, B[k]F y B[a]P recuperado aumenta hasta las primeras seis horas y después se mantiene constante hasta las 48 horas, mientras que para Fen, Ant y DB[a,h]A igual se observa constante después de las seis horas aunque tiende a una ligera disminución (menor que el LC) en la cantidad de HAP recuperado a las 48 horas, lo cual indica que aunque en algunos trabajos se menciona que los HAP's se pueden foto-oxidar cuando se encuentran en un medio acuoso,⁹⁴ esta degradación no biótica no es significativa como ya se había corroborado en otro estudio.⁹⁵ Por el contrario, la disminución en la concentración de los HAP's tan notoria que se observó en los ensayos con algas vivas (que se discutirán más adelante) solo puede deberse a que estas remueven los compuestos ya sea al sorberlos o metabolizarlos.^{23,32,76} Adicionalmente en los cromatogramas de los extractos provenientes de la biomasa (DMFS) y del medio líquido (EFS) a diferentes longitudes de onda de detección, tanto en el blanco como en las muestras provenientes de los ensayos de exposición, no se presentan interferencias en los tiempos de retención de los compuestos de interés ni señales que puedan ser atribuidas a productos de degradación de los HAP's (ver Figuras 19 y 20). Al respecto, resultados aún no publicados en el grupo de investigación han demostrado la formación de metabolitos, aunque en concentraciones muy bajas, difíciles de detectarse directamente en los extractos con el detector de espectrofotometría UV.

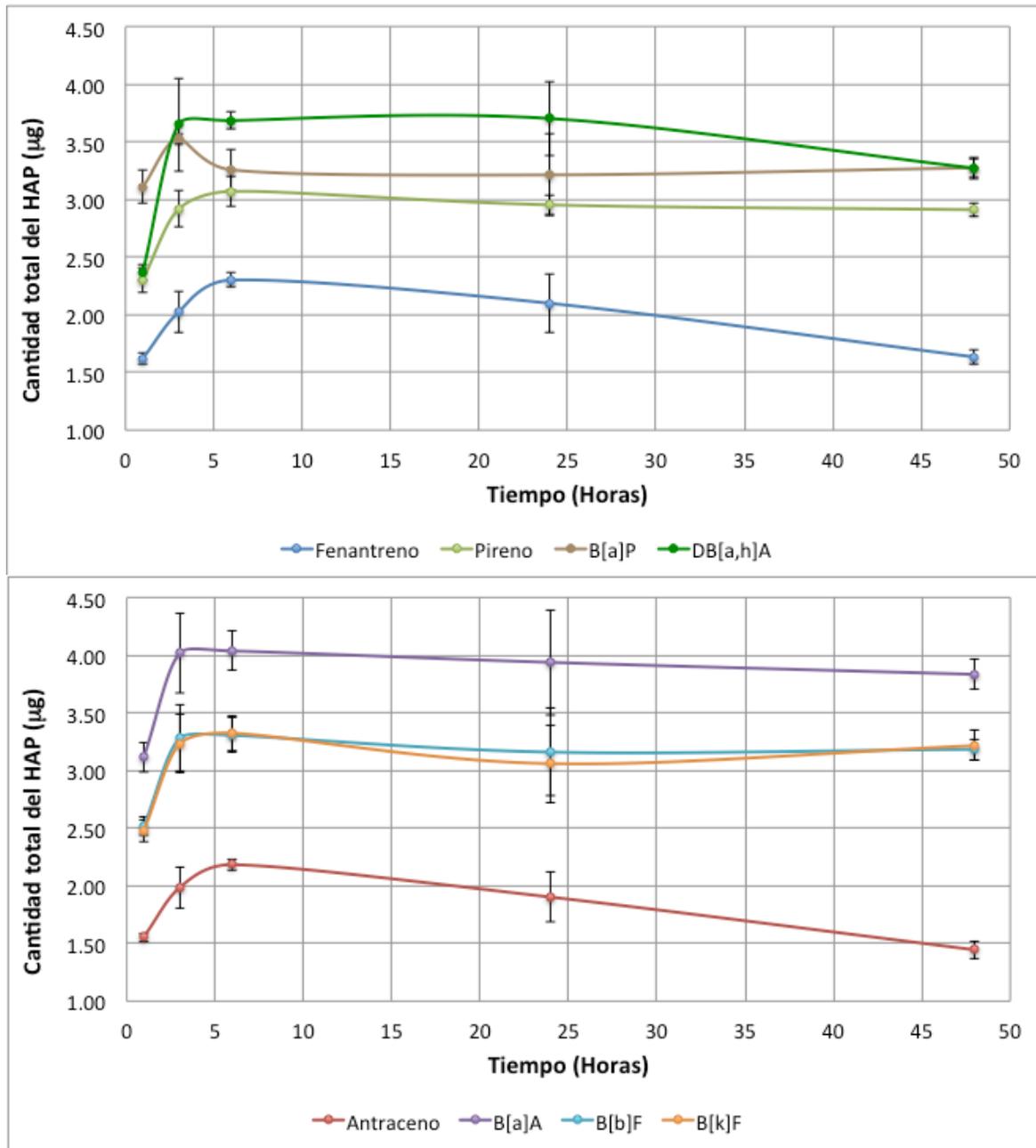


Figura 18. Cantidades totales recuperadas a diferentes tiempos de exposición de cada uno de los 8 HAP's en los ensayos control de algas muertas a 25 °C

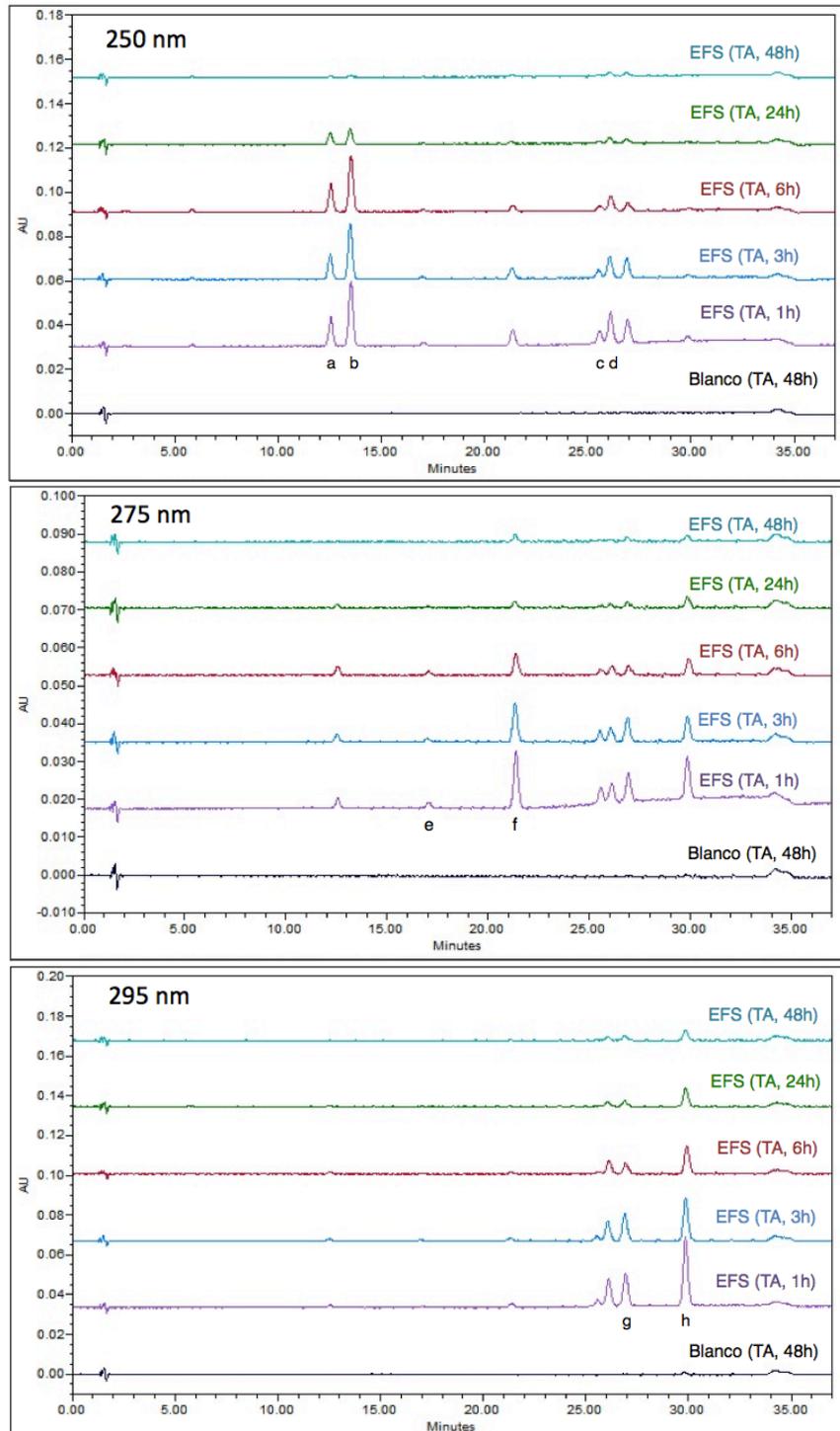


Figura 19. Cromatogramas a diferentes longitudes de onda de los extractos de EFS que muestran la desaparición de los 8 HAP's en el medio líquido en los ensayos de exposición a temperatura ambiente. Gradiente con metanol-agua. Flujo de 1 mL/min. Columna Zorbax eclipse XDB-C18. Detector DAD. (a) = Fen, (b) = Ant, (c) = B[b]F, (d) = B[k]F, (e) = Pir, (f) = B[a]A, (g) = B[a]P, (h) = DB[a,h]A

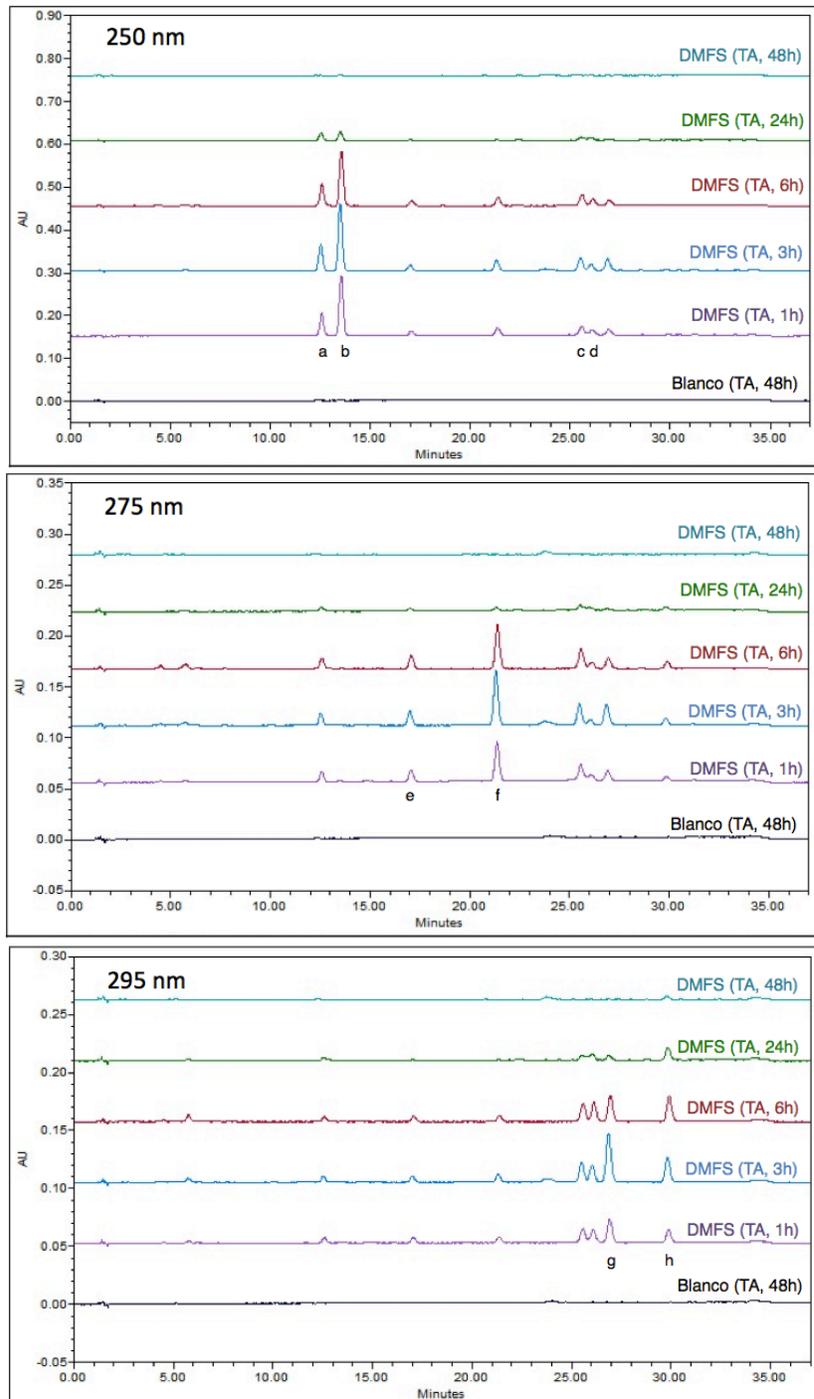


Figura 20. Cromatogramas a diferentes longitudes de onda de los extractos de DMFS que muestran la desaparición de los 8 HAP's de la biomasa en los ensayos de exposición a temperatura ambiente. Gradiente con metanol-agua. Flujo de 1 mL/min. Columna Zorbax eclipse XDB-C18. Detector DAD. (a) = Fen, (b) = Ant, (c) = B[b]F, (d) = B[k]F, (e) = Pir, (f) = B[a]A, (g) = B[a]P, (h) = DB[a,h]A

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general se observó una remoción rápida por parte de las microalgas hacia los HAP's ya que se vio una disminución acelerada de las cantidades de HAP's recuperados en el medio con respecto a la cantidad inicial adicionada conforme aumenta el tiempo de exposición (de 1 hasta 48 horas), esto fue más evidente a una temperatura controlada de 30 °C y a temperatura ambiente (23-29 °C). El proceso de adsorción de los HAP's en las microalgas se dio también de forma rápida, pues desde el ensayo de exposición a una hora se vio acumulación de los compuestos en la biomasa, y para casi todos a excepción del DB[a,h]A, a partir de un tiempo de exposición de 3 horas se encontraron más en la biomasa que en el medio de cultivo líquido, esto se da por su naturaleza no polar, que hace que tengan afinidad por las microalgas debido a la naturaleza lipofílica de su membrana celular. En el caso del DB[a,h]A, aunque es el más apolar de los compuestos, en la mayoría de los ensayos de 1 a 6 horas se encontró una mayor cantidad del compuesto en el medio de cultivo líquido que en la biomasa (ver Figura 28), lo cual se puede deber a su baja solubilidad en agua, lo que hace que tienda a acumularse en las paredes de vidrio del matraz en el que se realiza el ensayo,⁹⁶ (de donde se recupera con ayuda del isopropanol adicionado al medio) y el contacto con las microalgas sea limitado.

La actividad metabólica de la microalga *Selenastrum Capricornutum* parece ser dependiente de la concentración y la naturaleza del contaminante. Esto llama la atención ya que al comparar la cantidad recuperada de DB[a,h]A (el compuesto estudiado menos polar) a las 48 horas en el ensayo a temperatura ambiente donde se expuso individualmente fue de aproximadamente 0.9 µg (ver Tabla 28), con la cantidad del mismo compuesto recuperada en el ensayo al mismo tiempo a temperatura ambiente de aproximadamente 0.6 µg donde se expuso a los 8 HAP's a la vez (ver Figura 28), se observó que la cantidad total obtenida en este último ensayo fue mucho menor que la del primero, es decir la velocidad de degradación de DB[a,h]A aumentó cuando se tuvo a todos los contaminantes juntos, lo cual debe ser corroborado con estudios más detallados.

Por otro lado, al comparar las cantidades totales recuperadas del ensayo individual a temperatura ambiente del compuesto estudiado más polar, el fenantreno (ver Tabla

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

28), con la cantidad total de este HAP recuperada en el ensayo a temperatura ambiente con los 8 HAP's (ver Figura 21), se observó que en el primero desde las 24 horas de exposición ya no se detectó el Fen, mientras que en el segundo ensayo se deja de detectar a las 48 horas de exposición, por lo que se deduce que la velocidad de degradación es menor para fenantreno que cuando se tiene una mayor concentración de los HAP's, lo cual debe corroborarse con más investigación.

Entonces, tanto para los ensayos de Fen como los de DB[a,h]A, para comparar cualquier diferencia significativa entre tratamientos y tiempos de muestreo, se realizó un ANOVA paramétrico de 2 vías. Adicionalmente se realizó una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher de comparación múltiple cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($\alpha=0.05$). Las pruebas estadísticas se realizaron con el *software* Statgraphics Centurion XV.⁹⁷

Del análisis estadístico se deduce que la remoción del DB[a,h]A, el más pesado de los analitos, fue más rápida cuando se tenía la mezcla de los 8 HAP's en estudio, ya que se vio favorecida por la presencia de los HAP's más ligeros. Este fenómeno se ha observado en un estudio previo de la remoción de fluoranteno y pireno con diferentes tipos de algas entre los cuales se encontraba *Selenastrum capricornutum*⁵¹ y también en un trabajo donde se observó una remoción más rápida de B[a]P con la microalga *Scenedesmus acutus* cuando se encontraba combinado con pireno que cuando está solo.⁹⁸

A los ensayos en los cuales se adicionaron 0.266 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los 8 HAP's en estudio y se hicieron a diferentes temperaturas, también se les realizó un análisis estadístico (ANOVA paramétrico de 2 vías y prueba LSD de Fisher).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 29. Prueba de Rangos Múltiples (LSD) de Fisher para μg Totales de HAP por Temperatura

Temperatura	Grupos Homogéneos			
	Fen	Ant	Pir	B[a]A
TA	X	X	X	X
20 °C	X	X	X X	X
30 °C	X	X X	X X	X
25 °C	X	X	X	X
Temperatura	B[b]F	B[k]F	B[a]P	DB[a,h]A
TA	X	X	X	X
20 °C	X X	X	X	X
30 °C	X	X	X	X
25 °C	X	X	X	X

Los resultados de la prueba de rangos múltiples son presentados en la Tabla 29. De acuerdo con la alineación de las X's colocadas en las columnas se pudieron identificar los grupos que eran homogéneos, es decir que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas que compartieron una misma columna de X's. Así se observó que Fen, Ant, Pir, B[a]A y B[b]F tuvieron comportamientos diferentes entre ellos, para todos existió diferencia significativa entre temperatura ambiente (TA) y 25 °C y en todos (a excepción de Fen) no hubo una diferencia significativa en los ensayos realizados a 20 °C y a 30 °C. Por otro lado los compuestos menos polares B[k]F, B[a]P y DB[a,h]A tuvieron comportamiento similar, ya que ninguno presentó diferencia significativa en la degradación a temperatura ambiente y a 30 °C, mientras que éstos tuvieron diferencia a 20 °C y 25 °C, con excepción del DB[a,h]A en el cual no hubo diferencia entre estas dos temperaturas. La mayor degradación de los compuestos se dio a temperatura ambiente, ya que después de 48 horas de exposición las cantidades totales recuperadas de HAP's no son detectadas, menores o cercanas LC.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se analiza el comportamiento de cada uno de los HAP's estudiados con respecto a las cantidades recuperadas en medio líquido y biomasa a los diferentes tiempos de exposición y temperaturas.

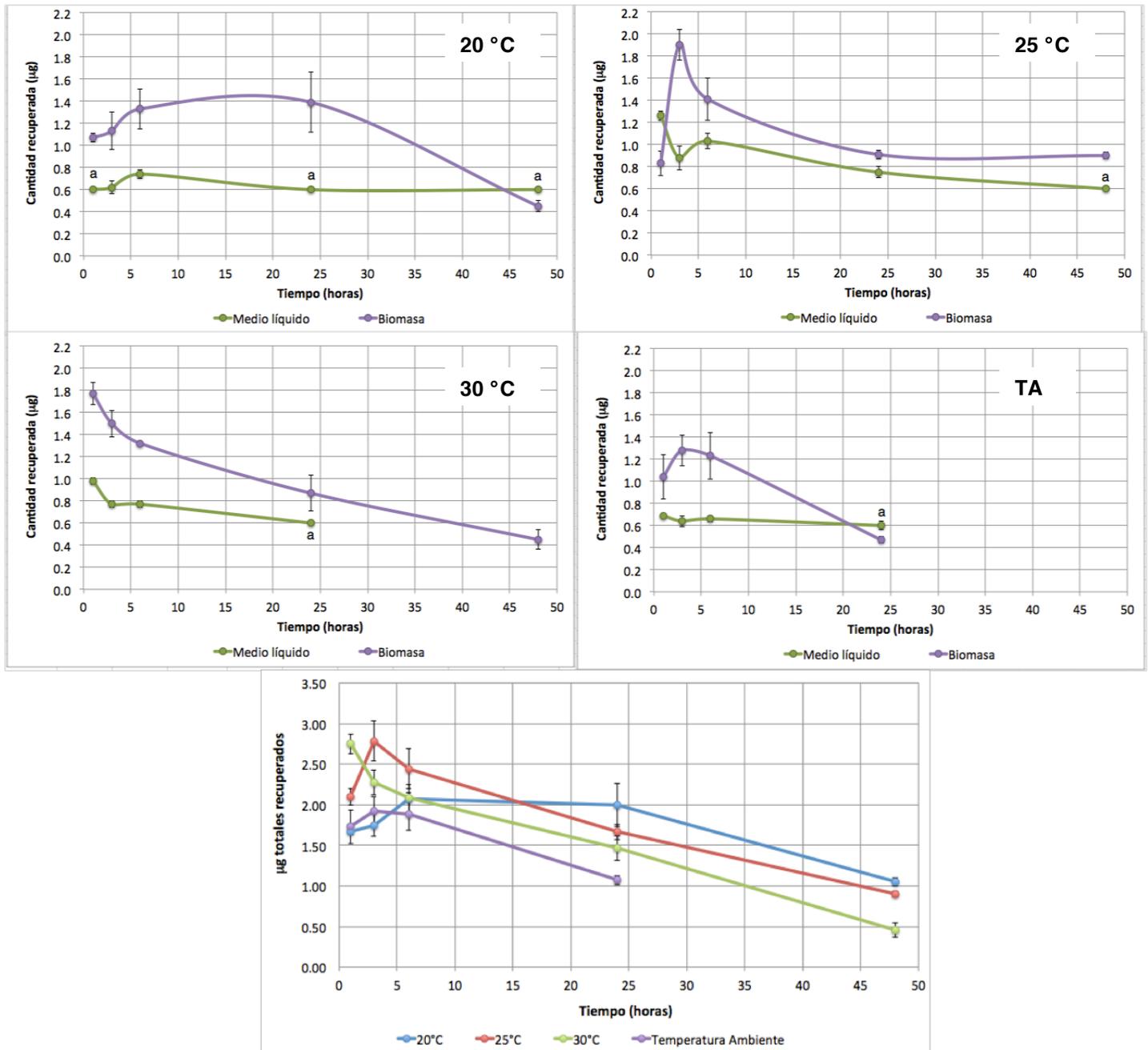


Figura 21. Cantidades recuperadas de fenantreno en medio líquido, biomasa y total en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas; TA: temperatura ambiente; a: < LCE

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el fenantreno se observó que a las cuatro temperaturas a las que se realizaron los ensayos la mayor cantidad del compuesto se encontró en la biomasa, y después de las 6 horas de exposición la concentración del HAP en la biomasa, el medio líquido y la total tendió a disminuir.

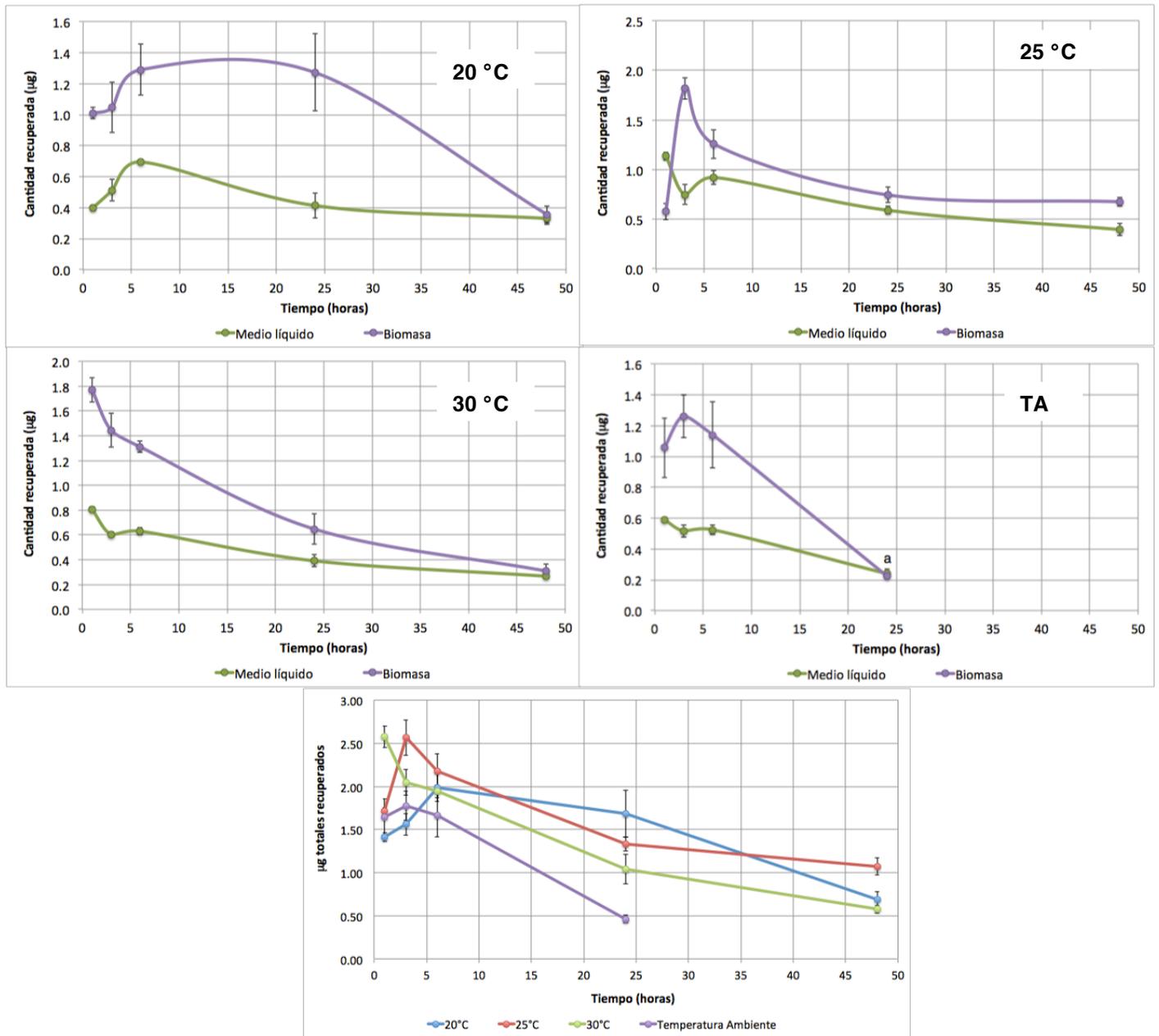


Figura 22. Cantidades recuperadas de antraceno en medio líquido, biomasa y total en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas; TA: temperatura ambiente; a: < LCE

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el antraceno se observó un comportamiento similar al fenantreno, ya que a las cuatro temperaturas a las que se realizaron los ensayos la mayor cantidad de este compuesto estuvo en la biomasa, por otro lado después de las 6 horas de exposición la concentración del HAP en la biomasa, el medio líquido y la total tendió a disminuir.

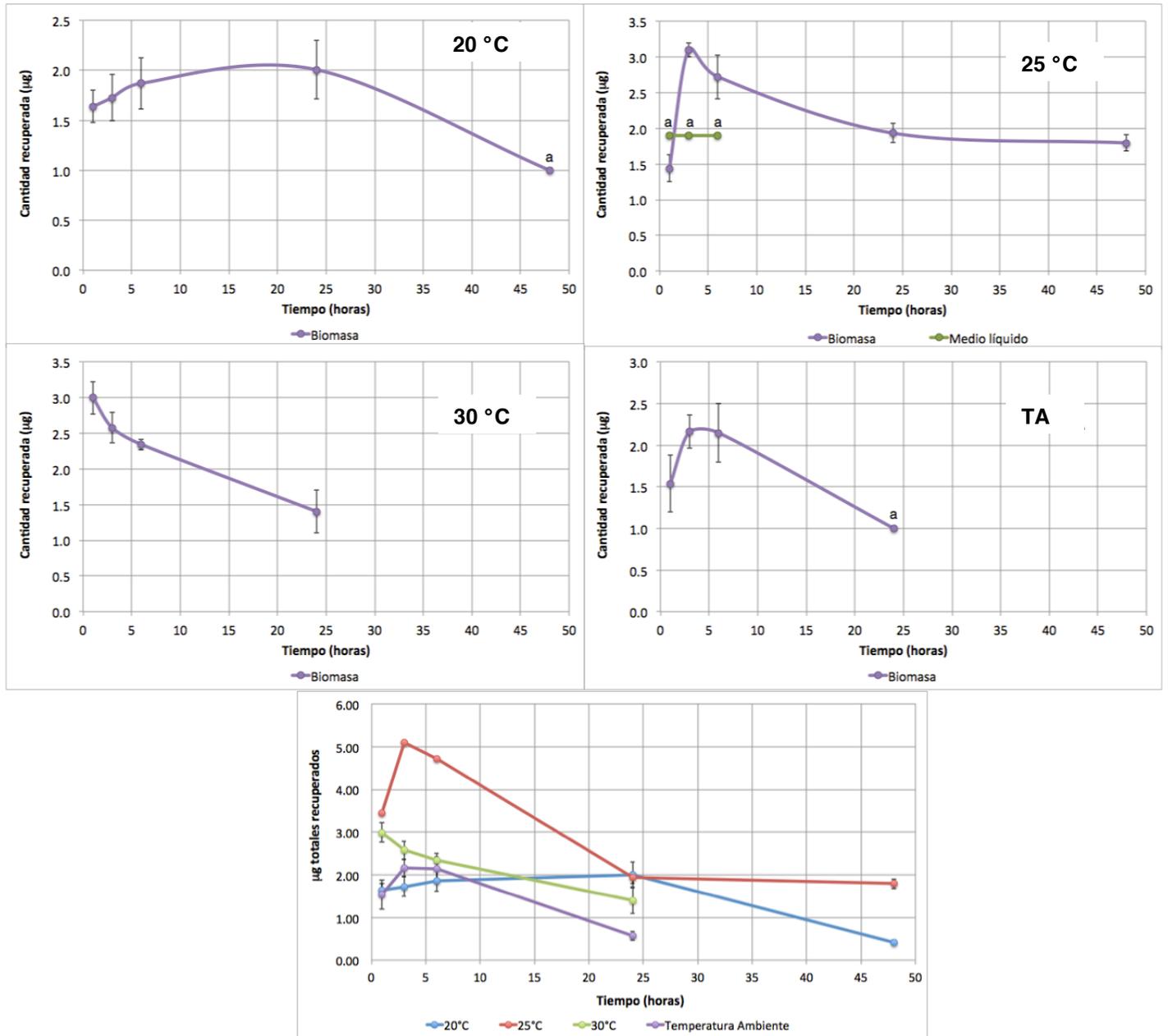


Figura 23. Cantidades recuperadas de pireno en biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas;

TA: temperatura ambiente; a: < LCE

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A diferencia de fenantreno y antraceno, prácticamente no se observó presencia de pireno en el medio líquido a 20 °C, 30 °C y temperatura ambiente, a 25 °C se observó una cantidad menor al LC pero muy cercana al LD, es decir la mayor cantidad del compuesto se encontró en la biomasa, además después de las 6 horas de exposición la cantidad del HAP en la biomasa y la total fue disminuyendo.

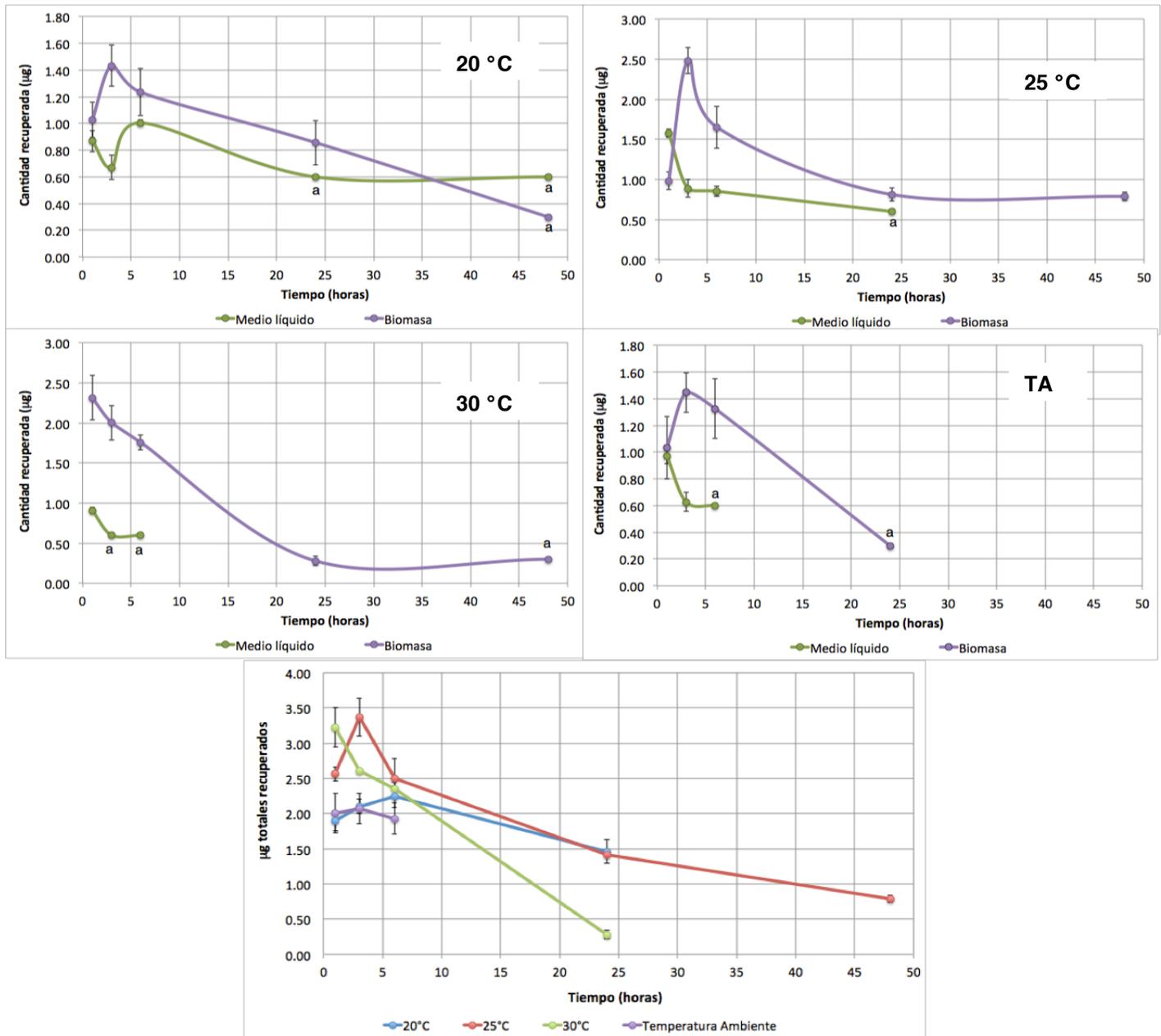


Figura 24. Cantidades recuperadas de benzo[a]antraceno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas; TA: temperatura ambiente; a: < LCE

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El benzo[a]antraceno tuvo comportamiento similar al fenantreno y al antraceno a las cuatro temperaturas a las que se realizaron los ensayos, la mayor cantidad de este compuesto estuvo en la biomasa, y a partir de las 6 horas de exposición la concentración del HAP en la biomasa, el medio líquido y la total fue disminuyendo.

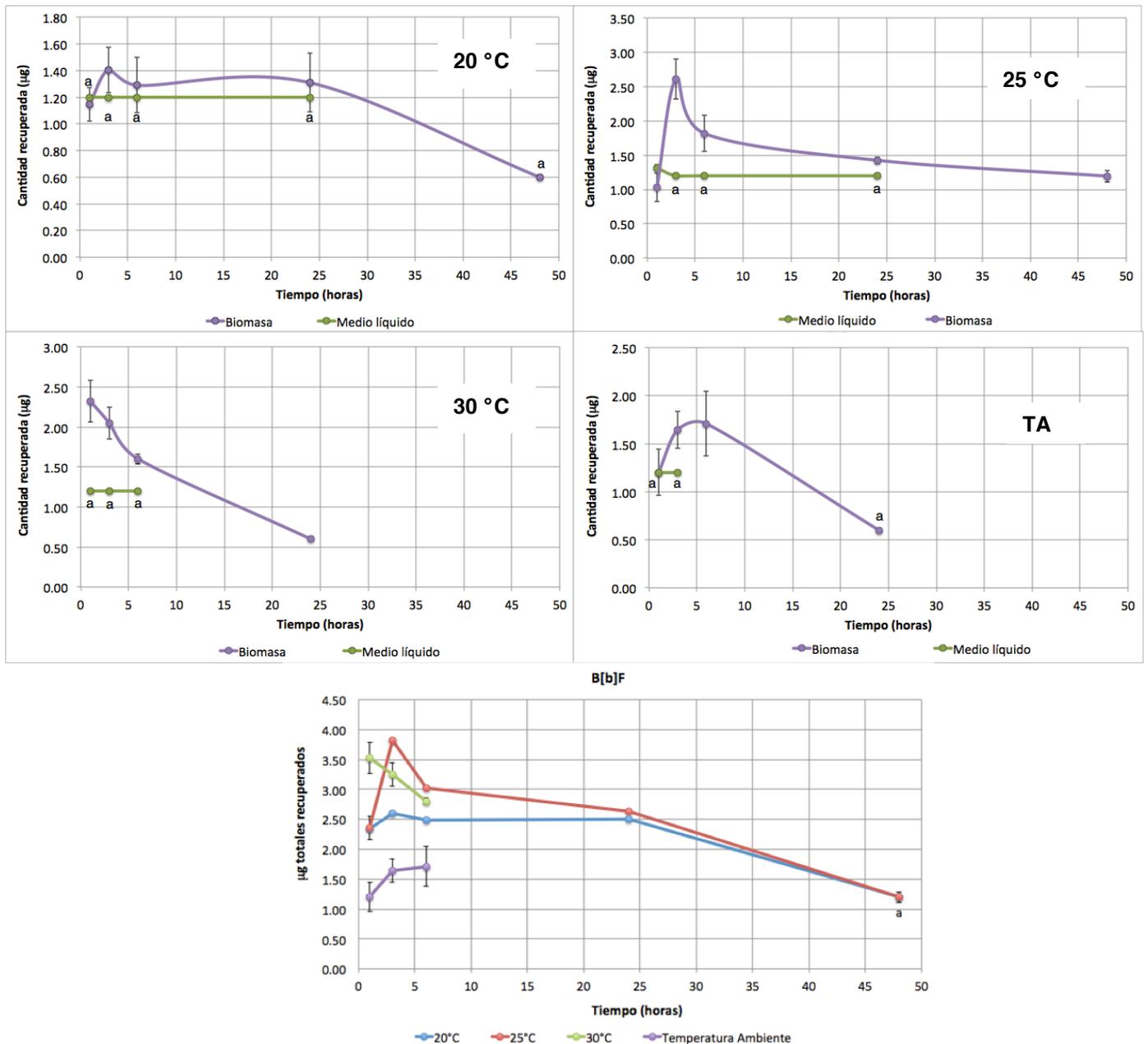


Figura 25. Cantidades recuperadas de benzo[b]fluoranteno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas; TA: temperatura ambiente; a: < LCE

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el benzo[b]fluoranteno, al igual que en fenantreno y antraceno, a las cuatro temperaturas a las que se realizaron los ensayos la mayor cantidad de este compuesto estuvo en la biomasa, en el medio líquido se recuperaron en la mayoría de los casos cantidades menores que el LC, además a partir de las 6 horas de exposición la concentración de este compuesto en la biomasa, el medio líquido y la total tendió a disminuir.

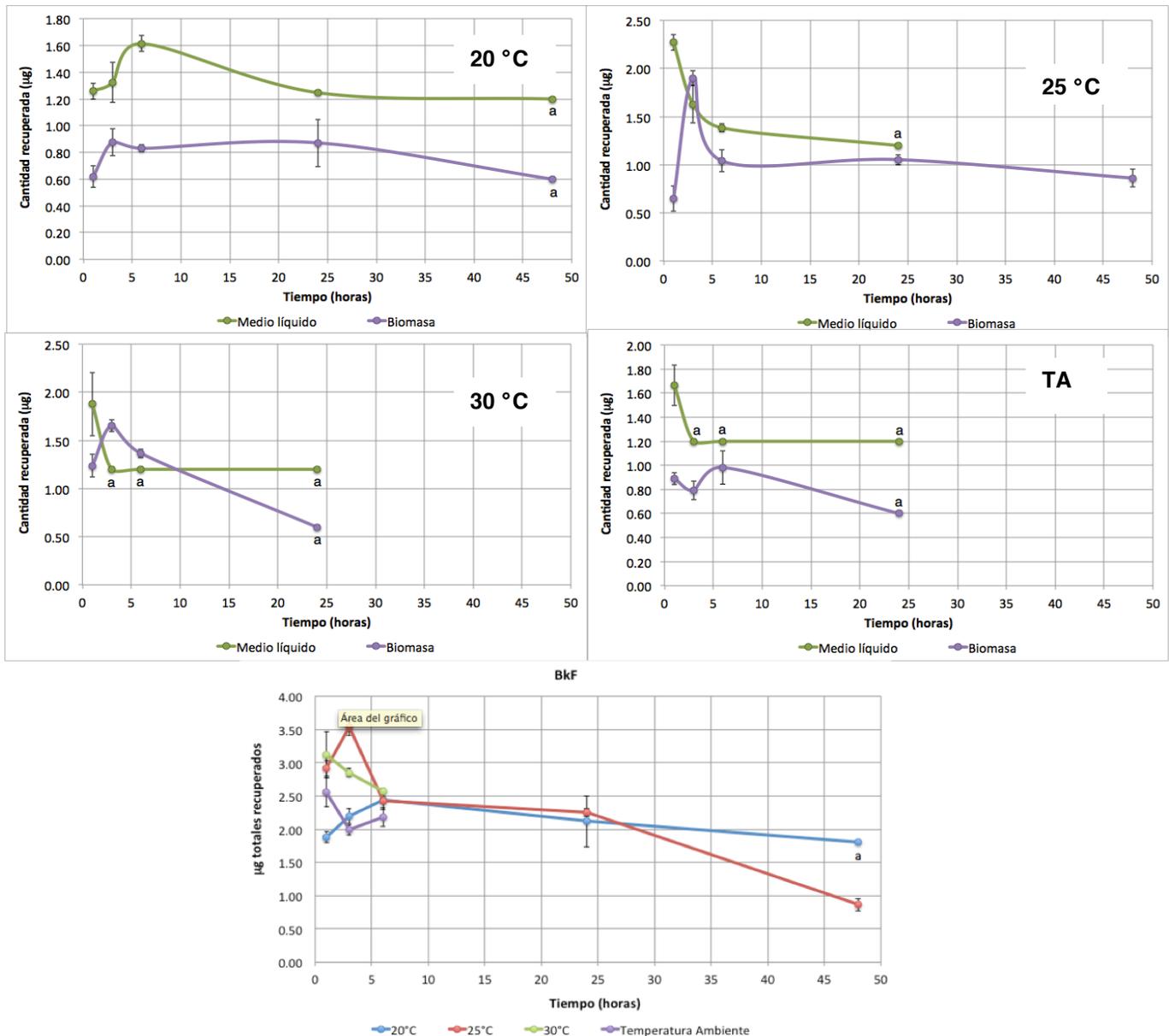


Figura 26. Cantidades recuperadas de benzo[k]fluoranteno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas; TA: temperatura ambiente; a: < LCE

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El benzo[k]fluoranteno, a pesar de ser isómero del benzo[b]fluoranteno, tuvo un comportamiento distinto a éste, ya que a 20 °C, 25 °C y temperatura ambiente la mayor cantidad de este compuesto se obtuvo en el medio líquido, mientras que a 30 °C a 3 y 6 horas de exposición, la mayor cantidad del HAP está en la biomasa. Por otro lado, después de las 6 horas de exposición disminuyó la cantidad total recuperada de dicho HAP, lo mismo pasó en la biomasa y en el medio líquido.

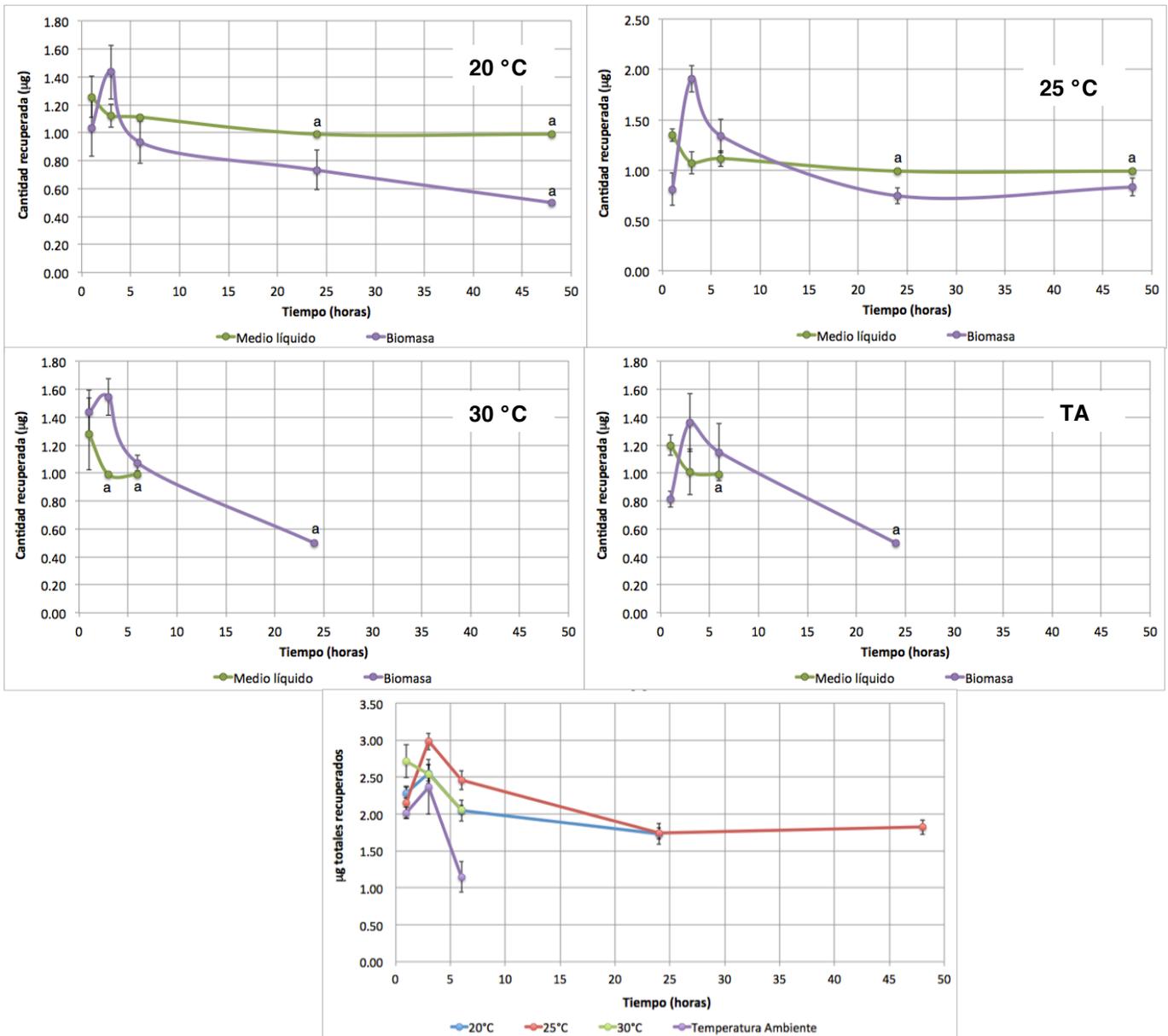


Figura 27. Cantidades recuperadas de benzo[a]pireno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas; TA: temperatura ambiente; a: < LC

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El benzo[a]pireno tiene un comportamiento similar al fenantreno y antraceno, ya que a las cuatro temperaturas a las que se realizaron los ensayos la mayor cantidad de este compuesto se obtuvo en la biomasa entre 1 y 6 horas de exposición, es posible que esto suceda a las 24 y las 48 horas de exposición pero a estos tiempos las cantidades recuperadas fueron menores que el LCE ó el LDE, además de las 6 horas de exposición en adelante la concentración de este HAP en la biomasa, el medio líquido y la total tendió a disminuir.

Para el dibenzo[a,h]antraceno a las cuatro temperaturas a las que se realizaron los ensayos la mayor cantidad de este compuesto estuvo en el medio líquido, además a partir de las 6 horas de exposición, como en los compuestos anteriores, la cantidad del compuesto tendió a disminuir en la biomasa, el medio líquido y la total.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

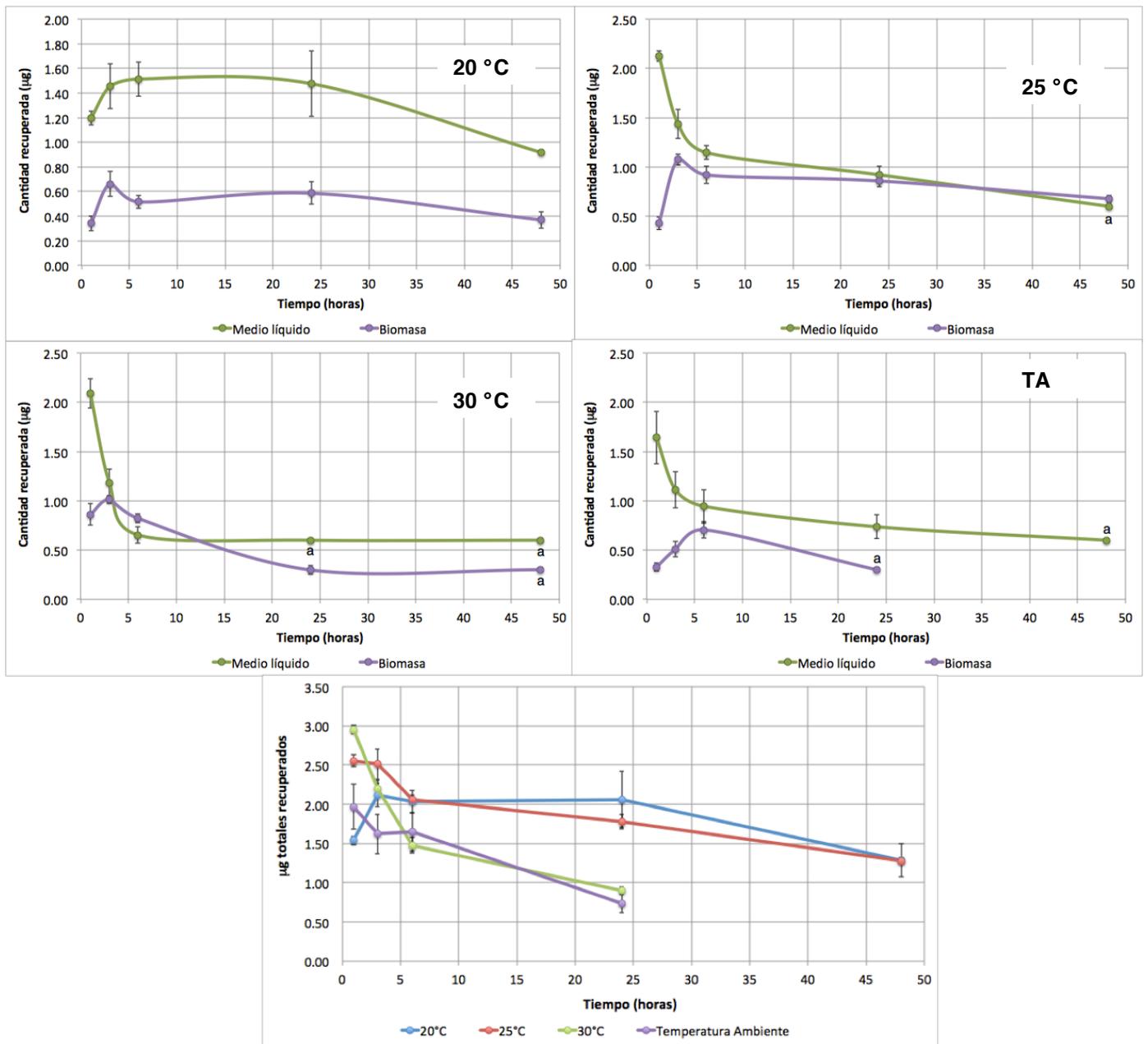


Figura 28. Cantidades recuperadas de dibenzo[a,h]antraceno en medio líquido y biomasa en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a diferentes temperaturas; TA: temperatura ambiente; a: < LC

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 29 se representan los porcentajes de degradación (calculados con base en la cantidad total del HAP recuperada) de los HAP's a diferentes temperaturas en los ensayos a 6 horas de exposición. Se observa que en los ensayos a temperatura ambiente y 30°C después de 6 horas de exposición B[k]F, B[a]P y DB[a,h]A son los compuestos más degradados, mientras que a 20°C y 25°C el compuesto más degradado es el B[b]F, lo que se confirma el efecto de sinergismo en la remoción, es decir se ve favorecida la remoción (ya sea por degradación o sorción) de los HAP's de alto peso molecular en presencia de los de bajo peso molecular, lo cual coincide con un trabajo reportado en la literatura de la degradación con la microalga *Selenastrum capricornutum* de la mezcla de fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno y benzo[a]pireno en presencia de metales, los resultados de este trabajo sugirieron que la microalga es más efectiva en la degradación de los HAP's de alto peso molecular.⁵⁷ Adicionalmente se observó que los porcentajes de remoción en el medio líquido (ver Figura 30) fueron más altos para los HAP's de bajo peso molecular debido a su solubilidad en el medio (lo que aumenta su sorción en la biomasa) y su tamaño.

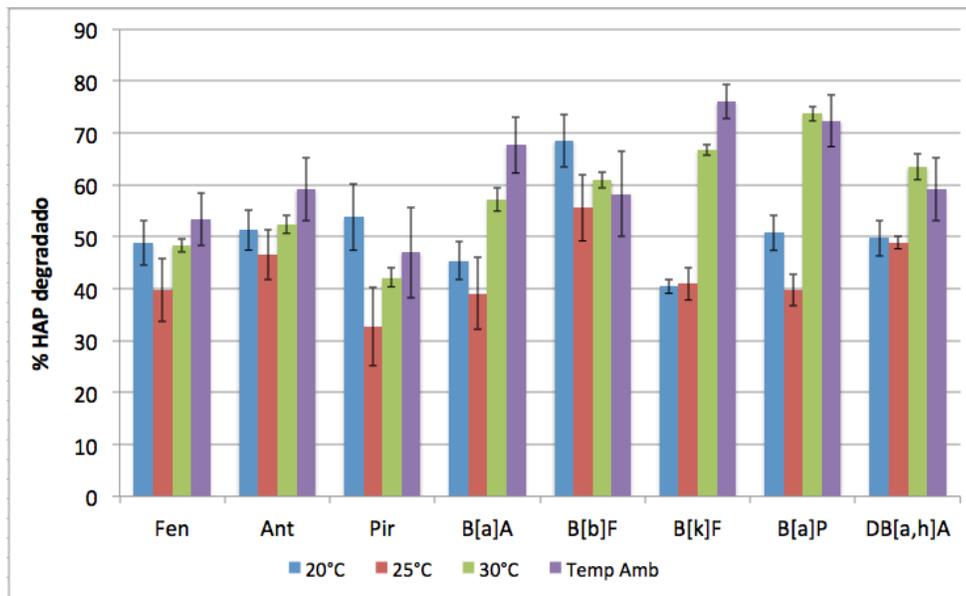


Figura 29. Porcentajes degradados de los HAP's en los ensayos de exposición a 6 h a diferentes temperaturas

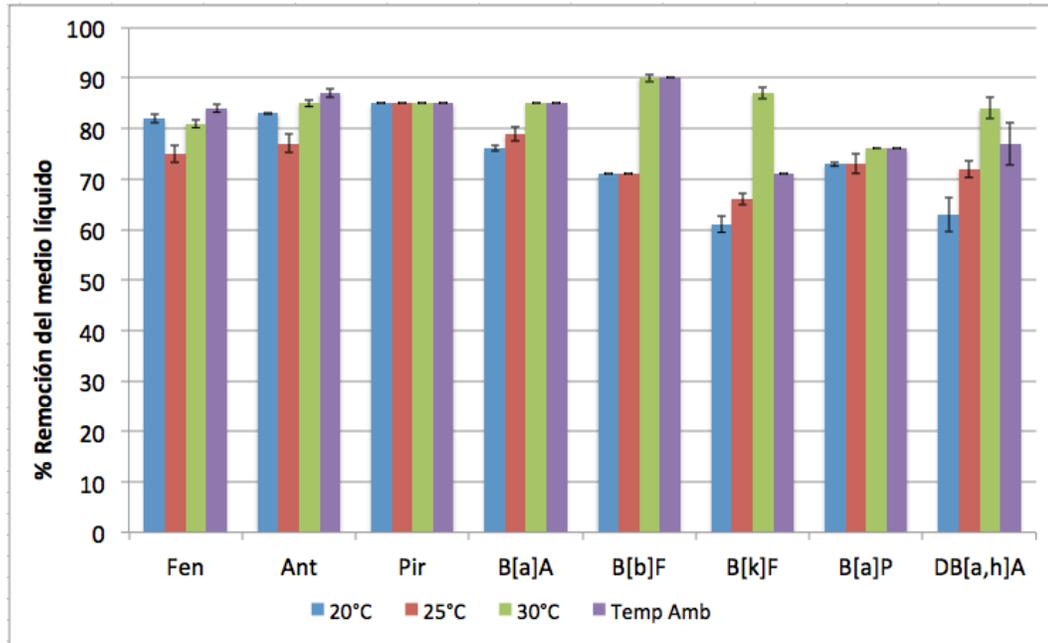


Figura 30. Porcentajes de remoción del medio líquido de los HAP's en los ensayos de exposición a 6 h a diferentes temperaturas

En Figura 31 se muestran las cantidades recuperadas en el medio líquido, la biomasa y totales de los 8 HAP's en los ensayos de exposición a 25°C, se eligió esta temperatura debido a que es donde los resultados son más homogéneos y es cercana a las condiciones reales del medio natural de la microalga. Se observó que tanto Pir como B[b]F solo pudieron ser cuantificados en la biomasa. De los 8 HAP's en estudio Pir es el que alcanza la mayor concentración en la biomasa y la menor concentración es del DB[a,h]A, que alcanza niveles de concentración más altos en el medio líquido, esto se debe a que el pireno no se adsorbe tanto en la pared del matraz, ya que es uno de los analitos más polares y de tamaño pequeño lo que permitió que se solubilizara en el medio de cultivo líquido y tuviera mayor contacto con las microalgas. Para todos los HAP's se observa que la cantidad total recuperada va disminuyendo a partir de las 6 horas de exposición.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

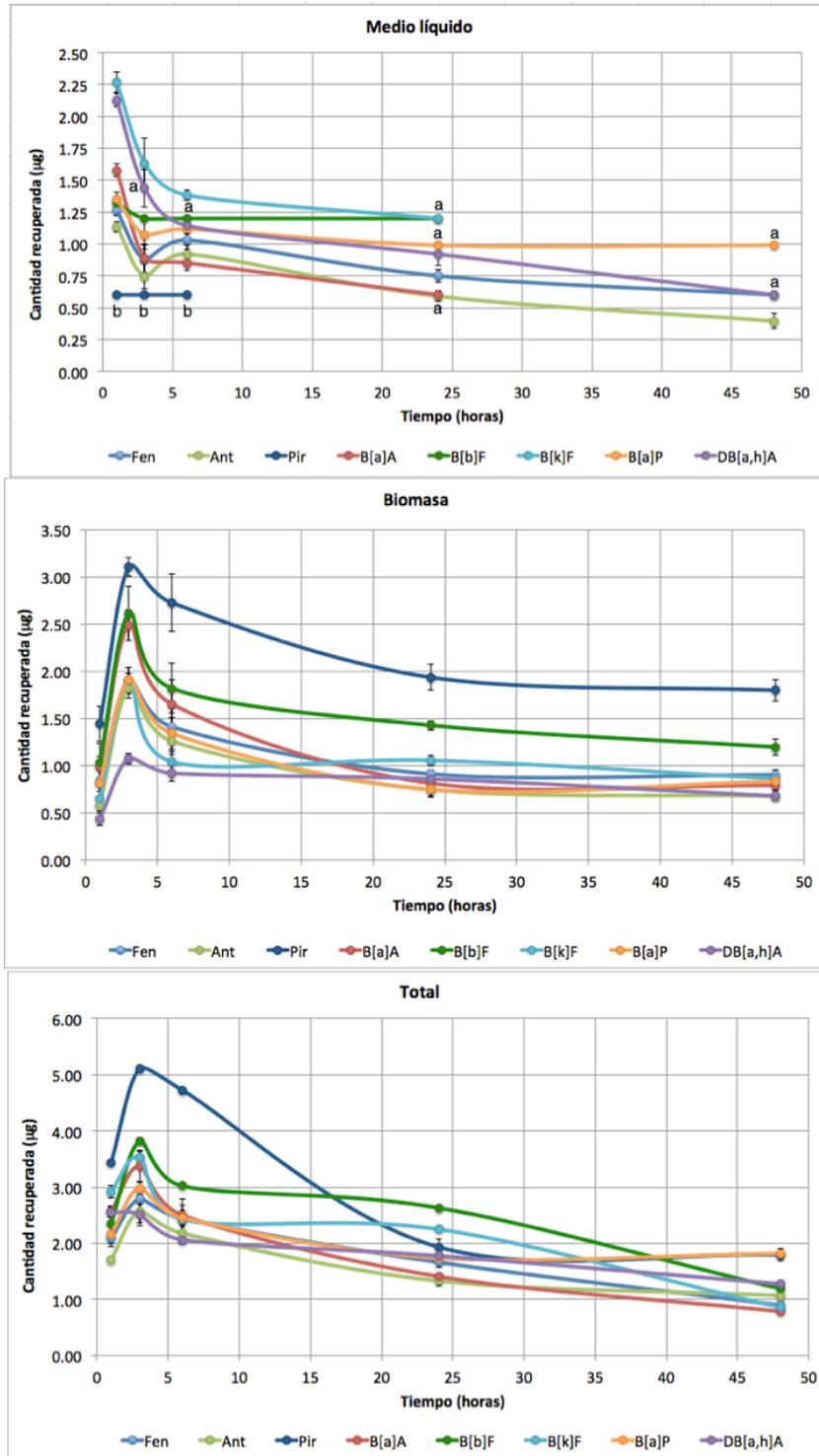
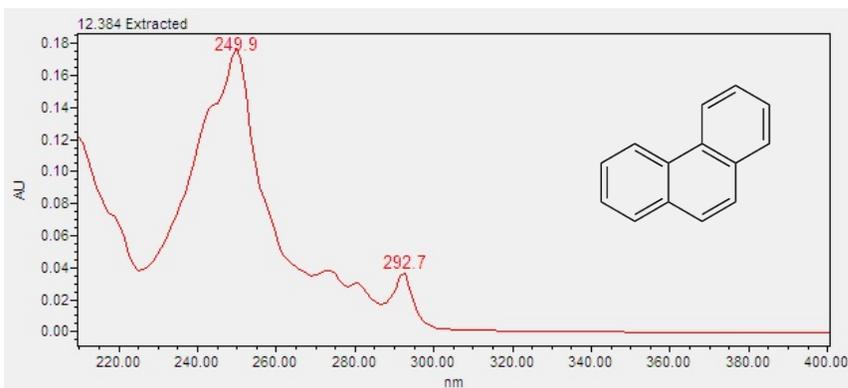
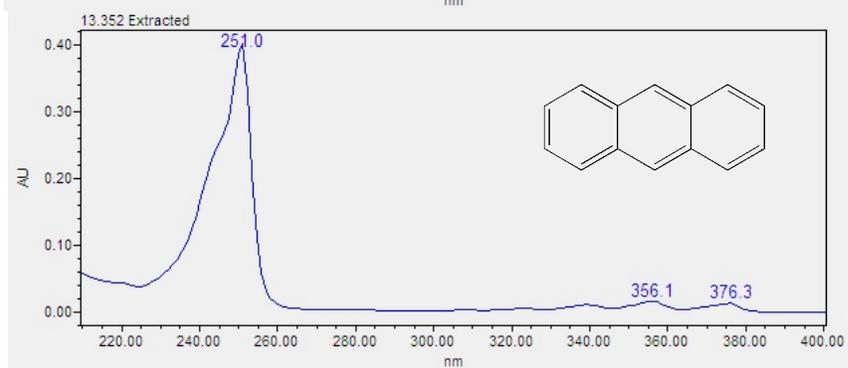
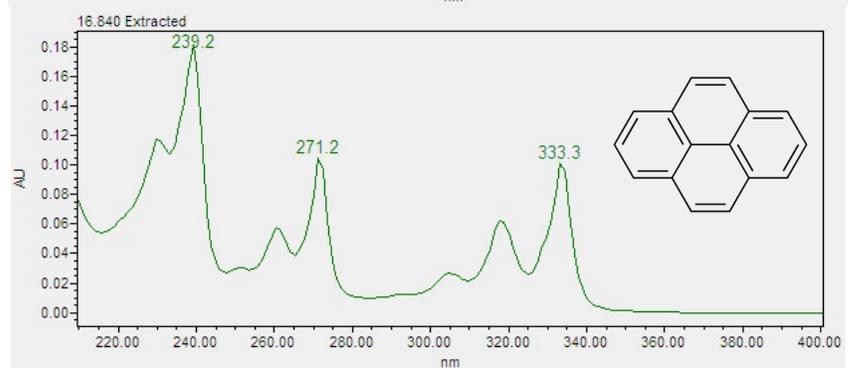


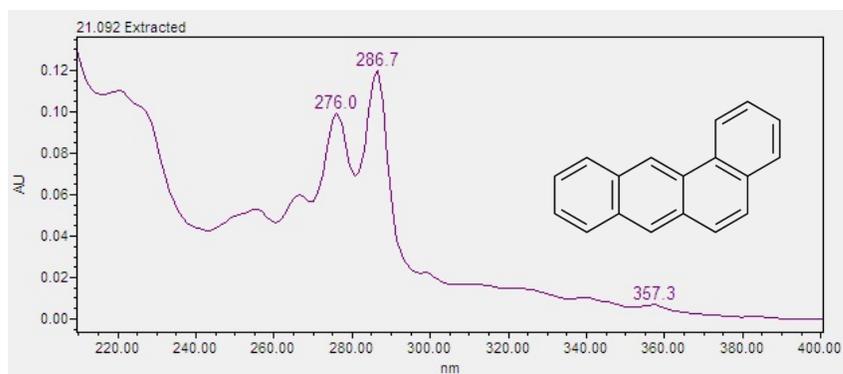
Figura 31. Cantidades recuperadas de los 8 HAP's en medio líquido, biomasa y totales en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a 1, 3, 6, 24 y 48 horas a 25°C;

a: < LC; b: valor cercano al LD

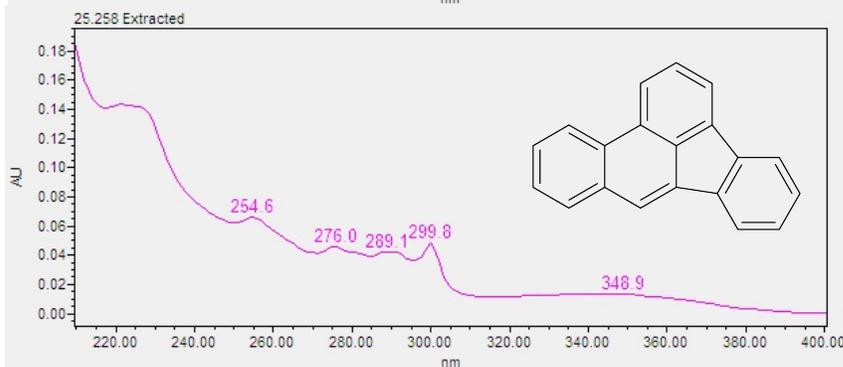
- Se logró la separación cromatográfica de los 8 HAP's en estudio por CLAR/DAD utilizando como fase móvil un gradiente con diferentes proporciones de agua y metanol, este sistema cromatográfico demostró ser lineal, preciso y exacto para la cuantificación de los analitos.
- Se optimizaron y validaron dos métodos para realizar la extracción de Fen, Ant, Pir, B[a]A, B[b]F, B[k]F, B[a]P y DB[a,h]A con la técnica de EFS para el medio líquido y DMFS para las microalgas, las cuales al ser validadas demostraron ser lineales, precisas y exactas.
- En los bioensayos se observó que después de un tiempo de exposición de 3 horas Fen, Ant, Pir, B[a]A, B[b]F, B[k]F y B[a]P se acumulan más en la biomasa que en el medio de cultivo líquido, esto debido a la naturaleza no polar de los analitos, mientras que DB[a,h]A se encuentra presente más en el medio líquido que en la biomasa posiblemente porque es más adsorbido en la pared de los matraces en los que se realizaron los ensayos y se recupera en el medio líquido cuando a éste se le adiciona el modificador orgánico, y además por su voluminoso tamaño que dificulta su adsorción en la superficie celular.
- Con la mezcla de los 8 HAP's la remoción de los compuestos más pesados fue más rápida que cuando se tenía uno solo, ésta se vio favorecida por la presencia de los HAP's más ligeros, ya que se presentó un fenómeno de sinergismo en la remoción.
- De las cuatro temperaturas evaluadas la mayor degradación de los HAP's se dio a temperatura ambiente y a 30°C, ya que después de 48 horas de exposición las cantidades totales recuperadas de HAP's no son detectadas, menores o cercanas LC.

ANEXO 1

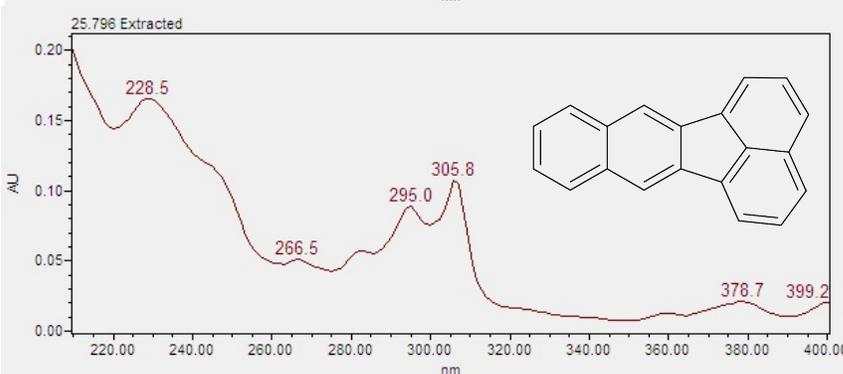
ESPECTROS DE ABSORCIÓN UV PARA LOS HAP's EN ESTUDIO OBTENIDOS
EXPERIMENTALMENTEEspectro de absorción
del fenantrenoEspectro de absorción
del antracenoEspectro de absorción
del
pireno



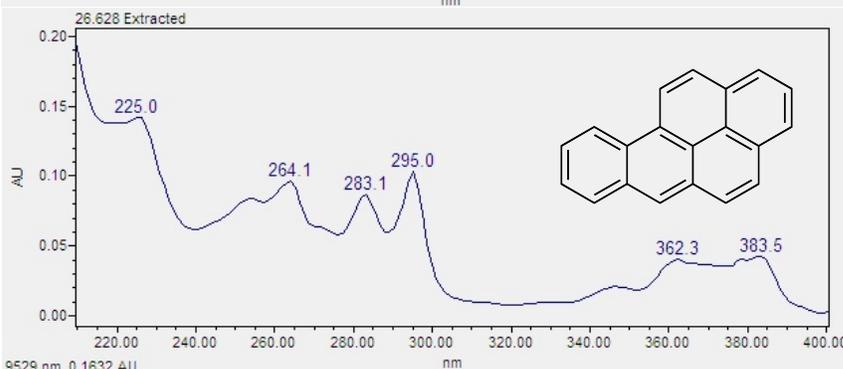
Espectro de absorción
del benzo[a]antraceno



Espectro de absorción
del benzo[b]fluranteno

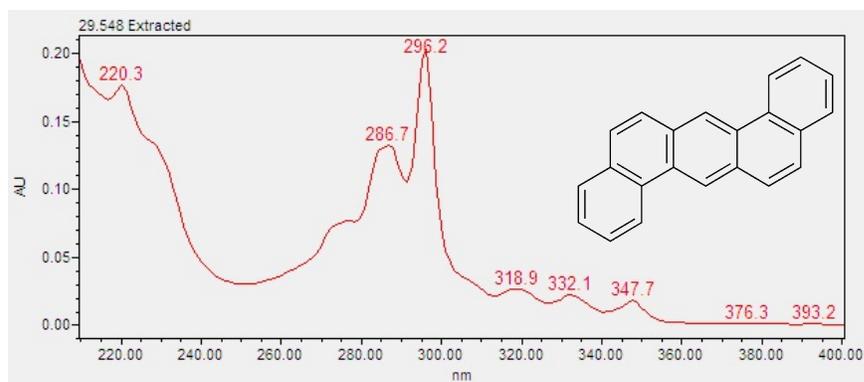


Espectro de absorción
del benzo[k]fluoranteno



Espectro de absorción
del benzo[a]pireno

.9529 nm. 0.1632 AU



Espectro de absorción
del dibenzo[a,h]antracenc

ANEXO 2

FÓRMULAS UTILIZADAS PARA EL CÁLCULO DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA,
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN BASADO EN LA
DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA RESPUESTA Y LA PENDIENTE

Pendiente	$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Ordenada al origen	$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$
Coefficiente de correlación	$r^2 = \frac{[n \sum xy - \sum x \sum y]^2}{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}$
Desviación estándar de la regresión	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$
Límite de Detección ⁹⁹	$LD = \frac{3.3 S_{y/x}}{m}$
Límite de Cuantificación ⁹⁹	$LC = \frac{10 S_{y/x}}{m}$

ANEXO 3

CANTIDADES PROMEDIO RECUPERADAS DE LOS HAP's EN MEDIO LÍQUIDO Y BIOMASA EN ENSAYOS A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN

Tabla 30. Cantidad promedio recuperada de fenantreno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición

	Temperatura	µg promedio recuperados ± DE (n=3)				
		1h	3h	6h	24h	48h
Medio líquido	20 °C	< LC	0.62 ± 0.06	0.74 ± 0.04	< 0.6	< 0.6
	25 °C	1.26 ± 0.04	0.88 ± 0.11	1.03 ± 0.07	0.75 ± 0.05	< 0.6
	30 °C	0.98 ± 0.03	0.77 ± 0.03	0.77 ± 0.03	< 0.6	ND
	TA	0.69 ± 0.01	0.64 ± 0.05	0.66 ± 0.03	< 0.6	ND
	Control (25 °C)	0.82 ± 0.01	1.07 ± 0.13	1.11 ± 0.04	1.04 ± 0.05	0.71 ± 0.04
Biomasa	20 °C	1.07 ± 0.04	1.13 ± 0.17	1.33 ± 0.18	1.39 ± 0.27	0.45 ± 0.05
	25 °C	0.83 ± 0.11	1.90 ± 0.14	1.41 ± 0.19	0.91 ± 0.04	0.90 ± 0.03
	30 °C	1.77 ± 0.10	1.50 ± 0.12	1.32 ± 0.02	0.87 ± 0.16	0.45 ± 0.09
	TA	1.04 ± 0.20	1.28 ± 0.14	1.23 ± 0.21	0.47 ± 0.03	ND
	Control (25 °C)	0.80 ± 0.04	0.95 ± 0.06	1.19 ± 0.06	1.99 ± 0.22	0.93 ± 0.04
Total	20 °C	< 1.67	1.75 ± 0.14	2.08 ± 0.17	< 1.99	< 1.05
	% Remoción (20 °C)	> 58 %	56 %	48 %	> 50 %	> 74 %
	25 °C	2.09 ± 0.10	2.78 ± 0.25	2.44 ± 0.25	1.66 ± 0.09	0.90 ± 0.03
	% Remoción (25 °C)	48 %	31 %	39 %	59 %	78 %
	30 °C	2.75 ± 0.12	2.27 ± 0.15	2.09 ± 0.05	< 1.47	0.45 ± 0.09
	% Remoción (30 °C)	31 %	43 %	48 %	> 63 %	89 %
	TA	1.73 ± 0.21	1.92 ± 0.18	1.89 ± 0.20	< 1.07	ND
	% Remoción (TA)	57 %	52 %	53 %	> 73 %	> 91 %
	Control (25 °C)	1.62 ± 0.05	2.02 ± 0.18	2.30 ± 0.06	2.10 ± 0.26	1.64 ± 0.06

TA: Temperatura ambiente; ND: No detectado

Tabla 31. Cantidad promedio recuperada de antraceno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición

	Temperatura	µg promedio recuperados ± DE (n=3)				
		1h	3h	6h	24h	48h
Medio líquido	20 °C	0.40 ± 0.02	0.51 ± 0.07	0.69 ± 0.01	0.41 ± 0.08	0.33 ± 0.04
	25 °C	1.14 ± 0.04	0.75 ± 0.10	0.92 ± 0.07	0.59 ± 0.04	0.39 ± 0.06
	30 °C	0.80 ± 0.02	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.27 ± 0.01
	TA	0.59 ± 0.01	0.52 ± 0.04	0.52 ± 0.03	< 0.24	ND
	Control (25 °C)	0.71 ± 0.02	0.96 ± 0.12	0.96 ± 0.04	0.90 ± 0.04	0.61 ± 0.03
Biomasa	20 °C	1.01 ± 0.04	1.05 ± 0.16	1.29 ± 0.16	1.27 ± 0.25	0.36 ± 0.05
	25 °C	0.58 ± 0.08	1.82 ± 0.11	1.26 ± 0.15	0.74 ± 0.08	0.68 ± 0.04
	30 °C	1.77 ± 0.10	1.44 ± 0.14	1.31 ± 0.05	0.65 ± 0.12	0.31 ± 0.05
	TA	1.06 ± 0.19	1.26 ± 0.14	1.14 ± 0.21	0.22 ± 0.02	ND
	Control (25 °C)	0.85 ± 0.04	1.03 ± 0.05	1.22 ± 0.05	1.00 ± 0.18	0.83 ± 0.05
Total	20 °C	1.41 ± 0.05	1.56 ± 0.12	1.99 ± 0.16	1.69 ± 0.27	0.69 ± 0.09
	% Remoción (20 °C)	65 %	61 %	50 %	58 %	83 %
	25 °C	1.71 ± 0.04	2.57 ± 0.20	2.18 ± 0.20	1.33 ± 0.08	1.07 ± 0.10
	% Remoción (25 °C)	57 %	36 %	46 %	67 %	73 %
	30 °C	2.57 ± 0.12	2.05 ± 0.15	1.94 ± 0.07	1.04 ± 0.17	0.58 ± 0.04
	% Remoción (30 °C)	36 %	49 %	52 %	74 %	86 %
	TA	1.65 ± 0.21	1.78 ± 0.17	1.66 ± 0.25	< 0.46	ND
	% Remoción (TA)	59 %	56 %	59 %	> 89 %	> 96 %
	Control (25 °C)	1.56 ± 0.03	1.99 ± 0.18	2.19 ± 0.05	1.90 ± 0.21	1.45 ± 0.08

TA: Temperatura ambiente; ND: No detectado

Tabla 32. Cantidad promedio recuperada de pireno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición

	Temperatura	µg promedio recuperados ± DE (n=3)				
		1h	3h	6h	24h	48h
Medio líquido	20 °C	ND	ND	ND	ND	ND
	25 °C	< 2.0	< 2.0	< 2.0	ND	ND
	30 °C	ND	ND	ND	ND	ND
	TA	ND	ND	ND	ND	ND
	Control (25 °C)	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0	< 2.0
Biomasa	20 °C	1.64 ± 0.16	1.73 ± 0.23	1.87 ± 0.26	2.01 ± 0.29	< 1.0
	25 °C	1.44 ± 0.19	3.10 ± 0.10	2.72 ± 0.31	1.93 ± 0.14	1.80 ± 0.11
	30 °C	3.00 ± 0.23	2.58 ± 0.21	2.34 ± 0.07	1.40 ± 0.31	ND
	TA	1.54 ± 0.34	2.16 ± 0.20	2.15 ± 0.35	< 1.0	ND
	Control (25 °C)	2.31 ± 0.11	2.92 ± 0.16	3.07 ± 0.13	2.96 ± 0.08	2.91 ± 0.06
Total	20 °C	1.64 ± 0.16	1.73 ± 0.23	1.87 ± 0.26	2.01 ± 0.29	0.42 ± 0.05
	% Remoción (20 °C)	59 %	57 %	53 %	50 %	90 %
	25 °C	< 3.44	< 3.10	< 2.72	1.93 ± 0.14	1.80 ± 0.11
	% Remoción (25 °C)	> 14 %	> 23 %	> 32 %	52 %	55 %
	30 °C	3.00 ± 0.23	2.58 ± 0.21	2.34 ± 0.07	1.40 ± 0.31	ND
	% Remoción (30 °C)	25 %	36 %	42 %	65 %	> 78 %
	TA	1.54 ± 0.34	2.16 ± 0.20	2.15 ± 0.35	< 1.0	ND
	% Remoción (TA)	62 %	46 %	46 %	75 %	> 78 %
	Control (25 °C)	< 4.31	< 4.92	< 5.07	< 4.96	< 4.91

TA: Temperatura ambiente; ND: No detectado

Tabla 33. Cantidad promedio recuperada de benzo[a]antraceno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición

	Temperatura	µg promedio recuperados ± DE (n=3)				
		1h	3h	6h	24h	48h
Medio líquido	20 °C	0.87 ± 0.08	0.67 ± 0.09	1.00 ± 0.02	< 0.6	< 0.6
	25 °C	1.58 ± 0.05	0.89 ± 0.11	0.85 ± 0.06	< 0.6	ND
	30 °C	0.91 ± 0.04	< 0.6	< 0.6	ND	ND
	TA	0.97 ± 0.06	0.63 ± 0.07	< 0.6	ND	ND
	Control (25 °C)	0.60 ± 0.04	0.79 ± 0.12	0.76 ± 0.02	0.78 ± 0.07	< 0.6
Biomasa	20 °C	1.03 ± 0.13	1.43 ± 0.15	1.23 ± 0.17	0.86 ± 0.17	< 0.3
	25 °C	0.98 ± 0.11	2.48 ± 0.16	1.65 ± 0.26	0.81 ± 0.08	0.79 ± 0.05
	30 °C	2.32 ± 0.28	2.00 ± 0.22	1.76 ± 0.09	0.28 ± 0.06	< 0.3
	TA	1.03 ± 0.23	1.45 ± 0.15	1.32 ± 0.22	< 0.3	ND
	Control (25 °C)	2.51 ± 0.09	3.23 ± 0.28	3.28 ± 0.15	3.16 ± 0.40	3.25 ± 0.09
Total	20 °C	1.89 ± 0.14	2.10 ± 0.10	2.24 ± 0.15	< 1.46	< 0.9
	% Remoción (20 °C)	53 %	48 %	44 %	> 64 %	> 78 %
	25 °C	2.56 ± 0.10	3.37 ± 0.27	2.50 ± 0.28	< 1.41	0.79 ± 0.05
	% Remoción (25 °C)	36 %	16 %	38 %	> 65 %	80 %
	30 °C	3.22 ± 0.28	< 2.60	< 2.36	0.28 ± 0.06	< 0.3
	% Remoción (30 °C)	20 %	> 35 %	> 41 %	93 %	> 93 %
	TA	2.01 ± 0.28	2.07 ± 0.22	< 1.92	< 0.3	ND
	% Remoción (TA)	50 %	48 %	> 52 %	> 92 %	> 92 %
	Control (25 °C)	3.12 ± 0.12	4.02 ± 0.35	4.04 ± 0.17	3.94 ± 0.46	3.84 ± 0.13

TA: Temperatura ambiente; ND: No detectado

Tabla 34. Cantidad promedio recuperada de benzo[b]fluoranteno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición

	Temperatura	µg promedio recuperados ± DE (n=3)				
		1h	3h	6h	24h	48h
Medio líquido	20 °C	< 1.2	< 1.2	< 1.2	< 1.2	ND
	25 °C	1.32 ± 0.04	< 1.2	< 1.2	< 1.2	ND
	30 °C	< 1.2	< 1.2	< 1.2	ND	ND
	TA	< 1.2	< 1.2	ND	ND	ND
	Control (25 °C)	< 1.2	< 1.2	< 1.2	< 1.2	< 1.2
Biomasa	20 °C	1.15 ± 0.13	1.40 ± 0.17	1.29 ± 0.21	1.31 ± 0.22	< 0.6
	25 °C	1.03 ± 0.21	2.61 ± 0.29	1.82 ± 0.26	1.43 ± 0.05	1.20 ± 0.09
	30 °C	2.32 ± 0.26	2.05 ± 0.20	1.60 ± 0.06	< 0.6	ND
	TA	1.20 ± 0.24	1.64 ± 0.19	1.71 ± 0.33	< 0.6	ND
	Control (25 °C)	2.52 ± 0.08	3.28 ± 0.29	3.31 ± 0.15	3.16 ± 0.38	3.19 ± 0.09
Total	20 °C	< 2.35	< 2.60	< 2.49	< 2.51	< 0.6
	% Remoción (20 °C)	> 41 %	> 35 %	> 38 %	> 37 %	> 85 %
	25 °C	2.35 ± 0.20	< 3.81	< 3.02	< 2.63	1.20 ± 0.09
	% Remoción (25 °C)	41 %	> 5 %	> 25 %	> 34 %	> 70 %
	30 °C	< 3.52	< 3.25	< 2.80	< 0.6	ND
	% Remoción (30 °C)	> 12 %	> 19 %	> 30 %	> 85 %	> 85 %
	TA	< 2.40	< 2.84	1.71 ± 0.33	< 0.6	ND
	% Remoción (TA)	> 40 %	> 29 %	57 %	> 85 %	> 85 %
	Control (25 °C)	< 3.72	< 4.48	< 4.51	< 4.36	< 4.39

TA: Temperatura ambiente; ND: No detectado

Tabla 35. Cantidad promedio recuperada de benzo[k]fluoranteno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición

	Temperatura	µg promedio recuperados ± DE (n=3)				
		1h	3h	6h	24h	48h
Medio líquido	20 °C	1.26 ± 0.06	1.33 ± 0.15	1.61 ± 0.06	1.25 ± 0.25	< 1.2
	25 °C	2.27 ± 0.08	1.63 ± 0.20	1.38 ± 0.04	< 1.2	ND
	30 °C	1.88 ± 0.33	< 1.2	< 1.2	< 1.2	ND
	TA	1.67 ± 0.17	< 1.2	< 1.2	< 1.2	ND
	Control (25 °C)	< 1.2	< 1.2	< 1.2	< 1.2	< 1.2
Biomasa	20 °C	0.62 ± 0.08	0.88 ± 0.10	0.83 ± 0.02	0.87 ± 0.18	< 0.6
	25 °C	0.65 ± 0.13	1.90 ± 0.08	1.04 ± 0.11	1.05 ± 0.05	0.86 ± 0.09
	30 °C	1.24 ± 0.12	1.65 ± 0.06	1.37 ± 0.04	< 0.6	ND
	TA	0.89 ± 0.05	0.79 ± 0.08	0.98 ± 0.14	< 0.6	ND
	Control (25 °C)	2.48 ± 0.10	3.24 ± 0.25	3.26 ± 0.18	3.06 ± 0.34	3.22 ± 0.13
Total	20 °C	1.88 ± 0.08	2.20 ± 0.12	2.44 ± 0.06	2.12 ± 0.39	< 1.8
	% Remoción (20 °C)	53 %	45 %	39 %	47 %	> 55 %
	25 °C	2.92 ± 0.11	3.53 ± 0.12	2.42 ± 0.13	< 2.25	0.86 ± 0.09
	% Remoción (20 °C)	27 %	12 %	40 %	> 44 %	79 %
	30 °C	3.12 ± 0.34	< 2.85	< 2.57	< 1.8	ND
	% Remoción (20 °C)	22 %	> 29 %	> 36 %	> 55 %	> 85 %
	TA	2.56 ± 0.22	< 1.99	< 2.18	< 1.8	ND
	% Remoción (20 °C)	> 36 %	> 50 %	> 46 %	> 55 %	> 85 %
	Control (25 °C)	< 3.68	< 4.44	< 4.53	< 4.26	< 4.42

TA: Temperatura ambiente; ND: No detectado

Tabla 36. Cantidad promedio recuperada de benzo[a]pireno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición

	Temperatura	µg promedio recuperados ± DE (n=3)				
		1h	3h	6h	24h	48h
Medio líquido	20 °C	1.26 ± 0.15	1.12 ± 0.08	1.11 ± 0.02	< 1.0	< 1.0
	25 °C	1.35 ± 0.06	1.07 ± 0.11	1.12 ± 0.08	< 1.0	< 1.0
	30 °C	1.28 ± 0.26	< 1.0	< 1.0	ND	ND
	TA	1.20 ± 0.07	1.01 ± 0.16	< 1.0	ND	ND
	Control (25 °C)	< LC	0.99 ± 0.16	< 1.0	< 1.0	< 1.0
Biomasa	20 °C	1.03 ± 0.20	1.43 ± 0.19	0.93 ± 0.15	0.73 ± 0.14	< 0.5
	25 °C	0.81 ± 0.16	1.91 ± 0.13	1.34 ± 0.17	0.75 ± 0.08	0.83 ± 0.09
	30 °C	1.43 ± 0.16	1.55 ± 0.13	1.07 ± 0.06	< 0.5	ND
	TA	0.81 ± 0.06	1.36 ± 0.21	1.15 ± 0.21	< 0.5	ND
	Control (25 °C)	3.11 ± 0.14	2.79 ± 0.05	3.26 ± 0.18	3.22 ± 0.35	3.28 ± 0.08
Total	20 °C	2.29 ± 0.07	2.56 ± 0.11	2.04 ± 0.14	< 1.72	< 1.5
	% Remoción (20 °C)	43 %	36 %	49 %	> 57 %	> 63 %
	25 °C	2.16 ± 0.22	2.98 ± 0.11	2.46 ± 0.13	< 1.74	< 1.82
	% Remoción (25 °C)	46 %	26 %	39 %	> 57 %	> 55 %
	30 °C	2.72 ± 0.22	< 2.54	< 2.06	< 0.5	ND
	% Remoción (30 °C)	32 %	> 37 %	> 49 %	> 88 %	> 88 %
	TA	2.01 ± 0.08	2.37 ± 0.07	< 2.14	< 0.5	ND
	% Remoción (TA)	50 %	41 %	> 47 %	> 88 %	> 88 %
	Control (25 °C)	< 4.10	3.53 ± 0.05	< 4.25	< 4.21	< 4.27

TA: Temperatura ambiente; ND: No detectado

Tabla 37. Cantidad promedio recuperada de dibenzo[a,h]antraceno en medio líquido y biomasa en muestras de cultivos de microalgas sometidas a diferentes tiempos de exposición

	Temperatura	µg promedio recuperados ± DE (n=3)				
		1h	3h	6h	24h	48h
Medio líquido	20 °C	1.20 ± 0.06	1.45 ± 0.18	1.51 ± 0.14	1.48 ± 0.27	0.92 ± 0.18
	25 °C	2.13 ± 0.05	1.44 ± 0.15	1.15 ± 0.07	0.92 ± 0.09	< 0.6
	30 °C	2.09 ± 0.15	1.19 ± 0.13	0.65 ± 0.08	< 0.6	< 0.6
	TA	1.64 ± 0.27	1.11 ± 0.18	0.94 ± 0.17	0.74 ± 0.12	< 0.6
	Control (25 °C)	0.69 ± 0.02	0.82 ± 0.13	0.69 ± 0.06	0.80 ± 0.16	0.58 ± 0.04
Biomasa	20 °C	0.34 ± 0.06	0.66 ± 0.10	0.52 ± 0.05	0.59 ± 0.09	0.37 ± 0.07
	25 °C	0.43 ± 0.07	1.08 ± 0.06	0.92 ± 0.09	0.86 ± 0.06	0.68 ± 0.04
	30 °C	0.86 ± 0.11	1.01 ± 0.04	0.82 ± 0.05	0.30 ± 0.04	< 0.3
	TA	0.33 ± 0.04	0.51 ± 0.08	0.70 ± 0.09	< 0.3	ND
	Control (25 °C)	1.68 ± 0.05	2.83 ± 0.29	3.00 ± 0.13	2.90 ± 0.19	2.69 ± 0.08
Total	20 °C	1.54 ± 0.6	2.12 ± 0.15	2.03 ± 0.14	2.06 ± 0.36	1.29 ± 0.21
	% Remoción (20 °C)	62 %	47 %	49 %	49 %	68 %
	25 °C	2.56 ± 0.08	2.51 ± 0.19	2.06 ± 0.05	1.78 ± 0.09	< 1.28
	% Remoción (25 °C)	36 %	37 %	49 %	56 %	> 68 %
	30 °C	2.95 ± 0.05	2.20 ± 0.11	1.48 ± 0.10	< 0.9	< 0.9
	% Remoción (30 °C)	26 %	45 %	63 %	> 78 %	> 78 %
	TA	1.97 ± 0.29	1.62 ± 0.25	1.65 ± 0.25	0.74 ± 0.12	< 0.6
	% Remoción (TA)	51 %	60 %	> 59 %	82 %	85 %
	Control (25 °C)	2.37 ± 0.07	3.65 ± 0.40	3.69 ± 0.07	3.71 ± 0.32	3.27 ± 0.09

TA: Temperatura ambiente; ND: No detectado

ANEXO 4

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CANTIDADES TOTALES RECUPERADAS EN
LOS ENSAYOS DE FEN Y DB[a,h]A REALIZADOS CON LOS HAP's INDIVIDUALES
Y CON LOS 8 HAP's EN ESTUDIO

ANOVA Multifactorial - μg totales FenVariable dependiente: μg totales Fen

Factores:

Ensayo

Tiempo

Número de casos completos: 18

Análisis de Varianza para ug totales Fen - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Ensayo	1,55467	1	1,55467	13,91	0,0022
B:Tiempo	6,08614	2	3,04307	27,22	0,0000
RESIDUOS	1,56488	14	0,111777		
TOTAL (CORREGIDO)	9,20569	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para ug totales Fen por Ensayo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Individual	9	0,896667	0,111444	X
8 HAP's	9	1,48444	0,111444	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
8 HAP's - Individual	*	0,587778	0,33803

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ug totales Fen con intervalos de confianza del 95,0%

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GLOBAL	18	1,19056			
Ensayo					
8 HAP's	9	1,48444	0,111444	1,24542	1,72347
Individual	9	0,896667	0,111444	0,657643	1,13569
Tiempo					
1h	6	1,81833	0,13649	1,52559	2,11108
24h	6	0,416667	0,13649	0,123924	0,709409
6h	6	1,33667	0,13649	1,04392	1,62941

ANOVA Multifactorial - μg totales DBAVariable dependiente: μg totales DBA

Factores:

Ensayo

Tiempo

Número de casos completos: 24

Análisis de Varianza para μg DBA - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Ensayo	7,90054	1	7,90054	126,57	0,0000
B:Tiempo	19,7009	3	6,56697	105,21	0,0000
RESIDUOS	1,18595	19	0,0624182		
TOTAL (CORREGIDO)	28,7874	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para μg DBA por Ensayo

Método: 95,0 porcentaje LSD

Ensayo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
8 HAP's	12	1,08833	0,0721215	X
Individual	12	2,23583	0,0721215	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
8 HAP's - Individual	*	-1,1475	0,213479

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para μg DBA con intervalos de confianza del 95,0%

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GLOBAL	24	1,66208			
Ensayo					
8 HAP's	12	1,08833	0,0721215	0,937381	1,23929
Individual	12	2,23583	0,0721215	2,08488	2,38679
Tiempo					
1h	6	2,57	0,101995	2,35652	2,78348
24h	6	1,41	0,101995	1,19652	1,62348
48h	6	0,29	0,101995	0,076521	0,503479
6h	6	2,37833	0,101995	2,16485	2,59181

ANEXO 5

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CANTIDADES TOTALES RECUPERADAS EN
LOS ENSAYOS DE LOS 8 HAP's EN ESTUDIO A DIFERENTES TEMPERATURAS

ANOVA Multifactorial - μg totales FenVariable dependiente: μg totales Fen

Factores:

Temperatura

Tiempo

Número de casos completos: 60

Análisis de Varianza para μg Totales Fen - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	4,72043	3	1,57348	14,36	0,0000
B:Tiempo	26,3138	4	6,57844	60,04	0,0000
RESIDUOS	5,69763	52	0,10957		
TOTAL (CORREGIDO)	36,7318	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para μg Totales Fen por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
TA	15	1,27533	0,0854672	X
20°C	15	1,34733	0,0854672	X
30°C	15	1,686	0,0854672	X
25°C	15	1,976	0,0854672	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20°C - 25°C	*	-0,628667	0,242542
20°C - 30°C	*	-0,338667	0,242542
20°C - TA		0,072	0,242542
25°C - 30°C	*	0,29	0,242542
25°C - TA	*	0,700667	0,242542
30°C - TA	*	0,410667	0,242542

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ug Totales Fen con intervalos de confianza del 95,0%

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Est.	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	60	1,57117			
Temperatura					
20°C	15	1,34733	0,0854672	1,17583	1,51884
25°C	15	1,976	0,0854672	1,8045	2,1475
30°C	15	1,686	0,0854672	1,5145	1,8575
TA	15	1,27533	0,0854672	1,10383	1,44684
Tiempo					
1h	12	1,91083	0,0955553	1,71909	2,10258
24h	12	1,18833	0,0955553	0,996587	1,38008
3h	12	2,18167	0,0955553	1,98992	2,37341
48h	12	0,451667	0,0955553	0,259921	0,643413
6h	12	2,12333	0,0955553	1,93159	2,31508

ANOVA Multifactorial - μ g totales AntVariable dependiente: μ g totales Ant

Factores:

Temperatura

Tiempo

Número de casos completos: 60

Análisis de Varianza para ug Totales Ant - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	3,85916	3	1,28639	11,28	0,0000
B:Tiempo	18,4383	4	4,60957	40,41	0,0000
RESIDUOS	5,93111	52	0,11406		
TOTAL (CORREGIDO)	28,2286	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para ug Totales Ant por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
TA	15	1,09533	0,0872008	X
20°C	15	1,464	0,0872008	X
30°C	15	1,63733	0,0872008	XX
25°C	15	1,77133	0,0872008	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20°C - 25°C	*	-0,307333	0,247461
20°C - 30°C		-0,173333	0,247461
20°C - TA	*	0,368667	0,247461
25°C - 30°C		0,134	0,247461
25°C - TA	*	0,676	0,247461
30°C - TA	*	0,542	0,247461

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ug Totales Ant con intervalos de confianza del 95,0%

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Est.	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	60	1,492			
Temperatura					
20°C	15	1,464	0,0872008	1,28902	1,63898
25°C	15	1,77133	0,0872008	1,59635	1,94631
30°C	15	1,63733	0,0872008	1,46235	1,81231
TA	15	1,09533	0,0872008	0,920352	1,27031
Tiempo					
1h	12	1,835	0,0974935	1,63936	2,03064
24h	12	1,11167	0,0974935	0,916031	1,3073
3h	12	1,98833	0,0974935	1,7927	2,18397
48h	12	0,583333	0,0974935	0,387698	0,778969
6h	12	1,94167	0,0974935	1,74603	2,1373

ANOVA Multifactorial - μg totales PirVariable dependiente: μg totales Pir

Factores:

Temperatura

Tiempo

Número de casos completos: 60

Análisis de Varianza para ug Totales Pir - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	7,14902	3	2,38301	8,71	0,0001
B:Tiempo	26,4334	4	6,60834	24,16	0,0000
RESIDUOS	14,2241	52	0,27354		
TOTAL (CORREGIDO)	47,8065	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para ug Totales Pir por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
TA	15	1,28333	0,135041	X
20°C	15	1,534	0,135041	XX
30°C	15	1,86467	0,135041	XX
25°C	15	2,2	0,135041	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20°C - 25°C	*	-0,666	0,383223
20°C - 30°C		-0,330667	0,383223
20°C - TA		0,250667	0,383223
25°C - 30°C		0,335333	0,383223
25°C - TA	*	0,916667	0,383223
30°C - TA	*	0,581333	0,383223

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ug Totales Pir con intervalos de confianza del 95,0%

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Est.	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	60	1,7205			
Temperatura					
20°C	15	1,534	0,135041	1,26302	1,80498
25°C	15	2,2	0,135041	1,92902	2,47098
30°C	15	1,86467	0,135041	1,59369	2,13565
TA	15	1,28333	0,135041	1,01235	1,55431
Tiempo					
1h	12	1,9025	0,15098	1,59954	2,20546
24h	12	1,48	0,15098	1,17704	1,78296
3h	12	2,3925	0,15098	2,08954	2,69546
48h	12	0,555833	0,15098	0,252869	0,858798
6h	12	2,27167	0,15098	1,9687	2,57463

ANOVA Multifactorial - μg totales BaAVariable dependiente: μg totales BaA

Factores:

Temperatura

Tiempo

Número de casos completos: 60

Análisis de Varianza para ug Totales BaA - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	6,59694	3	2,19898	15,96	0,0000
B:Tiempo	54,8288	4	13,7072	99,49	0,0000
RESIDUOS	7,16415	52	0,137772		
TOTAL (CORREGIDO)	68,5899	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para ug Totales BaA por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
TA	15	1,08133	0,0958374	X
20°C	15	1,41867	0,0958374	X
30°C	15	1,452	0,0958374	X
25°C	15	2,006	0,0958374	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20°C - 25°C	*	-0,587333	0,271971
20°C - 30°C		-0,0333333	0,271971
20°C - TA	*	0,337333	0,271971
25°C - 30°C	*	0,554	0,271971
25°C - TA	*	0,924667	0,271971
30°C - TA	*	0,370667	0,271971

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ug Totales BaA con intervalos de confianza del 95,0%

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Est.	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	60	1,4895			
Temperatura					
20°C	15	1,41867	0,0958374	1,22635	1,61098
25°C	15	2,006	0,0958374	1,81369	2,19831
30°C	15	1,452	0,0958374	1,25969	1,64431
TA	15	1,08133	0,0958374	0,889021	1,27365
Tiempo					
1h	12	2,42083	0,107149	2,20582	2,63584
24h	12	0,486667	0,107149	0,271655	0,701678
3h	12	2,38833	0,107149	2,17332	2,60334
48h	12	0,196667	0,107149	-0,018345	0,411678
6h	12	1,955	0,107149	1,73999	2,17001

ANOVA Multifactorial - μg totales BbFVariable dependiente: μg totales BbF

Factores:

Temperatura

Tiempo

Número de casos completos: 60

Análisis de Varianza para ug Totales BbF - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	8,35764	3	2,78588	19,24	0,0000
B:Tiempo	23,4689	4	5,86723	40,51	0,0000
RESIDUOS	7,53074	52	0,144822		
TOTAL (CORREGIDO)	39,3573	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para ug Totales BbF por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
TA	15	0,911333	0,0982588	X
20°C	15	1,03067	0,0982588	XX
30°C	15	1,27733	0,0982588	X
25°C	15	1,87933	0,0982588	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20°C - 25°C	*	-0,848667	0,278842
20°C - 30°C		-0,246667	0,278842
20°C - TA		0,119333	0,278842
25°C - 30°C	*	0,602	0,278842
25°C - TA	*	0,968	0,278842
30°C - TA	*	0,366	0,278842

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ug Totales BbF con intervalos de confianza del 95,0%

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Est.	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	60	1,27467			
Temperatura					
20°C	15	1,03067	0,0982588	0,833495	1,22784
25°C	15	1,87933	0,0982588	1,68216	2,0765
30°C	15	1,27733	0,0982588	1,08016	1,4745
TA	15	0,911333	0,0982588	0,714162	1,1085
Tiempo					
1h	12	1,75667	0,109857	1,53622	1,97711
24h	12	0,786667	0,109857	0,566223	1,00711
3h	12	1,92667	0,109857	1,70622	2,14711
48h	12	0,299167	0,109857	0,0787226	0,519611
6h	12	1,60417	0,109857	1,38372	1,82461

ANOVA Multifactorial - μ g totales BkFVariable dependiente: μ g totales BkF

Factores:

Temperatura

Tiempo

Número de casos completos: 60

Análisis de Varianza para ug Totales BkF - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	14,115	3	4,70501	14,94	0,0000
B:Tiempo	44,7199	4	11,18	35,50	0,0000
RESIDUOS	16,3781	52	0,314963		
TOTAL (CORREGIDO)	75,213	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para ug Totales BkF por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
TA	15	0,868	0,144905	X
30°C	15	1,26133	0,144905	X
20°C	15	1,72933	0,144905	X
25°C	15	2,15733	0,144905	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20°C - 25°C	*	-0,428	0,411217
20°C - 30°C	*	0,468	0,411217
20°C - TA	*	0,861333	0,411217
25°C - 30°C	*	0,896	0,411217
25°C - TA	*	1,28933	0,411217
30°C - TA		0,393333	0,411217

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ug Totales BkF con intervalos de confianza del 95,0%

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Est.	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	60	1,504			
Temperatura					
20°C	15	1,72933	0,144905	1,43856	2,02011
25°C	15	2,15733	0,144905	1,86656	2,44811
30°C	15	1,26133	0,144905	0,970559	1,55211
TA	15	0,868	0,144905	0,577226	1,15877
Tiempo					
1h	12	2,6175	0,162009	2,2924	2,9426
24h	12	0,8375	0,162009	0,512405	1,1626
3h	12	2,04583	0,162009	1,72074	2,37093
48h	12	0,215833	0,162009	-0,109262	0,540929
6h	12	1,80333	0,162009	1,47824	2,12843

ANOVA Multifactorial - μg totales BaPVariable dependiente: μg totales BaP

Factores:

Temperatura

Tiempo

Número de casos completos: 60

Análisis de Varianza para μg Totales BaP - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	5,3689	3	1,78963	14,56	0,0000
B:Tiempo	49,0893	4	12,2723	99,85	0,0000
RESIDUOS	6,39126	52	0,122909		
TOTAL (CORREGIDO)	60,8495	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para μg Totales BaP por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
30°C	15	1,104	0,0905203	X
TA	15	1,14133	0,0905203	X
20°C	15	1,52267	0,0905203	X
25°C	15	1,834	0,0905203	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20°C - 25°C	*	-0,311333	0,256881
20°C - 30°C	*	0,418667	0,256881
20°C - TA	*	0,381333	0,256881
25°C - 30°C	*	0,73	0,256881
25°C - TA	*	0,692667	0,256881
30°C - TA		-0,0373333	0,256881

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ug Totales BaP con intervalos de confianza del 95,0%

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
MEDIA GLOBAL	60	1,4005			
Temperatura					
20°C	15	1,52267	0,0905203	1,34102	1,70431
25°C	15	1,834	0,0905203	1,65236	2,01564
30°C	15	1,104	0,0905203	0,922357	1,28564
TA	15	1,14133	0,0905203	0,959691	1,32298
Tiempo					
1h	12	2,29333	0,101205	2,09025	2,49642
24h	12	0,415833	0,101205	0,212751	0,618916
3h	12	2,36333	0,101205	2,16025	2,56642
48h	12	0,251667	0,101205	0,0485841	0,454749
6h	12	1,67833	0,101205	1,47525	1,88142

ANOVA Multifactorial - μg totales DBAVariable dependiente: μg totales DBA

Factores:

Temperatura

Tiempo

Número de casos completos: 60

Análisis de Varianza para ug Totales DBA - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temperatura	5,2968	3	1,7656	8,34	0,0001
B:Tiempo	25,2451	4	6,31127	29,81	0,0000
RESIDUOS	11,0077	52	0,211686		
TOTAL (CORREGIDO)	41,5496	59			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para ug Totales DBA por Temperatura

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
TA	15	1,19467	0,118796	X
30°C	15	1,38467	0,118796	X
20°C	15	1,80867	0,118796	X
25°C	15	1,918	0,118796	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20°C - 25°C		-0,109333	0,337122
20°C - 30°C	*	0,424	0,337122
20°C - TA	*	0,614	0,337122
25°C - 30°C	*	0,533333	0,337122
25°C - TA	*	0,723333	0,337122
30°C - TA		0,19	0,337122

* indica una diferencia significativa.

Tabla de Medias por Mínimos Cuadrados para ug Totales DBA con intervalos de confianza del 95,0%

			Error	Límite	Límite
Nivel	Casos	Media	Est.	Inferior	Superior
MEDIA GLOBAL	60	1,5765			
Temperatura					
20°C	15	1,80867	0,118796	1,57029	2,04705
25°C	15	1,918	0,118796	1,67962	2,15638
30°C	15	1,38467	0,118796	1,14629	1,62305
TA	15	1,19467	0,118796	0,956285	1,43305
Tiempo					
1h	12	2,25333	0,132818	1,98681	2,51985
24h	12	1,22	0,132818	0,953482	1,48652
3h	12	2,1125	0,132818	1,84598	2,37902
48h	12	0,490833	0,132818	0,224315	0,757352
6h	12	1,80583	0,132818	1,53931	2,07235

- ¹ Stadler, R. H., Lineback, D. R. (2009). Process-Induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks, John Wiley & Sons.
- ² Wenzl, T., Simon, R., Kleiner, J., Anklam, E. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (7), 716-725.
- ³ Skupinska, K., Misiewicz, I., Kasprzycka-Guttman, T. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 61 (3), 233-240.
- ⁴ Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., Labuzek, S. (2003). Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12 (1), 15-25.
- ⁵ Timmis, K. M. (2010). Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Chapter 34. Springer-Verlag, Berlín Heidelberg.
- ⁶ Semple, K., Cain, R. y Schmidt, S. (1999). Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 291-300.
- ⁷ Lei, A. Hu, Z., Wong, Y., Tam, N. F. (2007). Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource Technology*, 98, 273-280.
- ⁸ Chan, S. M. N., Luan, T., Wong, M. H., Tam, N. F. Y. (2006). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (7), 1772-1779.
- ⁹ Ke, L., Luo, L. Wang, P., Luan, T. Tam, N. F. (2010). Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology*, 101, 6950-6961.
- ¹⁰ Moldoveanu, S. C., David, V. (2002). Sample Preparation in Chromatography, Journal of Chromatography Library, Volume 65. Elsevier.
- ¹¹ Wilson, S.C., Jones, K.C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, 81, 229-249.
- ¹² Rehm, H.J., Reed, G. (2000). Biotechnology. Second Edition. Wiley-VCH.
- ¹³ Mastral, A.M., Callén, M. (2000). A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environmental Science and Technology*, 34, 3051-3057.

-
- ¹⁴ Kabzinski, A.K.M., Cyran, J., Juszcak, R. (2002). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water (including drinking water) of Łódź. *Polish Journal of Environmental Studies*. 11 (6), 695-706.
- ¹⁵ Karyab, H., Yunesian, M., Nasser, S., Mahvi, A.H., Ahmadkhaniha, R. Rastkari, N., Nabizadeh, R. (2013). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in drinking water of Tehran, Iran. *Journal of Environmental Health Sciences & Engineering*, 11 (25), 1-7.
- ¹⁶ Guidelines for drinking-water quality. (1998) 2nd edition. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization (WHO), Geneva.
- ¹⁷ Witt, G. (1995). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and Sediment of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 31 (4-12), 237-248.
- ¹⁸ Zhoua, J.L., Maskaoui, K. (2003). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay, China. *Environmental Pollution*, 121, 269-281.
- ¹⁹ Tsenga, W., Chen, P., Huang, S. (2014). Optimization of two different dispersive liquid-liquid microextraction methods followed by gas chromatography-mass spectrometry determination for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analysis in water. *Talanta*, 120, 425-432.
- ²⁰ Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Coglian, V. (2005). Policy watch: carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Lancet Oncology*, 6 (12), 931-932.
- ²¹ Guidelines for indoor air quality: selected pollutants. (2010). WHO Regional Office for Europe, WHO Regional Publications, European Series.
- ²² Technical factsheet on: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). (2006) Washington, DC, US Environmental Protection Agency. <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/historical/upload/Archived-Technical-Fact-Sheet-on-Polycyclic-Aromatic-Hydrocarbons.pdf>, consultada en agosto de 2013.
- ²³ Cerniglia, C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368.
- ²⁴ Cerniglia, C. E., White, G. L., and Heflich, R. H. (1985). Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of Microbiology*, 143, 105-110.

-
- ²⁵ Mueller, J. G., Cerniglia, C. E., Pritchard, P. H. (1996). Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioremediation: Principles and Applications*. Cambridge University Press. UK.
- ²⁶ Cerniglia, C. E.. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 324-333.
- ²⁷ Lindquist, B., Warshawsky, D. (1985). Stereospecificity in algal oxidation of the carcinogen benzo(a)pyrene. *Experientia*, 41, 767-769.
- ²⁸ Kelley, I., Freeman, J. P., Evans, F. E., Cerniglia, C. E. (1991). Identification of a carboxylic acid metabolite from the catabolism of fluoranthene by *Mycobacterium sp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 636-641.
- ²⁹ Kelley, I., Freeman, J. P., Evans, F. E., and Cerniglia, C. E. (1993). Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium sp.* strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 800-806.
- ³⁰ Walker, J.D., Colwell, R.R. and Petrakis, L. (1975). Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Journal of Applied Microbiology*, 30, 79-81.
- ³¹ Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 331-338.
- ³² 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.
- ³³ Semple, K., Cain, R. y Schmidt, S. (1999). Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 291-300.
- ³⁴ Soto, C., Hellebust, J.A. and Hutchinson, T.C. (1975). Effect of naphthalene and crude oil extracts on the green flagellate *Chlamydomonas angulosa*. II. Photosynthesis and the uptake and release of naphthalene. *Canadian Journal of Botany*, 53 (2), 118-126.
- ³⁵ Johnsen, A. R., Wick, L. Y., Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133, 71-84.
- ³⁶ Lee, H., Jang, Y., Choi, Y., Kim, M., Lee, J., Lee, H., Hong, J., Lee, Y. M., Kim, G., Kim, J. (2014). Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. *Journal of Microbiological Methods*, 97, 56-62.

- ³⁷ Valentín, L., Lu-Chaua, T.A., López, C., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M. (2007). Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera sp.* BOS55. *Process Biochemistry*, 42, 641-648.
- ³⁸ Winquist, E., Björklöf, K., Schultz, E., Räsänen, M., Salonen, K., Anasonye, F., Cajthaml, T., Steffen, K. T., Jørgensen, K. S., Tuomela, M. (2014). Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi- from laboratory to field scale. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 238-247.
- ³⁹ Eggen, T., Majcherczyk, A. (1998). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 111-117.
- ⁴⁰ Zheng, Z., Obbard, J. P. (2002). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 3-9.
- ⁴¹ Covino, S., Svobodová, K., Cvančarová, M., D'Annibale, A., Petruccioli, M., Federici, F., Kresinová, Z., Galli, E., Cajthaml, T. (2010). Inoculum carrier and contaminant bioavailability affect fungal degradation performances of PAH-contaminated solid matrices from a wood preservation plant. *Chemosphere*, 79, 855-864.
- ⁴² Chang, Y., Lee, J., Chao, H. (2007). Variability of communities and physiological characteristics between free-living bacteria and attached bacteria during the PAH biodegradation in a soil/water system. *European Journal of Soil Biology*, 43, 283-296.
- ⁴³ Shao, Z., Cui, Z., Dong, C., Lai, Q., Chen, L. (2010). Analysis of a PAH-degrading bacterial population in subsurface sediments on the Mid-Atlantic Ridge. *Deep-Sea Research I*, 57, 724-730.
- ⁴⁴ Wongwongsee, W., Chareanpat, P., Pinyakong, O. (2013). Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, 74, 95-104.
- ⁴⁵ Martin, F., Torelli, S., Le Paslier, D., Barbance, A., Martin-Laurent, F., Bru, D., Geremia, R., Blake, G., Jouanneau, Y. (2012). Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. *Environmental Pollution*, 162, 345-353.

- ⁴⁶ Rodrigues, A., Nogueira, R., Melo, L.F., Brito, A. G. (2013). Effect of low concentrations of synthetic surfactants on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 83, 48-55.
- ⁴⁷ Liao, W., Tseng, D. (1996). Biotreatment of naphthalene by PAH-acclimated pure culture with white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Science and Technology*, 34 (10), 73-79.
- ⁴⁸ Giraud, F., Guiraud, P., Kadri, M., Blake, G. Steiman, R. (2001). Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water Research*, 35 (17), 4126-4136.
- ⁴⁹ Wang, Z., Li, J., Hesham, A., He, S., Zhang, Y., Wang, Z., Yang, M. (2007). Co-variations of bacterial composition and catabolic genes related to PAH degradation in a produced water treatment system consisting of successive anoxic and aerobic units. *Science of the Total Environment*, 373, 356-362.
- ⁵⁰ González, N., Simarro, R., Molina, M.C., Bautista, L.F., Delgado, L., Villa, J. A. (2011). Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. *Bioresource Technology*, 102, 9438-9446.
- ⁵¹ Lei, A.P., Hu, Z.L., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y. (2007). Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource Technology*, 98, 273-280.
- ⁵² Hong, Y. W., Yuan, D. X., Lin, Q. M., Yang, T. L. (2008). Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*, 56, 1400-1405.
- ⁵³ Lei, A., Wong, Y., Tam, N. (2002). Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Science and Technology*, 46, 195-201.
- ⁵⁴ Todd, S. J., Cain, R. B., Schmidt, S. (2002). Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae. *Biodegradation*, 13, 229-238.
- ⁵⁵ Chan, S.M.N., Luan, T., Wong, M.H., Tam, N.F.Y. (2006). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1772-1779.
- ⁵⁶ Ueno R, Wada S, Urano N. (2008). Repeated batch cultivation of the hydrocarbon-degrading, micro-algal strain *Prototheca zopfii* RND16 immobilized in polyurethane foam. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 66-70.
- ⁵⁷ Ke, L., Luo, L. Wang, P., Luan, T. Tam, N. F. (2010). Effects of metals on biosorption and

- biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology*, 101, 6950-6961.
- ⁵⁸ Miller, W. E., Greene, J. C., Shiroyama, T. (1978). The *Selenastrum capricornutum* Printz Algal Assay Bottle Test. EPA.
- ⁵⁹ <http://www.carolina.com/algae/selenastrum-capricornutum-living/152520.pr> consultada en agosto de 2013.
- ⁶⁰ http://www.ccap.ac.uk/strain_info.php?Strain_No=278/4 consultada en agosto de 2013.
- ⁶¹ <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/6665> consultada en agosto de 2013.
- ⁶² Mitra, S. (2003). Sample preparation techniques in analytical chemistry. John Wiley & Sons.
- ⁶³ Ridgwaya, K., Lalljiea, S.P.D., Smith, R. M. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153, 36-53.
- ⁶⁴ Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., Qiu, C. (2008). Review: sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 1184, 191-219.
- ⁶⁵ Fritz, J. S. (1999). Analytical Solid-Phase Extraction. John Wiley & Sons.
- ⁶⁶ Poole, C. F., Gunatilleka, A. D., Sethuraman, R. (2000). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885, 17-39.
- ⁶⁷ Hennion, M. C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856, 3-54.
- ⁶⁸ Erger, C., Balsaa, P., Werres, F., Schmidt, T.C. (2012). Multi-component trace analysis of organic xenobiotics in surface water containing suspended particular matter by solid phase extraction/gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1249, 181-189.
- ⁶⁹ Song, X., Li, J., Xu, S., Ying, R., Ma, J., Liao, C., Liu, D., Yu, J., Chen, L. (2012). Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater using molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 99, 75-82.
- ⁷⁰ Buseti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., Traverso, P. (2006). Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography A*, 1102, 104-115.
- ⁷¹ Luthe, G., Broeders, J., Brinkman, U.A.T. (2001). Monofluorinated polycyclic aromatic

- hydrocarbons as internal standards to monitor trace enrichment and desorption of their parent compounds during solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 933, 27-35.
- ⁷² Houessou, J.K., Benac, C., Delteil, C., Camel, V.R. (2005). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Coffee Brew Using Solid-Phase Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 871-879.
- ⁷³ Lai, J.P., Niessner, R., Knopp, D. (2004). Benzo[a]pyrene imprinted polymers: synthesis, characterization and SPE application in water and coffee samples. *Analytica Chimica Acta*, 522, 137-144.
- ⁷⁴ García López, M., Canosa, P., Rodríguez, I. (2008). Trends and recent applications of matrix solid phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 963-974.
- ⁷⁵ Barker, S.A. (2000). Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885, 115-127.
- ⁷⁶ Olmos-Espejel, J. J., García de Llasera, M. P., Velasco-Cruz, M. (2012). Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1262, 138-147.
- ⁷⁷ Campíns-Falcó, P., Verdú-Andrés, J., Sevillano-Cabeza, A., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R. (2008). New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 1211, 13-21.
- ⁷⁸ Pensado, L., Casais, M.C., Mejuto, M.C., Cela, R. (2005). Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1077, 103-109.
- ⁷⁹ Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Tadeo, J. L. (2003). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Honey by Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 86 (3), 576-582.
- ⁸⁰ Loveland, P.M., Reddy, A.P., Pereira, C.B., Field, J.A., Bailey, G.S. (2001). Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of dibenzo[a,l]pyrene content of experimental animal diets used in a large-scale tumor study. *Journal of Chromatography A*, 932, 33-41.

-
- ⁸¹ Law, J. R., Biscaya, J. L. (1994). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)- Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. *Marine Pollution Bulletin*, 29, 235-241.
- ⁸² http://www.waters.com/waters/en_US/Waters-PAH-Columns/nav.htm?cid=513781&locale=en_US consultada en agosto de 2013.
- ⁸³ <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9657655> consultada en agosto de 2013.
- ⁸⁴ <http://www.restek.com/catalog/view/7645> consultada en agosto de 2013.
- ⁸⁵ Quevauviller, P., Maier, E.A., Griepink, B. (1995) Quality Assurance for Environmental Analysis. Elsevier.
- ⁸⁶ Cuadros-Rodríguez, L. Bagur-González, M.G., Sánchez-Viñas, M., González-Casado, A., Gómez-Sáez, A.M. (2007). Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *Journal of Chromatography A*, 1158, 33-46.
- ⁸⁷ Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. (2010). Introduction to modern liquid chromatography. Third edition. John Wiley & Sons.
- ⁸⁸ Trullols, E., Ruisánchez, I., Rius, F. X. (2004). Validation of qualitative analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (2), 137-145.
- ⁸⁹ Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., Carda-Broch, S. (2012). Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *Journal of Chromatography A*, 1232, 101-109.
- ⁹⁰ <http://web.biosci.utexas.edu/utex/mediaDetail.aspx?mediaID=29>, consultada en octubre de 2013.
- ⁹¹ Olmos Espejel, José de Jesús. (2013). Metodologías cromatográficas en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microorganismos. Dirigida por Dra. Martha Patricia García Camacho. Tesis doctoral. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- ⁹² Guide Q2B Validation of analytical procedures: Methodology. (1996). International Conference of Harmonisation, ICH.
- ⁹³ Guide Q2(R1) Validation of analytical procedures: Text and Methodology. (2005) International Conference of Harmonisation, ICH.
- ⁹⁴ Fasnacht, M.P., Blough, N. V. (2002). Aqueous Photodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, 36, 4364-4369.

- ⁹⁵ Fasnacht, M.P., Blough, N. V. (2003). Mechanisms of the Aqueous Photodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, 37, 5767-5772.
- ⁹⁶ Marcé, R. M., Borrull, F. (2000). Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *Journal of Chromatography A*, 885, 273-290.
- ⁹⁷ Statgraphics Centurion XV, Statpoint technologies, Inc, 2007.
- ⁹⁸ Montaña Montiel, Adriana. (2013). Remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio acuoso por *Scenedesmus acutus*. Dirigida por Dra. Martha Patricia García Camacho. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- ⁹⁹ García, A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., Alcántara, A., Chárvel, A., Mota, R., Garzón, A. (2002) Métodos Analíticos, Guía de Validación. Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C.