



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIO SUPERIORES ZARAGOZA

TESIS

**“Biorremediación por microalgas de medio acuoso  
contaminado por hidrocarburos aromáticos policíclicos”**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO**

PRESENTA

**JAHZIEL SÁNCHEZ HUESCA**

Ciudad de México

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS:**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por el conocimiento impartido en mi estancia académica. Siempre será mi segunda casa.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo y la beca otorgada en el proyecto PAPIIT IT203214

A la Facultad de Química de la UNAM por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones y por el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (PAIP)

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su dirección y apoyo en la realización de esta tesis.

A la M. en C. Rosario Covarrubias por su apoyo técnico, amabilidad, consejos y paciencia en la realización del trabajo experimental.

Al Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía (LACET) de la Facultad de Ciencias, UNAM, en especial a la M. en C. Guadalupe Vidal Gaona por su amable disponibilidad para proporcionar información acerca de la cepa adquirida.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por la cepa proporcionada.

A mis compañeros del laboratorio 208 de la Facultad de Química, UNAM por las buenas experiencias y el buen compañerismo.

## **Dedicatoria**

A mi madre Silvia Huesca por enseñarme lo que significa el verdadero amor, por tus noches de desvelo junto a mí y tu cariño incondicional. A mi padre Pedro Sánchez por mostrarme lo que es el trabajo duro y constante, siempre querré ser como tú. Los amo, no tengo como agradecer ni pagar todo lo que hacen por mí.

A mis hermanos Elizabeth y Pedro por el buen ejemplo y aliento que me dieron para concluir mis estudios de licenciatura. A mis sobrinitos Arturin, Pedrin y el próximo en llegar que siempre están en mi mente y corazón.

A mi hermano Javier por enseñarme lo que es la superación de las dificultades. Tu ejemplo lo guardo con gran cariño.

A Rocío R. por el apoyo incondicional, amistad y palabras de aliento cuando más lo necesito.

A mis amigos de la FES Zaragoza. En especial a mi amigo Eduardo Castillo por su valiosa amistad y apoyo que me ha brindado en todo momento. Siempre estaré para ti.

**A Dios, el supremo investigador.**

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	10
2.1 Características generales de los HAPs.....	10
2.2 Propiedades físico-químicas de los HAPs.....	11
2.3 Producción de los HAPs.....	13
2.4 Existencia de HAPs en el medio ambiente.....	14
2.5 Toxicidad de HAPs.....	18
2.6 Aspectos generales de la degradación de HAPs.....	21
2.7 Biodegradación de HAPs.....	21
2.8 Remoción de HAPs por <i>Chlorella vulgaris</i> .....	25
2.9 Aspectos generales de las microalgas.....	25
2.9.1 Características de las tres especies de microalgas utilizadas en este estudio.....	28
2.10 Análisis de HAPs.....	30
2.10.1 Extracción en Fase Sólida (EFS).....	31
2.10.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	33
2.10.2.1 Parámetros cromatográficos.....	35
2.10.2.1.1 Coeficiente termodinámico de reparto.....	35
2.10.2.1.2 Factor de capacidad.....	36
2.10.2.1.3 Eficiencia.....	37
2.10.2.1.4 Selectividad.....	38
2.10.2.1.5 Resolución.....	39
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
4. HIPÓTESIS.....	42
5. OBJETIVOS.....	42
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	44
6.1 Material.....	44
6.1.1 Reactivos y disolventes.....	44
6.1.2 Medios de cultivo.....	45
6.1.3 Sistema cromatográfico.....	45

6.1.4 Otros equipos.....	46
6.1.5 Materiales diversos.....	46
6.1.6 Microorganismos.....	47
6.2 Metodología.....	48
6.2.1 Preparación de soluciones estándar.....	48
6.2.2 Manejo de microalgas.....	49
6.2.2.1 Curvas de crecimiento.....	50
6.2.3 Optimización de la separación cromatográfica y detección de HAPs de interés.....	51
6.2.4 Validación del sistema cromatográfico.....	52
6.2.4.1 Linealidad del sistema.....	52
6.2.4.2 Limite de detección (L.D.) y límite de cuantificación (L.C.) .....	52
6.2.4.3 Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)....	53
6.2.5 Linealidad de método.....	53
6.2.6 Acondicionamiento del adsorbente.....	54
6.2.7 Implementación de la extracción por EFS.....	54
6.2.8 Extracción en fase sólida.....	55
6.2.9 Evaluación de interferencias .....	56
6.2.10 Aplicación de los métodos analíticos a bioensayos de exposición .....	57
6.2.11 Comparación de la remoción de HAPs con las diferentes especies.....	58
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	59
7.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección de los HAPs en estudio.....	59
7.2 Validación de sistema.....	61
7.2.1 Linealidad de sistema.....	61
7.2.2 Precisión (repetibilidad y reproducibilidad), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del sistema.	61
7.3 Implementación de método de EFS.....	62

7.4 Linealidad de método.....	63
7.4.1 <i>Chlorella vulgaris</i> CIBNOR.....	63
7.4.2 <i>Chlorella vulgaris</i> LACET.....	64
7.4.3 Precisión (repetibilidad y reproducibilidad), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de método.....	65
7.5 Curvas de crecimiento.....	66
7.6 Evaluación de interferencias en los extractos de <i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i> .....	72
7.7 Aplicación de los métodos analíticos a bioensayos de exposición.....	73
7.7.1 <i>Chlorella vulgaris</i> CIBNOR.....	74
7.7.2 <i>Chlorella vulgaris</i> LACET.....	76
7.8 Comparación de ensayos de exposición .....	77
7.9 Comparación de la remoción de HAPs con las diferentes especies.....	81
8. CONCLUSIONES.....	84
9. PERSPECTIVAS .....	85
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
11. ANEXOS.....	94

## **1. INTRODUCCIÓN**

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

Los HAPs se consideran contaminantes del medio ambiente, tales como: atmósfera, agua, suelo, sedimentos y organismos. Las principales fuentes que producen estos subproductos incluyen emisiones de la quema de carbón y madera, emisiones de automóviles, plantas generadoras de energía y quema de desperdicios.

Una de las principales características de los HAPs es que son altamente lipofílicos y por lo tanto muy solubles en disolventes orgánicos, esto los convierte en contaminantes persistentes en el medio que son depositados y difíciles de degradar.

Diversos estudios demuestran que los 16 HAPs prioritarios señalados por la Agencia Protectora del Medio Ambiente de los Estados Unidos (USEPA) y sus derivados o productos de degradación son potentes carcinógenos y/o mutagénicos, es por eso que el conocimiento de la fuente, la aparición, el transporte y destino de los HAPs en el medio ambiente debe ser ampliamente estudiado, encontrando a través de este estudio una alternativa viable para su remoción del medio ambiente.

El uso de biorremediación para remover productos químicos peligrosos es una alternativa práctica a la remediación tradicional. Se basa en el uso de seres vivos (microorganismos y plantas) capaces de retener o degradar compuestos que provocan desequilibrio en el medio ambiente, ya sea suelo, sedimento o aguas.

El conocimiento actual del destino ambiental de los HAPs indica que la biodegradación es una de las vías más directas para la disminución de estos contaminantes del agua. La biodegradación de sitios contaminados por los HAPs considera la degradación completa de compuestos de uno a tres anillos. El incremento de los HAPs ha llevado al estudio de su remediación por diversos medios, siendo los más eficientes los llevados a cabo por microorganismos como hongos y microalgas. Se ha observado que la degradación de los HAPs por microalgas de agua dulce es un método eficiente y rápido para degradar estos compuestos. Algunos estudios demuestran que la microalga, *Selenastrum capricornutum* remueve y degrada Benzo[a]pireno a metabolitos de tipo dihidrodiol. (1); (2). Los estudios de las microalgas *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* describen la remoción de HAPs ligeros, de menos de 4 anillos aromáticos en su estructura química, como pireno y fluoranteno (3).

Se ha reportado que la microalga *Chlorella vulgaris* tiene la capacidad de remover HAPs de medio acuoso como fluoranteno, pireno y acenafteno hasta en porcentajes de 93% (4).

El presente trabajo tiene como propósito se determinar si dos cepas mexicanas de *Chlorella vulgaris*, provenientes de distintos laboratorios, tienen la capacidad de

remover Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno, HAPs de alto peso molecular. Para esto se realizarán ensayos de exposición de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno en cultivos de *Chlorella vulgaris* a diferentes tiempos. El seguimiento de la desaparición de los HAPs se efectuará cuantificándolos por medio de los métodos de extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Características generales de los HAPs**

En los últimos años, una creciente preocupación acerca de la supervisión de la calidad del medio ambiente se ha reflejado en muchos estudios. Hoy en día, gran preocupación se centra en contaminantes orgánicos tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

Los HAPs son sustancias que se originan a partir de la reacción llamada pirolisis de compuestos orgánicos, bajo condiciones de temperatura que van desde 500 °C a 900 °C. Se originan principalmente por combustión incompleta durante las actividades humanas industriales, tales como los procesos de carbón y petróleo crudo, la combustión de gas natural o de madera, la combustión de la basura, tráfico vehicular, consumo de tabaco, así como procesos naturales, tales como la carbonización. (5)

La Agencia de Protección Ambiental de EUA. (USEPA, por sus siglas en inglés) ha establecido a 16 HAPs como contaminantes prioritarios de control, y de acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, 7 de ellos son potencialmente cancerígenos para los seres humanos.

Los HAPs pueden afectar negativamente no solo la salud humana, sino también los ecosistemas al considerarse compuestos persistentes.

## 2.2 Propiedades físico-químicas de los HAPs

Los HAPs son un grupo de más de cien compuestos orgánicos conocidos por su toxicidad y persistencia ambiental. Se componen principalmente de carbono e hidrógeno unidos en dos o más anillos de benceno. Sus propiedades físicas y químicas están determinadas por su sistema de electrones  $\pi$  conjugados, que dependen del número de anillos aromáticos del compuesto y de su peso molecular. Se clasifican como de peso molecular bajo si tienen dos o tres anillos aromáticos condensados, o un peso molecular alto si tienen cuatro o más anillos de aromáticos condensados.

La solubilidad de los HAPs en el agua depende de la temperatura, pH, la fuerza iónica y los componentes de la matriz donde se encuentran (6); (7). Los HAPs generalmente tienen una solubilidad baja en agua, pero se disuelven fácilmente en grasas y aceites, por lo tanto, tienen una tendencia para acumularse en el tejido graso de los organismos vivos.

Los HAPs tienen presiones de vapor variables (que van desde 10.4 Pa para Naftaleno hasta 0.37 nPa para Dibenzo [h]antraceno). Aquellos HAPs con menores presiones de vapor se asocian con partículas, mientras que aquellos con las mayores presiones de vapor se encuentran como vapor a temperatura ambiente en el aire. En general, la solubilidad de los HAPs disminuye y la hidrofobicidad aumenta con un mayor número de anillos de benceno condensados. Además, la volatilidad disminuye a medida que aumenta el número de anillos aromáticos condensados.

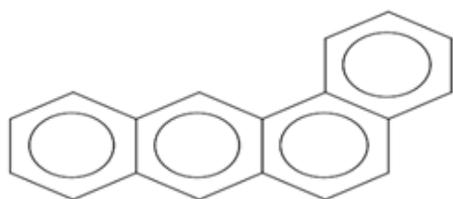
(6)

La tabla 2.1 muestra las propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios según la USEPA, resaltado los HAPs utilizados en la experimentación.

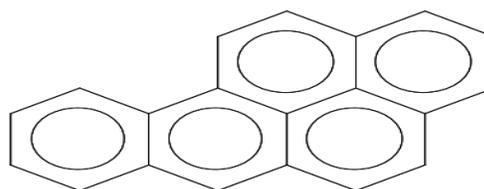
Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios por el departamento de salud y servicios humanos de E.U.A.

HAP	Peso Molecular	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Log K <sub>ow</sub>	Solubilidad en agua 25°C (g/L)	Presión de vapor 25°C (mm/Hg)
Naftaleno	128	80	218	3.3	32	0.0492
Acenafteno	154	95	279	3.98	3.4	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-3</sup>
Acenaftileno	152	78	280	4.07	3.93	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-3</sup>
Fluoreno	166	116	295	4.18	1.98	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-3</sup>
Fenantreno	178	99	336	4.45	1.0-1.3	6.8x10 <sup>-4</sup>
Antraceno	178	218	342	4.45	0.05-0.07	2x10 <sup>-4</sup>
Pireno	202	156	404	4.88	0.14	6.9x10 <sup>-9</sup>
Fluoranteno	202	107	384	4.9	0.26	10 <sup>-5</sup> -10 <sup>-6</sup>
Criseno	228	252	448	5.56	2.8x10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-7</sup> -10 <sup>-11</sup>
Benzo[a]antraceno	228	160	437.6	5.79	9.4x10 <sup>-6</sup>	2.1x10 <sup>-7</sup>
Benzo[a]pireno	252	179.3	312	5.97	1.62x10 <sup>-6</sup>	5.49x10 <sup>-9</sup>
Benzo[b] fluoranteno	252	165	480	6.06	7.6x10 <sup>-4</sup>	2.62x10 <sup>-8</sup>
Benzo[k] fluoranteno	252	215	480	6.84	7.6x10 <sup>-4</sup>	9.7x10 <sup>-10</sup>
Benzo[g,h,i]perileno	276	273	550	6.5	2.68x10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-10</sup>
Indeno[c,d]pireno	276	164	530	6.58	0.062	10 <sup>-10</sup>
1,2:5,6-dibenzoantraceno	278	267	524	6.84	5x10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-10</sup>

Los dos HAPs evaluados en la presente experimentación, BaA y BaP, se consideran de alto peso molecular por tener en su estructura 4 y 5 anillos aromáticos respectivamente. La estructura química de BaA y BaP se presenta en la figura 2.1.



**Benzo(a)antraceno (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>)**



**Benzo(a)pireno (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>)**

Figura 2.1. Estructura química de BaA y BaP, HAPs que se utilizaron en el presente estudio

### 2.3 Producción de los HAPs

Los HAPs son omnipresentes en el medio ambiente, y la población en general está expuesta a niveles de contaminación medibles (8). Los HAPs son más comúnmente generados por actividades que implican procesos de combustión incompleta de materiales orgánicos durante las actividades humanas por ejemplo, descarga industrial, transporte, cocción, quema de biomasa, combustión de carbón, gasolina, gas y madera, y la incineración de desechos (9), escape de motor de automóviles (especialmente diesel), y otras fuentes, tales como la cocina y el humo de tabaco (10). La comida es una fuente importante de exposición a los HAPs para la población general (11). El contacto de la piel con suelos contaminados por HAPs y el uso de productos farmacéuticos aplicados por vía dérmica, productos a base de alquitrán de hulla tales como el material de recubrimiento de tuberías de agua

potable, también han sido identificados como fuentes de la exposición de la población en general (12); (13).

#### **2.4 Existencia de HAPs en el medio ambiente**

Los HAPs se liberan en la atmósfera principalmente a través de emisiones gaseosas, pero también pueden ser descargados de los compartimentos del suelo y del agua mediante evaporación o re-suspensión de partículas. Una vez en la atmósfera, los HAPs son transportados hacia el agua, tierra y vegetación. Por otro lado, los HAPs pueden llegar a los sistemas acuáticos mediante filtraciones naturales de aceite, por deposición atmosférica o por descargas accidentales o intencionales principalmente de la extracción, transporte y refinación del petróleo.

Los HAPs en agua o sedimentos pueden unirse a partículas suspendidas, o bioacumularse en los organismos acuáticos a través de la cadena alimenticia. Los que se encuentran en la superficie están sujetos a evaporación y re-suspensión de las partículas con las que están asociadas. En el suelo, los HAPs pueden volatilizarse, solubilizarse o adsorberse sobre materia orgánica. En la fase líquida, los HAPs pueden entrar en el agua subterránea y ser transportados hacia los acuíferos convirtiéndose en parte de los sistemas acuáticos. Una vez que los HAPs están en agua, suelo o atmósfera, se bioacumulan en plantas y animales a través de la cadena alimenticia. (14); (7).

Según el Inventario de Emisiones Tóxicas (TRI por sus siglas en inglés) de la Agencia de Protección Ambiental de EUA. (USEPA), las emisiones industriales de HAPs en el medio ambiente alcanzó su punto máximo en el año 2000, cuando más

de 4.9 millones de libras se emitieron, en su mayoría a los vertederos *in situ* y *ex situ* y al aire. Desde el año 2002 las emisiones son relativamente más bajas y estables. En 2008, 1.192 instalaciones industriales emitieron 1.2 millones de libras de HAPs al aire, al agua o vertederos (en su mayoría al aire o vertederos) (15).

Las concentraciones medias de HAPs medidos individualmente en el aire de un ambiente urbano, por lo general van de 1 a 30 ng/m<sup>3</sup>. Las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire durante el invierno, cuando la calefacción residencial es una fuente importante, generalmente son por lo menos una orden de magnitud mayor que los de verano (13). El aire en áreas cercanas a fuentes tales como la circulación de vehículos, también tienen mayores concentraciones de HAPs.

Para las personas que fuman, el humo del tabaco es una fuente importante de exposición a HAPs. Las concentraciones totales de HAPs en humo de cigarrillo fueron de 1 a 1.6 ng / cigarrillo. El fumador pasivo está expuesto a una concentración mayor a tres veces que el fumador activo ya que las concentraciones de Benzo[a]pireno en el humo de la corriente secundaria variaron de 52-95 ng / cigarrillo.

BaP ha sido detectado en una diversidad de matrices acuosas tales como la superficie de aguas, aguas marinas, aguas subterráneas, agua potable, así como en los sedimentos. Los límites máximos de 0.010 µg/L de aguas potables y 0.1 µg/L para superficies de agua se han establecido para el BaP. (16)

Los HAPs presentes en el agua pueden proceder de la escorrentía superficial (erosión de pavimentos de asfalto). Las descargas industriales también pueden contribuir a la aparición de HAPs en aguas superficiales. Sin embargo, las concentraciones de HAPs en el agua, por lo general, son muy bajas debido a su baja solubilidad. Las concentraciones en agua superficial no suelen ser mayores de 50 ng / L. Las concentraciones de HAPs es más alta en el agua de lluvia que en las aguas superficiales (100 a 200 ng / L, algunas muestras superiores a 1.000 ng / L). Esto se debe a que los HAPs tienen muy alto coeficiente de reparto octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ), se unen fuertemente a las partículas del suelo y son relativamente inmóviles del suelo. Las concentraciones en el agua subterránea y el agua potable por lo general son muy bajas (0.02-1.8 ng / L), y las concentraciones de HAPs en sedimentos pueden ser muy alta, pueden llegar hasta varios miles de microgramos por kilogramo.

Las estimaciones de la ingesta diaria de HAPs en los alimentos varían ampliamente, desde unos pocos nanogramos a unos pocos microgramos por persona. Las fuentes de HAPs en la dieta incluyen asados a la plancha, a la parrilla y carnes ahumadas; asado al horno y alimentos fritos (elaborados a altas temperaturas); panes, cereales y granos (secados a la llama); y vegetales cultivados en suelos contaminados.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) y el Comité sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos determinó una ingesta diaria significativa de Benzo[a]pireno de 4ng/ kg de peso corporal y una ingesta diaria total de HAPs de 10 ng / kg (17). Entre los alimentos comunes, los más altos niveles de HAP fueron encontrados en la parrilla o en barbacoa de carne,

pollo con piel y las hamburguesas, especialmente cuando están "bien cocidas" o "muy bien cocidas" (18). Debido a que los HAPs se forman en la superficie de la carne, en lugar de en el interior, los alimentos que se cocinan a la misma temperatura sin estar expuestos a las llamas no muestran niveles significativos de HAPs. Los HAPs también son introducidos por ciertos métodos de conservación de carne y otros productos alimenticios. En los alimentos ahumados en los hornos tradicionales, la concentración promedio fue de 1.2 mg/kg para el Benzo[a]pireno y 9 mg/kg para el total de HAPs, en comparación con 0.1 g/kg de Benzo[a]pireno y 4.5 mg/kg para los HAPs totales en alimentos tratados en hornos modernos (18).

La acumulación de HAPs en los alimentos de origen animal, especialmente el ganado, se debe principalmente al consumo de alimento seco contaminado. Los alimentos no elaborados, tales como verduras, frutas, aceites vegetales, productos lácteos, pescados y mariscos pueden estar contaminados con HAPs por la deposición de partículas y vapores de la atmósfera y la absorción del suelo, el agua y los sedimentos. Los niveles de HAPs son bajos en cereales y legumbres, pero las técnicas de secado para su conservación, tales como combustión y la calefacción de gas, aumentan las concentraciones de HAPs en estos alimentos. Huevos y productos lácteos como el queso, la leche y la mantequilla contienen bajos niveles de HAPs. El consumo de mariscos, crustáceos, y peces especialmente los que se alimentan en el fondo de los océanos, pueden contribuir considerablemente a la cantidad de HAPs en la dieta (19).

En México existe regulación sobre la presencia de HAPs en el suelo. En específico la NOM 138-SEMARNAT/SSA1-2012 (20) presenta los límites permisibles para algunos hidrocarburos específicos en suelos y el método analítico para su cuantificación. La tabla 2.2 muestra estas especificaciones.

Tabla 2.2.- Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo

HIDROCARBUROS ESPECÍFICOS	USO DE SUELO PREDOMINANTE (mg/kg BASE SECA)			MÉTODO ANALÍTICO
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial	
Benzo[a]pireno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008
Dibenzo[a,h]antraceno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008
Benzo[ a ]antraceno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008
Benzo[b]fluoranteno	2	2	10	NMX-AA-146-SCFI-2008
Benzo[k]fluoranteno	8	8	80	NMX-AA-146-SCFI-2008

## 2.5 Toxicidad de HAPs

En 1775, un médico inglés, Sir Percival Pott, describió por primera vez un cáncer de origen profesional. Asoció el cáncer de escroto de los deshollinadores con su prolongada exposición a alquitrán y hollín, en condiciones deficientes de higiene personal. En el decenio de 1930 se describió el cáncer de pulmón en los trabajadores de la industria del acero y del coque y en 1933 se demostró que el BaP, presente en el alquitrán de hulla era cancerígeno. Los estudios epidemiológicos indican una mayor frecuencia de cáncer de pulmón en los trabajadores de las industrias de coque, aluminio y acero (21); (22). No todos los

HAPs han mostrado poseer efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutágenos y muchas veces el efecto se atribuye a la presencia conjunta de más de un compuesto de la familia y de algunos de sus derivados, principalmente los nitroderivados como se muestra en la tabla 2.3.

Los efectos tóxicos de algunos HAPs sobre la piel están asociados con dermatitis aguda y crónica con síntomas de quemazón, picor y edema, que son más pronunciados en las regiones de la piel expuesta. La exposición prolongada causa pigmentación en las zonas de la piel expuesta, con cornificación de las capas superficiales y telangioectasis. También se puede observar irritación de las vías aéreas superiores con bronquitis y tos crónica. En los ojos producen lagrimeo, fotofobia, edema de párpados e hiperemia conjuntival (21)

Tabla 2.3. Datos relativos a los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos HAPs (22).

<i>PAHs</i>	<i>Carcinogenicidad</i>	<i>Genotoxicidad</i>	<i>Mutagenicidad</i>
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Pireno	N	L	+
Benzofluorenos	I	I	?
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Benzo [e]pireno	I	L	+
Benzo[a]pireno	S	S	+
Dibenz[a]antraceno	S	S	+
Benzo[ghi]perileno	I	I	+
Dibenzopirenos	S	I	+
2-Nitronaftaleno	N	L	-
1-Nitropireno	I	S	+

(S= suficiente; I= insuficiente; N= no carcinogénico; L= limitados.)  
 Mutagenicidad (Test de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconcluso).

Actualmente se admite que los HAPs son previamente activados en el organismo antes de ejercer su efecto como disruptor endocrino o cancerígeno/mutágeno. Tras la exposición prolongada pueden producir cáncer cutáneo (escroto y cara), cáncer broncogénico en vías respiratorias, cáncer de vejiga; en el sistema hematopoyético pueden originar leucemia y linfoma (22). En la especie humana la vía respiratoria es considerada la más importante, particularmente para individuos ocupacionalmente expuestos, de igual manera la vía dérmica puede ser tanto o más importante. Muchas de estas sustancias también tienen efecto negativo sobre el sistema inmunológico, característica que parece estar asociada a la capacidad carcinogénica (23). Un esquema propuesto para la *carcinogenicidad* por exposición ambiental considera las siguientes etapas: exposición, activación metabólica, formación de aductos entre HAPs y ADN, mutaciones en genes críticos como, por ejemplo, el p53 (gen represor de tumores) y sucesión de mutaciones en otros genes. Es importante recalcar que la aparición del cáncer es un proceso que involucra varias etapas, siendo también influenciado por susceptibilidad individual y otros factores, tales como la edad, sexo, etnia, estado de salud, nutrición y polimorfismo genético. En general, una mayor concentración de aductos HAPs-ADN se encuentra en personas ocupacionalmente expuestas. En relación al efecto de los HAPs como posibles disruptores endocrinos, muchos estudios indican que diferentes compuestos químicos presentes en el ambiente, además de los HAPs, como los pesticidas, dioxinas, furanos y bifenilos policlorados, presentan actividad estrogénica *in vitro*. De cualquier manera, la potencia de estos compuestos es muy baja comparada con estrógenos endógenos y además no está claro si los humanos ante una mezcla química ambiental reciben un efecto estrogénico neto (24).

## **2.6 Aspectos generales de la degradación de HAPs**

Teniendo en cuenta los riesgos de los HAPs para la salud pública, se han desarrollado varias metodologías para la eliminación parcial o total de los HAPs de matrices ambientales.

Actualmente, los organismos gubernamentales, científicos e ingenieros han centrado sus esfuerzos en identificar mejores métodos para eliminar, transformar o aislar estos contaminantes a través de una variedad de procesos físicos, químicos y biológicos. Algunos autores sugieren la extracción por volatilización, la oxidación (25), adsorción, ultrasonido (26), electro ósmosis, electrodiálisis (27), polímeros conductores (28), adsorción con carbón activado, fotodegradación (29) y la biodegradación.

La mayoría de estas técnicas implican costosas manipulaciones del contaminante, sobre todo los procesos químicos, que transfieren el problema desde un sitio hasta otro. Sin embargo, la biodegradación es uno de los procesos más importantes que pueden degradar HAPs. Por lo tanto, la biorremediación puede ser una alternativa importante para transformar los HAPs en formas no peligrosas con menos utilización de solventes químicos, energía y tiempo (30).

## **2.7 Biorremediación de HAPs**

La biorremediación es el proceso que utiliza microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural.

La biorremediación es la tecnología basada en la biodegradación o transformación microbiana de contaminantes para eliminarlos o transformarlos en otros productos menos peligrosos para el medio ambiente y la salud humana. Idealmente los productos son convertidos en CO<sub>2</sub>, agua, sales inorgánicas y/o biomasa, pero a menudo una parte del contaminante se puede acumular como productos de transformación parcial.

La biodegradación es un proceso que se produce de forma natural en el medio ambiente y la biorremediación intenta potenciarlo. Se trata de una tecnología económica, aplicable en suelo y aguas, y que no requiere grandes infraestructuras. En el sentido más amplio, la biorremediación incluye el uso de enzimas, estimulantes del crecimiento, bacterias, hongos o plantas para degradar, transformar, secuestrar o movilizar contaminantes orgánicos, inorgánicos, o metales en el suelo, agua o aire (31).

El grado y la tasa de biodegradación de los HAPs dependen de muchos factores que incluyen: la estructura química del compuesto, pH, temperatura, oxígeno, la accesibilidad de nutrientes y la adaptación de la enzima de degradación microbiana. Por otra parte, el microorganismo evaluado también hace una diferencia en el mecanismo de degradación de varios HAPs (32).

Sin embargo, la mayoría de los estudios se han centrado principalmente en bacterias y hongos y se ha prestado poca atención al papel de las microalgas, a pesar de que las algas se han aplicado en diversos procesos de tratamiento de aguas residuales, eliminación de metales y contaminantes orgánicos demostrando ser capaces de eliminar contaminantes por crecimiento autotrófico (33).

La adsorción inicial de los contaminantes por las microalgas puede ser un proceso físico-químico pasivo rápido y también puede ser logrado tanto por células muertas como por células vivas (34). Los compuestos orgánicos podrían ser acumulados y transformados dentro de las células. Se informó que la eficiencia de estos procesos era específica de una especie, la disponibilidad y composición de los materiales de las paredes celulares y sus sistemas enzimáticos (35).

Los microorganismos generalmente eliminan contaminantes a través de la adsorción físico-química rápida y pasiva en las paredes celulares o superficie de sus células (biosorción). Al igual que en el fitoplancton y plantas superiores, los contaminantes se acumulan dentro de las células mediante absorción activa y son degradados a través de una serie de acciones enzimáticas. La eficiencia de eliminación a menudo se ve afectada por la concentración de microalgas, mayor biomasa proporciona más superficie celular, mayores volúmenes, y enzimas para la adsorción, la absorción, y la degradación del contaminante. Sin embargo, si la biomasa es demasiado alta, las células tienden a agregarse, lo que lleva a una reducción en el área de adsorción.

Algunos estudios han demostrado que el alga verde, *Selenastrum capricornutum*, bajo condiciones fotoautótroficas de crecimiento metaboliza Benzo[a]pireno predominantemente a cis - 11,12 - dihidroxi - 11,12 -dihidrobenzo[a]pireno. Otros cis-dihidrodióles menores también se detectan. Estos productos de degradación se presentan en la figura 2.2 (1); (2).

La formación de *cis*-dihidrodiol sugiere una reacción catalizada por dioxigenasa, similar a las que se encuentran en procariontas heterotróficos, en lugar de una reacción catalizada por la monooxigenasa, tal como se presenta en cianobacterias, hongos y mamíferos (36).

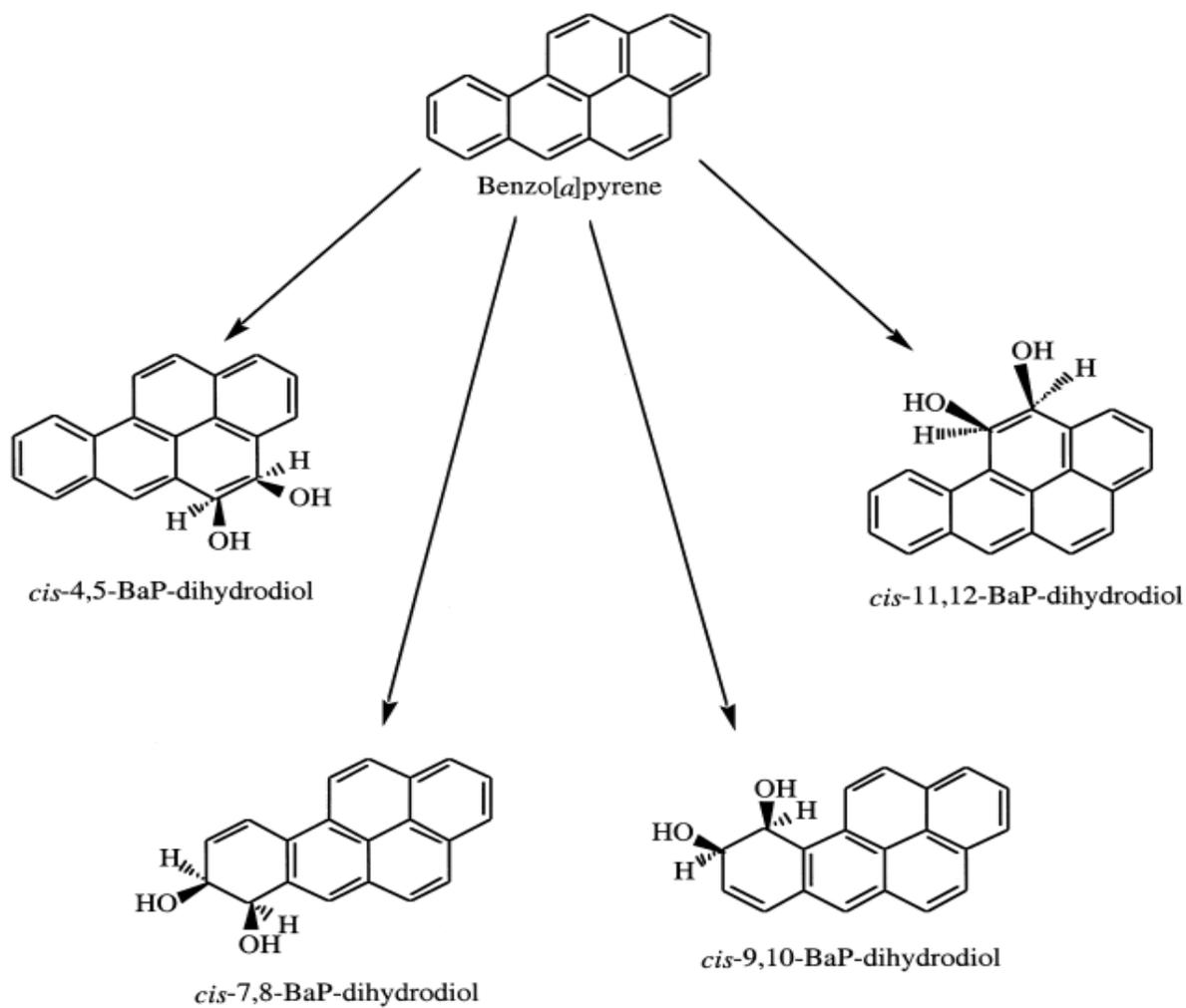


Figura 2.2. Productos de degradación de BaP por medio de biodegradación de microalgas (37).

## **2.8 Remoción de HAPs por *Chlorella vulgaris***

Se han reportado estudios donde la microalga *Chlorella vulgaris* tiene la capacidad para remover HAPs de medio acuoso. La remoción de HAPs por medio de *C. vulgaris*, ha quedado demostrada al remover HAPs como fluoranteno, pireno, acenafteno y benzo[b,k]fluoranteno hasta en porcentajes de 93%. La remoción de HAPs aumenta cuando se hace la exposición en cultivos de algas muertas, removiendo hasta el 100% de los HAPs estudiados en un periodo de 6 días (3); (38).

Un estudio realizado en exposición de HAPs a cultivos de *C. vulgaris*, demuestra la degradación de acenafteno y fluoranteno mediante la detección y evaluación de las enzimas degradativas que producen, aunque no se detectaron los metabolitos generados (4).

Aun no se ha demostrado la remoción y/o degradación de HAPs de alto peso molecular como BaA y BaP, ni la formación de metabolitos por parte de la microalga *C. vulgaris*.

## **2.9 Aspectos generales de las microalgas**

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que pueden crecer tanto en ambientes marinos como de agua dulce. Su proceso fotosintético es similar al de las plantas.

Las algas presentan mayor diversidad vegetativa, reproductiva y de hábitat en relación al grupo de las plantas. Su clasificación está determinada por ciertos

caracteres estables como: naturaleza de los pigmentos fotosintéticos, productos metabólicos de reserva, naturaleza química de la pared celular, número y posición de flagelos, tipos de reproducción, ciclos de vida y hábitat. La combinación de varios caracteres delimita las divisiones y clases de las algas, pero estas clasificaciones tienen un carácter subjetivo y temporal, según el énfasis que da cada investigador a un carácter en particular.

La clasificación que se basa en los patrones de pigmentación fotosintética presente se muestra en la Tabla 2.4:

Tabla 2.4. Taxonomía de microalgas basado en pigmentos fotosintéticos presentes

<b>División</b>	<b>Principal pigmento fotosintético</b>
Cyanophyta	Clorofila a, ficocianobilina, ficoeritrobilina
Rhodophyta	Clorofila a, ficoeritrobilina
Chlorophyta	Clorofila a y b
Chromophyta	Clorofila a, c1, c2, fucoxantina
Haptophyta	Clorofila a, c2, fucoxantina
Dinophyta	Clorofila a, c2, peridina
Cryptophyta	Clorofila a, c2, ficocianobilina
Euglenophyta	Clorofila a y b

Las microalgas son organismos no visibles sin un microscopio, muchos de los cuales son unicelulares, con tamaños entre 3-10  $\mu\text{m}$ . El crecimiento de las microalgas requiere elementos regulados como: nutrientes, fuente de nitrógeno, fósforo, dióxido de carbono, así como energía luminosa.

Su proceso fotosintético es similar al de las plantas. Sin embargo, son más eficientes que estas últimas en la utilización de la energía solar para la producción de biomasa (siendo responsable de una fracción significativa de la producción mundial de oxígeno). Las características propias que las identifican como grupo son:

- 1) Se consideran plantas talófitas (no poseen raíz, tallo y hojas)
- 2) No desarrollan embrión
- 3) Son organismos autótrofos (tienen la capacidad de sintetizar su propio alimento)

Son fundamentalmente acuáticas y pueden vivir en agua dulce como en agua de mar, suelo, rocas, cortezas de árboles e incluso la nieve (32).

Algunas cepas de microalgas tienen altas tasas de crecimiento (la concentración de biomasa puede duplicarse en cuestión de horas), esto hace que tengan un potencial económico sobresaliente (39). Considerando sus características, las microalgas están asociadas con aplicaciones ambientales que han sido intensamente estudiadas en los últimos años:

- (1) captura de  $\text{CO}_2$  de los gases de combustión.
- (2) producción de bioenergía.
- (3) eliminación de nutrientes de aguas residuales.

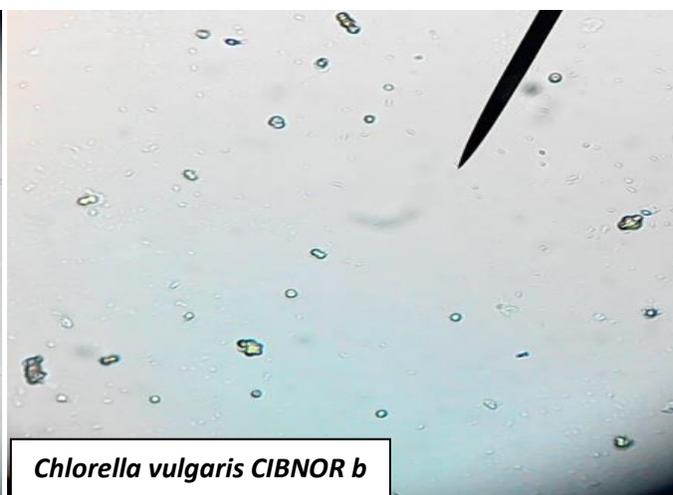
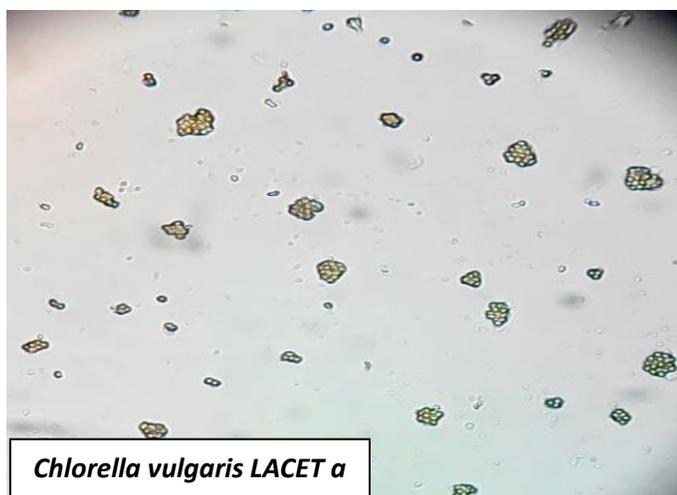
(4) se ha demostrado que las algunas algas eucariotas y cianobacterias, tiene la capacidad de degradar, mediante oxidación, algunos HAPs, como el BaP y BaA hasta en un 85% del medio. (40); (41); (42); (43).

### **2.9.1 Características de las tres especies de microalgas utilizadas en este estudio**

En el presente trabajo se estudió la remoción de BaA y BaP con microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* provenientes de dos laboratorios productores. *C. vulgaris* tiene la capacidad de crecer en agua dulce y agua de mar. La cepa de *C. vulgaris* LACET proviene de la reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de la UNAM en Ciudad Universitaria y fue aislada por el Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía de la Facultad de Ciencias UNAM. *C. vulgaris* CIBNOR es una cepa dulceacuicola de origen alóctono e inoculada por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en Baja California Sur. Para comparar su comportamiento, se utilizaron otras dos microalgas que previamente fueron manejadas en el grupo de investigación y que se demostró que degradan a los HAPs. En la tabla 2.5 se presentan las características principales de cada una de estas especies.

Tabla 2.5. Características de las tres especies de microalgas utilizadas en este estudio (44).

Género y especie de alga	División	Medio de cultivo	Tamaño de célula (μm)	Área de superficie (S)(μm <sup>2</sup> )	Volumen (V) (μm <sup>3</sup> )	S/V radio	Forma de célula
<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorophyta	Basal Bold	3-6	89.9	80.1	1.10	Esférica
<i>Scenedesmus acutus</i>	Chlorophyta	Bristol	30x70	258.5	290.8	0.89	Colonias de 4 a 8 células
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Chlorophyta	Bristol	2x10	126.5	69.6	1.82	Espiral



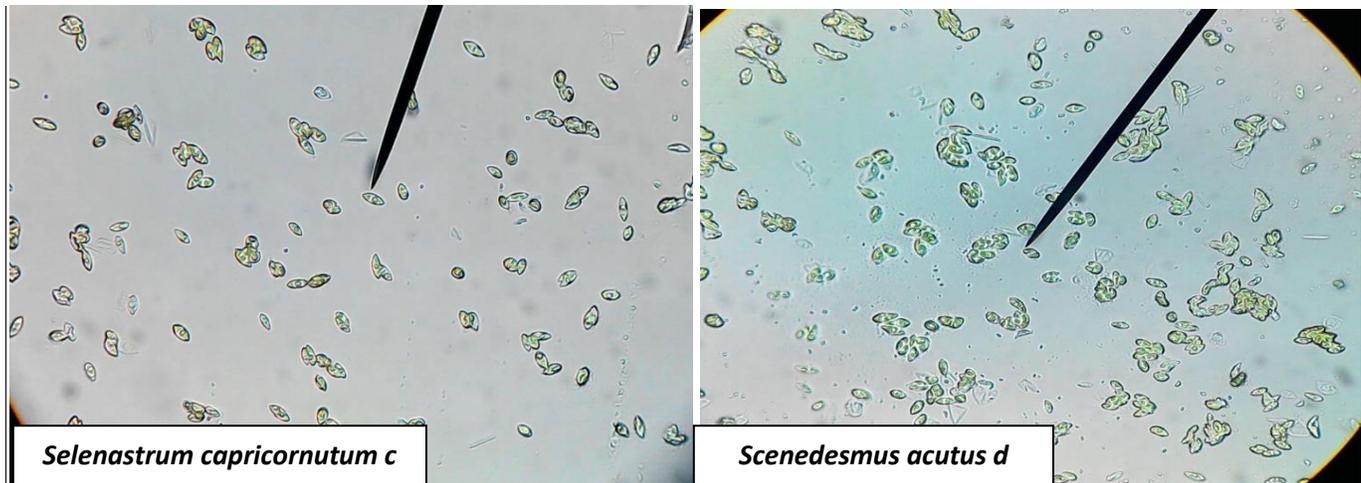


Figura 2.3. Imágenes de las especies de microalgas utilizadas en el estudio. a) *Chlorella vulgaris* LACET b) *Chlorella vulgaris* CIBNOR c) *Selenastrum capricornutum* d) *Scenedesmus acutus*. Objetivo 40x. Imágenes propias

## 2.10 Análisis de HAPs

En la actualidad existen métodos para el análisis de HAPs en diferentes tipos de muestras ambientales como el agua y lodo (31). Los HAPs generalmente son analizados por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas como detector o por cromatografía de líquidos acoplada con detector de UV-dispositivo de diodos y/o fluorescencia; sin embargo, la confirmación de los HAPs en muestras ambientales suele ser difícil. Por ello se han desarrollado métodos de extracción para esta tarea, buscando la separación selectiva de estos compuestos presentes en la muestra. La técnica de extracción para el aislamiento de HAPs en muestras acuosas utilizada en el presente trabajo se describe a continuación.

### **2.10.1 Extracción en fase sólida (EFS)**

El uso de EFS es más común en los laboratorios analíticos para superar los inconvenientes de la extracción líquido-líquido (ELL). En EFS, el reparto de los analitos ocurre entre un sólido y una fase líquida (por lo que a veces es denominada extracción líquido-sólido) y por lo tanto posee mecanismos de retención análogos a la cromatografía de líquidos. Las muestras son expuestas a una fase estacionaria o adsorbente para la retención de los analitos de interés con el fin de aumentar su concentración o eliminar las interferencias de la matriz. Como lo muestra la Figura 2.4 la EFS consta de cuatro pasos fundamentales:

1. Acondicionamiento. La activación del adsorbente y de los grupos funcionales se consigue al pasar un volumen de solvente o mezcla de solventes apropiado a través de la columna. Los frites de la columna se solvatan convenientemente. Para activar adsorbentes hidrofóbicos se usa generalmente metanol o acetonitrilo, mientras que para los hidrofílicos se usa hexano o cloruro de metileno. Se recomienda usar de 2 a 4 volúmenes de lecho.

2. Aplicación de la muestra. Se aplica la muestra en la parte superior del lecho de adsorbente. Los contaminantes de matriz pueden pasar por la columna sin ser retenidos, y otros componentes de la matriz pueden retenerse más o menos fuertemente en la superficie del adsorbente. Para obtener la máxima eficacia se debe controlar el caudal de la muestra. Si se desea incrementar el caudal de una muestra viscosa se pueden usar adsorbentes de 90 o 140mm. La capacidad de intercambio y la selectividad no se ven afectadas (conviene analizar la fracción no retenida para comprobar que todos los compuestos de interés han sido retenidos).

3. Lavado de interferencias. El lavado permite la eliminación de cualquier compuesto que pueda interferir en el análisis manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente. Se pueden usar solventes o mezcla de solventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado.

4. Elución. Se eluye con un solvente adecuado por la columna para eliminar la interacción analito-solvente y eluir el 100% de los compuestos de interés. El solvente adecuado ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, dejándolas en el lecho de adsorbente. El volumen de elución ha de ser el menor posible para mantener alto el factor de concentración.

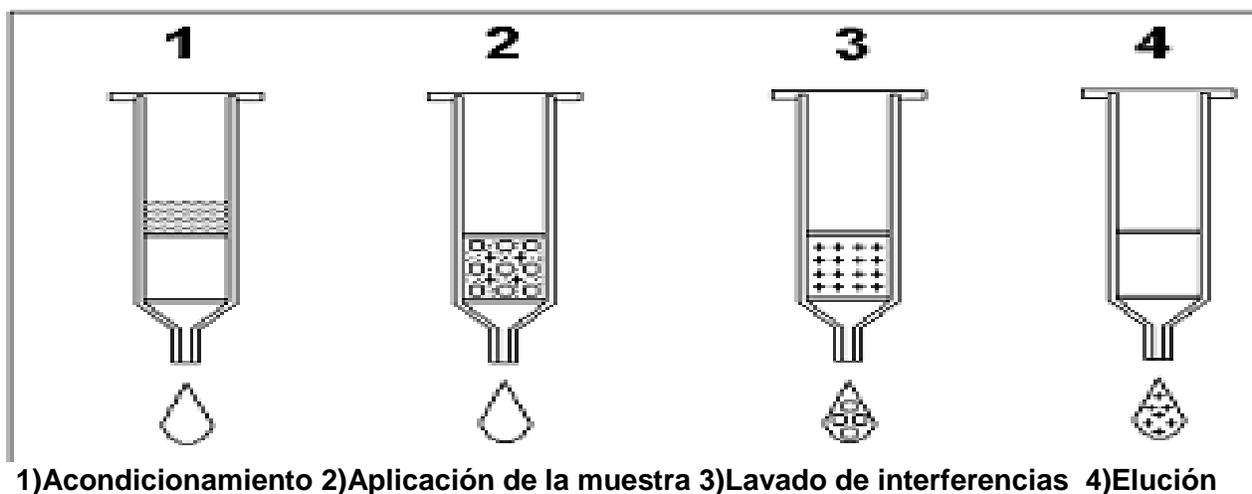


Figura. 2.4 Metodología general de la extracción en fase sólida.

La EFS, considerándose como una cromatografía de líquidos simple puede clasificarse en fase inversa (FR- EFS), fase normal (FN- EFS) e intercambio de iones (II- EFS). La elección del tipo de EFS es el primer paso en el desarrollo del método y se determina basándose en las características del analito y de la matriz; en particular, polaridad, pKa y solubilidad. En FN- EFS, el mecanismo de retención

se basa en interacciones polares: dipolo-dipolo, enlace de hidrógeno, interacciones  $\pi-\pi$  y dipolo-dipolo (45).

Estos tipos de interacciones pueden clasificarse como de baja a moderada. Los adsorbentes inorgánicos más comunes para EFS de fase normal son gel de sílice, alúmina, silicato de magnesio y tierra de diatomeas. Estos adsorbentes son eficientes en la extracción de compuestos de polaridad moderada a alta de matrices no polares.

Para RP-SPE, el reparto se produce a través de interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals o fuerzas de dispersión. Esto es análogo al mecanismo de ELL, cuando una fase orgánica o un grupo enlazado apolar están unidos a una partícula de sílice (como en una cromatografía de fase inversa). Sin embargo, se debe considerar que algunos polímeros son capaces de provocar interacciones  $\pi-\pi$  con compuestos aromáticos. Los adsorbentes de fase inversa podrían ser más familiares basándose en las fases estacionarias comúnmente usadas para el análisis HPLC: C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, Fenilo, CN y fases poliméricas mezcladas. Estas fases son las más eficientes para la extracción de compuestos de polaridad baja a moderada o analitos hidrofóbicos de matrices acuosas o tamponadas (46).

### **2.10.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución**

La Cromatografía de líquidos de alta resolución (**CLAR**) es una técnica empleada para separar los constituyentes de una mezcla. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de distribución de los compuestos presentes entre las dos fases no miscibles, una llamada fase estacionaria (sólida) que se encuentra inmovilizada

en la columna o fijada en un soporte y la fase móvil (líquida). La muestra se introduce en la fase móvil y es transportada a lo largo de la columna que contiene la fase estacionaria; los solutos de la muestra experimentan interacciones repetidas entre ambas fases, el reparto se lleva a cabo por la diferencia entre las propiedades fisicoquímicas de los componentes de la muestra. La CLAR es ampliamente utilizada por su sensibilidad y fácil adaptación en determinación cuantitativas. Esta técnica no está limitada por la volatilidad o estabilidad de un producto termolábil y es capaz de separar compuestos iónicos, materiales poliméricos y compuestos polifuncionales de alta masa molar. (47)

- Cromatografía de fase normal

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

- Cromatografía de fase reversa

Una mezcla de agua/solvente orgánico es comúnmente usada como fase móvil, y un sólido de superficie altamente no polar es empleado como fase estacionaria. La última es usualmente un empaque de alcanos ligados a la sílice, con grupos alquilo de 8 o 18 carbonos. El disolvente de la fase móvil traslada al soluto hacia la zona derivatizada que previamente se ha enlazado en la superficie del soporte. Los solutos no polares interactúan con la fase estacionaria y son eluidos en la fase

móvil, los grupos polares de los solutos interactúan con disolventes polares como el agua. La retención hidrofóbica de la columna disminuye al agregar un disolvente orgánico miscible en agua.

### **2.10.2.1 Parámetros cromatográficos**

Un parámetro es una cantidad que puede tener distintos valores y caracteriza un proceso, una operación o un resultado. La parametrización de datos en cromatografía, como en otros métodos facilita la tabulación y la comunicación de dichos datos. Se puede parametrizar la forma, la posición y la resolución de las bandas de una cromatografía. Estos pueden correlacionarse satisfactoriamente con descripciones de los procesos moleculares que tienen lugar durante la separación.

#### **2.10.2.1.1 Coeficiente termodinámico de reparto:**

El comportamiento de retención de un compuesto refleja la distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. La concentración en cada fase está dada por el coeficiente termodinámico de reparto ( $K$ ). Cuando  $K=1$ , el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases

$$k = C_E / C_M$$

$C_E$  y  $C_M$  son las concentraciones en la fase estacionaria y en la fase móvil, respectivamente.

### 2.10.2.1.2 Factor de capacidad:

Relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna, es decir, es la relación del tiempo transcurrido en la fase estacionaria contra el tiempo transcurrido en la fase móvil. Matemáticamente se define como el cociente de los moles de un soluto en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil:

$$k' = C_E V_E / C_M V_M$$

$C_E$  y  $C_M$  son las concentraciones en la fase estacionaria y en la fase móvil, respectivamente.

$V_E$  y  $V_M$  son los volúmenes en la fase estacionaria y en la fase móvil, respectivamente.

El factor de capacidad puede ser calculado para cada pico usando la siguiente ecuación:

$$k' = t_R - t_0 / t_0$$

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención de la muestra y  $t_0$  es el tiempo de retención de un soluto que no interactúa con la fase estacionaria, también conocido como tiempo muerto. El tiempo de retención transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el compuesto alcanza el detector. El primer componente eluido deberá tener un tiempo de retención del doble del tiempo muerto. Dicho de otra manera, la razón de reparto es el tiempo adicional que un soluto requiere para eluir, en comparación con un soluto no retenido, para el cual  $k' = 0$ .

### **2.10.2.1.3 Eficiencia:**

Una característica importante de un sistema cromatográfico es su eficiencia, expresada como una cantidad adimensional llamada número de platos teóricos (N). El término plato teórico proviene de un estudio teórico en el que se trató a una columna como si estuviera constituida de numerosas, discretas y contiguas capas denominadas platos teóricos. Refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna. Entre más grande sea el número de platos teóricos de una columna, mayor será su eficiencia y por tanto se podrá lograr una mayor resolución. La eficiencia depende principalmente de las propiedades físicas de la matriz y de la columna. La eficiencia mejora mucho al disminuir el diámetro de la columna, al aumentar su longitud y al reducir el tamaño de partícula del empaque o al bajar la viscosidad del disolvente.

La eficiencia de una columna puede determinarse a partir de un pico del cromatograma mediante la siguiente ecuación:

$$N=5.54 (t_R / W_{1/2})^2$$

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención del pico y  $W_{1/2}$  es ancho del pico medido a la mitad de la altura del mismo.

El número de platos teóricos algunas veces es reportado como platos por metro de columna. En esta expresión, la altura equivalente a un plato teórico H está dada por la ecuación:

$$H = L / N$$

Donde L es longitud de columna y N es el número de platos teóricos

#### **2.10.2.1.4 Selectividad:**

Se refiere a la capacidad del método para distinguir las propiedades de los componentes a nivel molecular y que permite diferenciarlos. La selectividad física es la que predomina en cromatografía de fase reversa porque en este método los componentes son separados de acuerdo a sus polaridades. Esto significa que la cromatografía de fase reversa puede usarse para separar grupos de compuestos de acuerdo a su estructura química. Las diferencias en las estructuras moleculares de dos compuestos resaltan en su adsorción y por lo tanto permite su separación por cromatografía de fase reversa.

La selectividad ( $\alpha$ ) es equivalente a la retención relativa de los picos de la muestra y está dada por la siguiente expresión:

$$\alpha = k_2' / k_1' = V_2 / V_1$$

Donde  $V_1$  y  $V_2$  son los volúmenes de retención,  $k_1'$  y  $k_2'$  son los factores de capacidad para los picos 1 y 2 respectivamente.

### **2.10.2.1.5 Resolución:**

La resolución de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos solutos. Los parámetros que contribuyen en la resolución ( $R_s$ ) de los picos son la selectividad ( $\alpha$ ), la eficiencia o número de platos teóricos ( $N$ ) y el factor de retención  $k'$  (48). Estos parámetros se relacionan en una ecuación de la siguiente manera:

$$R_s = \frac{1}{4} (\alpha - 1) \sqrt{N} \left[ \frac{k'}{1 + k'} \right]$$

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El crecimiento de la población y el avance de las actividades industriales a partir del siglo XIX trajeron serios problemas de contaminación ambiental. Desde entonces, los países generan más desperdicios, muchos de ellos no biodegradables o que se degradan muy lentamente en la naturaleza, lo que provoca su acumulación en el ambiente sin tener un destino seguro o un tratamiento adecuado. De este modo, en lugares donde no existe control sobre la emisión y el tratamiento de los desechos, es factible encontrar una amplia gama de contaminantes.

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son compuestos de actividad tóxica, mutagénica y/o carcinógena muy comunes en el medio ambiente. La Agencia de Protección Ambiental de EE.UU (EPA por sus siglas en inglés) especifica a 16 HAPs como los principales contaminantes dentro de los cuales se encuentran en BaA y el BaP.

Ciertamente los HAPs se han encontrado contaminando los medios acuosos naturales. La EPA contempla solo el Benzo[a]pireno en su lista de contaminantes regulados. Para este compuesto se permite un nivel máximo de contaminante (MCL) de 0.0002 mg/L en muestras de agua potable. En efecto, la cantidad de HAPs cuantificados en aguas residuales domésticas varían de 0.005 a 14.3 mg/ L y en aguas residuales urbanas de 2.7 a 26.4 mg/ L (49). Un predominio de compuestos de bajo peso molecular se ha observado en las aguas residuales urbanas, donde el fenantreno (Phe), naftaleno (Nap), fluoranteno (Ft) y pireno (Pyr) son los compuestos más abundantes. Las aguas y sedimentos que son utilizados para las actividades humanas son altamente contaminados por estos compuestos, por lo

tanto, es urgente utilizar métodos viables, eficientes (a diferencia de métodos químicos y físicos que presentan un mayor costo y un impacto negativo al medio ambiente) para la máxima remoción de los HAPs.

#### **4. HIPÓTESIS**

La microalga *Chlorella vulgaris* proveniente de dos diferentes laboratorios, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y del Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía (LACET), serán capaces de remover los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno presentes en el medio acuoso, por lo que su presencia en el medio de cultivo no influirá en el crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET.

Se espera que no haya diferencias en la remoción de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno por parte de la microalga *Chlorella vulgaris* proveniente de dos laboratorios diferentes: CIBNOR y LACET y que será comparable a la remoción obtenida con otras especies de microalgas identificadas como degradadoras de HAPs.

#### **5. OBJETIVOS**

General:

-Evaluar la capacidad de la microalga *Chlorella vulgaris*, proveniente de dos diferentes lugares de la República Mexicana, aisladas por diferentes laboratorios (CIBNOR y LACET), para realizar la remoción de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno, mediante metodología analítica basada en técnicas de extracción con adsorbentes y cromatografía de líquidos de alta resolución.

Particulares:

- Establecer la curva de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* de CIBNOR y LACET y obtener las condiciones óptimas de crecimiento.

- Evaluar el efecto de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno en el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET.

- Optimizar método de extracción en fase sólida (EFS) y análisis HPLC con detección espectrofotométrica UV para la microalga *Chlorella vulgaris* de CIBNOR y LACET.

- Validar el método considerando los parámetros de linealidad, reproducibilidad, repetibilidad y límites de detección

-Realizar bioensayos de exposición al Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno por separado a diferentes tiempos de exposición y determinar las cantidades remanentes de los HAPs

-Comparar la capacidad de remoción, a un tiempo determinado, de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno entre las microalgas *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris* (CIBNOR y LACET).

## **6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **Tipo de estudio**

Experimental. Diseño con preprueba-posprueba y grupo control (50)

### **Población de estudio**

Microalga *Chlorella vulgaris* proveniente de dos laboratorios diferentes: CIBNOR y LACET

### **Variables**

Independiente. Tipo de microalga; tiempo de exposición

Dependiente. Remoción de HAPs

## **6.1 Material**

### **6.1.1 Reactivos y disolventes**

- Agua desionizada obtenida de un equipo de purificación Simplicity UV (MILLIPORE, EUA)
- Acetonitrilo grado HPLC (JT Baker, EUA)
- Isopropanol grado HPLC (JT Baker, EUA)
- Metanol grado HPLC (JT Baker, EUA)
- Estándar de Benzo [a] antraceno, pureza>99.2% (CHEMSERVICE, EUA)
- Estándar de Benzo [a] pireno, pureza>99.2% (CHEMSERVICE, EUA)
- Sílice C<sub>18</sub> Supelclean de 45mm de diámetro de partícula. (SUPELCO, EUA)

### 6.1.2 Medios de cultivo

- Medio Bristol (*S. capricornutum*): Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ), cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato dibásico de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ).
- Medio Basal Bold (*C. vulgaris*): Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ), cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), fosfato dibásico de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), etilendiamintetracetato (EDTA), sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ), cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2$ ), óxido de molibdeno VI ( $\text{MoO}_3$ ).
- Peptona proteosa (MCD Lab, México)
- Agar bacteriológico (MCD Lab, México)

### 6.1.3 Sistema Cromatográfico

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Waters 2998 EUA)
- Detector UV dispositivos de diodos (Waters 2998 EUA)
- “Software” de control y procesamiento de datos Empower 3
- Bucle de inyección (Waters 2998 EUA)
- Precolumna de 20 x 2 mm, empacada con adsorbente Nucleosil 100-5, 5  $\mu\text{m}$  (MACHEREY-NAGEL, Alemania)
- Columna analítica Gemini de 150 x 4.6 mm empacada con fase inversa C18 tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$  (PHENOMENEX, EUA)

#### **6.1.4 Otros Equipos**

- Balanza analítica modelo Adventure AV 114C (OHAUS, EUA)
- Desionizador Simplicity UV (MILLIPORE, EUA)
- Parrilla de calentamiento Cimarec 2 modelo S469 (THERMOLINE, EUA)
- Autoclave eléctrica modelo 2540EL (TUTTNAUER, NL)
- Agitador orbital modelo 2346 (THERMO SCIENTIFIC, EUA)
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (THERMO SCIENTIFIC, EUA)
- Microscopio óptico modelo B2-220 (NATIONAL OPTICAL, EUA)
- Campana de flujo laminar modelo 11231 BBC86 (BIOBASE, China)
- Agitador con controlador de temperatura modelo SI-600R (JEIOTECH, Corea)
- Centrifuga SIGMA Ostero de modelo 2-5 (HARZ, ALEMANIA)

#### **6.1.5 Materiales diversos**

- Asa bacteriológica en anillo.
- Mecheros de bunsen.
- Celdas de plástico para región visible.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Cámara de Neubauer (MARIENFELD, Alemania)
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Lámpara con foco de luz amarilla 14 watts.
- Micropipeta 100 – 1000  $\mu$ L (EPPENDORF, EUA)
- Matraz Erlenmeyer de 15 mL.

- Cartuchos de empaque para extracción en fase sólida de 6 mL (VARIAN, EUA)
- Frites de polietileno. (MILLIPORE, Irlanda)
- Probetas de 10 mL.
- Viales ámbar con tapón de rosca de 10 mL.
- Pipeta volumétrica de 15 mL.
- Propipeta

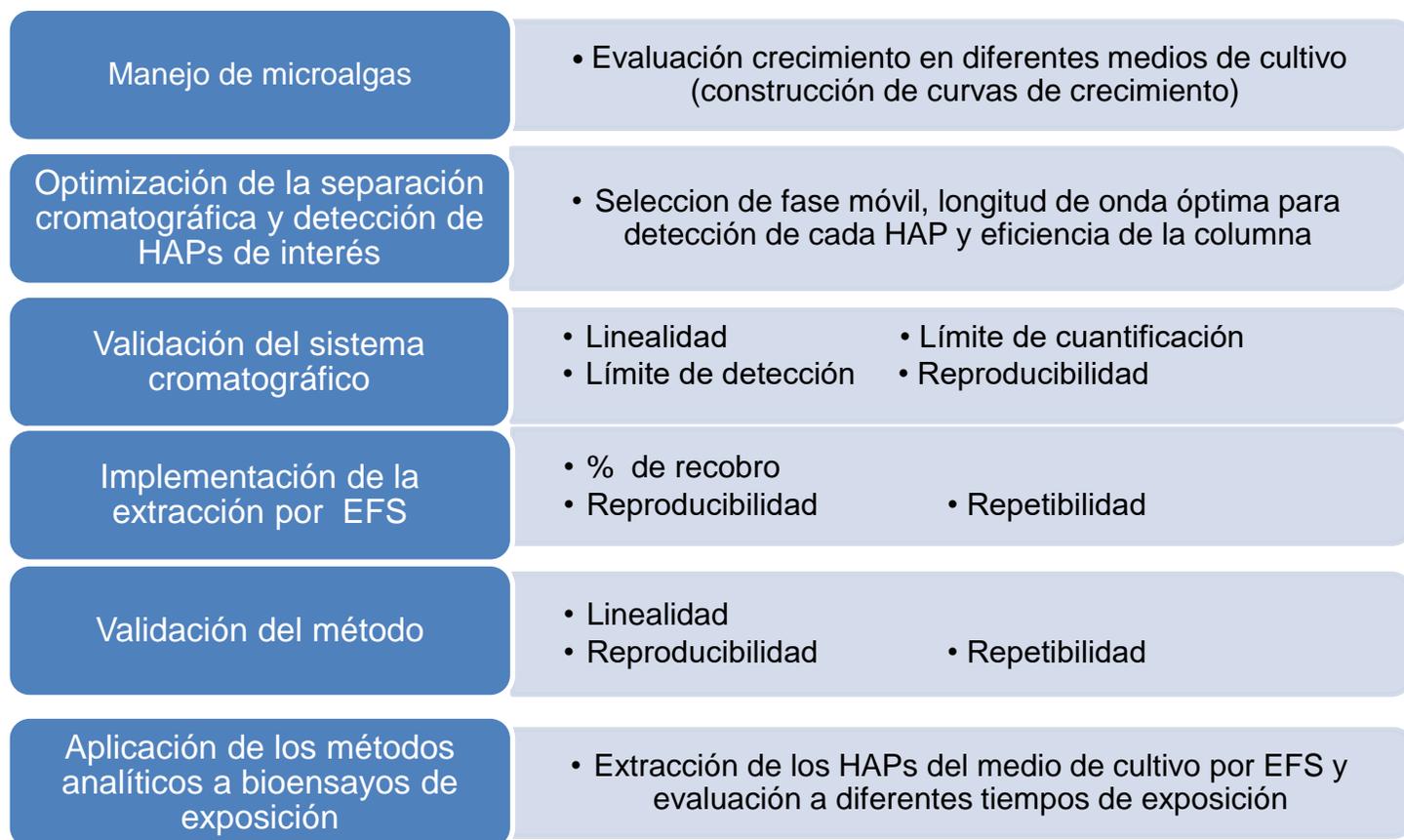
- **6.1.6 Microorganismos**

- Alga *Chlorella vulgaris* (CIBNOR) (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz Baja California, México).
- Alga *Chlorella vulgaris* (LACET) (Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México).
- Alga *Scenedesmus acutus* (UTEX 72) (Colección de Cultivo de Algas, Universidad de Texas, TX, EUA).
- Alga *Selenastrum capricornutum* (UTEX 1648) (Colección de Cultivo de Algas, Universidad de Texas, TX, EUA).

## 6.2 Metodología

Esquema general de experimentación:

En la figura 6.1 se describen las etapas que se realizaron en el presente trabajo.



**Figura 6.1 Esquema general de experimentación**

### 6.2.1 •Preparación de soluciones estándar

Se prepararon disoluciones “stock” de BaA y BaP a una concentración de 30.43 mg/ L y 21.93 mg/ L respectivamente, en metanol (MeOH) como disolvente. Estas disoluciones se utilizaron a lo largo de toda la experimentación. Se almacenaron en viales ámbar cerrados a 4°C.

### 6.2.2 •Manejo de microalgas

La microalga *Selenastrum capricornutum* se sembró en matraces erlenmeyer de 300 mL con medio bristol estéril (Anexo I), adicionado con proteasa-peptona 1g/ mL. La microalga *Chlorella vulgaris* CIBOR y LACET se sembró en matraces erlenmeyer de 300 mL con medio basal Bold estéril (Anexo I) sin adición de proteasa-peptona. Se realizaron ensayos preliminares con medio Bristol con proteasa-peptona 1g/mL para *Chlorella vulgaris*, resultando un medio no óptimo para su crecimiento. Se incubaron con agitación constante y ciclos de luz-obscuridad 16:8 horas. Se reservaron cultivos sólidos de reserva de microalgas en tubos con el medio correspondiente adicionado de 1% de agar bacteriológico y almacenados en ciclos de luz-obscuridad 16:8 h. La figura 6.2 muestra los cultivos líquidos y sólidos utilizados en la experimentación.

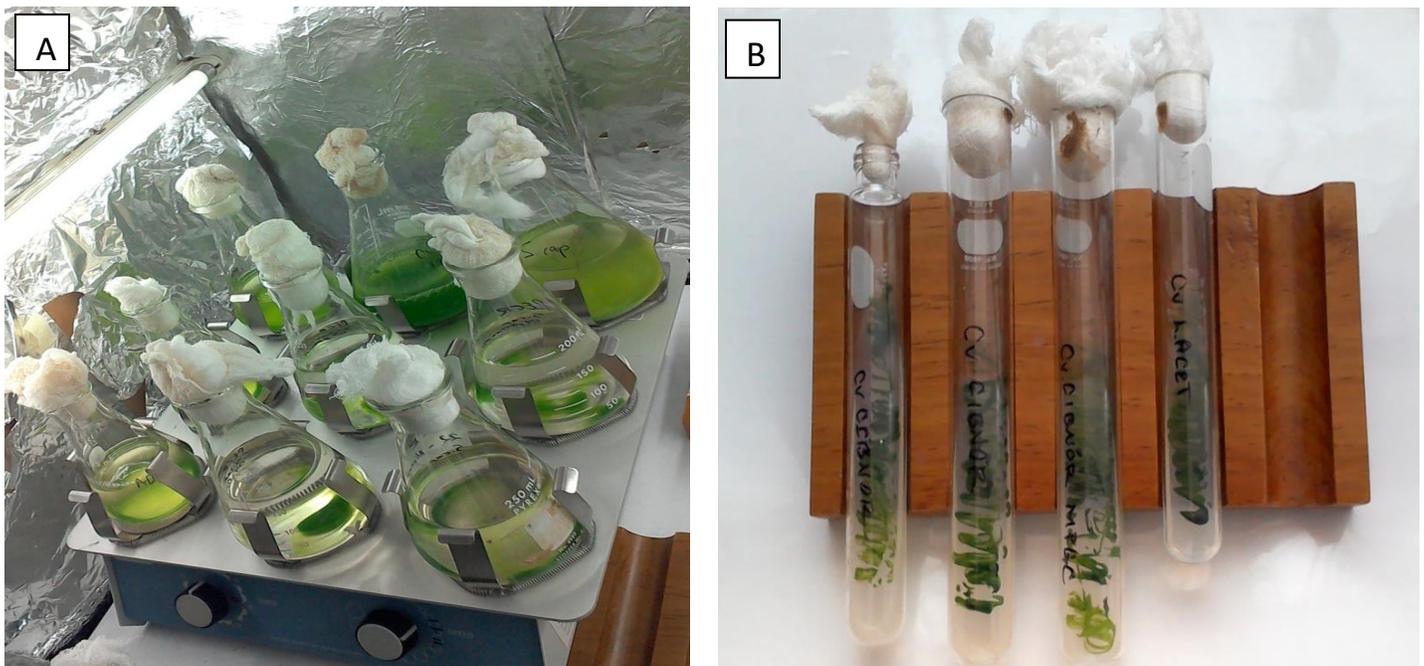


Figura 6.2. Cultivo y mantenimiento de microalgas en medio A) líquido y B) sólido

### 6.2.2.1•Curvas de crecimiento

Se evaluó el crecimiento de cada especie de microalga, por un periodo de 20-30 días, mediante monitoreo de la absorbancia espectrofotométrica a una longitud de onda de 685nm (longitud máxima para la clorofila) y trazando la curva de absorbancia vs. tiempo, al mismo tiempo se contó el número de células/mL de cada microalga por en cámara de Neubauer y también se trazó la curva número. de células vs tiempo (51).

Se realizaron curvas de crecimiento durante 18 días de la microalga *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET en presencia de los HAPs, BaP y BaA. Se adicionó una concentración de 4 mg/ mL de cada HAP por separado a cada cultivo.

En la figura 6.3 se presentan cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET con diferentes tiempos de crecimiento.

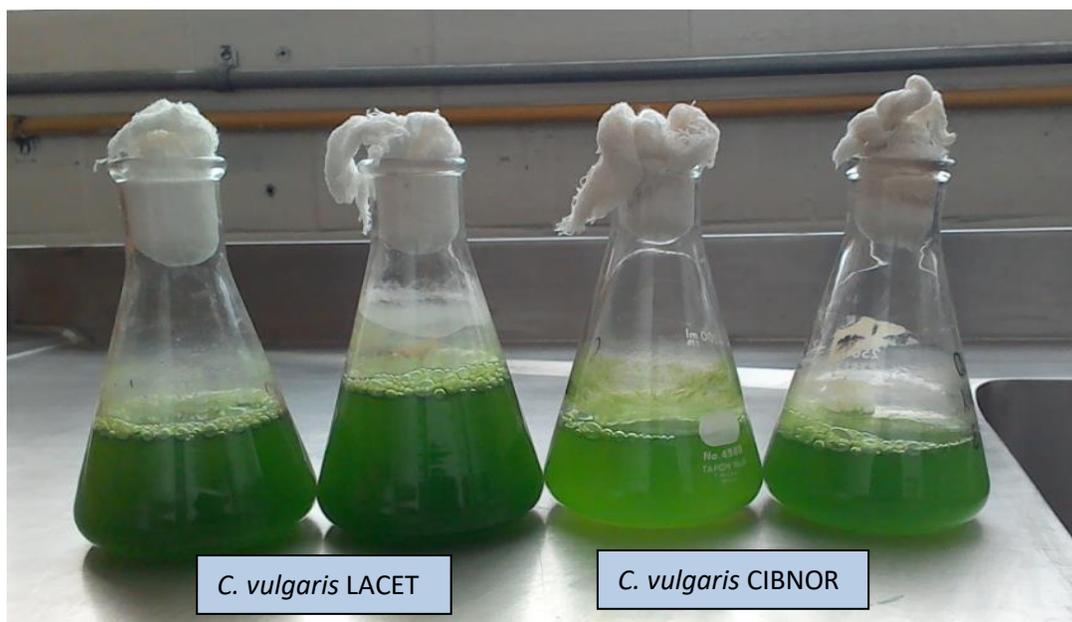


Figura 6.3 Cultivos utilizados para evaluación de crecimiento celular de *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET. Cultivos de 14 días de crecimiento

### **6.2.3-Optimización de la separación cromatográfica y detección de HAPs de interés**

Para la determinación de los parámetros de interés: resolución ( $R_s$ ), factor de capacidad ( $k'$ ) y número de platos teóricos ( $N$ ), se utilizaron las condiciones cromatográficas previamente obtenidas por (52), para la evaluación del BaA y el BaP. Estas se muestran a continuación:

Fase estacionaria: Columna analítica Gemini de 150 x 4.6 mm empacada con fase inversa C18 tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$

Fase móvil: composición isocrática al 95% metanol/ 5% agua, flujo 1mL/min

Detector: UV con dispositivo de diodos (DAD)

Longitud de onda seleccionada ( $\lambda$ ): BaP (295), BaA (285.5)

El cromatógrafo utilizado se muestra en la figura 6.4



**Figura 6.4 Cromatógrafo de líquidos Waters 2998 utilizado en el presente trabajo**

## **6.2.4 •Validación del sistema cromatográfico**

### **6.2.4.1 •Linealidad del sistema**

Para la determinación de linealidad del sistema se construyó una curva de 5 niveles de concentración por triplicado. Se prepararon disoluciones de BaP y BaA por separado en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 6 mg/mL. Mediante la integración del área de los picos obtenidos, se construyó la curva de calibración. Graficando área vs concentración se obtuvo la regresión lineal de la curva de cada HAP evaluado y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), con el cual se evalúa la linealidad de la curva.

### **6.2.4.2 •Límite de detección (L.D.) y límite de cuantificación (L.C.)**

Para la determinación del L.D. y de L.C. se elaboraron curvas de calibración de cada uno de los compuestos, tanto de BaA y BaP a concentraciones bajas. Se evaluaron cinco concentraciones por triplicado: 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL. Los límites fueron estimados mediante las siguientes fórmulas que involucran al valor de la pendiente obtenida:

$$LD = (3.3 \cdot S_{y/x}) / b_1$$

$$LC = (10 \cdot S_{y/x}) / b_1$$

$S_{y/x}$  representa la desviación estándar de la regresión y  $b_1$  es la pendiente de la curva de calibración.

#### **6.2.4.3 •Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)**

Se denomina repetibilidad a la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. La reproducibilidad es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

Para su la evaluación de la precisión se usó el nivel de concentración de 4 mg/mL en inyecciones por quintuplicado. Para repetibilidad, se realizaron el mismo día y para reproducibilidad en tres días diferentes. Se calculó el %CV para ambos casos, como sigue:

$$\%CV = (\sigma/x) * 100$$

Donde  $\sigma$  es la desviación estándar y  $x$  es la media de las áreas obtenidas

#### **6.2.5•Linealidad de método**

Se determinó la linealidad del método con tres niveles de concentración, 0.66, 2.66 y 3.99 mg/mL respectivamente por triplicado para cada HAP y cada microalga. Las áreas obtenidas se graficaron con respecto a la concentración, obteniendo así el coeficiente de correlación ( $r^2$ ).

### **6.2.6•Acondicionamiento del adsorbente**

La fase estacionaria C<sub>18</sub> supelclean se acondicionó con MeOH 100% en una relación de 1 mL/g de fase estacionaria. Se dejó secar, mediante vacío, por una hora. Este acondicionamiento tiene como objetivo solvatar las moléculas de adsorbente y favorecer la interacción con los HAPs evaluados.

### **6.2.7 • Implementación de la extracción por EFS**

Para implementar el método de extracción de los HAPs de los medios de cultivo se utilizó medio líquido proveniente del crecimiento de las microalgas, previamente centrifugado y separado de la biomasa. Este medio líquido se fortificó con disoluciones estándar de los HAPs para obtener en el medio la concentración de 266 µg/L de BaA y BaP por separado. Se aplicó un método de extracción previamente desarrollado en el laboratorio (53); (54) para la microalga *Selenastrum capricornutum* y se optimizó para muestras de medio de cultivo de la microalga *Chrorella vulgaris*. El método se describe en siguiente sección. Con los datos obtenidos se evaluó el % de recobro y la precisión del método (%CV).

$$\% \text{Recobro} = \frac{\text{(cantidad de analito recuperado)}}{\text{(cantidad de analito añadido)}}$$

### **6.2.8 • Extracción en fase sólida**

El método utilizado que se desarrolló anteriormente por EFS para el aislamiento de los HAPs se utilizó en el presente trabajo. Este se describe a continuación: se utilizó un cartucho de extracción de polipropileno con capacidad de 6 mL empacado con 300 mg de sílice C<sub>18</sub> Supelco, la cual fue activada previamente adicionando MeOH 100% en una relación de 1 mL/1 g de fase estacionaria. Se dejó secar, mediante vacío, por una hora. Se colocaron en el cartucho 2 frits, uno antes y uno después de empacar con sílice. Posteriormente se realizó el acondicionamiento de la sílice, adicionando 3 mL de ACN y después 10 mL de agua destilada. Los 15 mL de muestra de medio líquido que contiene los HAPs fue adicionada con 4 mL de isopropanol (modificador orgánico) y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente, la muestra se aplicó a través del cartucho C<sub>18</sub>, seguido de una serie de eluentes débiles para limpieza de interferentes:

- 10 mL de agua destilada
- 4 mL de ACN:agua 10:90
- 3 mL de ACN:agua 55:45

Finalmente, los HAPs fueron eluidos con 3 mL de ACN y esta fracción fue analizada por cromatografía de líquidos. La ilustración de este procedimiento se presenta en la figura 6.5.

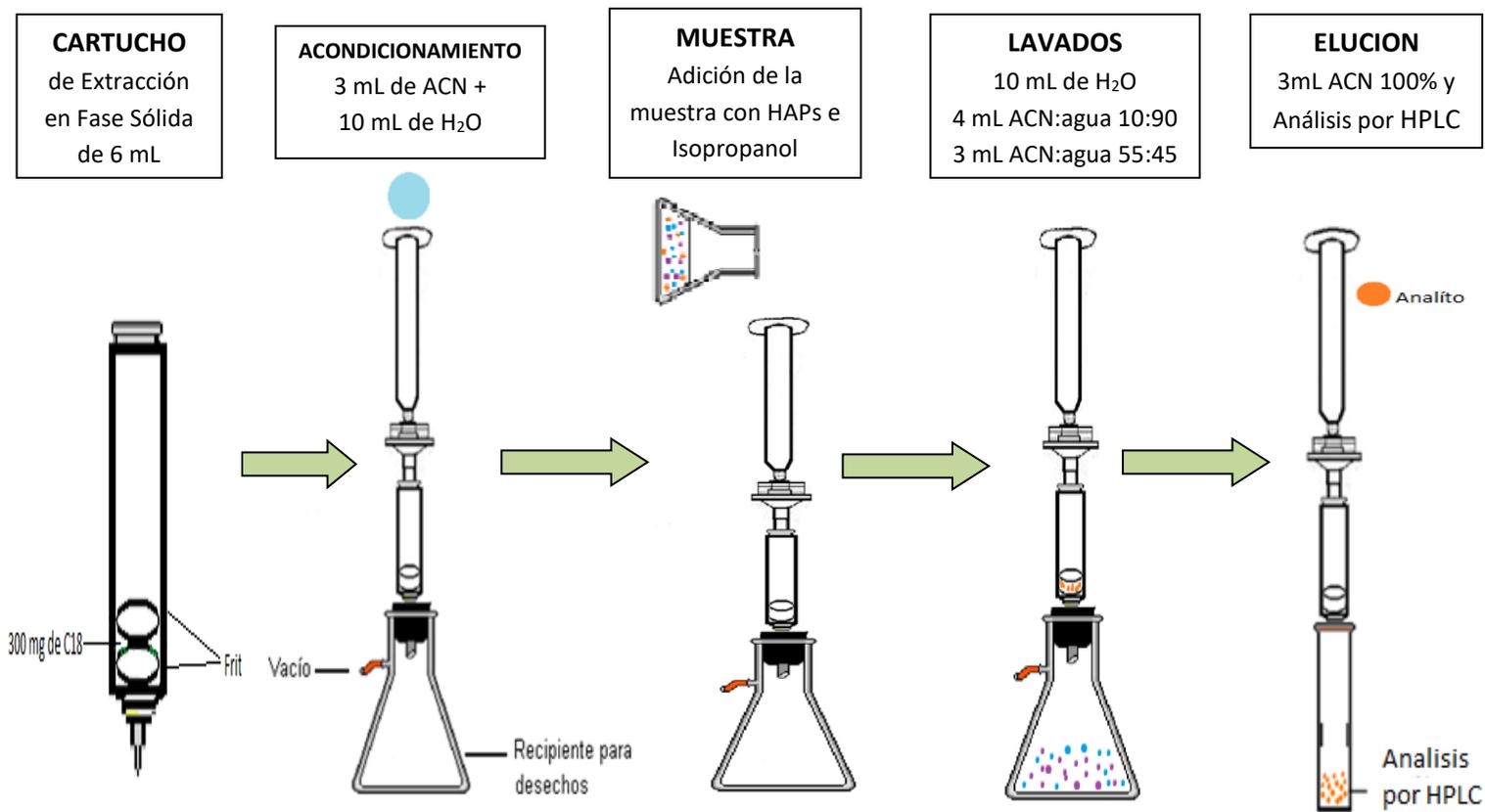


Figura 6.5 Procedimiento de extracción en fase sólida

### 6.2.9 •Evaluación de interferencias

Se realizó la EFS de los cultivos de las microalgas *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET sin presencia de HAPs para evaluar la existencia de interferencias provenientes de la matriz. Se inyectó el extracto en el HPLC para observar picos interferentes en el tiempo de retención y/o longitud de onda de los compuestos de interés (BaP y BaA)

### **6.2.10 Aplicación de los métodos analíticos a bioensayos de exposición**

Se realizaron ensayos de exposición de las microalgas *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET, adicionando BaP y BaA por separado. En condiciones asépticas se tomaron alícuotas de 15 mL de los medios de cultivo de *C.vulgaris* CIBNOR y LACET, con una absorbancia espectrofotométrica de 1.0, a 685 nm que corresponde a 5,1 millones de células/mL aproximadamente. La alícuota se colocó en matraces erlenmeyer de 15 mL previamente esterilizados. Se fortificó estos cultivos con estándares BaP y BaA para obtener una concentración en el medio de 0.266 µg/mL. Los cultivos se colocaron en una incubadora con condiciones constantes de temperatura (25°C) y agitación (75 rpm) e iluminados con un foco de luz amarilla. Se seleccionaron 5 tiempos de exposición: 0.75, 1.5, 3, 6 y 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, los cultivos fueron transferidos a tubos de 15 mL para ser centrifugados a 3900 rpm por 20 min. Después, se separó el medio líquido de la biomasa y se realizó la EFS (ver sección 6.2.8.) para su posterior inyección en el HPLC y cuantificación.

Se realizaron blancos de cada tiempo de exposición seleccionado para los ensayos de exposición, fortificando el medio de cultivo libre de microalga con estándares de BaP y BaA por separado. Se incubaron en condiciones constantes de temperatura (25°C) y agitación (75 rpm) e iluminados con un foco de luz amarilla.

Se realizó triplicado y blanco de cada tiempo seleccionado y para cada microalga.

### **6.2.11 •Comparación de la remoción de HAPs con las diferentes especies**

Se realizaron ensayos de exposición (ver sección 6.2.10) adicionando BaP y BaA por separado en un tiempo seleccionado de 1.5 h para las microalgas *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET, *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*. Se realizó triplicado del tiempo de exposición seleccionado, para cada HAP y para cada microalga.

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección de los HAPs en estudio**

La tabla 7.1 proporciona los valores obtenidos de los parámetros que se obtuvieron para la prueba de eficiencia en la columna analítica Gemini de 150 x 4.6 mm empacada con fase inversa C<sub>18</sub> tamaño de partícula 5 µm. y usando la composición móvil óptima de 80% MeOH:H<sub>2</sub>O para la columna evaluada. Los analitos utilizados para esta prueba fueron antraceno y naftaleno.

La resolución (R) es mayor a 1.5, lo que indica que se obtiene una buena separación de los dos compuestos evaluados. El factor de capacidad (k') para ambos casos es mayor a 2. El número de platos teóricos (N) refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases (unidades de equilibrio) durante su paso a través de la columna, en este caso llega aproximadamente a 2700, mostrando una buena eficiencia de la columna, ya que el mínimo para obtener una buena repartición entre las fases es de 2000 N (55).

**Tabla 7.1. Parámetros cromatográficos de columna analítica Gemini. Tiempo muerto con NaNO<sub>3</sub> (t<sub>0</sub>): 0.774 min.**

<b>Compuesto</b>	<b>R</b>	<b>k'</b>	<b>N/m</b>	<b>N/m</b>
<b>Antraceno</b>	5.70144324	4.59636268	2747.8277	18318.8513
<b>Naftaleno</b>		2.70574382	2731.20643	18208.0429

Con el detector espectrofotométrico de dispositivo de diodos (DAD) se seleccionó la longitud de onda óptima para el BaA y BaP, donde se presenta la máxima absorbancia en la región del espectro. En la tabla 7.2 se presentan las longitudes de onda óptimas para cada hidrocarburo.

**Tabla 7.2 Longitudes de onda óptima para los HAPs utilizados en el presente trabajo**

<b>HAP</b>	$\lambda$
Benzo[a]antraceno	285.5
Benzo[a]pireno	295

Los parámetros cromatográficos obtenidos para los HAPs evaluados individualmente en la columna analítica Gemini de 150 x 4.6 mm empacada con fase inversa C<sub>18</sub> tamaño de partícula 5  $\mu$ m. y usando la composición móvil de 95% MeOH:H<sub>2</sub>O se presentan en la tabla 7.3.

**Tabla 7.3 Parámetros cromatográficos obtenidos de los HAPs utilizados en el presente trabajo**

<b>HAP</b>	<b>tr</b>	<b>k'</b>
Benzo[a]antraceno	3.753	2.455
Benzo[a]pireno	4.785	3.130

Al obtener factores de capacidad mayores a 2 y tiempos de retención relativamente bajos, la composición móvil que se utilizó en el presente trabajo fue 95% MeOH:H<sub>2</sub>O

## 7.2 Validación de sistema

### 7.2.1 Linealidad de sistema

En la figura 7.1 se pueden observar las áreas obtenidas de los HAPs en función de las concentraciones evaluadas de 0.0625 a 6 mg/mL para cada uno de los hidrocarburos de interés. Se puede observar que las curvas presentan respuesta lineal debido a que el  $r^2$  es superior a 0.99 en el intervalo de concentraciones.

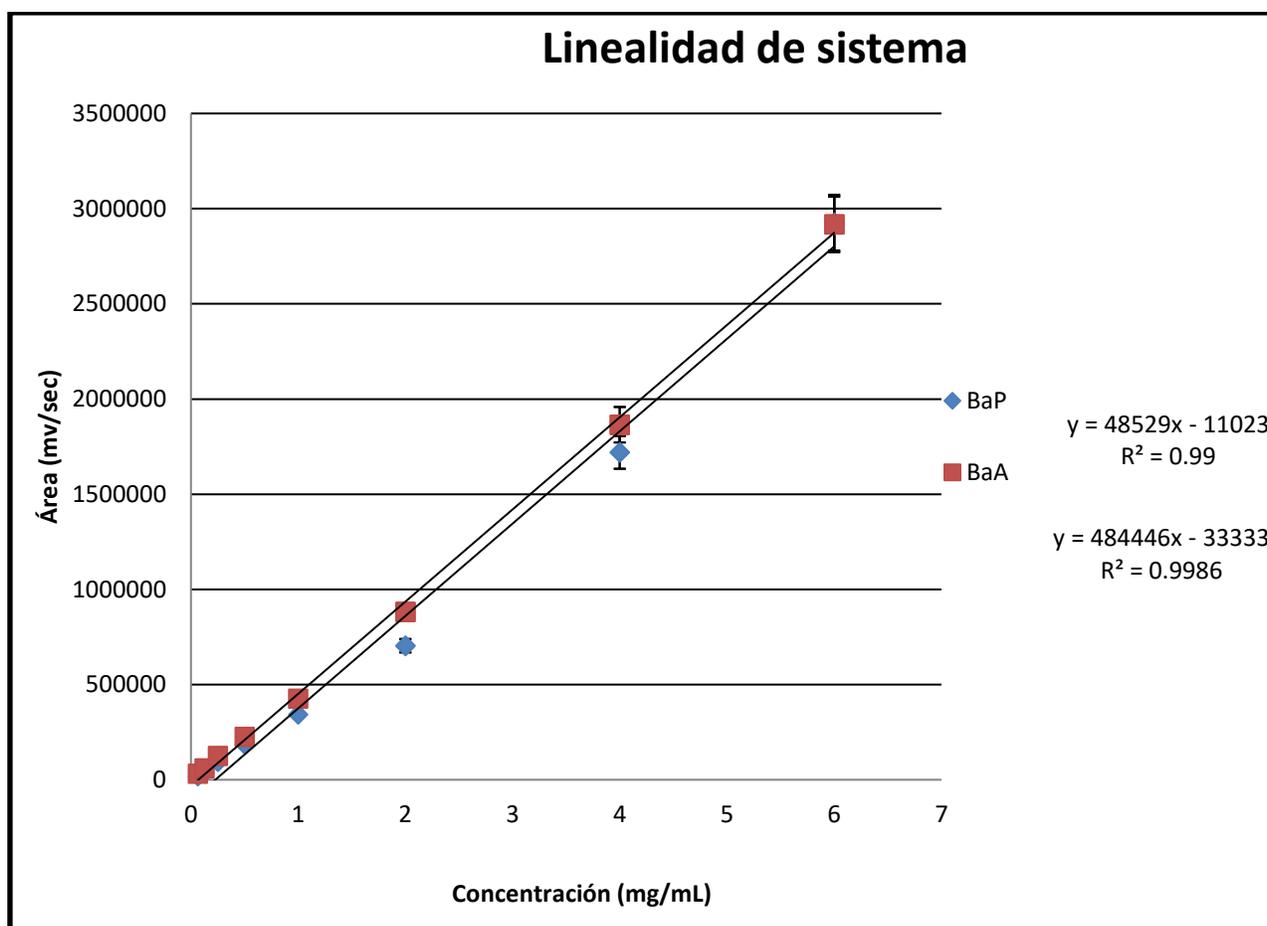


Figura 7.1. Curva de calibración de BaP y BaA en el sistema cromatográfico

### 7.2.2 Precisión (repetibilidad y reproducibilidad), Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) del sistema

La tabla 7.2 muestra el % CV para cada hidrocarburo, evaluando así la repetibilidad y la reproducibilidad del sistema. Los valores obtenidos son menores al 10% mostrando que el sistema es repetible y reproducible. Los valores de % CV en repetibilidad son menores a los de reproducibilidad debido a que los factores como operador, condiciones ambientales y preparación de los estándares inciden de mayor manera en la evaluación en días diferentes.

Las propiedades fisicoquímicas de cada HAPs, en particular el coeficiente de absorptividad molar, propician a que se obtengan diferentes límites de detección y cuantificación. En la tabla 7.4 se presentan los límites obtenidos para cada HAP y así poder evaluar su comportamiento por encima de estos límites y garantizar resultados confiables.

**Tabla 7.4 Valores de repetibilidad, reproducibilidad, LD y LC del sistema cromatográfico**

<b>HAP</b>	<b>Repetibilidad CV (%)</b>	<b>Reproducibilidad CV (%)</b>	<b>LD (mg/mL)</b>	<b>LC (mg/mL)</b>
<b>BaP</b>	1.56	2.86	0.08	0.26
<b>BaA</b>	2.23	3.40	0.06	0.19

### 7.3 Implementación de método de EFS

En la tabla 7.5 se presentan los recobros porcentuales para cada uno de los HAPs así como el % CV para las muestras fortificadas. Se observan recobros mayores de 70% y % CV menores a 4 para ambos casos, lo que indica que se cumple con las recomendaciones de la USEPA (2013), para muestras expuestas a alguno(s) de los 16 HAPs prioritarios y contenidas en muestras acuosas o matriz biológica, de

obtener recobros en un intervalo de 70-130% y % CV menores a 3.8%. Los HAPs son compuestos que se adhieren a las paredes de vidrio del material utilizado, esto explica que no se obtengan recobros cercanos al 100%.

**Tabla 7.5. Recobros y coeficientes de variación de la implementación del método de EFS**

<b>Compuesto</b>	<b>% Recobro</b>	<b>CV (%)</b>
<b>BaP</b>	73	3.7
<b>BaA</b>	73	2.4

## **7.4 Linealidad de método**

### **7.4.1 *Chlorella vulgaris* CIBNOR**

Se determinó la linealidad del método para *C. vulgaris* CIBNOR y *C.vulgaris* LACET con cada uno de los HAPs evaluados, BaP y BaA. El rango de concentraciones utilizadas son 0.066, 0.266 y 0.399 mg/mL

En la figura 7.2 se observa el área obtenida en función de las tres concentraciones evaluadas, dando una respuesta lineal en este rango de concentración para los dos HAPs ya que para BaP y BaA el  $r^2 > 0.99$ .

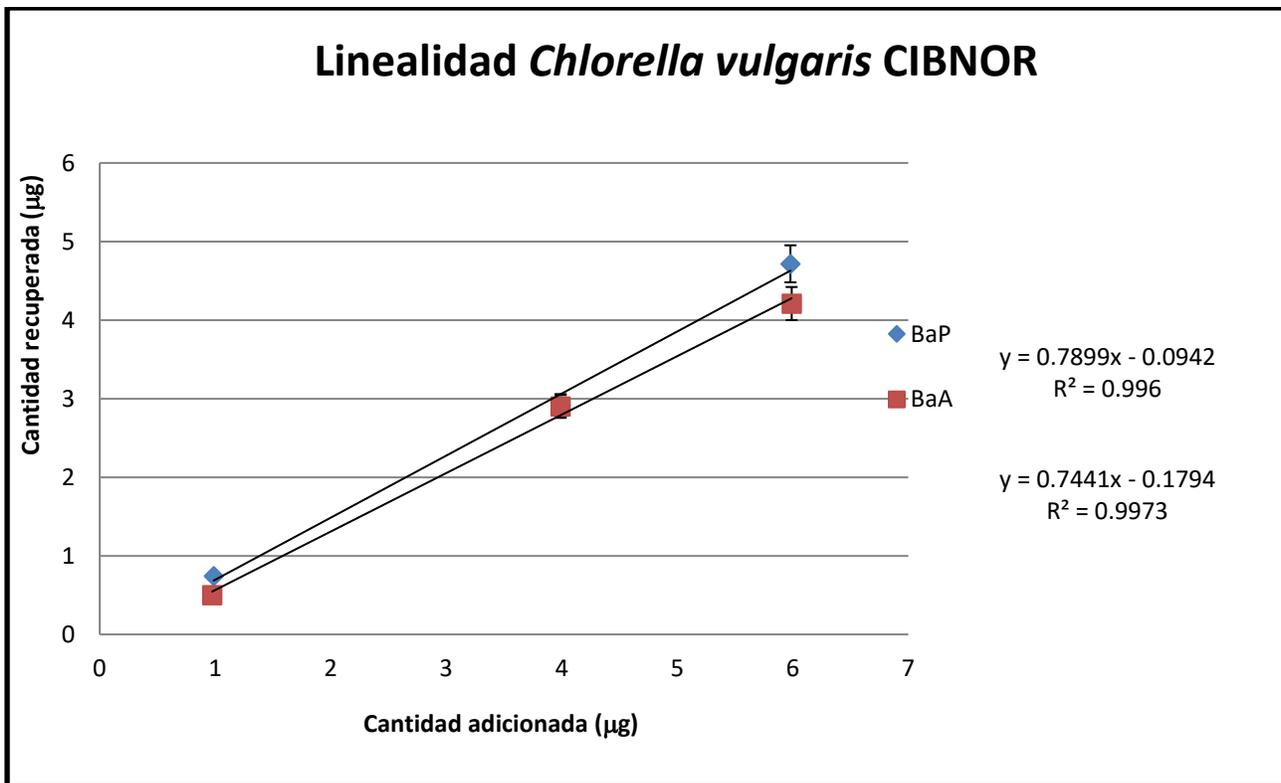


Figura 7.2 Linealidad del método BaP y BaA en cultivos de *C. vulgaris* CIBNOR

#### 7.4.2 *Chlorella vulgaris* LACET

En la figura 7.3 se muestra también una respuesta lineal en *C. vulgaris* LACET al determinar el  $r^2$  de cada una de las rectas, dando como resultado un  $r^2 > 0.99$  para BaP y BaA en el rango de concentración que se utilizó.

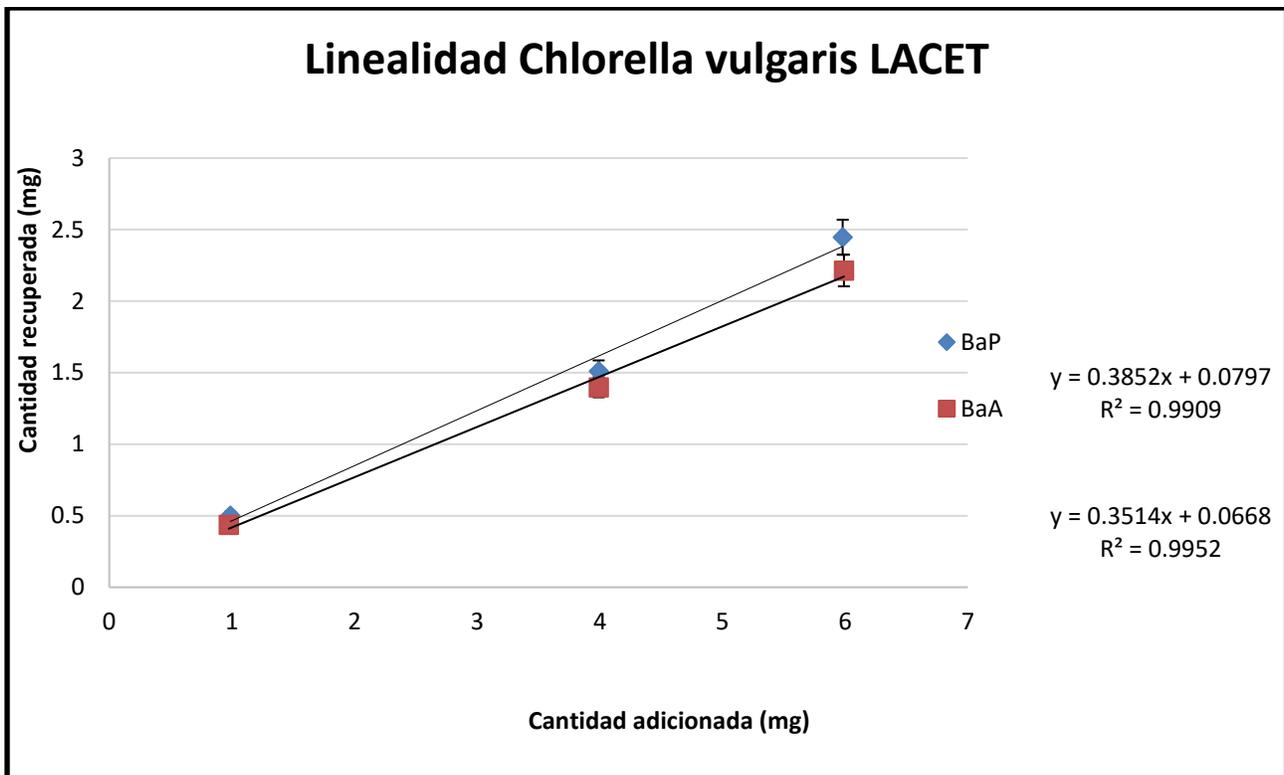


Figura 7.3 Linealidad del método para BaP y BaA en cultivos de *C. vulgaris* LACET

#### 7.4.3 Precisión (repetibilidad y reproducibilidad), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de método

Al evaluar la repetibilidad y reproducibilidad del método y obtener los %CV para BaP y BaA para las dos microalgas, como se muestra en la tabla 7.6, se puede observar que los valores obtenidos son menores al 10% en todas las determinaciones. Los valores de reproducibilidad son mayores a los presentados en repetibilidad ya que los factores como el analista, preparación de estándares y condiciones ambientales pueden afectar en las mediciones entre días. Los LD y LC que se presentan en la figura 7.4. se observan todos diferentes, lo cual puede explicarse por su diferente coeficiente de absorptividad de los HAPs y también por las diferentes matrices o muestras.

Tabla 7.6. Valores de repetibilidad y reproducibilidad obtenidos de *C.vulgaris* CIBNOR y LACET

Microalga	Compuesto	Repetibilidad CV (%)	Reproducibilidad CV (%)	L.D. $\mu\text{g/mL}$	L.C. $\mu\text{g/mL}$
<b>C. vulgaris CIBNOR</b>	<b>BaP</b>	0.379	0.825	0.099	0.196
	<b>BaA</b>	0.249	1.414	0.034	0.073
<b>C. vulgaris LACET</b>	<b>BaP</b>	1.76	9.32	0.087	0.149
	<b>BaA</b>	1.081	3.80	0.029	0.093

### 7.5 Curvas de crecimiento

En la Figura 7.4 se presentan las curvas de crecimiento de las microalgas de acuerdo a la absorbancia y de acuerdo al número de células determinadas en diferentes tiempos. En ellas se observa que el crecimiento de *Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum* difiere en la velocidad en que crecen dichas microalgas porque para alcanzar la absorbancia de 1 (Figura 7.4A), la cual fue utilizada en todos los ensayos para homologar el número de células que participan en la remoción, las microalgas *C. vulgaris* LACET y CIBNOR la alcanzan en un periodo de 10 y 11 días respectivamente, mientras que *S. capricornutum* la alcanza en 20 días. La figura 7.4B muestra la cantidad de células que se cuantificaron a diferentes días. El número de células es mayor en la microalga *Chlorella vulgaris* que en *Selenastrum capricornutum* llegando a duplicar el número de células en la mitad de días de crecimiento.

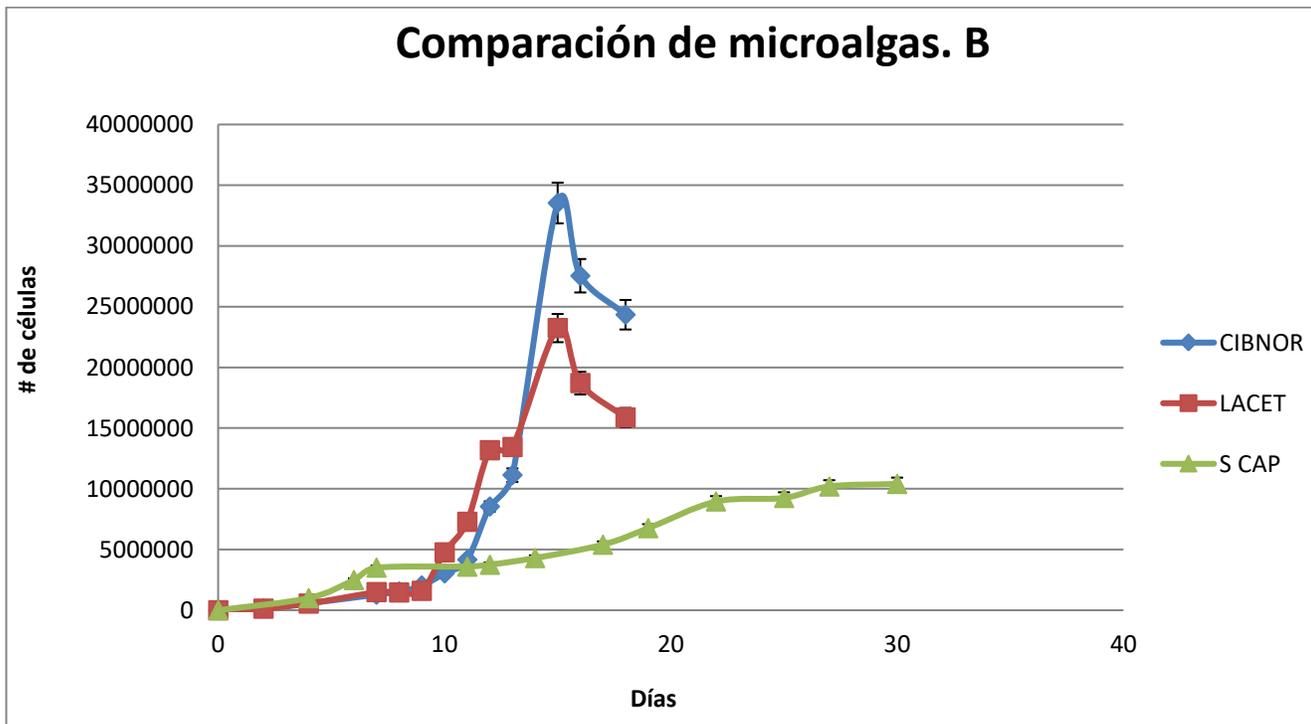
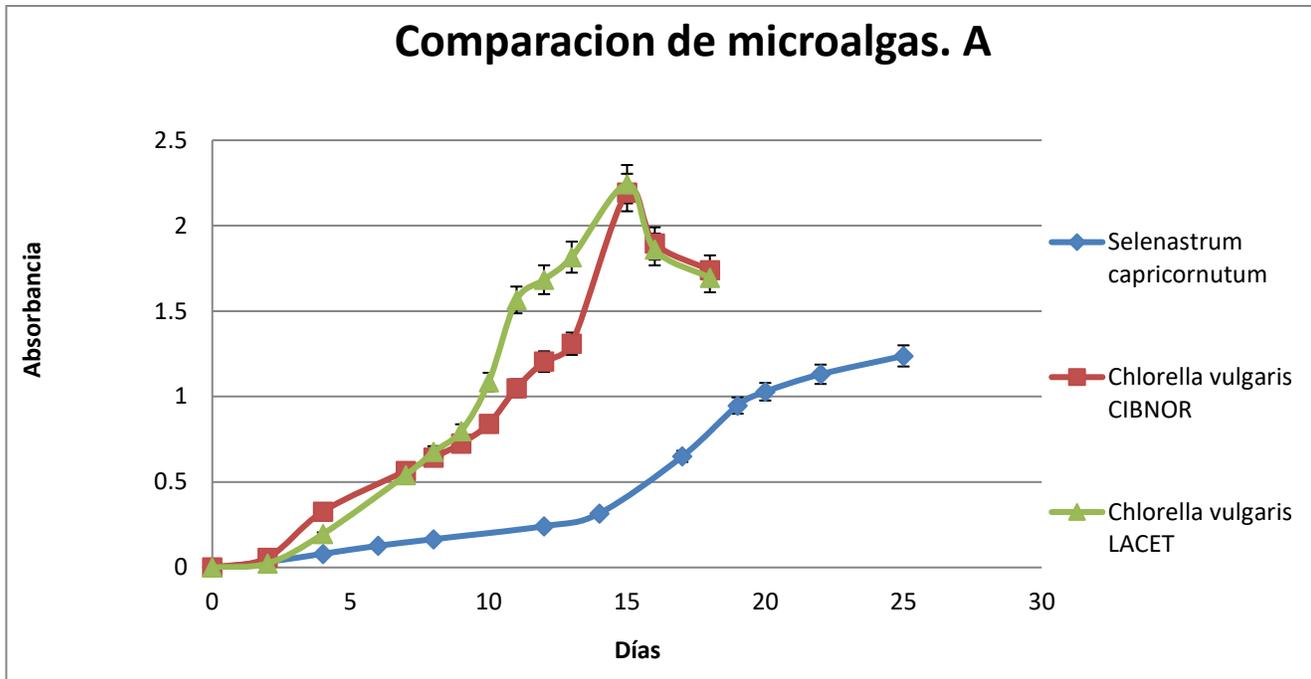
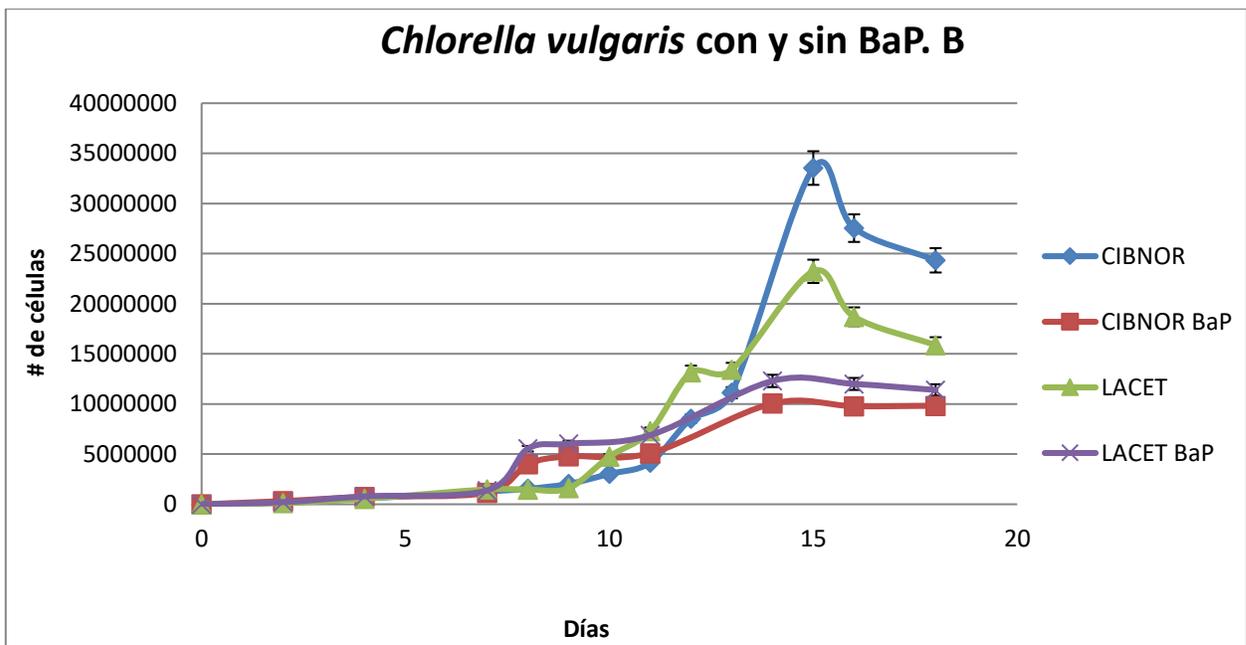
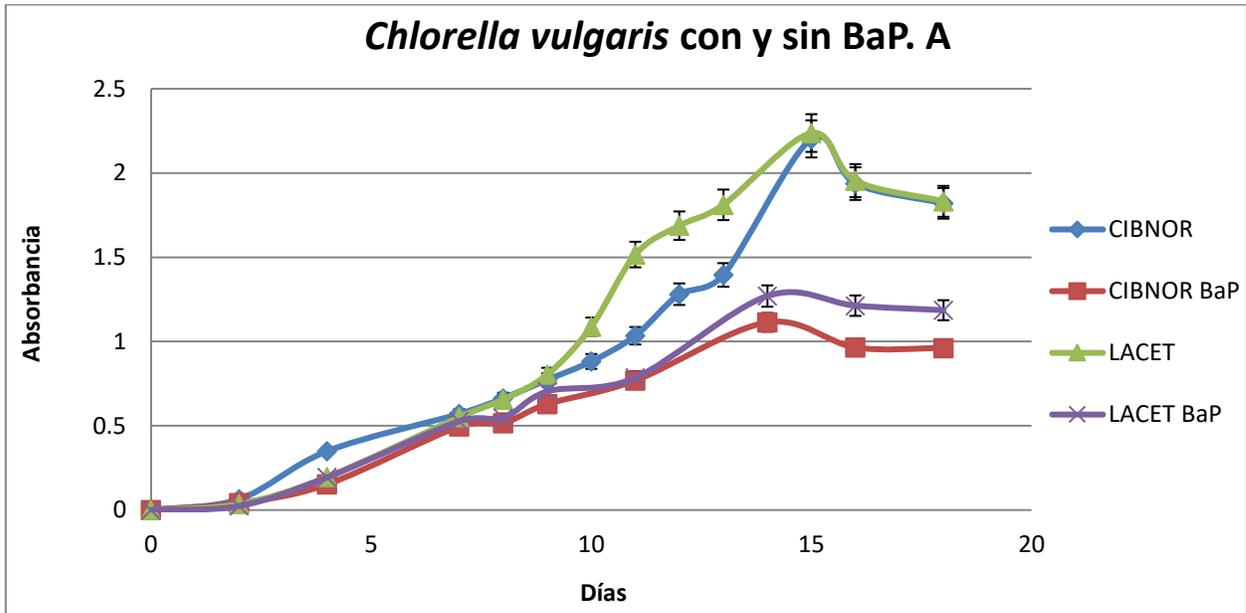


Figura 7.4. Curvas de crecimiento de *C. vulgaris* CIBNOR y LACET y *S. capricornutum*. Evaluando A) Absorbancia vs días y B) # células vs días

Sin embargo, en la figura 7.4B donde se compara el crecimiento de cada microalga sin HAP evaluando el número de células con respecto a los días, en el día 20 la microalga *S. capricornutum* tiene alrededor de 7.5 millones de células mientras que *C. vulgaris* CIBNOR en el día 11 tiene alrededor de 4.5 millones y *C. vulgaris* LACET en el día 10 alrededor de 5 millones. Aunque en estos días las tres microalgas presentan la misma absorbancia, como se discutió anteriormente, el cambio en el número de células difiere debido a la diferente producción de clorofila que presenta cada microalga. *C.vulgaris* presenta una mayor producción de clorofila que *S. capricornutum* con un menor número de células.

Se ha reportado que el crecimiento de las microalgas se ve disminuido con la presencia de compuestos como los HAPs debido a que el sistema orbital pi, que presentan los HAPs (por el cual absorben fuertemente en las regiones ultravioleta y regiones del espectro solar) (56), sufren una rápida modificación estructural, generalmente vía oxidación al ser expuestos a la luz solar generando moléculas de alta toxicidad del tipo singulete excitado y tripletes que afectan el crecimiento de la microalga (57). Para evaluar la influencia de la presencia de los HAPs en el crecimiento de las microalgas, se diseñaron experimentos de crecimiento adicionando al medio BaA y BaP por separado, en concentraciones de 0.266 mg/mL. En la figura 7.5 se presentan las curvas de crecimiento de *C. vulgaris* CIBNOR y LACET en presencia de BaP. Los cultivos que tienen presencia de hidrocarburo se ven disminuidos en su crecimiento en aproximadamente 1 unidad de absorbancia con respecto a los cultivos que no contienen el hidrocarburo (Figura 7.5A). El número de células de cada uno de los cultivos también es afectado por la presencia de hidrocarburo. Los cultivos con presencia HAP llegan a un máximo de

células al día 14 con aproximadamente 10 millones de células, mientras que los cultivos libres de hidrocarburo sus máximos llegan a los 25 y 35 millones de células en sus puntos máximos (Figura 7.5B). Lo que comprueba que la presencia de HAP en el medio afecta su crecimiento y su metabolismo.



**Figura 7.5. Curvas de crecimiento de *C.vulgaris* CIBNOR y LACET con y sin presencia de BaP Evaluando A) Absorbancia vs días y B) # células vs días**

Aunque en los primeros 10 días tienen un comportamiento similar todas las microalgas. En la figura 7.6 A observamos que entre los 14 y 15 días los cultivos que tienen la presencia del hidrocarburo BaA tienen aproximadamente 15 millones de células menos en comparación para los cultivos que tienen la presencia del hidrocarburo BaA, y para el día 18 el comportamiento es similar nuevamente. Para la medición del número de células (Figura 7.6B) el comportamiento es similar para todas las microalgas en todos los ensayos. Esto puede deberse a la resistencia de *Chlorella vulgaris* a la presencia de hidrocarburos y su capacidad para removerlos como en *Chlorella sp.* (58) *Chlorella sp.* al estar en contacto con Tributiltin (TBT) tiene un crecimiento similar en los primeros días, ya que el contaminante puede permanecer en la pared celular de la microalga. A partir de las 72 h se comienzan a ver diferencias significativas entre los cultivos expuestos con TBT y los que no fueron expuestos. Al tener propiedades lipofílicas los HAPs tienden a permanecer en la pared lipídica de las microalgas, lo que puede explicar que en los primeros 10 días el crecimiento celular sea similar al ser o no expuesto al HAP.

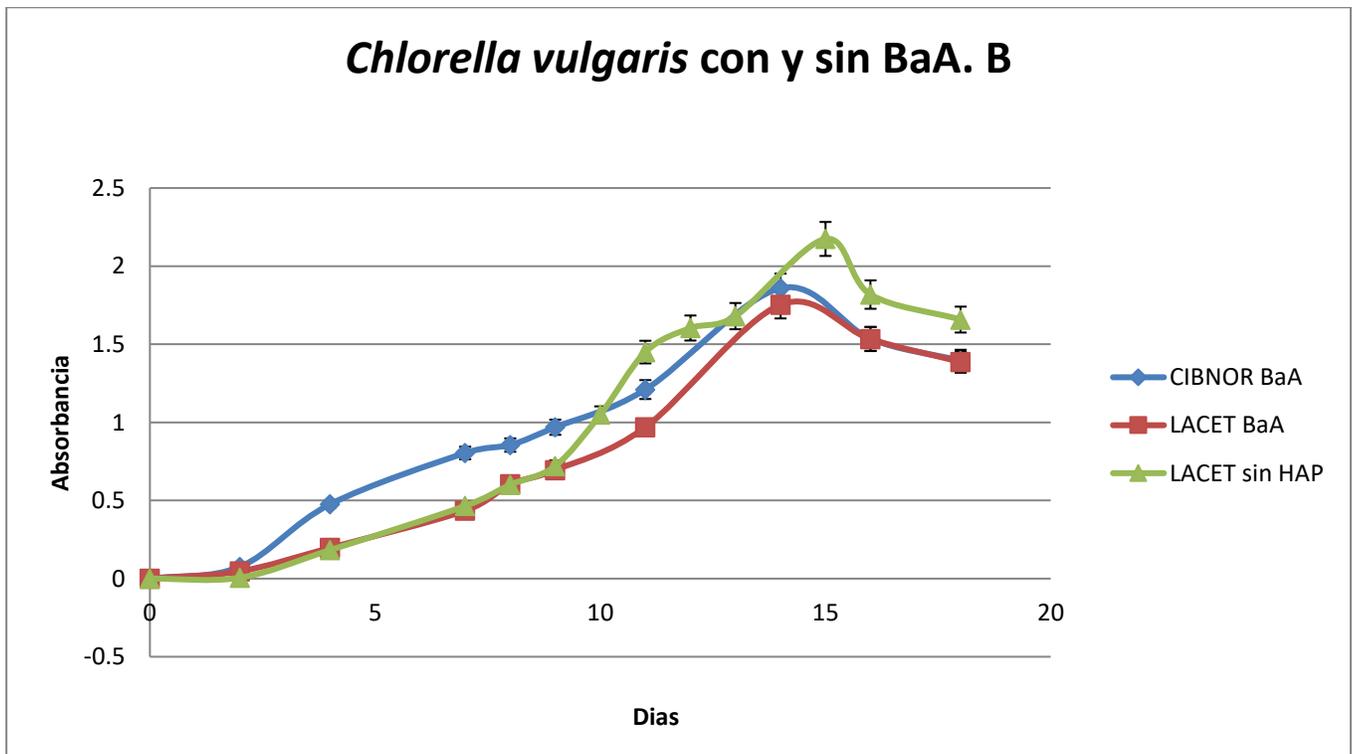
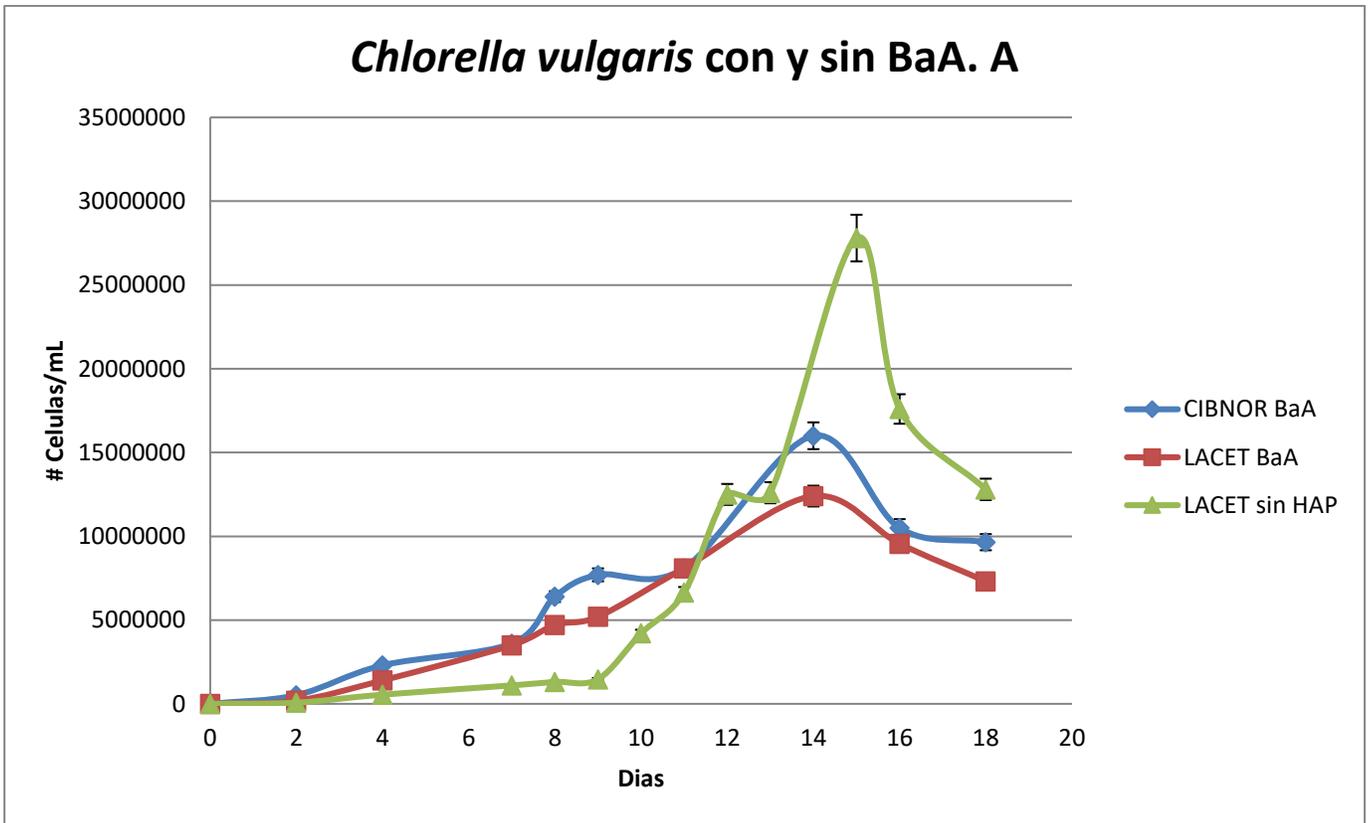
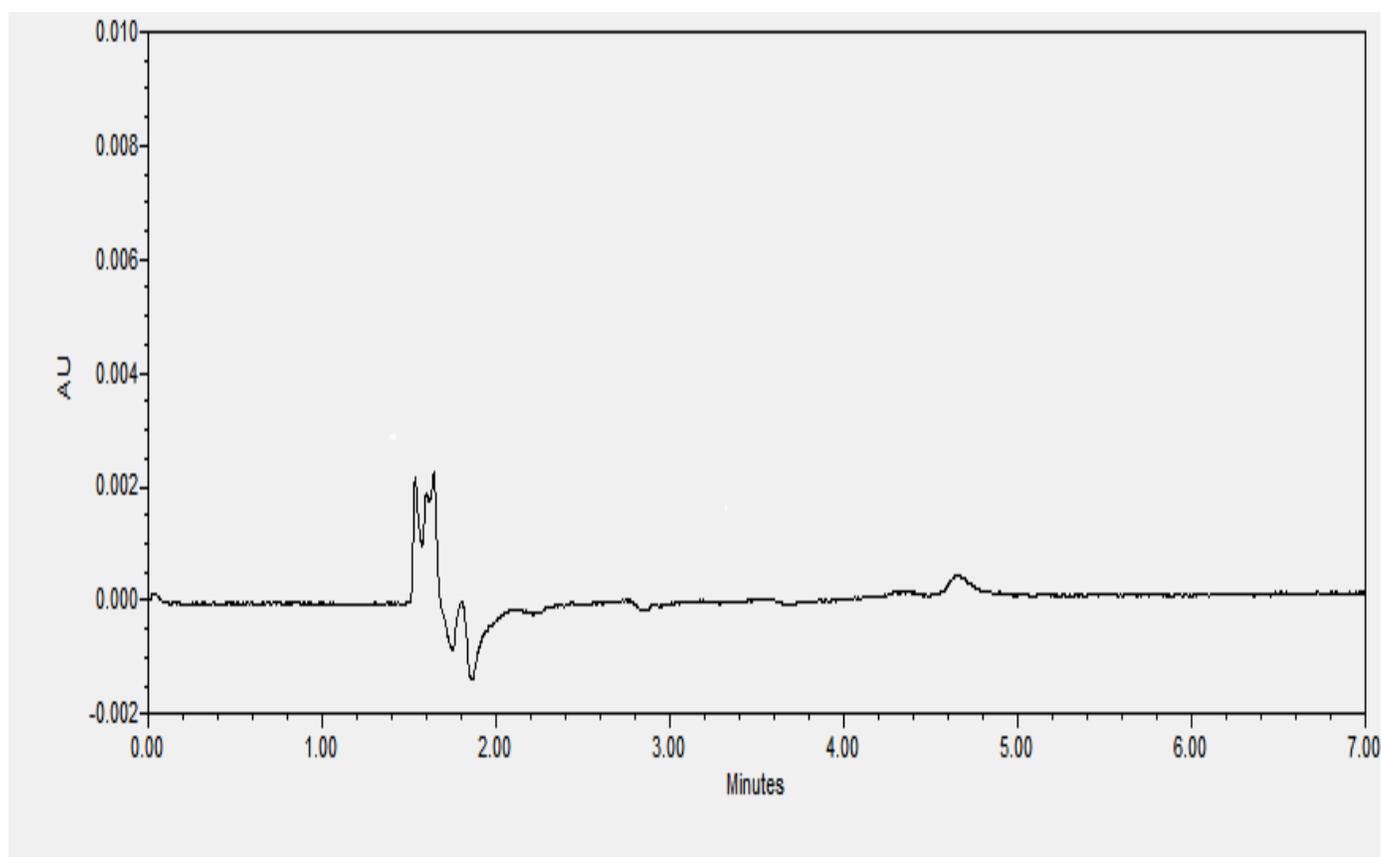


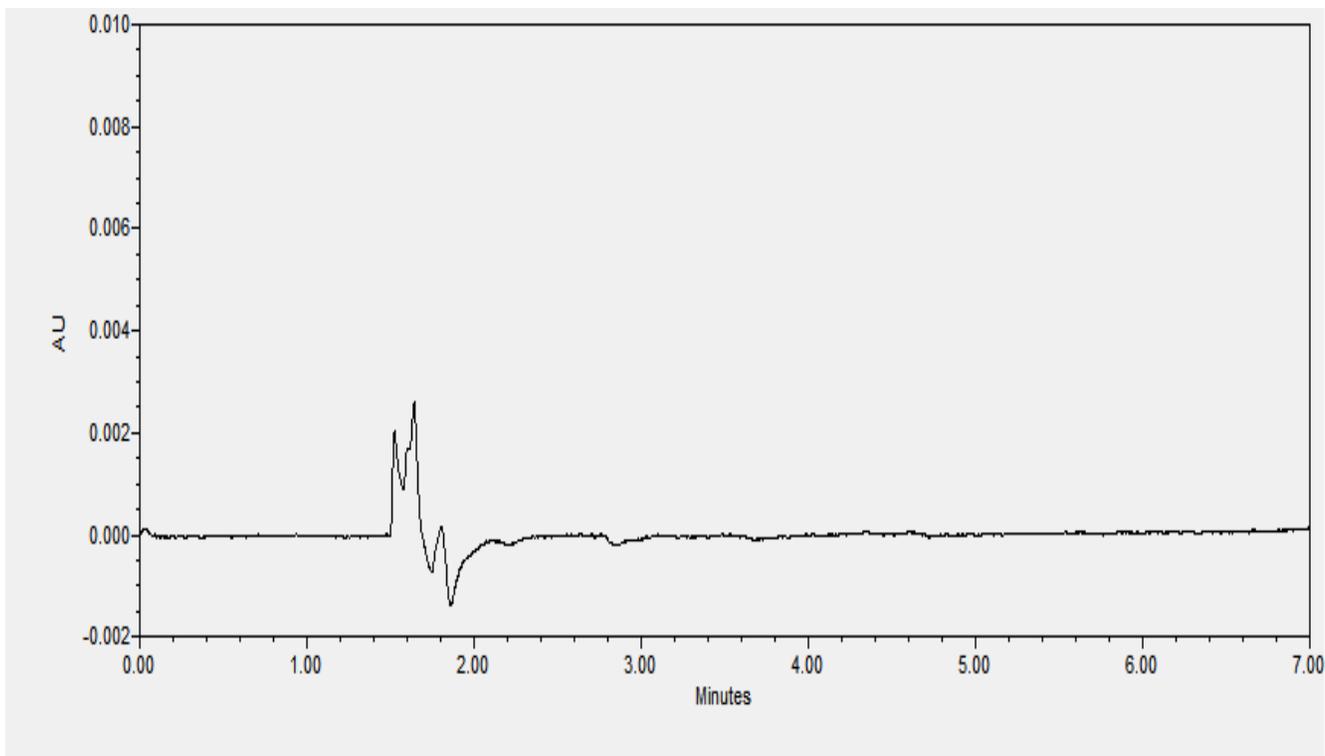
Figura 7.6. Curva de crecimiento de *C.vulgaris* LACET con y sin presencia de BaA Evaluando A) Absorbancia vs días y B) # células vs días

## 7.6 Evaluación de interferencias en los extractos de de *Chlorella vulgaris*

Las figuras 7.7 y 7.8 presentan los cromatogramas del extracto EFS de medio de cultivo de *C.vulgaris* CIBNOR y LACET. En ellos se muestra una línea base del cromatograma libre de compuestos que puedan interferir en el tiempo de retención en las condiciones de detección de los analitos de interés y por lo tanto se garantiza una respuesta debido sólo a los hidrocarburos estudiados.



**Figura 7.7** Cromatograma de un extracto de cultivo de *C. de C. vulgaris* (LACET)



**Figura.7.8 Cromatograma de un extracto de cultivo *C.vulgaris* (CIBNOR)**

### 7.7 Aplicación de los métodos analíticos a bioensayos de exposición

La cantidad recuperada y porcentaje de remoción por cada microalga y por cada HAP se muestra en la tabla 7.7:

**Tabla 7.7 Recobros y porcentaje de remoción global por parte de *C. vulgaris***

<b>Microalga</b>	<b>HAP</b>	<b>Cantidad recuperada (<math>\mu</math>)</b>	<b>Remoción (%)</b>	<b>I.C.</b>
<i>C. vulgaris</i> CIBNOR	BaP	0.76	81	0.03
	BaA	0.37	91	0.03
<i>C. vulgaris</i> LACET	BaP	0.89	78	0.02
	BaA	0.85	78	0.04

### 7.7.1 *Chlorella vulgaris* CIBNOR

#### Benzo[a]pireno

La figura 7.9 muestra las cantidades de BaP y BaA recuperados a los tiempos de exposición seleccionados en función del tiempo de exposición. Se observa una disminución considerable de BaP en los primeros tres tiempos de exposición: 0.75, 1.5 y 3 h. En el tiempo de 0.75 h ya se remueve el 54% de hidrocarburo presente y el porcentaje removido para las 3 h es de 71%. En los tiempos de 6 a 24 h se observa que la cantidad removida de BaP, disminuye 10%, ya que para las 24 h la remoción de BaP alcanzó 81%. Se observa que la capacidad de *Chlorella vulgaris* CIBNOR se ve aumentada con respecto al tiempo. No se alcanzó una remoción del 100% de BaP debido a los tiempos de exposición cortos, a la remoción abiótica (tabla 7.8) y/o a la cantidad que se adhiere al material de vidrio utilizado.

**Tabla 7.8 Recobros y porcentaje de remoción abiótica**

HAP	Cantidad recuperada ( $\mu$ )	Remoción (%)	I.C.
BaP	2.63	34	0.01
BaA	2.66	33	0.03

#### Benzo[a]antraceno

Las cantidades de BaA que permanecieron en el medio disminuyeron significativamente dentro de las primeras 6 h de exposición. Las diferencias entre los bioensayos de 6 a 24 h son pequeñas. La figura 7.9b muestra que la cantidad

removida de BaA al tiempo de 0.75 h fue de 21%, para los tiempos de 1.5, 3 y 6 h la remoción fue de 52.5, 71.75 y 84.5% respectivamente. El bioensayo de 24 h muestra que la remoción del hidrocarburo disminuye en comparación con los anteriores tiempos de remoción solo 7.25% más que el tiempo de 6 h, llegando a un 91.75%

La cantidad de BaA removida es mayor que la cantidad removida de BaP, esto puede deberse a que BaA presenta una mayor solubilidad en agua en comparación con BaP.

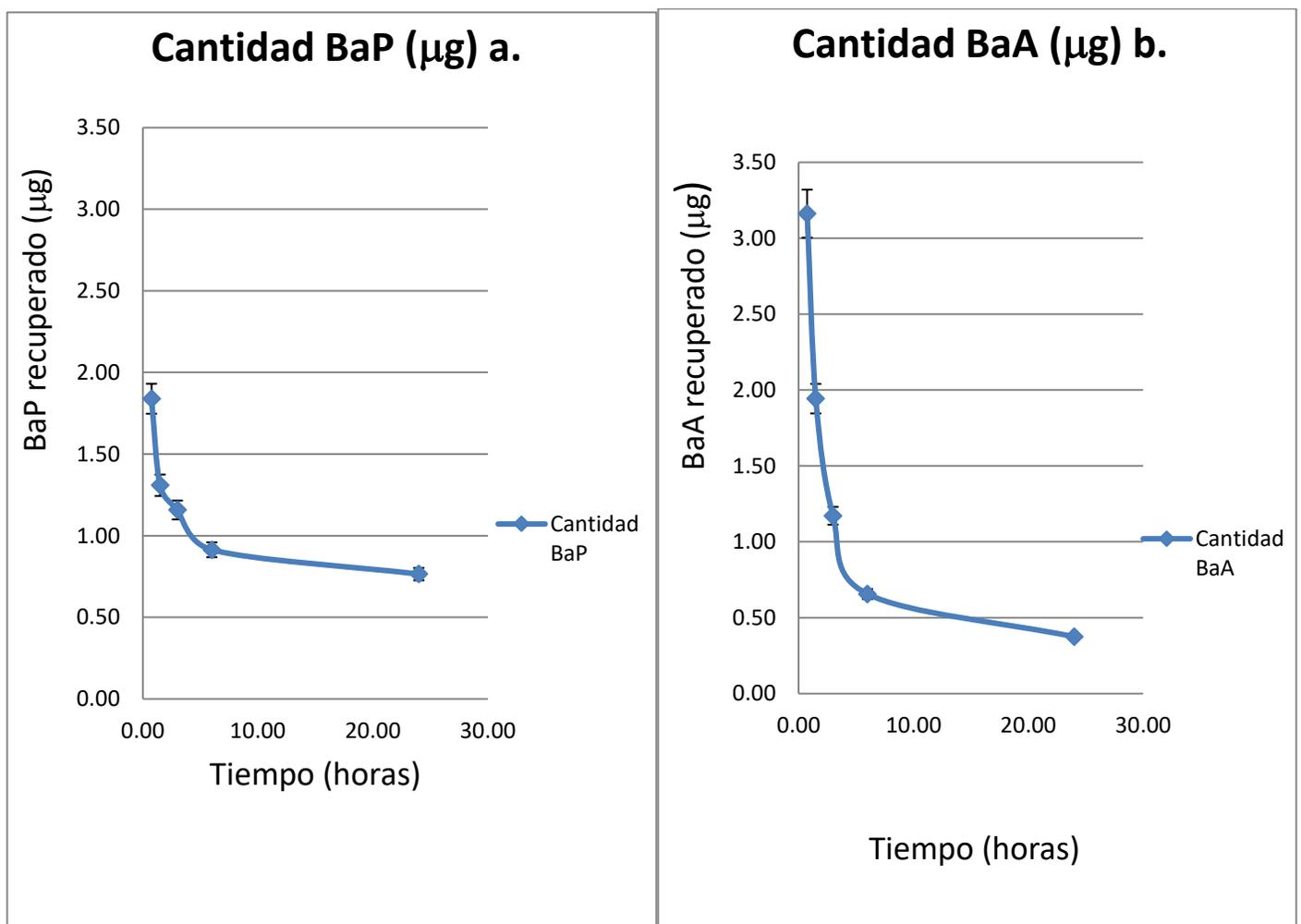


Figura 7.9. Cantidad de a) BaP y b) BaA recuperado por *C. vulgaris* CIBNOR en diferentes tiempos de exposición

### **7.7.2 *Chlorella vulgaris* LACET**

#### **Benzo[a]pireno**

En la figura 7.10a se presenta la remoción de BaP del medio con respecto al tiempo exposición. La cantidad de BaP removido en los tiempos de 0.75, 1.5 y 3.0 h son de 59.5, 50.75 y 44.74% respectivamente. La velocidad es grande en las primeras tres horas de exposición ya que más del 55% del BaP ha sido removido del medio. Después de las 3 h la cantidad presente en el medio de cultivo disminuye, representando el 22.5% de la cantidad inicial. La línea descendente muestra que de las 6 a las 24 h de exposición la degradación sigue una tendencia constante de disminución de BaP, por lo que se sugeriría tiempos de exposición más largos para comprobar la cantidad total de BaP removida del medio.

#### **Benzo[a]antraceno**

En la figura 7.10b observamos que la velocidad de remoción de BaA es grande en los primeros tres tiempos de exposición. La cantidad cuantificada de BaA del medio líquido va de 77.25% a las 0.75 h a 35.25% a las 3 h, lo que representa una remoción del 64.25%. Los siguientes dos tiempos de 6 y 24 h, muestran una disminución en la cantidad removida de BaA con 26.75% y 21.25% respectivamente. Comparando los tiempos de 3 y 24 h se observa una remoción de sólo 14% en 21 h de exposición. La cantidad cuantificada de los 6 a 24 h muestra una línea constante de BaA presente en el medio líquido con sólo 5.5% de remoción, lo que nos sugiere que la microalga disminuye considerablemente su capacidad de remoción después de las 6 h de contacto con el BaA.

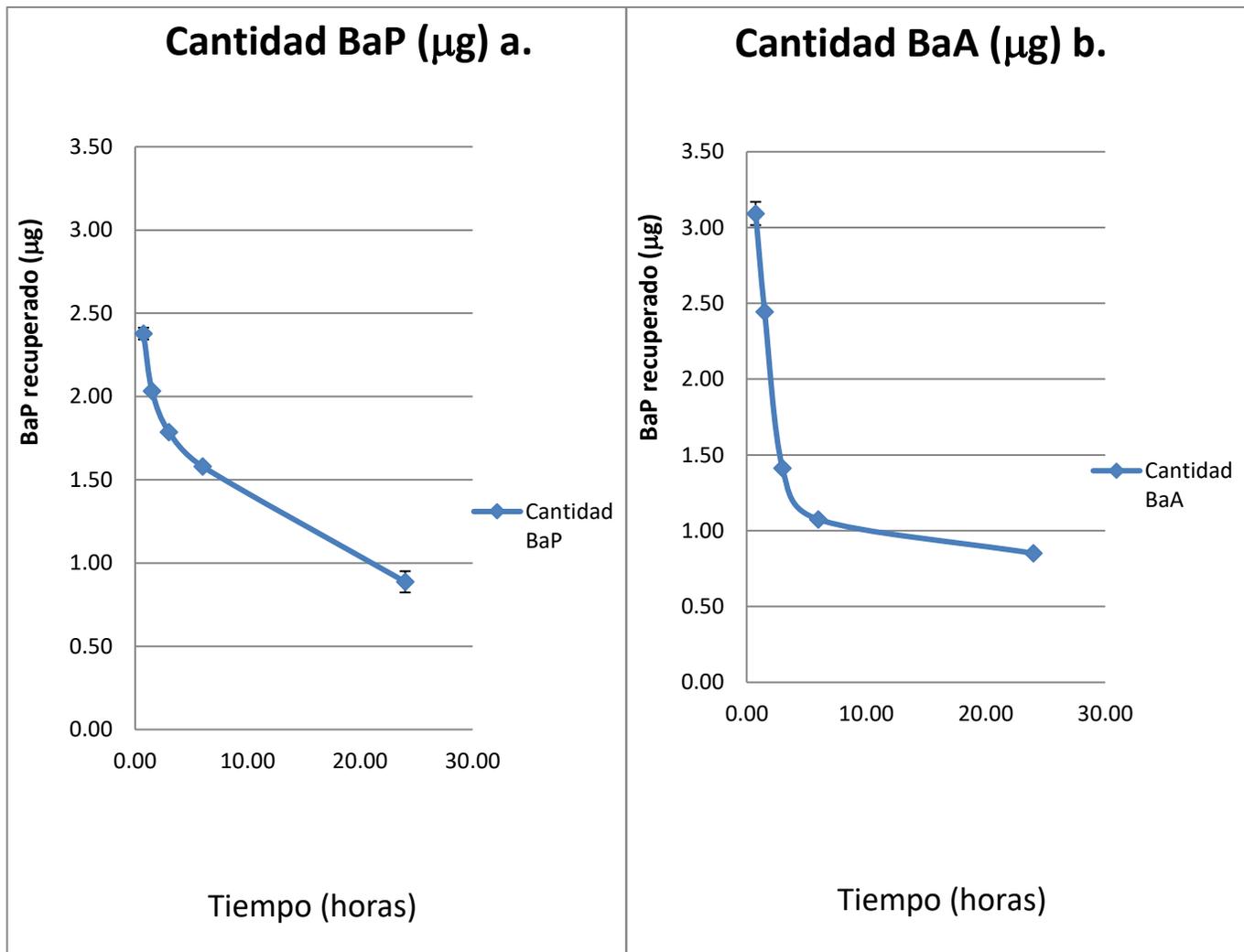


Figura 7.10. Cantidad de a) BaP y b) BaA recuperado por *C. vulgaris* LACET en diferentes tiempos de exposición

### 7.8 Comparación de ensayos de exposición

La señal obtenida en los cromatogramas va disminuyendo conforme pasa el tiempo, siendo el ensayo de exposición de 24 h el que muestra la señal de menor área.

La figura 7.11 muestra el % de remoción tanto de las microalgas *C. vulgaris* CIBNOR y LACET y la degradación abiótica o que es debida a otras condiciones independientes a las microalgas. La cantidad HAP presente en el medio del ensayo

abiótico se mantiene por encima de los ensayos con microalgas en todos los tiempos de exposición, esto muestra que mayormente la remoción es debida solamente a las microalgas. La disminución abiótica puede deberse a foto-oxidación, reacción que típicamente presentan los HAPs. Una propiedad de los HAPs es la baja solubilidad en agua, por lo que se sugiere que la cantidad removida del medio permanece en la pared lipídica de la pared celular y una pequeña cantidad en las paredes de vidrio del material utilizado.

### Benzo[a]pireno

La cantidad removida de BaP por parte de las dos microalgas, como se muestra en la figura 7.11a, varia hasta por un 18% en el tiempo de 1.5 h de exposición, siendo la microalga CIBNOR la que tiene el mayor porcentaje de remoción. Sin embargo, en el tiempo de 24 h para la microalga LACET el % de remoción es de 22.25 y para CIBNOR es de 19%, lo que solo representa un 3.25% de diferencia en la remoción de BaP. La remoción de las 6 a 24 h es mayor por parte de la microalga LACET que para CIBNOR con 17.25% y 3.75% respectivamente. Un análisis de varianza de un factor (ANDEVA, realizado en el programa Microsoft Excel 2007) muestra que F calculada en todos los tiempos de exposición es mayor que F de tablas (7.7086), lo que indica que hay diferencia significativa para degradar el BaP entre las microalgas *C. vulgaris* CIBNOR y LACET.

## **Benzo[a]antraceno**

La figura 7.11b. indica que la cantidad removida de BaA por parte de las microalgas *C. vulgaris* CIBNOR y LACET al tiempo de 0.75 h es muy similar, con 21% y 22.75% respectivamente. Los tiempos posteriores muestran una mayor remoción por parte de la microalga CIBNOR que LACET hasta en un rango de 12% para las 24 h de exposición. El bioensayo de 24 h muestra una mayor remoción por parte de CIBNOR con 90.75% y LACET con 78.75%, demostrando así una mayor eficiencia de CIBNOR para remover el BaA. Al realizar un análisis de varianza de un factor (ANDEVA, realizado en el programa Microsoft Excel 2007) muestra que F calculada es mayor que F de tablas (7.7086), a excepción del tiempo de exposición de 0.75 h el cual presenta una F calculada de (0.7942). Esto muestra que las microalgas *C.vulgaris* CIBNOR y LACET remueven de la misma manera el BaA en tiempos bajos, por debajo de los 45 min. Sin embargo la prueba indica que para los tiempos posteriores existe diferencia significativa entre *C.vulgaris* CIBNOR y LACET al remover BaA.

Al analizar por medio de ANDEVA los datos de remoción abiótica y la remoción por parte de las microalgas, indica que F calculada es mayor a F de tablas en todos los tiempos de exposición y se deduce que existen diferencias significativas entre la remoción abiótica y la remoción por *C.vulgaris* CIBNOR y LACET.

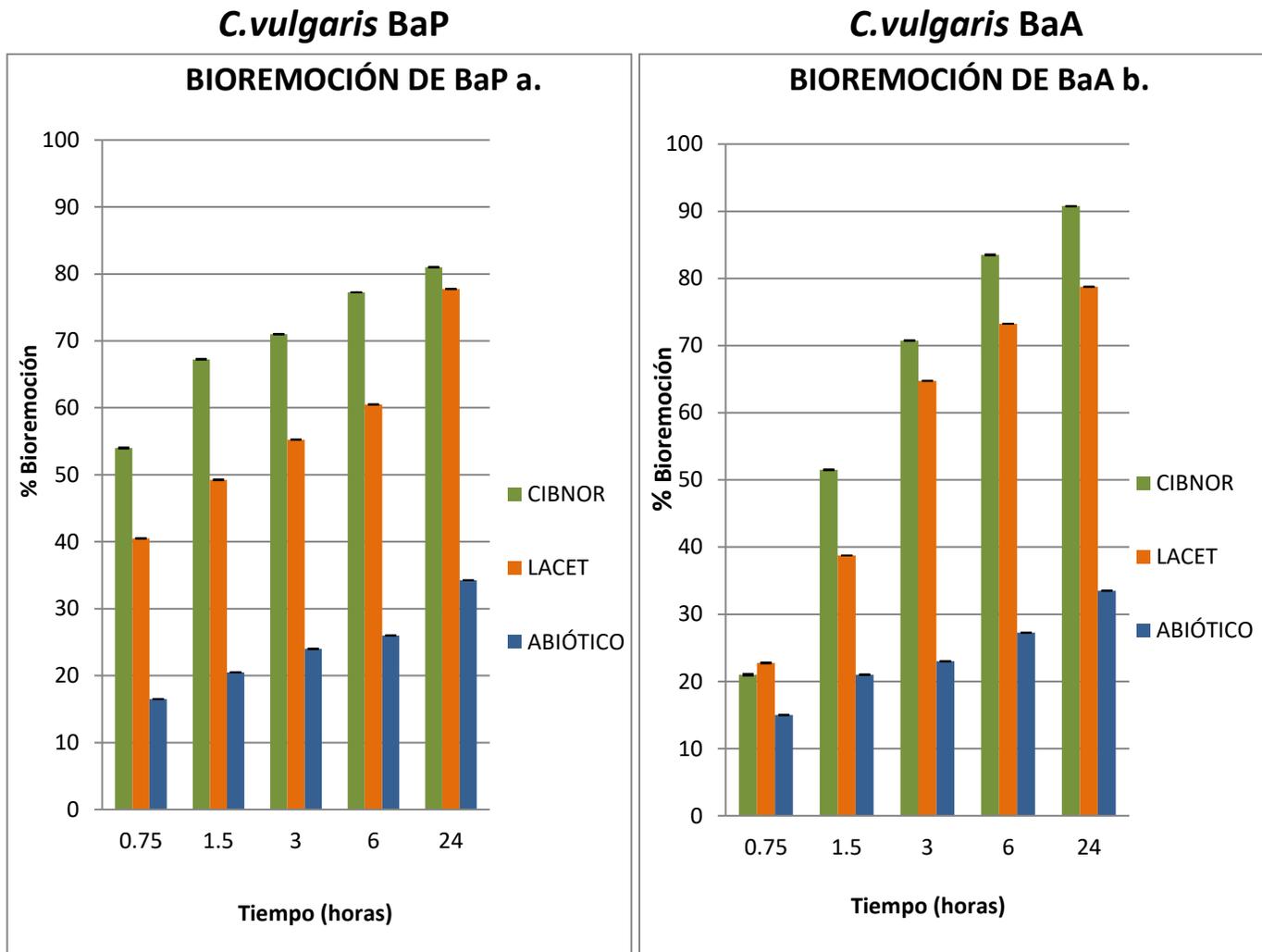


Figura 7.11. Porcentaje de Bioremediación de a) BaP y b) BaA por *C.vulgaris* CIBNOR y LACET

Los resultados muestran que, para realizar ensayos de exposición para la degradación de BaP y BaA, las dos microalgas evaluadas *C.vulgaris* CIBNOR o *C.vulgaris* LACET, se obtienen resultados estadísticamente diferentes. Sin embargo, se comprobó que ambas microalgas remueven los HAPs a los que fueron expuestas.

## 7.9 Comparación de la remoción de HAPs con las diferentes especies

Las figuras 7.12 y 7.13 demuestran que la cantidad de BaP y BaA removido a 1.5 h por parte de las microalgas *C.vulgaris* CIBNOR y LACET, *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*. En ambos casos el orden decreciente de remoción de HAP es:

*S. acutus* > *S. capricornutum* > *C. vulgaris* CIBNOR > *C. vulgaris* LACET

(44) hace la comparación de remoción de pireno de las mismas especies de microalgas del presente estudio, siendo en orden decreciente de remoción:

*S.capricornutum* > *S. acutus* > *C. vulgaris*

Aunque (33) muestra que la velocidad de remoción es mayor en *S. capricornutum*, la tasa de remoción puede diferir entre las diferentes especies de microalgas e incluso dentro de las mismas especies que sean de diferente origen u obtención (59). Lo que explica las diferencias entre las microalgas evaluadas incluso entre *C. vulgaris* CIBNOR y LACET, provenientes de diferentes laboratorios.

Un análisis de varianza de un factor (ANDEVA, realizado en el programa Microsoft Excel 2007) muestra que para BaP, F calculada (335.2) es mayor que F de tablas (4.06) y para BaA F calculada (152.8) es mayor que F de tablas (4.06), lo que indica que hay diferencia significativa en la remoción de BaP y BaA a 1.5 h de exposición para las cuatro microalgas evaluadas.

Las diferencias en la remoción y la transformación de los HAPs podrían estar relacionadas con las características propias de las células de la especie de

microalga, las variaciones en el tamaño de las células, forma, composición química, grupo taxonómico y origen de estas especies (44).

(60) explicó que la razón por la cual las microalgas mostraron mayor capacidad de absorción de metales que las macroalgas, podría atribuirse en parte a mayores proporciones de área superficial en contacto con los HAPs.

Estos resultados sugieren que, además del volumen y la forma de las células, otras características tales como composición y estructura de la pared celular podrían ser más determinantes en la remoción de contaminantes.

La causa de tener una mayor remoción por la microalga LACET podría deberse también a que este cultivo no es axénico, y pudiera tener, aunque en menor proporción, a otra(s) especies de microalgas que contribuyan también a la remoción.

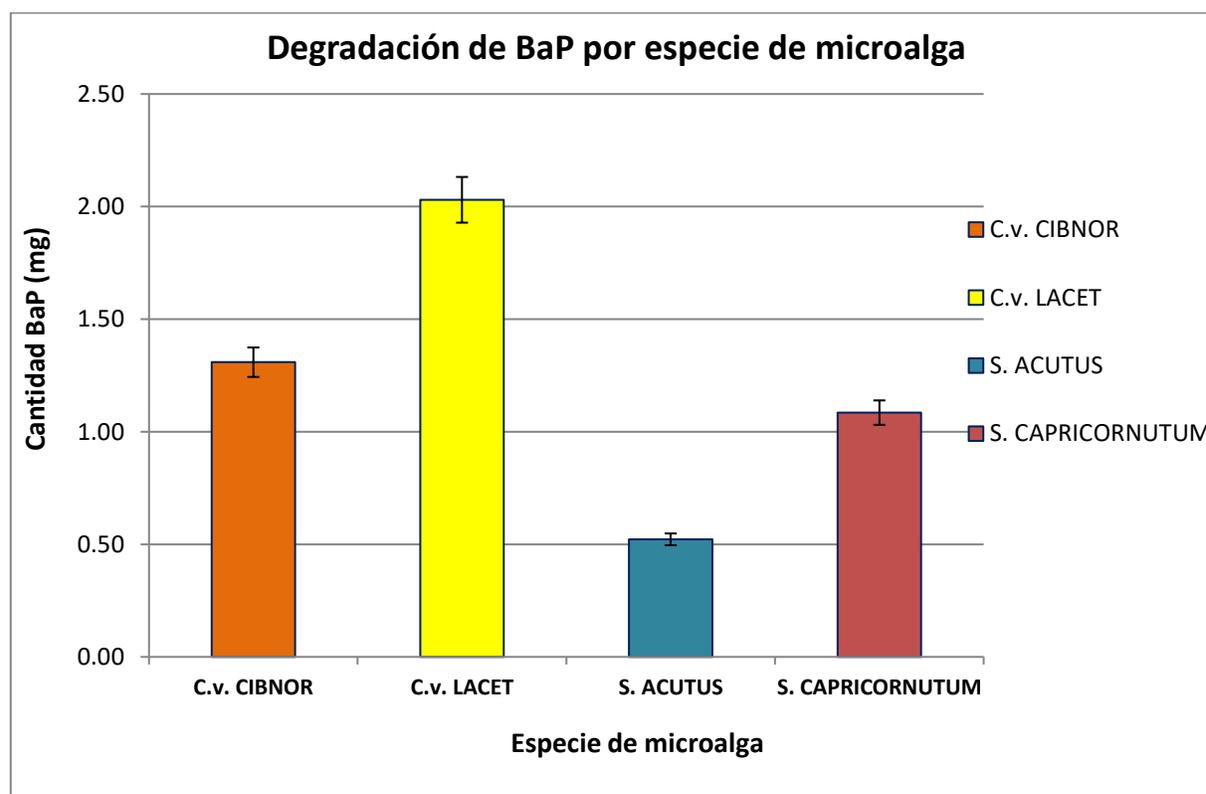


Figura 7.12. Cantidad de BaP removido por 4 diferentes especies de microalgas

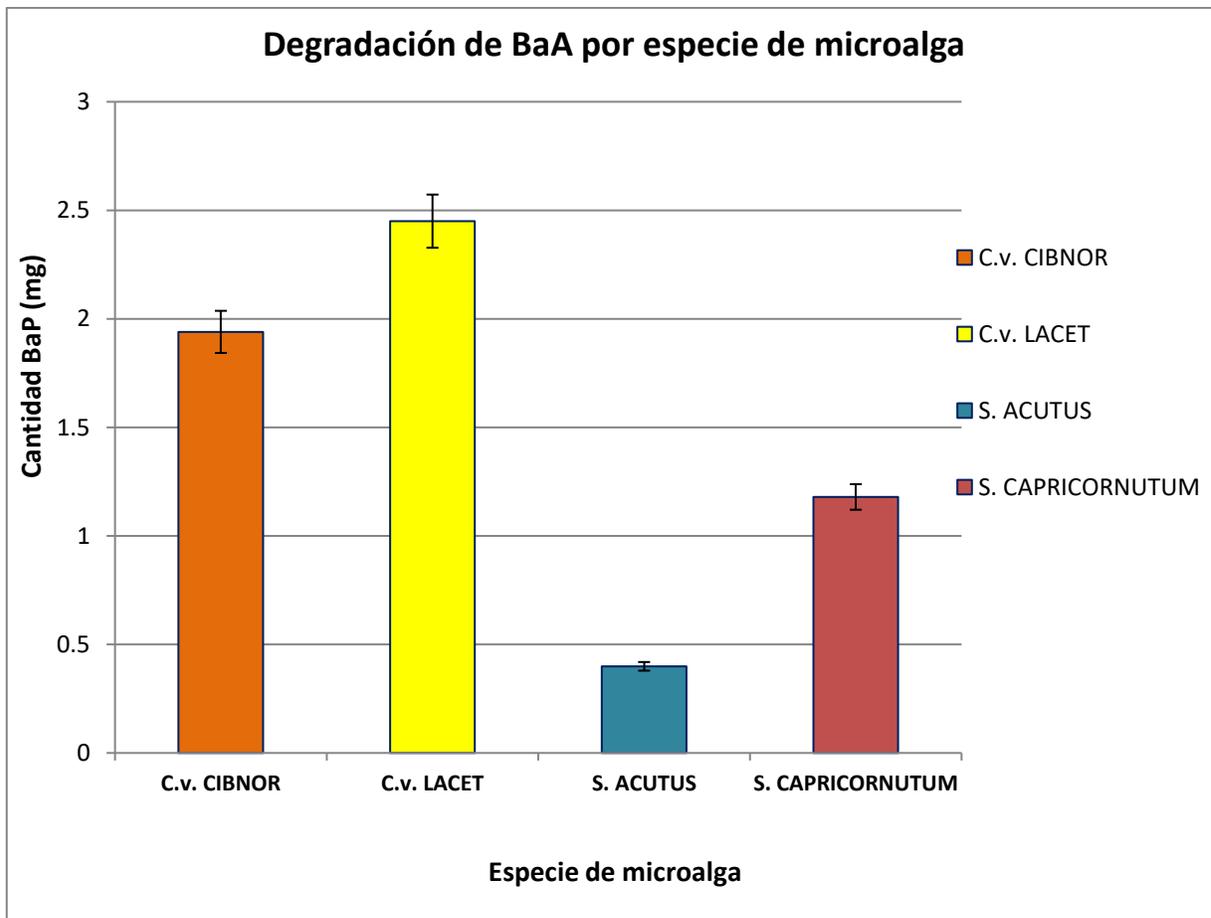


Figura 7.13. Cantidad de BaA removido por 4 diferentes especies de microalgas

## **8. CONCLUSIONES**

Se demostró linealidad y reproducibilidad en el sistema cromatográfico, así como en el método de EFS, evaluando el coeficiente de correlación  $r^2 > 0.99$  y el % CV < 10%.

Se estableció la curva de crecimiento de las microalgas *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET resultando el medio Basal Bold el adecuado para realizar el crecimiento de dicha microalga. Se demostró que el crecimiento de la microalga disminuye por la presencia de Benzo[a]pireno, mientras que Benzo[a]antraceno no influye de manera negativa en su crecimiento.

*Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET tienen la capacidad de remover hidrocarburos del medio acuoso, hasta 78.75% y 90.75% para Benzo[a]antraceno y 81% y 77.75% para Benzo[a]pireno respectivamente. Sin embargo, esta remoción presenta diferencias estadísticamente significativas al comparar ambas microalgas. Esto muestra que un factor importante para la capacidad de remoción de HAPs es el origen u obtención de la especie de microalga evaluada.

Las cuatro microalgas, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris* (CIBNOR y LACET) expuestas a Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno a un tiempo determinado, fueron capaces de remover los HAPs del medio. La cantidad removida varió estadísticamente entre especies, resultando *S. acutus* la que presentó mayor remoción.

## **9. PERSPECTIVAS**

Cuantificar la cantidad de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno presente en la biomasa algal de *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET mediante el método de Dispersión en Matriz en Fase Sólida (DMFS).

Realizar ensayos de exposición mayores a 24 h para evaluar la remoción de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno por *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET.

Evaluar la biotransformación de Benzo[a]antraceno y Benzo[a]pireno por *Chlorella vulgaris* CIBNOR y LACET.

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

(1) 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.

(2) Olmos Espejel J.J, García de Llasera M. M, Velazco 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*, 1262, 138–147.

(3) Lei A., Hu Z., Wong Y., Tam N. (2007). Removal of Xuoranthene and pyrene by diferent microalgal species. *Bioresource Technology*, 98, 273–280.

(5) González D., Ruiz L. M., Garralón G., Plaza F., Arévalo J., Parada J., Pérez J., Moreno B. (2010). Wastewater polycyclic aromatic hydrocarbons removal by membrane bioreactor, *Desalination and Water Treatment*, 42, 1-3, 94-99.

(6) Dabestani R., Ivanov N. (1999). Review a compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemical and Analytical Photochemistry and Photobiology*, 70(1), 10-34.

(7) Vela N, Martínez-Menchón M, Navarro G, Pérez-Lucas G, Navarro S. (2012). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from groundwater by heterogeneous photocatalysis under natural sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 232, 32–40.

(8) Tang L., Tang X.Y., Zhu Y.G., Zheng M.H., Miao Q.L., (2005). Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils. *Environment International*, 31, 822–828.

(9) Ravindra K., Sokhi R., Van Grieken R. (2008) Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42, 2895–2921.

(10) IARC. (1983). Some Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 3, 271.

(11) International Programme on Chemical Safety IPCS (2009). More than 30 new food safety standards adopted. *EUA: Codex Alimentarius Commission adopts international standards for dangerous bacteria, chemicals*. Disponible en: <http://www.who.int/ipcs/publications/en/>.

(12) International Programme on Chemical Safety IPCS (2001). Environmental Health Criteria 202. *EUA: Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons*. Disponible en: <http://www.who.int/ipcs/publications/en/>,

(13) Jongeneelen F. (2001). Benchmark Guideline for Urinary 1-Hydroxypyrene as Biomarker of Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *British Occupational Hygiene Society*, 45, 3–13.

(14) Birgül A., Tasdemir Y., Cindoruk S. (2011). Atmospheric wet and dry deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) determined using a modified sampler. *Turkey Atmospheric Research*, 101, 341–353.

(15) IARC. (2010). Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 92, 853.

(16) Homem V., Dias Z., Santos L., and Alves A., (2009). "Preliminary Feasibility Study of Benzo(a)Pyrene Oxidative Degradation by Fenton Treatment," Journal of Environmental and Public Health, 2009, 6.

(17) JECFA. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In Evaluation of Certain Food Contaminants. Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization, 64, 61-79.

(18) Lijinsky W. (1991). The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. Mutation Research, 259, 251-261.

(19) Ramesh A., Walker S., Hood D., Guillen M., Schneider K., Weyand E. (2004) Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. International Journal of Toxicology, 23 (5), 301– 333.

(20) NORMA Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.

(21) Stellman JM, McCan M. (1998) Hidrocarburos poliaromáticos. En: Encyclopaedia of Occupational Health and Safety: Chemical, industries and occupations International Labour Organization seccion.

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

(23) Denissenko M, Pao A, Tang M. (1994). Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hot spots in P53. *Science*, 274, 430-432.

(24) Liehr J. (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Reviews*, 21, 40-54.

(25) Rubio-Clemente, A., Torres-Palma, R. A., and Peñuela, G. A. (2014). "Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review." *Science of The Total Environment*, 478, 201–225.

(26) Ioannis D., Hrisi K., Constantinos V., (2011). Degradation of PAHs by high frequency ultrasound. *Water research*, 45, 2587–2594.

(27) Lima A., Ottosen L., Heister K., Gustav J.P. (2012). Loch Assessing PAH removal from clayey soil by means of electro-osmosis and electrodialysis. *Science of the Total Environment*, 1–6, 435–436.

(28) Krishnania K.K., Srinivesa S., Mohapatraa B.C., Boddue V. M., Haof J., X. Mengf, Mulchandania A. (2013). Hexavalent chromium removal mechanism using conducting polymers. *Journal of Hazardous Materials*, 252– 253 99– 106.

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

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

(31) Izquierdo A. (2013). Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de

poblaciones bacterianas y genes funcionales. (Tesis) Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

(32) Harayama S. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 268-273.

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

(34) García de Llasera M., Olmos-Espejel J., Diaz G., Montaña A. (2016). Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 3365–3375.

(35) 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.

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

(37) Juhasz, A.L., Stanley, G.A. and Britz, M.L. (2000), Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 396–401.

(38) Chan S., Luan T., Wong M., Tam N., (2006), Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (7), 1772–1779.

- (39) Boudreau T., Sibley P., Mabury S., Muir C., Solomon K. (2003). Laboratory Evaluation of the Toxicity of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Lemna gibba*, *Daphnia magna*, and *Daphnia pulicaria*. *Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 307–313.
- (40) Sturm S. M., Lamer L. (2011) An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production. *Applied Energy*, 88, 3499–3506.
- (41) Bhatnagar A., Chinnasamy S., Singh M. & Das K. C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88, 3425-3431.
- (42) Rawat, Y. S., Vishvakarma S. (2011). Pattern of fodder utilization in relation to sustainability under indigenous agroforestry systems, North-Western Himalaya, India. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6, 1-13.
- (43) Pires J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., Simões, M., (2012). Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 3043-3053.
- (44) Lei A.P., Wong Y.S., Tam N.F.Y., (2002). Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Science and Technology*, 46 (12), 195–201.
- (45) Thurman E. M., Mills M. S. (1998) *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. March 1998 in *chemical analysis a series of monographs on analytical Chemistry and Applications*, 147.
- (46) Beverly N. (2011). *Sample preparation of pharmaceutical dosage forms challenges and strategies for sample preparation and extraction*. Edit. Springer E.U.A.

(47) Técnicas Cromatográficas (2007) Química Analítica Instrumental II. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Ciudad de México, México.

(48) Snyder, L. R, Kirkland, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third edition, Wiley 2009, New York.

(49) García M. (2005) Los hidrocarburos policíclicos aromáticos asociados a combustibles fósiles. Caracterización, análisis y remediación (Tesis) Madrid: Universidad Politécnica de Madrid. España.

(50) Sampieri R. Metodología de la investigación. McGraw-Hill. 6ta edición. 2014.

(51) Montaña A. (2012), Manual de cultivo de microalgas. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. Ciudad de México, México.

(52) León M. (2016) Bioremoción de contaminantes orgánicos de medio acuoso con sistemas algales. (Tesis) Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM, Ciudad de México, México.

(53) Velasco M. (2011) Metodología analítica cromatográfica para la determinación de metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microalgas (Tesis), Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM, Ciudad de México, México.

(54) Diaz G. (2012) Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por la microalga *Selenastrum Capricornutum* mediante metodología de extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida acoplado a CLAR-UV (Tesis), Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM, Ciudad de México, México.

- (55) Ergene A., Ada K., Tan S., (2009). Removal of remazol brilliant blue R dye from aqueous solutions by adsorption on to immobilized *Scenedesmus quadricauda*: Equilibrium and kinetic modeling studies. *Desalination*, 249, 1308-1314.
- (56) Infante, Angulo E., Zárate A., Flores J., Barrios F., Zapata C., (2012). Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 159-164.
- (57) Alves F., Castro M.M. (2005). QSAR model the phototoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of molecular structure. Theoretical Chemistry*, 719, 191-200.
- (58) Levin W, Chang RL, Wood AW, Yagi H, Thakker DR, Jerina DM, Conney AH. (1984). High stereo selectivity among the optical isomers of the diastereomeric bay-region diol-epoxides of benz[*a*]anthracene in the expression of tumorigenic activity in murine tumor models. *Cancer Research*, 44(3), 929-933.
- (59) Tam N., Chong A., Wong W. (2002). Removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells. *Mar Pollution Bulletin*, 45, 362–371.
- (60) Pirszel J., Pawlik B., Skowronski T., (1995). Cation-exchange capacity of algae and cyanobacteria: a parameter of their metal sorption abilities. *Journal Industrial Microbiology*, 14, 319–322.

## 11. ANEXOS

### Composición de los medios utilizados para el de cultivo de microalgas

- Medio Bristol (*S. capricornutum*):

REACTIVO	Stok g/L H <sub>2</sub> O	Adición por litro (mL)
Nitrato de sodio (NaNO <sub>3</sub> )	25.00	10
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O)	2.50	10
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O)	7.50	10
Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	7.50	10
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	17.50	10
Cloruro de sodio (NaCl).	2.50	10

- Medio basal Bold (*C. vulgaris*)

REACTIVO	Stok g/L H <sub>2</sub> O	Adición por litro (mL)
Nitrato de sodio (NaNO <sub>3</sub> )	25.00	10
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O)	2.50	10
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O)	7.50	10
Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	7.50	10
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	17.50	10
Cloruro de sodio (NaCl).	2.50	10
Etilendiamintetracetato (EDTA)	50	1
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> )	4.98	1
Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.1	1
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	11.42	1
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> )	8.82	1
Cloruro de manganeso (MnCl <sub>2</sub> )	1.44	1
Oxido de molibdeno VI (MoO <sub>3</sub> )	0.71	1