



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE
METABOLITOS DEL BENZO(a)PIRENO FORMADOS POR
ENZIMAS INTRA Y EXTRA CELULARES DE *Selenastrum
capricornutum*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

AURA CITLALLI FUENTES PÉREZ



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: José de Jesús García Valdés
VOCAL: Profesor: Martha Patricia García Camacho
SECRETARIO: Profesor: Olivia Zamora Martínez
1er. SUPLENTE: Profesor: Claudia Inés Rivera Cárdenas
2° SUPLENTE: Profesor: María del Rosario Covarrubias Herrera

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO 2F, LABORATORIO DE ANÁLISIS DE TRAZAS
NÚMERO 227. CIRCUITO EXTERIOR S/N, COYOACÁN, CD. UNIVERSITARIA, 04510,
CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.**

ASESOR DEL TEMA: MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

SUPERVISOR TÉCNICO: MARÍA DEL ROSARIO COVARRUBIAS HERRERA

SUSTENTANTE: AURA CITLALLI FUENTES PÉREZ

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de obtener una formación profesional.

Gracias al Proyecto CONACYT CB-283377 “Actividad enzimática en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por microalgas” por el apoyo presupuestal otorgado. Al proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM IT202718 “Diseño y evaluación de un biorreactor microalgal para la remediación de un medio acuoso contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos” por el apoyo presupuestal y la beca otorgada.

Asimismo, se agradece al proyecto PAIP 5009034 de la Facultad de Química, UNAM por el apoyo presupuestal y al departamento de Superación Académica por permitirme formar parte del Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación”.

Finalmente, un especial agradecimiento a la Dra. Martha Patricia García Camacho y a la M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera, por la asesoría brindada en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS	4
1. ANTECEDENTES	5
1.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	5
1.1.1 Exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos	7
1.2 Eliminación de los HAPs en el medio ambiente	11
1.2.1 Factores que influyen en la degradación microbiana	12
1.3 Microalgas	14
1.3.1 Selenastrum capricornutum	16
1.4 Disrupción celular	18
1.4.1 Cuantificación de la ruptura celular	21
1.5 Disrupción con ultrasonido	22
1.6 Disrupción química	28
1.7 Extracción del material intracelular	30
1.7.1 Extracción de proteínas	31
1.7.2 Extracción de enzimas involucradas en la degradación de HAPs	32
1.8 Extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus metabolitos oxigenados	34
1.8.1 Extracción en Fase Sólida	36
1.8.2 Dispersión de Matriz en Fase Sólida	38
1.9 Análisis instrumental de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus metabolitos oxigenados	40

1.10 Validación	42
1.10.1 Parámetros de desempeño y criterios de aceptación	43
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	45
2.1 Equipo y material	45
2.1.1 Sistema cromatográfico	45
2.1.2 Disolventes	46
2.1.3 Estándares de hidrocarburo y metabolitos	46
2.1.4 Sistema de Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida	46
2.1.5 Lisis celular	46
2.1.6 Determinación de proteínas totales (Método de Lowry)	46
2.1.7 Cultivo de la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	47
2.1.8 Ensayos biológicos	47
2.1.9 Equipo, material y reactivos de usos múltiples	47
2.2 Cultivo de crecimiento de la microalga <i>S. capricornutum</i>	47
2.3 Metodología	48
2.3.1 Optimización de la metodología analítica	50
2.3.1.1 Optimización de condiciones cromatográficas	50
2.3.1.1.1 Condiciones cromatográficas para el análisis del benzo(a)pireno	50
2.3.1.1.2 Optimización de las condiciones cromatográficas para el análisis de los metabolitos del benzo(a)pireno	50
2.3.1.2 Optimización del procedimiento para la obtención del lisado celular	50
2.3.1.3 Obtención de los extractos enzimáticos intra y extracelular	53
2.3.1.3.1 Obtención del extracto enzimático extracelular (Ee)	54
2.3.1.3.2 Obtención del extracto enzimático intracelular (Ei)	54
2.3.1.4 Tratamiento de la muestra para el aislamiento y concentración del benzo(a)pireno y sus metabolitos	56
2.3.1.4.1 Método de Extracción en Fase sólida	56
2.3.1.4.2 Método de Dispersión de Matriz en Fase Sólida	57

2.3.2 Validación de analítica	58
2.3.2.1 Validación del sistema cromatográfico para el benzo(a)pireno y sus metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP	58
2.3.2.1.1 Benzo(a)pireno	58
2.3.2.1.2 Metabolitos 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno	60
2.3.2.2 Verificación del recobro y linealidad del método de EFS-CLAR (UV) para el BaP y del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en el medio de cultivo líquido	61
2.3.2.3 Validación del método de EFS-CLAR (UV) para el BaP y del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en el lisado celular	62
2.3.2.3.1 Tratamiento del lisado celular	62
2.3.2.3.2 Evaluación de interferentes en la matriz	62
2.3.2.3.3 Fortificación del lisado celular	62
2.3.2.3.4 Benzo(a)pireno	63
2.3.2.3.5 Metabolitos 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno	64
2.3.2.3.6 Robustez	65
2.3.3 Bioensayos de exposición	65
2.3.3.1 Bioensayos de activación de medios de cultivo de <i>Selenastrum capricornutum</i> (controles de remanente)	69
2.3.3.2 Bioensayos de actividad enzimática en extractos celulares	70
2.3.3.2.1 Determinación de proteínas totales en el extracto intracelular y extracelular	70
2.3.3.2.2 Bioensayos de actividad enzimática a partir de células activadas	70
2.3.3.2.3 Evaluación de la actividad enzimática del extracto intracelular proveniente de microalgas lisadas en presencia de dodecilsulfato de sodio	71
2.3.3.2.4 Evaluación de la actividad enzimática de extractos celulares provenientes de microalgas no activadas	72

2.3.3.3 Control metabólico	73
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
3.1 Cultivo de crecimiento de la microalga <i>S. capricornutum</i>	74
3.2 Optimización de la metodología analítica	75
3.2.1 Optimización de condiciones cromatográficas	75
3.2.1.1 Condiciones cromatográficas para el análisis del benzo(a)pireno	75
3.2.1.2 Optimización de las condiciones cromatográficas para el análisis de los metabolitos del benzo(a)pireno	75
3.2.1.3 Condiciones cromatográficas finales para el análisis de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP	80
3.2.3 Optimización del procedimiento para la obtención del lisado celular	80
3.3 Validación analítica	91
3.3.1 Validación del sistema cromatográfico para el benzo(a)pireno y sus metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP	91
3.3.1.1 Benzo(a)pireno (BaP)	91
3.3.1.2 Metabolitos 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno	92
3.3.2 Verificación del recobro y linealidad del método de EFS-CLAR (UV) para el BaP y del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en el medio de cultivo líquido	94
3.3.3 Validación del método de EFS-CLAR (UV) para el BaP y del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en el lisado celular	97
3.3.3.1 Evaluación de interferentes en la matriz	97
3.3.3.2 Benzo(a)pireno	98
3.3.3.3 Metabolitos 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno	101
3.3.3.4 Robustez	104

3.4 Bioensayos de exposición	107
3.4.1 Bioensayos de activación de medios de cultivo de <i>Selenastrum capricornutum</i> (controles de remanente)	107
3.4.2 Bioensayos de actividad enzimática en extractos celulares	121
3.4.2.1 Determinación de proteínas totales en el extracto intracelular y extracelular	123
3.4.2.2 Bioensayos de actividad enzimática a partir de células activadas	125
3.4.2.3 Evaluación de la actividad enzimática del extracto intracelular proveniente de microalgas lisadas en presencia de dodecilsulfato de sodio	137
3.4.2.4 Evaluación de la actividad enzimática de extractos celulares provenientes de microalgas no activadas	141
3.4.3 Control metabólico	143
4. CONCLUSIÓN	150
REFERENCIAS	152
ANEXOS	160

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
BaP	Benzo(a)pireno
4,5-cis dBaP	4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno
7,8-cis dBaP	7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno
H ₂ O	Agua
MeOH	Metanol
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tris-HCl	Clorhidrato de trisaminometano
CCAyAC	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CV	Coeficiente de variación
DF	Detector de fluorescencia
DMFS	Dispersión de matriz en fase sólida
EFS	Extracción en fase sólida
Ee	Extracto extracelular
Ei	Extracto intracelular
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
k'	Factor de capacidad
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
N	Número de platos teóricos
R	Resolución
t _r	Tiempo de retención
t ₀	Tiempo muerto
λ _{em}	Longitud de onda de emisión
λ _{ex}	Longitud de onda de excitación
λ _{max}	Longitud de onda de máxima absorción
TA	Temperatura ambiente
α	Selectividad
r	Coeficiente de correlación
r ²	Coeficiente de determinación
UV	Detección ultravioleta

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas del benzo(a)pireno y sus metabolitos	18
Tabla 1.2. Criterios de aceptación	43
Tabla 1.3. Recuperación para residuos y contaminantes en alimentos y agua	44
Tabla 1.4. Repetibilidad y reproducibilidad para residuos y contaminantes en alimentos y agua	44
Tabla 2.1. Condiciones de los ensayos para la optimización de la lisis celular	53
Tabla 2.2. Identificación y objetivo de los ensayos biológicos	67
Tabla 3.1. Parámetros cromatográficos para los metabolitos del BaP analizados a temperatura ambiente y a 30 °C	80
Tabla 3.2. Experimentos de lisis celular de la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> empleando un baño de ultrasonido (Branson, modelo 1510 de 47 kHz)	81
Tabla 3.3. Lisis de la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> en una disolución de cloruro de sodio 0.9 %, empleando el procesador ultrasónico Cole-Parmer modelo CPX 130 PB, variando el tiempo de procesamiento y la amplitud de las ondas acústicas	83
Tabla 3.4. Lisis de la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> , empleando el procesador ultrasónico Cole-Parmer modelo CPX 130 PB. Tiempo de procesamiento de 6 min a una amplitud del 80 %, variando el medio de resuspensión de las células	84
Tabla 3.5. Límites de detección y cuantificación del sistema para el benzo(a)pireno	92
Tabla 3.6. Límites de detección y cuantificación del sistema para los metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno	94
Tabla 3.7. Límites de detección y cuantificación del método de EFS-CLAR (UV) para el benzo(a)pireno en el lisado celular	99
Tabla 3.8. Límites de detección y cuantificación del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en el lisado celular	102
Tabla 3.9. Comparación entre los experimentos de recuperación en el lisado celular con y sin dodecilsulfato de sodio (SDS), n=3	106

Tabla 3.10. Cantidad de benzo(a)pireno y sus metabolitos en el medio líquido y la biomasa, después de la exposición primaria de 48 h y 72 h a 25 °C	108
Tabla 3.11. Cantidad de benzo(a)pireno y sus metabolitos en el medio líquido y la biomasa, después de la exposición primaria a BaP de 3 h, 48 h y 72 h a 34 °C	114
Tabla 3.12. Determinación de proteínas totales en los extractos enzimáticos obtenidos a partir de microalgas expuestas y no expuestas a BaP durante 72 h a 34 °C	124
Tabla 3.13. Cantidad de analitos obtenidos en los extractos extracelular e intracelular después de realizar los bioensayos enzimáticos y en los controles de remanentes; (activación: 72 h a 25 °C, exposición enzimática: 3 h a TA)	126
Tabla 3.14. Cantidad de analitos obtenidos en los extractos extracelular e intracelular después de realizar los bioensayos enzimáticos y en los controles de remanentes; (activación: 72 h a 34 °C, exposición enzimática: 3 h a TA)	131
Tabla 3.15. Cantidad de analitos obtenidos en el bioensayo enzimático con SDS en comparación con el bioensayo enzimático sin SDS; (activación: 72 h a 34 °C, exposición enzimática: 3 h a TA)	138
Tabla 3.16. Cantidad de benzo(a)pireno y sus metabolitos presentes en el medio líquido y la biomasa después de realizar el bioensayo de control metabólico y la exposición primaria de 3 h a 34 °C	144

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura química de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos	6
Figura 1.2. Destino de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el medio ambiente	7
Figura 1.3. Representación de una posible vía metabólica del benzo(a)pireno en humanos	9
Figura 1.4. Esquema general de la biodegradación aeróbica de contaminantes orgánicos	12
Figura 1.5. Productos de transformación del benzo(a)pireno por microalgas	17
Figura 1.6. Clasificación de los métodos de disrupción celular	20
Figura 1.7. Baño de ultrasonido (A) y procesador ultrasónico (B)	24
Figura 1.8. Esquema de los componentes principales del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	41
Figura 2.1. Medio líquido (A) y medio sólido (B) de la microalga <i>S. capricornutum</i>	48
Figura 2.2. Esquema general del procedimiento experimental	49
Figura 2.3. Experimentos para la optimización del método de lisis celular, a. Baño ultrasónico, b. Procesador ultrasónico	51
Figura 2.4. Procedimiento para la obtención del extracto enzimático extracelular	54
Figura 2.5. Condiciones para la obtención del extracto enzimático intracelular	55
Figura 2.6. Procedimiento de extracción en fase sólida empleado para aislar y concentrar el BaP y sus metabolitos de las muestras	57
Figura 2.7. Procedimiento de dispersión de matriz en fase sólida para aislar y concentrar el BaP y sus metabolitos de la biomasa de la microalga <i>S. capricornutum</i>	58
Figura 2.8. Procedimiento general de los ensayos biológicos	68
Figura 2.9. Bioensayos de actividad enzimática: exposición de los extractos enzimáticos a benzo(a)pireno, tratamiento de la muestra y su análisis	71
Figura 3.1. Curva de crecimiento de la microalga <i>S. capricornutum</i> en 250 mL de medio de cultivo Bristol con proteosa peptona	74

- Figura 3.2. Cromatograma de la disolución estándar de benzo(a)pireno de 1 mg/L en acetonitrilo 75
- Figura 3.3. Cromatograma de los estándares de los metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dBaP (50 µg/L) en disolución 55:45 v/v acetonitrilo:agua ($R_{4,5\text{-cis dBaP}, 7,8\text{-cis dBaP}} = 1.921$, $\alpha_{4,5\text{-cis dBaP}, 7,8\text{-cis dBaP}} = 1.129$), y cromatograma de los metabolitos en el medio líquido de la microalga *S. capricornutum* expuesta a BaP durante 3 h a 25 °C. Columna Hypersil Green PAH, ThermoQuest (100 mm x 4.6 mm D.I.; diámetro de partícula de 5 µm). Temperatura ambiente, fase móvil 65:35 v/v metanol:agua, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 264$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm) 76
- Figura 3.4. Cromatograma de los metabolitos producidos en el medio líquido por la microalga *S. capricornutum* por la exposición a BaP durante 3 h a 25 °C, en la columna 2 Spherisorb 5 ODS (Phenomenex) y la columna 3 Spheri-5-ODS (Perkin Elmer); ambas de 250 mm x 4.6 mm D.I. y diámetro de partícula de 5 µm. A temperatura ambiente, fase móvil 65:35 v/v metanol:agua, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 264$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm) 77
- Figura 3.5. Cromatograma de los metabolitos producidos por la microalga *S. capricornutum* expuesta a BaP durante 3 h a 25 °C, utilizando la columna 3 Spheri-5-ODS, Perkin Elmer (250 mm x 4.6 mm D.I.; diámetro de partícula de 5 µm). Analizados en una fase móvil 65:35 y 60:40, metanol:agua en ambos casos. Temperatura ambiente, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 264$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm) 78
- Figura 3.6. Cromatograma de los metabolitos producidos en el medio líquido por la microalga *S. capricornutum* expuesta a BaP durante 3 h a 25 °C. Utilizando la columna 3 Spheri-5-ODS, Perkin Elmer (250 mm x 4.6 mm D.I.; diámetro de partícula de 5 µm); a diferentes temperaturas de análisis: temperatura ambiente y 30 °C. Fase móvil 65:35 metanol:agua, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 264$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm) 79
- Figura 3.7. Microalgas *Selenastrum capricornutum* antes (A) y después (B) de haber sido sometidas al proceso de lisis celular durante 5 min por pulsos de 10 s con pausas de 5 s a una amplitud del 40 %, usando el procesador ultrasónico digital Branson modelo 450 88
- Figura 3.8. Células enteras de las microalgas *S. capricornutum* 89
- Figura 3.9. Células de la microalga *S. capricornutum* después del proceso de lisis; A. Fragmentos celulares, B. Célula dividida por la mitad, C. Células semivacías, D. Células vacías 90

Figura 3.10. Curva de calibración obtenida para el benzo(a)pireno mediante cromatografía de líquidos con detección ultravioleta (λ_{\max} = 263 nm), n=3	91
Figura 3.11. Curva de calibración obtenida para el 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno mediante cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia (λ_{ex} = 264 nm; λ_{em} = 390 nm), n=3	93
Figura 3.12. Concentración recuperada de benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de medio de cultivo líquido	95
Figura 3.13. Concentración recuperada de 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de medio de cultivo líquido	96
Figura 3.14. Concentración recuperada de 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a las muestras de medio de cultivo líquido	96
Figura 3.15. Cromatogramas de un extracto blanco (fracción A) y una disolución estándar de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP de 25 $\mu\text{g/L}$ en 55:45 v/v, acetonitrilo:agua	97
Figura 3.16. Cromatogramas de un extracto blanco (fracción B) y de una disolución estándar de benzo(a)pireno de 0.1 mg/L en acetonitrilo	98
Figura 3.17. Curva de calibración obtenida para el benzo(a)pireno en muestras de lisado celular mediante cromatografía de líquidos con detección ultravioleta (λ_{\max} = 263 nm), n=3	99
Figura 3.18. Concentración recuperada de benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular	100
Figura 3.19. Curva de calibración obtenida para el 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en el lisado celular mediante cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia (λ_{ex} = 264 nm; λ_{em} = 390 nm) n=3	101
Figura 3.20. Concentración recuperada de 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular	103
Figura 3.21. Concentración recuperada de 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular	103

Figura 3.22. Concentración recuperada de benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular sin SDS	104
Figura 3.23. Concentración recuperada de 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular sin SDS	105
Figura 3.24. Concentración recuperada de 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular sin SDS	105
Figura 3.25. Cromatogramas del extracto de benzo(a)pireno proveniente del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 48 h y 72 h a 25 °C	109
Figura 3.26. Cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 48 h y 72 h a 25 °C	110
Figura 3.27. Cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 72 h a 25 °C	111
Figura 3.28. Cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 3 h a 34 °C	113
Figura 3.29. Cromatogramas del extracto de benzo(a)pireno proveniente del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 3 h, 48 h y 72 h a 34 °C	116
Figura 3.30. Cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 3 h, 48 h y 72 h a 34 °C	117
Figura 3.31. Microgramos totales (medio líquido + biomasa) de benzo(a)pireno presentes después de la exposición primaria en diferentes periodos de tiempo a 25 °C y 34 °C	119
Figura 3.32. Microgramos totales (medio líquido + biomasa) del metabolito 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno presentes después de la exposición primaria en diferentes periodos de tiempo a 25 °C y 34 °C	119

Figura 3.33. Curva de calibración espectrofotométrica de la proteína albumina de suero bovino para la determinación de proteínas por el método de Lowry, n=2	123
Figura 3.34. Cromatogramas del benzo(a)pireno en el extracto extracelular e intracelular, se compara el BaP obtenido después del bioensayo enzimático y el BaP remanente después de la exposición primaria de 72 h a 25 °C	128
Figura 3.35. Cromatograma de los metabolitos en el extracto extracelular e intracelular, se comparan los metabolitos obtenidos después del bioensayo enzimático contra el remanente después de la exposición primaria de 72 h a 25 °C	129
Figura 3.36. Cromatogramas del benzo(a)pireno en el extracto extracelular e intracelular, se compara el BaP obtenido después del bioensayo enzimático y el BaP remanente después de la exposición primaria de 72 h a 34 °C	133
Figura 3.37. Cromatograma de los metabolitos en el extracto extracelular e intracelular, donde se comparan los metabolitos obtenidos después del bioensayo enzimático contra los metabolitos remanentes después de la exposición primaria de 72 h a 34 °C	134
Figura 3.38. Microgramos netos del metabolito 4,5-cis dBaP producidos por las enzimas presentes en los extractos intracelular y extracelular, obtenidos a partir de medios de cultivo activados durante 72 h a 25 °C y 34 °C	135
Figura 3.39. Microgramos netos de BaP recuperados, que no fueron degradados por las enzimas presentes en los extractos intracelular y extracelular, obtenidos a partir de medios de cultivo activados durante 72 h a 25 °C y 34 °C	136
Figura 3.40. Cromatogramas del benzo(a)pireno en el extracto intracelular, donde se compara el BaP recuperado después de realizar el bioensayo enzimático con y sin SDS	139
Figura 3.41. Cromatogramas de los metabolitos en el extracto intracelular, donde se comparan los metabolitos recuperados después del bioensayo enzimático con y sin SDS	139

Figura 3.42. Cantidad neta del metabolito 4,5-cis dBaP producida por las enzimas presentes en los extractos intracelulares obtenidos a partir de microalgas activadas durante 72 h a 34 °C y lisadas con el procesador ultrasónico, en disoluciones con y sin dodecilsulfato de sodio	140
Figura 3.43. Cromatogramas de los metabolitos en el extracto intracelular y extracelular, obtenidos a partir de microalgas no activadas, después de realizar los bioensayos enzimáticos	142
Figura 3.44. Microgramos totales de benzo(a)pireno no degradado después de la exposición primaria de 3 h a 34 °C y después de realizar el control metabólico (exposición primaria de 72 h a 34 °C seguido de la exposición secundaria de las células enteras durante 3 h a 34 °C)	145
Figura 3.45. Cromatogramas del extracto de benzo(a)pireno proveniente del medio de cultivo líquido y la biomasa para el control metabólico, la exposición primaria de 3 h a 34 °C y el BaP remanente en la biomasa después de la exposición primaria de 72 h a 34 °C	146
Figura 3.46. Cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa para el control metabólico, la exposición primaria de 3 h a 34 °C, y los metabolitos remanentes en la biomasa después de la exposición primaria de 72 h a 34 °C	148
Figura 3.47. Microgramos totales de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP presentes en la exposición primaria de 3 h a 34 °C y en el bioensayo de control metabólico (exposición primaria de 72 h a 34 °C seguido de una exposición secundaria de las células enteras durante 3 h a 34 °C)	149

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha surgido interés por estudiar y eliminar compuestos orgánicos xenobióticos del medio ambiente, entre ellos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), compuestos no polares constituidos por la unión de anillos aromáticos en diferentes arreglos (Patnaik, 2017). Su formación ocurre mediante la combustión incompleta de materia orgánica de forma natural por incendios o erupciones volcánicas, aunque la mayor fuente de producción y acumulación excesiva en el ambiente se debe a causas antropogénicas como derrames de petróleo, emisiones vehiculares, quema de combustible fósil, actividad industrial, etc. (Kaushik et al., 2006; Abdel-Shafy et al., 2015).

Se ha relacionado la exposición a los HAPs con afecciones a la salud en humanos y otros mamíferos, cuando estos contaminantes se metabolizan en los tejidos del organismo, forman compuestos de degradación (metabolitos) que interactúan con el ADN, lo que puede derivar en mutaciones genéticas y cáncer (Mastandrea et al., 2005; Kumar et al., 2014; Abdel-Shafy et al., 2015).

En consecuencia, se hace prioritaria la eliminación de los HAPs del ambiente, lo cual puede hacerse mediante procesos de adsorción e incineración, fotólisis, oxidación química y degradación microbiana (Rubio-Clemente et al., 2014). Este último método, utiliza organismos vivos para transformar los HAPs a través de reacciones catalizadas biológicamente. La biodegradación puede conducir hasta la formación de moléculas inorgánicas como CO_2 , H_2O y NH_3 , así como otras moléculas a base de carbono para el crecimiento celular. Además es un método seguro, rentable y con la posibilidad de aplicarse *in situ*. Los microorganismos que se han encontrado como degradadores de HAPs pertenecen al grupo de las bacterias, los hongos y las microalgas (Ghosal et al., 2016; Singh et al., 2004). Se sabe que las bacterias producen enzimas dioxigenasas que median el proceso de oxidación para generar sustancias que formen parte del metabolismo microbiano como ácido succínico, fumárico, pirúvico, aldehídos, entre otros, sustancias que son utilizadas como fuente de energía y para la síntesis de biomasa. Los hongos utilizan enzimas extracelulares como las lignino peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas para catalizar las reacciones de oxidación; también utilizan mecanismos que involucran monooxigenasas del citocromo P-450, aunque pocas

especies pueden mineralizar los HAPs (Juhász et al., 2000). Contrariamente, en el caso de las microalgas, las rutas metabólicas no están bien elucidadas, aunque sí se ha reportado la existencia de algunos productos de degradación del tipo dihidrodiol vecinales cis, lo que indicaría que estos microorganismos emplean dioxigenasas al igual que las bacterias (Warshawsky et al., 1988; García de Llasera et al., 2016). Sin embargo, también se ha sugerido la participación de enzimas monooxigenasas por la presencia de metabolitos monohidroxilados (Ke et al., 2010). La controversia existe y hasta el momento aún no se ha aislado ni caracterizado el sistema enzimático encargado de la oxidación de los hidrocarburos.

Por lo tanto, es necesario continuar la investigación para elucidar el metabolismo microalgal de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, identificar los productos de degradación, estudiar su estabilidad, distribución y transformaciones subsecuentes en estos microorganismos. Igualmente, es fundamental estudiar los mecanismos enzimáticos involucrados, para lo cual es necesario desarrollar métodos para la obtención de las enzimas funcionales, y así, realizar su identificación, purificación y caracterización.

La microalga *Selenastrum capricornutum* se ha estudiado por su capacidad de transformar HAPs de alto peso molecular, como el benzo(a)pireno (BaP), pero hasta la fecha, no se ha estudiado la producción enzimática de esta microalga. Por tanto, en el presente trabajo, se pretende aportar información acerca de las enzimas encargadas de la degradación del BaP, al evidenciar su presencia en el medio de cultivo líquido y en el lisado celular después de activar las microalgas por exposición previa al contaminante. Se evaluó la capacidad de degradación de los extractos enzimáticos obtenidos a dos temperaturas diferentes y se desarrolló una metodología analítica para la extracción y cuantificación a nivel de trazas del hidrocarburo y sus metabolitos, mediante el empleo de la extracción en fase sólida y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Los métodos analíticos se validaron con el fin de obtener resultados confiables que permitan evaluar los procesos biológicos.

Se espera que la generación de nuevos conocimientos sobre la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por microalgas, permita el desarrollo de nuevas tecnologías para la biorremediación de los ecosistemas.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es desarrollar y aplicar una metodología analítica validada basada en extracción en fase sólida (EFS) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección ultravioleta y de fluorescencia para evaluar si la degradación del benzo(a)pireno (BaP) realizada por células microalgales persiste en sus extractos enzimáticos intra y extracelular, provenientes de cultivos preexpuestos (activados) de la microalga *Selenastrum capricornutum*.

Metas

Analíticas

- a) Verificar el método EFS-CLAR-UV/DF para el análisis del benzo(a)pireno y sus metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en el medio de cultivo líquido, con el fin de confirmar su correcta aplicación.
- b) Evaluar el grado de lisis celular de la microalga *S. capricornutum* con diferentes disoluciones y equipos de ultrasonido para seleccionar las mejores condiciones que garanticen la ruptura de las células.
- c) Desarrollar y validar un método de EFS-CLAR-UV/DF para cuantificar el benzo(a)pireno y sus metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en el lisado celular.
- d) Determinar las concentraciones de benzo(a)pireno y sus metabolitos en el medio de cultivo líquido y en la biomasa después de la exposición primaria al hidrocarburo, a fin de seleccionar las mejores condiciones de tiempo y temperatura para la activación de las microalgas.
- e) Determinar las concentraciones de benzo(a)pireno y sus metabolitos en los extractos enzimáticos intra y extracelular, provenientes de cultivos activados, después de la exposición secundaria al hidrocarburo con el propósito de evaluar la actividad enzimática

- f) Comparar la actividad enzimática en lisados de microalgas activadas, procesadas en presencia y ausencia de dodecilsulfato de sodio, a fin de evaluar el efecto del SDS en la extracción de la enzima degradadora.

Biológicas

- a) Obtener extractos enzimáticos funcionales para la degradación del benzo(a)pireno que demuestren la formación de metabolitos después de su exposición.
- b) Comparar la producción de la enzima degradadora de benzo(a)pireno a dos temperaturas de activación de los cultivos, con el objetivo de evaluar la correlación de la degradación con la temperatura.

HIPÓTESIS

- a) Si se detecta la presencia de metabolitos en los extractos celulares después de la incubación con benzo(a)pireno, entonces será indicación de actividad enzimática.
- b) Si el aumento de la temperatura de activación de las microalgas incrementa su metabolismo, entonces aumentará la producción de los metabolitos en los extractos intra y extracelular.
- c) Si no se detecta la formación de metabolitos en los extractos celulares obtenidos a partir de medios de cultivo no activados, entonces se demostrará la necesidad de realizar la exposición primaria de las microalgas (activación) para estimular la producción de la enzima encargada de la degradación del benzo(a)pireno.
- d) Si se detecta una mayor producción de metabolitos en la exposición secundaria con las células enteras, entonces el metabolismo de las microalgas aumenta después de realizar la activación de estas (exposición primaria).

1 ANTECEDENTES

1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

Actualmente, el agua, el aire y el suelo se encuentran comúnmente contaminados con compuestos orgánicos llamados hidrocarburos aromáticos policíclicos, también conocidos como HAPs o PAHs por sus siglas en inglés. En 1775, el cirujano inglés Percival Pott relacionó una inusual incidencia de cáncer de escroto entre los trabajadores que limpiaban chimeneas, por su constante exposición al hollín y la ceniza (Krush, 1982). Tiempo después en los años de 1930, se aisló del alquitrán de hulla, el benzo(a)pireno, y se determinó su carcinogenicidad al realizar pruebas en animales (Kenneway, 1955). Desde entonces ha surgido la necesidad de estudiar estos compuestos, comprender su metabolismo en los organismos y buscar métodos para eliminarlos o removerlos del medio ambiente.

Los HAPs están formados por dos o más anillos aromáticos fusionados, pueden estar unidos en forma recta, angular o racimados, por lo que, dependiendo su acomodo, cada compuesto tiene propiedades específicas. Aunque de manera general, son sólidos incoloros, blancos o amarillo pálido, tienen una baja solubilidad en agua, altos puntos de fusión, ebullición y baja presión de vapor (Patnaik, 2017). Dependiendo de su carácter aromático, los HAPs absorben luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico, absorben fácilmente luz solar en regiones ultravioleta (280-400 nm) y visibles (400-760 nm) (Mastandrea et al., 2005; Kumar et al., 2014; Abdel-Shafy et al., 2015). Las estructuras químicas de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos se presentan en la figura 1.1; se destaca el benzo(a)pireno (BaP), compuesto con el que se realizó este trabajo.

La formación de estos compuestos ocurre durante la pirólisis o descomposición térmica de moléculas orgánicas, donde los fragmentos y radicales de las moléculas se recombinan (Haritash et al., 2009). Los HAPs que se encuentran en el medio ambiente provienen de fuentes naturales y antropogénicas. Entre las fuentes naturales se encuentran los incendios forestales, filtraciones naturales de petróleo y erupciones volcánicas. Las fuentes antropogénicas incluyen derrames de petróleo, emisión vehicular, quema de combustible fósil, actividad industrial, etc. (Kaushik et al., 2006; Chan et al., 2006; Abdel-Shafy et al., 2015).

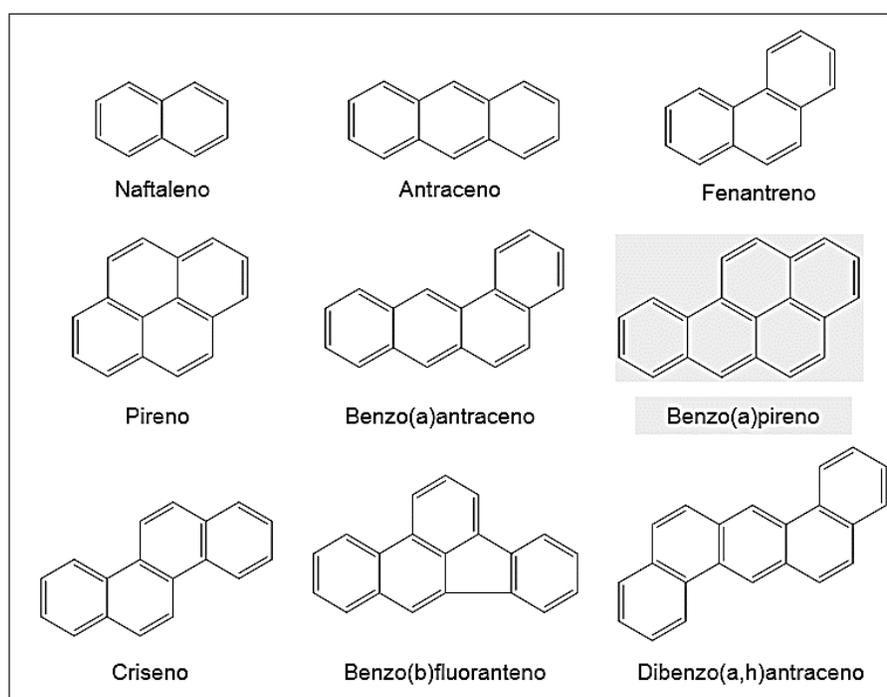


Figura 1.1. Estructura química de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Una vez que estos contaminantes son emitidos a la atmósfera, su distribución en el medio ambiente depende de su peso molecular. Los HAPs más pesados se adsorben a las partículas del entorno y son transportados largas distancias por los vientos, mientras que los HAPs más ligeros tienden a permanecer en estado gaseoso hasta que cambian de fase por la precipitación (Skupinska et al., 2004; Mastandrea et al., 2005). Las concentraciones de HAPs en el agua tienden a ser bajas debido a su limitada solubilidad, lo cual conduce a la acumulación de estas sustancias en sedimentos y organismos acuáticos (ATSDR, 2012). La bioacumulación de estos compuestos tóxicos aumenta a lo largo de la cadena trófica, de manera que existe una mayor concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el predador que en la presa, siendo el humano uno de los destinos finales por el consumo alimentario cotidiano (Ghosal et al., 2016). En la figura 1.2 se muestra un esquema de la distribución de los HAPs en el medio ambiente.

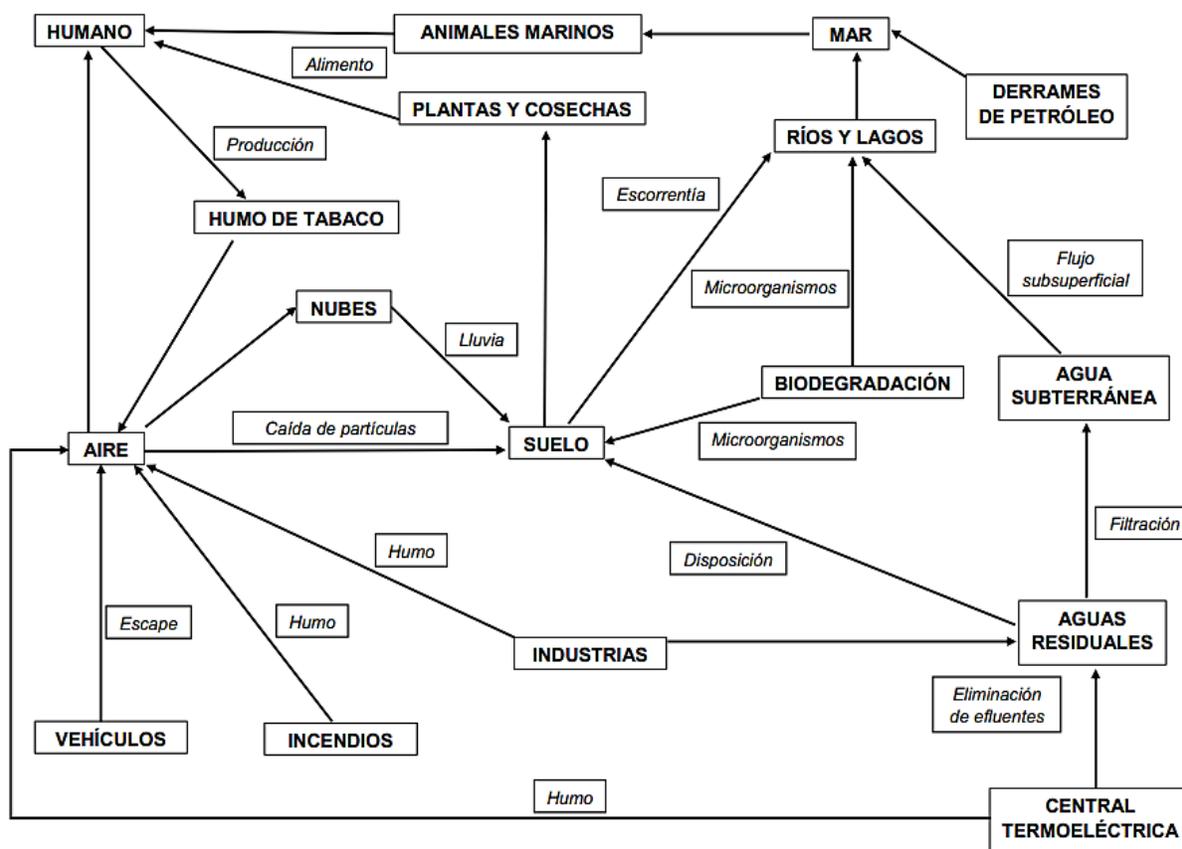


Figura 1.2. Destino de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el medio ambiente. Adaptado de Kaushik et al., 2006.

1.1.1 Exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los HAPs ingresan al cuerpo humano por inhalación, ingestión o contacto dérmico (ATSDR, 2012), una vez absorbidos, ingresan a la linfa, circulan en la sangre y se metabolizan principalmente en el hígado y los riñones. Su distribución en el cuerpo humano depende de las propiedades lipofílicas, sin embargo, suelen acumularse en la leche materna y el tejido adiposo. Si son inhalados, se depositan en las vías respiratorias, donde pueden eliminarse por secreción bronquial o penetrar las células para después metabolizarse. El benzo(a)pireno (BaP) y otros HAPs se adsorben fácilmente en el tracto gastrointestinal cuando están presentes en la dieta (Kumar et al., 2014).

El impacto de los HAPs en la salud humana depende principalmente de la duración, la ruta de exposición y la concentración a los que se expone, así como la toxicidad de cada compuesto (Stellman et al., 1998; Abdel-Shafy et al., 2015). Existe una preocupación por los efectos tóxicos de algunos metabolitos de los HAPs que forman los mamíferos, porque estas especies pueden reaccionar con macromoléculas formando aductos. Metabolito es el producto que queda después de la descomposición metabólica de una sustancia química (Kumar et al., 2014; Abdel-Shafy et al., 2015).

En las células de mamíferos, el BaP se metaboliza a epóxidos mediante la monooxigenasa del citocromo P-450. Estos epóxidos pueden hidratarse enzimáticamente a trans-dihidrodiol, espontáneamente formar fenoles o conjugarse con moléculas polares como el glutatión. Los trans-dihidrodiol se pueden oxidar adicionalmente a epóxidos de dihidrodiol, el 7,8-diol-9,10-epóxido-BaP se considera el metabolito carcinogénico máximo de benzo(a)pireno (ATSDR, 1995; Mastandrea et al., 2005; Kumar et al., 2014). En la figura 1.3, se representa una posible ruta metabólica del benzo(a)pireno en humanos; la mayoría de los metabolitos formados se suelen excretar en las heces y la orina (ATSDR, 2012; Abdel-Shafy et al., 2015).

Por lo tanto, se considera que los efectos tóxicos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos se producen cuando hay una exposición, seguido de la activación metabólica y la formación de enlaces de los metabolitos de HAPs con el ADN y proteínas celulares. Estas interacciones ocasionan daño celular, mutaciones de genes, sustituciones de pares de bases y alteraciones cromosómicas, causando malformaciones del desarrollo, tumores y cáncer. Por ejemplo, en el metabolito de tipo dihidrodiolepóxido, el carbono bencílico es capaz de reaccionar con las porciones nucleofílicas del ADN, principalmente con grupos amino exocíclicos de guanina y adenina, formando aductos estables dentro del ADN (Lin et al., 2001), y eventualmente iniciar un proceso mutagénico en genes críticos, como el gen p53, represor de tumores (Kaushik et al., 2006; Abdel-Shafy et al., 2015; Mastandrea et al., 2005).

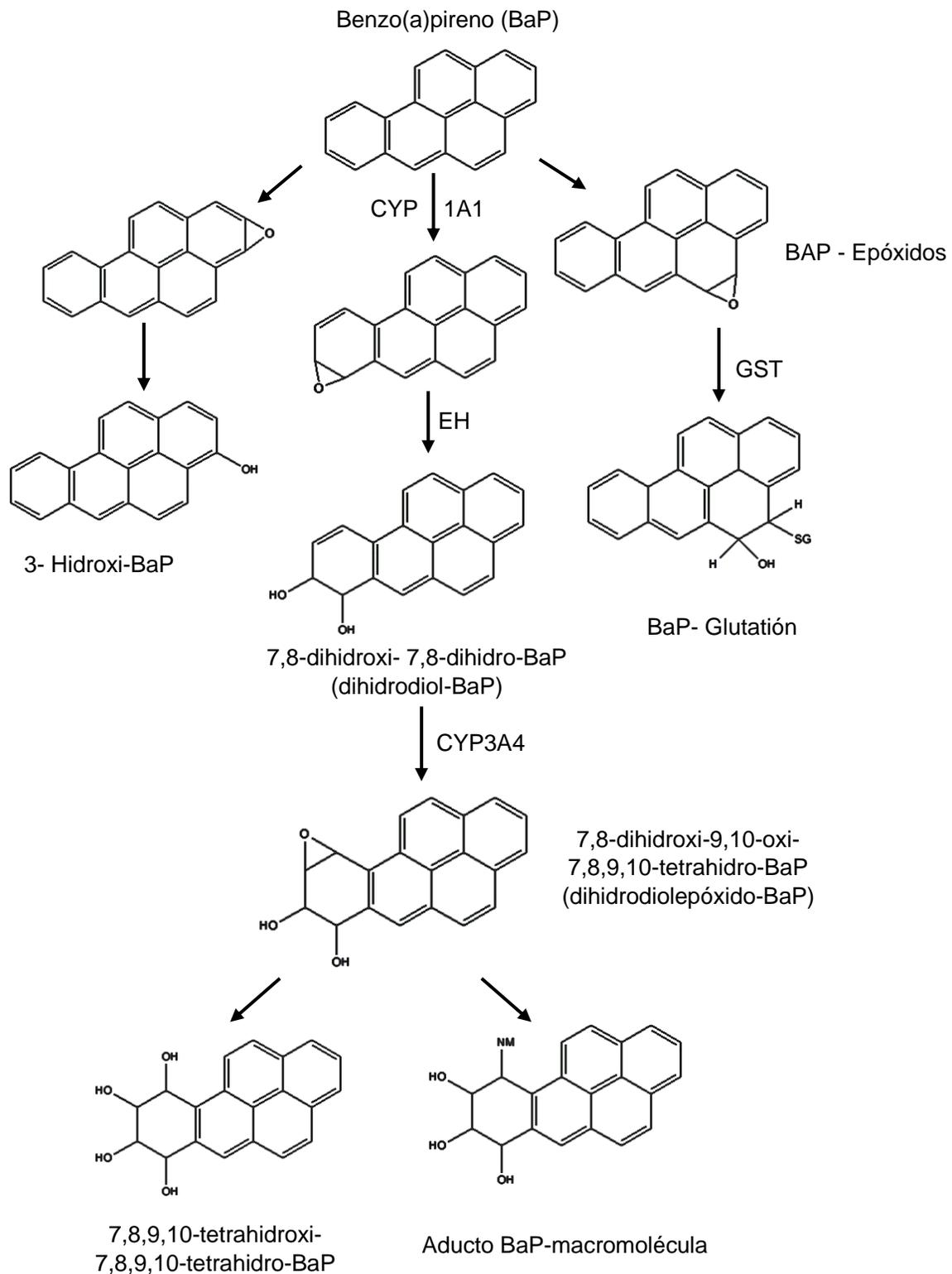


Figura 1.3. Representación de una posible vía metabólica del benzo(a)pireno en humanos. (CYP1A1: Aril-hidrocarburo-hidroxilasa, EH: Epóxido hidrolasa, GST: Glutatión-S-Transferasa, CYP3A4: Citocromo P450). Recuperado de Mastandrea et al., 2005.

Los aductos formados son eliminados por enzimas reparadoras de ADN a diferentes velocidades, sin embargo, estudios moleculares han revelado que la unión de los metabolitos al ADN, bloquea la actividad de replicación de la polimerasa, lo que reduce la actividad reparadora (Hsu et al., 2005). Los HAPs de cuatro, cinco y seis anillos tienen un mayor potencial carcinogénico que los HAPs con dos, tres y siete anillos. La adición de cadenas alquílicas a estos compuestos puede aumentar la actividad carcinogénica. (Kaushik et al, 2006). La Agencia de Protección Ambiental (EPA), ha clasificado los siguientes siete hidrocarburos aromáticos, como probables carcinógenos humanos: benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(ah) antraceno e indeno(1,2,3-cd)pireno (Abdel-Shafy et al., 2015).

Por otra parte, estudios de laboratorio con animales expuestos a HAPs durante largos períodos de tiempo, mostraron el desarrollo de cáncer de pulmón por inhalación, cáncer de estómago por ingestión y cáncer de piel por contacto (EPA, 2008). Los efectos genotóxicos de algunos HAPs se han demostrado tanto en roedores como en pruebas in vitro, utilizando células de mamíferos (incluidas las humanas) (Rodríguez et al., 2008; Kumar et al., 2014; Abdel-Shafy et al., 2015).

Se han realizado estudios para cuantificar metabolitos hidroxilados de diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos en la orina, pues sirven como indicadores del grado de exposición a estos contaminantes, por ejemplo, el metabolito más estudiado del pireno es el 1-hidroxi pireno (CDC, 2018). Se observó que existe una mayor concentración de 1-hidroxi pireno en personas que viven en áreas urbanas industrializadas en comparación con las que viven en áreas rurales (Kuo et al., 2004). Además, se ha encontrado que diferentes sectores de la población están propensos a una mayor contaminación por HAPs dependiendo de su ocupación, por ejemplo: maquinistas, mecánicos, conductores de autobuses y operadores de cabinas de peaje (ATSDR, 2012). Aparte de la exposición en entornos ocupacionales, la mayor fuente de HAPs proviene de los alimentos, el tabaco y el aire contaminado por las emisiones vehiculares (Phillips, 1999; FAO, 2008; ATSDR, 2012; Abdel-Shafy et al., 2015).

1.2 Eliminación de los HAPs en el medio ambiente

Se han implementado diferentes tratamientos para eliminar los hidrocarburos aromáticos policíclicos del medio ambiente, por ejemplo, existen métodos físicos como la incineración, volatilización o adsorción; métodos químicos oxidantes como el uso de dióxido de cloro, permanganato de potasio, ozonización y cloración, también otros métodos como fotólisis y procesos de oxidación avanzada (POA), que se basan en la producción del radical hidroxilo (Ali et al., 2009; Rubio-Clemente et al., 2014). Sin embargo, los métodos físicos no degradan estos contaminantes, sólo remueven o transfieren los HAPs de una fase a otra y los métodos químicos generan subproductos potencialmente nocivos para los seres vivos. Además, presentan desventajas como altos costos de los equipos y el mantenimiento, la generación de desechos, así como la energía requerida para impulsar los procesos (Rubio-Clemente et al., 2014).

Por otro lado, el método biológico, también conocido como biorremediación, consiste en utilizar organismos vivos para transformar moléculas orgánicas potencialmente peligrosas en otras menos tóxicas o inocuas mediante reacciones catalizadas biológicamente, utilizando así pocos recursos y energía. La degradación de HAPs mediante microorganismos, ha surgido como una alternativa segura y rentable con la posibilidad de aplicarse *in situ* (Ghosal et al., 2016; Singh et al., 2004). La biodegradación, frecuentemente, aunque no necesariamente, conduce a la conversión de moléculas complejas en productos inorgánicos, como CH₄ en anaerobiosis y CO₂ en aerobiosis, además de H₂O y NH₃, lo que se conoce como mineralización; asimismo, parte del carbono se utiliza para el crecimiento celular (Van Agteren et al., 1998; Singh et al., 2004).

El crecimiento de microorganismos en medios contaminados con HAPs, requiere que estos sean capaces de producir enzimas que degraden los contaminantes a intermediarios no tóxicos, que formen parte del metabolismo microbiano. A menudo, estas enzimas son monooxigenasas y dioxigenasas, que catalizan reacciones para incorporar oxígeno molecular (Van Agteren et al., 1998). La degradación se logra mediante vías metabólicas específicas para cada tipo de contaminante, que operan en un organismo o combinación de organismos. Las vías metabólicas pueden funcionar: dentro de la célula, mediante enzimas excretadas por la célula o, a través de enzimas aisladas y aplicadas en forma purificada (Evans et al., 2003; Singh et al., 2004).

En la siguiente figura, se muestra un esquema general del metabolismo de moléculas orgánicas, por microorganismos aerobios.

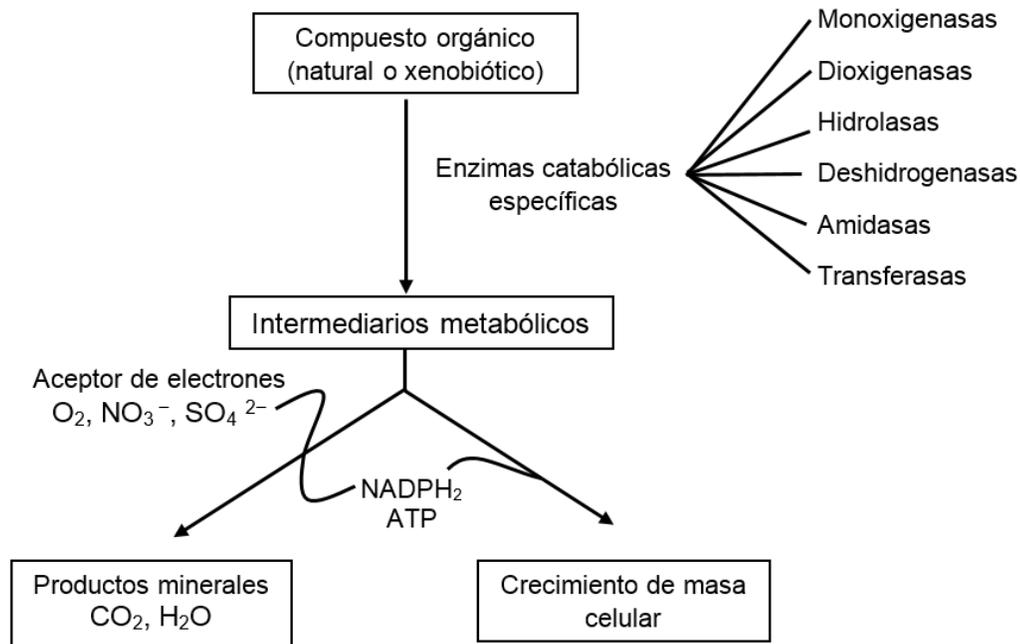


Figura 1.4. Esquema general de la biodegradación aeróbica de contaminantes orgánicos. Recuperado de Van. Agteren et al., 1998.

1.2.1 Factores que influyen en la degradación microbiana

La biodegradación de HAPs en el ambiente depende de diversos factores bióticos y abióticos como: cantidad y tipo de microorganismos, propiedades de transporte celular, humedad, temperatura, pH, acceso a los nutrientes, concentración de oxígeno (degradación aeróbica), el potencial redox (degradación anaeróbica), tipo de contaminante, su coeficiente de reparto, concentración y biodisponibilidad. La biorremediación será efectiva sólo en sitios donde las condiciones ambientales permitan el crecimiento microbiano y la actividad enzimática (Van Agteren et al, 1998; Singh, 2004).

La biodegradación de los HAPs en el medio ambiente se ve limitada debido a la baja solubilidad de estos compuestos, y a la tendencia a adsorberse en superficies minerales como arcillas y materia orgánica, lo cual reduce la biodisponibilidad. Biodisponibilidad se define como la fracción de una sustancia que puede ser adsorbida o transformada por

organismos vivos (Bosma et al., 1997; Semple et al., 2003). La mayoría de los estudios de biodegradación se centran en la biorremediación de HAPs en condiciones aeróbicas, donde el oxígeno actúa como reactivo limitante de la velocidad de reacción, porque se requiere para la acción de las enzimas mono y dioxigenasas en la oxidación inicial de los anillos aromáticos. Cuando la temperatura aumenta, la solubilidad de los HAPs también lo hace, incrementando así la biodisponibilidad de los contaminantes en el agua, sin embargo, el nivel de oxígeno disuelto disminuye, lo que ocasiona la disminución de la actividad metabólica de los microorganismos mesófilos aeróbicos (Ghosal et al., 2016).

Se ha estudiado en gran medida la degradación de HAPs por bacterias y hongos, se ha logrado elucidar el metabolismo microbiano de HAPs como el naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoreno y benzo(a)pireno. Se sabe que las bacterias producen dioxigenasas que incorporan dos átomos de oxígeno al hidrocarburo, posteriormente, se realizan reacciones de oxidación subsecuentes hasta la producción de ácido succínico, fumárico, pirúvico y acético, así como, aldehídos, estas sustancias son utilizadas por las bacterias como energía y para la síntesis de componentes celulares. Por otra parte, se ha demostrado que la oxidación del BaP por hongos está mediada por el citocromo P-450, al igual que en los mamíferos. También es posible que las reacciones de oxidación sean catalizadas por diferentes mecanismos enzimáticos que involucran enzimas extracelulares como lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas. Aunque pocas especies tienen la capacidad de mineralizar al BaP (Juhasz et al., 2000).

Otros microorganismos capaces de oxidar hidrocarburos aromáticos policíclicos son las microalgas. Si bien se ha estudiado la degradación de HAPs de bajo peso molecular, como el naftaleno, pocos estudios se han realizado sobre la degradación de HAPs de alto peso molecular. Tampoco se conoce por completo el metabolismo de degradación, ni el perfil de las enzimas involucradas; lo cual es necesario para comprender mejor los procesos de degradación, y así, desarrollar estrategias para eliminar estos contaminantes cancerígenos de los ecosistemas.

1.3 Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos que se desarrollan predominantemente en ambientes acuáticos, son capaces de convertir la energía luminosa y fuentes de carbono, como el dióxido de carbono, en biomasa. Son organismos unicelulares que pueden ser procariotas y eucariotas, usualmente tienen un tamaño de micrómetros (5-50 μm) (Tebbani et al., 2014). La diversidad de las microalgas es muy amplia, se ha estimado que existen de 2×10^5 a 8×10^5 especies. Las tres clases más importantes de microalgas en términos de abundancia son: las diatomeas (Bacillariophyceae), las algas verdes (Chlorophyceae) y las algas doradas (Chrysophyceae); las cianobacterias o algas azul-verdes (Cyanophyceae) también se clasifican como microalgas (Kim, 2015). Respecto a su estructura celular, las microalgas tienen pared celular, una membrana plasmática, un núcleo, y organelos esenciales para su funcionamiento, como: cloroplastos, amiloplastos, oleoplastos y mitocondrias. Contienen tres tipos principales de pigmentos: clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas (Tebbani et al., 2014).

La mayoría de las microalgas se reproducen asexualmente; para monitorear el crecimiento de las microalgas, se realiza una determinación espectrofotométrica, que depende de la densidad del cultivo y el contenido de clorofila, la longitud de onda utilizada se encuentra en el rango visible del espectro electromagnético (400-700 nm). Para mediciones más precisas, esta técnica se combina con métodos gravimétricos o de conteo para realizar curvas de calibración. La evaluación gravimétrica del crecimiento de microalgas se basa en la determinación del peso de la biomasa seca o húmeda, mientras que la técnica de enumeración consiste en el conteo microscópico de las células en un hemocitómetro (Kim, 2015).

Las microalgas tienen 4 fases de crecimiento; la fase lag o retraso es el periodo de adaptación que tienen las microalgas antes de comenzar a multiplicarse, luego, en la fase exponencial, las células comienzan a dividirse y entran en un periodo de crecimiento logarítmico, también es el momento en el que las células presentan mayor actividad metabólica, por lo que es en esta fase, cuando las microalgas tienen una mayor capacidad de degradación. La fase estacionaria, se alcanza cuando se consumen los nutrientes y el número de muerte celular es igual al número de células nuevas, por lo que, la cantidad de algas vivas se mantiene estable, pero la actividad metabólica se torna

lenta. Finalmente, en la fase de declinación o muerte, el número de muertes supera el número de células nuevas (Tortora et al., 2013).

Las microalgas se emplean en la industria: alimentaria, farmacéutica, cosmética, y agrícola, en el área de energía renovable como una fuente viable para la producción de biocombustibles, y en área ambiental, al usarse para el tratamiento de aguas residuales y el secuestro de dióxido de carbono (Johansen, 2012; Tebbani et al., 2014). La degradación de contaminantes orgánicos por estos microorganismos depende de procesos de biotransformación y eliminación enzimática, que se denominan de desintoxicación (Johansen, 2012). La eficiencia de la biosorción y biotransformación es específica para cada especie, depende de las diferencias morfológicas y fisiológicas, incluyendo la composición de la pared celular y la membrana, la tasa de crecimiento y los sistemas enzimáticos que posee (Lei et al., 2002; Johansen, 2012).

Cuando las microalgas entran en contacto con los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), se cree que estos compuestos lipófilos se retienen en la superficie externa de la célula y luego se internalizan para su posterior metabolismo. Se sabe que los HAPs se adsorben a la pared celular de las células vivas y muertas, para después ser metabolizados por las células vivas, a través de una serie de reacciones enzimáticas (Chan et al., 2006). Hasta ahora, se ha demostrado que las moléculas de benzo(a)pireno penetran las células de la microalga *Chlorella kessleri*, imágenes microscópicas de fluorescencia muestran su degradación (desaparición) dentro de la célula viva a lo largo del tiempo (Takáčová et al., 2014). De igual manera, Subashchandrabose et al. (2017) observaron la captación de pireno por la microalga *Chlorella sp.* MM3 en cuerpos lipídicos mediante un microscopio de fluorescencia.

Entre mayor sea la cantidad de biomasa, mayores serán los porcentajes de remoción y degradación. Sin embargo, al incrementar la cantidad de biomasa, es posible que las células compitan por el espacio, nutrientes, dióxido de carbono y suministro de luz; lo que limitaría el crecimiento celular (Lei et al., 2002; Chan et al., 2006). Semple et al. (1999) mencionan que se requiere una densidad celular superior a 5×10^6 células/mL para obtener una tasa de eliminación del 80 % o más, por otro lado, Chan et al. (2006) señalan que una densidad celular inicial de 1×10^7 células/mL, es eficaz para remover HAPs. Hernández Blanco y García de Llasera (2016) determinaron que el crecimiento celular

disminuye conforme aumenta la concentración de BaP, no obstante, no se produjo la inhibición del crecimiento. Lo cual sugiere que las microalgas tienen posibilidades de crecer y desarrollarse en presencia de inhibidores del crecimiento y contaminantes, lo que aumenta la posibilidad de mutaciones adaptativas o la aclimatación a condiciones adversas.

1.3.1 *Selenastrum capricornutum*

Una de las microalgas utilizadas para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos es *Selenastrum capricornutum*, también conocida como *Pseudokirchneriella subcapitata*. Este microorganismo fue aislado del río Nitelva, Noruega en 1959 por Olav M. Skulberg. *S. capricornutum* es una microalga verde, unicelular eucariota con forma de media luna, sin movilidad. Tiene un tamaño promedio de 9.1 μm de longitud y 3.2 μm de ancho, así como, un volumen celular entre 40 μm^3 y 60 μm^3 (Morales, 2004; EPS, 2007; Krienitz et al., 2011; Machado et al., 2014).

Lei et al. (2002) realizaron experimentos con siete especies de microalgas y encontraron que *S. capricornutum* fue la especie más efectiva en la transformación de pireno. En otro estudio, se realizó la eliminación de benzo(a)pireno por sorción y degradación mediante dos especies de microalgas: *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*. Se observó que *S. capricornutum* removió el 99 % de BaP después de 15 h de exposición y *S. acutus* removió el 95 % después de 72 h de exposición (García de Llasera et al., 2016). Chan et al. (2006) realizaron experimentos con mezclas de HAPs, observando que la microalga *S. capricornutum* removió por sorción una mayor proporción de pireno, en comparación con el fluoranteno y fenantreno; mientras que la tasa de biodegradación se vio favorecida para el fluoranteno, luego para el pireno, y por último para el fenantreno, sugiriendo que los HAPs de 4 anillos son más fáciles de degradar por esta microalga.

La sorción es un fenómeno importante para la remoción de benzo(a)pireno por *S. capricornutum*, pero la biodegradación es el principal proceso en las células vivas para eliminar BaP. La formación de los metabolitos de degradación por *S. capricornutum* es rápida y parece ser proporcional a la cantidad de BaP añadida. Además, la rápida disminución de la concentración de BaP indica que, probablemente la degradación comienza justo después de que las primeras moléculas del contaminante se adsorben a las células (García de Llasera et al., 2016).

Warshawsky et al. (1988) y García de Llasera et al. (2016) evaluaron la oxidación de BaP por la microalga *Selenastrum capricornutum*, encontraron que la biotransformación del BaP dio como resultado la formación de los derivados dihidroxilados 4,5-dihidrodiol (4,5-dBaP), 7,8-dihidrodiol (7,8-dBaP), 9,10-dihidrodiol (9,10-dBaP) y 11,12-dihidrodiol benzo(a)pireno (11,12-dBaP). La estructura del BaP y sus metabolitos se muestran en la figura 1.5. En otros estudios con *S. capricornutum*, la degradación de HAPs como el fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno y benzo(a)pireno, dio la producción de derivados monohidroxilados (Ke et al., 2010; Chan et al., 2006).

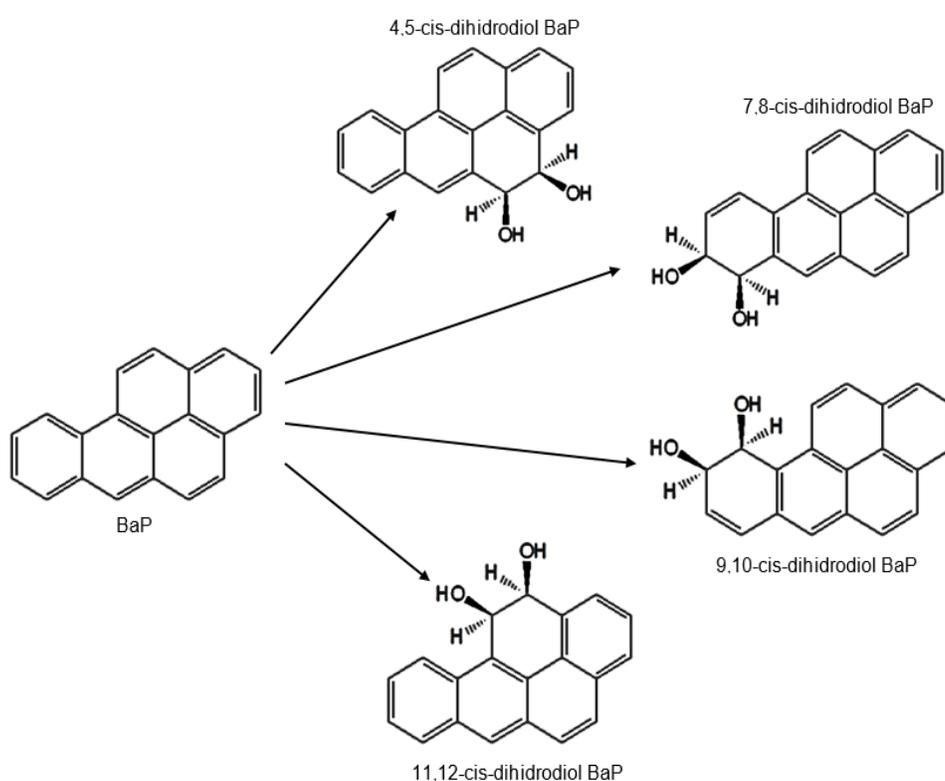
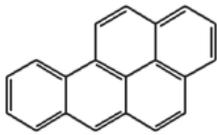
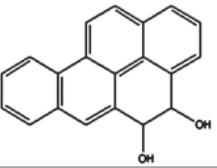
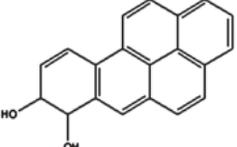


Figura 1.5. Productos de transformación del benzo(a)pireno por microalgas. Recuperado de Juhasz A. y Naidu R., 2000.

En el presente trabajo se manejaron los metabolitos 4,5-dBaP y 7,8-dBaP, por lo que en la tabla 1.1 se presentan sus propiedades fisicoquímicas junto con las del BaP.

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas del benzo(a)pireno y sus metabolitos (ASTDR, 1995; Hernández Blanco y García de Llasera, 2016)

Compuesto	Apariencia	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (mg/L)	Log K _{ow}
Benzo(a)pireno (BaP) 	Sólido de color amarillo pálido en forma de láminas o agujas	C ₂₀ H ₁₂	252.31	179	495	0.0023	6.06
4,5 - cis- dihidrodiol BaP 	Sólido de color café claro en forma de láminas o agujas	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	286.32	212	499	0.61	3.83
7,8 - cis- dihidrodiol BaP 	Sólido de color verde claro en forma de láminas o agujas	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	286.32	212	499	0.43	4.01

1.4 Disrupción celular

Los microorganismos producen sustancias como proteínas, lípidos, antibióticos y hormonas que han resultado útiles para el hombre, por lo que se le ha dado importancia a la biosíntesis, extracción y purificación de estas sustancias. Los microorganismos, tanto nativos como genéticamente modificados, producen dos tipos de compuestos biológicos: extracelulares, que se excretan en el medio de crecimiento; e intracelulares, que se retienen dentro de la célula (Geciova et al., 2002). Si el producto se excreta, se conserva la parte líquida para su posterior tratamiento, mientras que, si el producto se encuentra dentro del microorganismo, se conserva la fracción sólida, también llamada biomasa.

La mayoría de las proteínas intracelulares se localizan en el citoplasma, la fracción soluble de las células, mientras que otras, están presentes en la membrana plasmática que envuelve al citoplasma y otras en el espacio periplasmático que separa la membrana

de la pared celular (Hatti-Kaul et al., 2003). No todas las proteínas que entran a la vía de secreción llegan hasta el medio extracelular, algunas proteínas recombinantes con señales de secreción terminan en varios orgánulos en lugar de cruzar la membrana plasmática o pueden permanecer en el espacio periplasmático (Pyle et al., 1990). Se han diseñado diferentes técnicas para la disrupción celular que modifican o destruyen la membrana plasmática y la pared celular para permitir la liberación del producto intracelular. La selección del método de disrupción determinará los pasos restantes del procesamiento, pues el proceso de ruptura afecta las propiedades físicas de la suspensión, como la viscosidad, densidad, tamaño de partícula y sedimentación, lo que influye en la posterior separación sólido-líquido de la mezcla (Pyle et al., 1990; Hatti-Kaul et al., 2003). El método de disrupción dependerá de la naturaleza del microorganismo, la ubicación del producto y el valor de su producción, así como, de la tolerancia a las condiciones del proceso y la escala a la que se desee realizar (Harrison, 1991).

Algunos tipos de células animales y algunas bacterias gram negativas se rompen fácilmente mediante un tratamiento suave, como el choque osmótico; mientras que las levaduras, microalgas, micelios fúngicos y algunas bacterias gram positivas son altamente resistentes, estos microorganismos tienen una pared celular y estructuras de membrana capaces de resistir una presión osmótica interna de alrededor de 2 MPa (Chaplin et al., 1990). Si bien, se han realizado muchas investigaciones sobre la disrupción de microorganismos como levaduras y bacterias, se ha experimentado poco con microalgas (Lee et al., 2012). La pared celular algal es similar a la de las plantas y generalmente es trilaminar, presenta un alto contenido de proteína, principalmente glicoproteínas. El 45 % de la pared celular está compuesta de celulosa, también contiene otros polisacáridos como hemicelulosa, pectina, ácido urónico, fructosa, ramnosa, manosa, xilano y glucosa, además, puede contener algaenan, un biopolímero resistente. Estos materiales forman estructuras duras con una resistencia a la tracción del orden de 9.5 MPa, que es aproximadamente la misma que la de las levaduras y bacterias gram positivas, pero tres veces mayor que la resistencia de la pared celular de células vegetales como la zanahoria, *Daucus carota* (Lee et al., 2012; Wang et al., 2015; Aarthy et al., 2018).

Los métodos de disrupción se pueden clasificar en métodos no mecánicos y mecánicos (figura 1.6). En la disrupción celular mecánica, la célula se rompe de forma inespecífica mediante fuerzas de corte (líquidas o sólidas), en general los métodos mecánicos tienen una mayor eficacia, sin embargo, se requiere aplicar energía, lo que aumenta el costo operativo. Conforme se hace el tratamiento de lisis, se suele crear una mezcla viscosa y compleja que incluye fragmentos finos de las células, ácidos nucleicos y proteínas junto con el producto de interés. Algunos de los métodos mecánicos incluyen: homogeneización a alta presión, homogeneización a alta velocidad, molino de perlas, ultrasonido, etc. (Pyle et al., 1990; Hatti-Kaul et al., 2003).

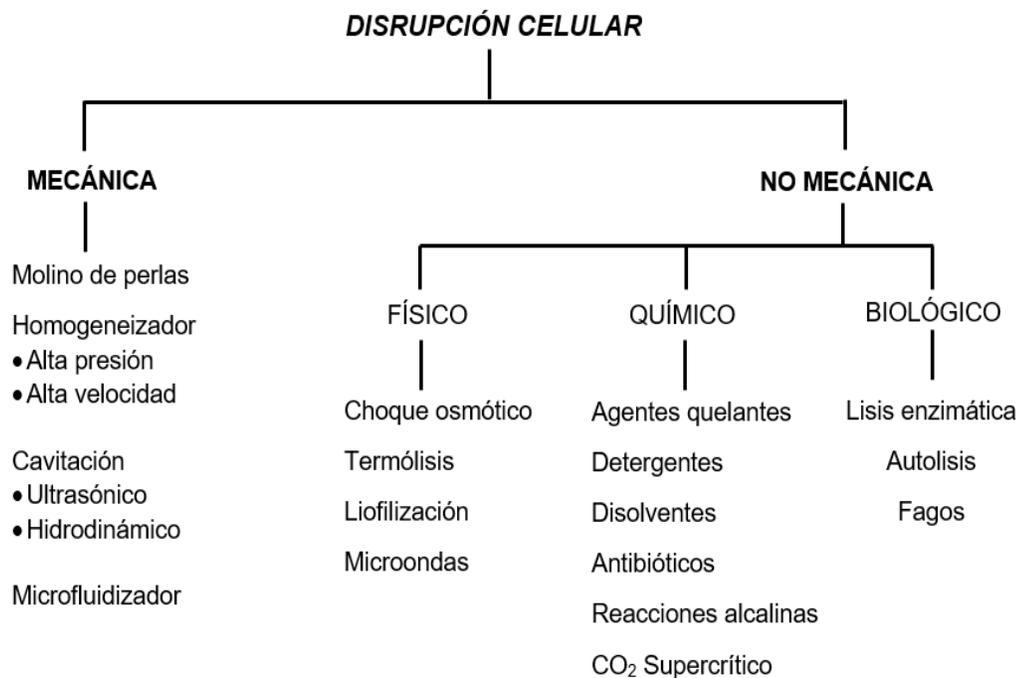


Figura 1.6. Clasificación de los métodos de disrupción celular. Recuperado de Lee et al., 2012.

Los métodos no mecánicos se dividen en métodos físicos, químicos y biológicos, estos métodos de disrupción celular consumen menos energía, son más suaves y específicos, pero son difíciles de escalar a niveles industriales y pueden consumir más tiempo. Los métodos no mecánicos incluyen métodos físicos tales como, choque osmótico, termólisis y microondas, los métodos químicos incluyen el uso de detergentes, disolventes orgánicos y tratamiento alcalino, mientras que dentro de los métodos biológicos se encuentra la lisis celular enzimática y autólisis (Lee et al., 2012; Alasuvanto et al., 2017). Durante la ruptura de las células, las enzimas liberadas pueden desnaturalizarse a causa de las fuerzas de estrés generadas por el procedimiento utilizado, debido a la digestión por proteasas y fosfatasas liberadas de las células o por la interacción con otros constituyentes no proteicos (Hatti-Kaul et al., 2003). Para prevenir la pérdida de la actividad enzimática y obtener un mayor rendimiento de proteína, se suele enfriar la muestra, añadir inhibidores de proteasas y fosfatasas en el medio de extracción o adicionar un exceso de sustratos alternativos, como proteínas de bajo costo (Chaplin et al., 1990). Usualmente, la disrupción celular mecánica y no mecánica se combinan para optimizar el consumo de energía, maximizar el rendimiento y tener productos puros (Alasuvanto et al., 2017).

La disrupción con ultrasonido y la química fueron probadas en el presente trabajo, por lo que se describen con detalle más adelante.

1.4.1 Cuantificación de la ruptura celular

Existen varios métodos para la cuantificación de la ruptura celular, entre ellos se encuentra el conteo de células y la determinación de su tamaño, el monitoreo de la liberación de proteínas, la medición de absorbancia y turbidez, el análisis de pérdida de masa de la muestra y variaciones en la viscosidad (Wang et al., 2015; Menegazzo et al., 2019). Para determinar la fragmentación de las células es conveniente emplear métodos que permitan visualizar la estructura de los microorganismos como el conteo de células u observaciones con microscopía de barrido y de transmisión electrónica. Mientras que, si se desea determinar la liberación del material intracelular por la permeabilización y el rompimiento de las células, conviene emplear métodos como la medición espectrofotométrica o la medición de la densidad óptica de la suspensión de microalgas, la determinación de proteínas y carbohidratos mediante el método de Lowry y Dubois,

respectivamente (Keris-Sen et al., 2014; Safi et al., 2014; Soto Sierra et al., 2017; Suarez García et al., 2018).

El método de Lowry es un ensayo colorimétrico de proteínas, la producción de color por la presencia de proteínas en una muestra ocurre por tres procesos. En primer lugar, el ión Cu^+ , forma complejos de coordinación con dos enlaces peptídicos consecutivos de las proteínas, dando lugar a un compuesto de color azul. En segundo lugar, este compuesto es capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico), dando un color más azulado. Finalmente, el reactivo de Folin-Ciocalteu también reacciona con los residuos de tirosina, triptófano y cisteína de la cadena polipeptídica, produciendo asimismo un color azul por la reducción del fosfomolibdato en medio básico. El espectro de absorción no corresponde a una única sustancia, por lo que las mediciones de absorbancia pueden realizarse en un amplio intervalo de longitudes de onda, entre 500 y 750 nm (Roca et al., 2003; Shen, 2019). El método de Lowry es aproximadamente 100 veces más sensible que la medición de la absorción ultravioleta de las proteínas (280 nm), lo cual es una ventaja cuando se miden concentraciones muy bajas; sin embargo, la coloración depende de la naturaleza de las proteínas determinadas (Lowry et al., 1951; Markwell et al., 1978; Roca et al., 2003; Shen, 2019).

1.5 Disrupción con ultrasonido

El ultrasonido consiste en ondas acústicas de alta frecuencia (18 kHz - 1 MHz). Específicamente, las frecuencias de 18 kHz a 100 kHz se utilizan para generar cambios físicos, químicos y bioquímicos permanentes. La generación de ultrasonido se fundamenta en la deformación elástica de materiales ferroeléctricos, dentro de un campo eléctrico de alta frecuencia, causada por la mutua atracción de moléculas polarizadas en el campo. Para inducir la polarización de las moléculas, se debe transmitir una frecuencia alternante mediante dos electrodos, hasta el material ferroeléctrico. Después, se da la conversión a oscilaciones mecánicas y el sonido producido puede ser transmitido a un amplificador, para finalmente transmitirse al medio (Chaplin et al., 1990; Robles-Ozuna et al., 2012).

Las ondas de alta intensidad se propagan a través del líquido, generando ciclos alternos de alta presión (compresión) y baja presión (rarefacción). Estos ciclos crean microburbujas que se expanden y contraen, cuando las burbujas alcanzan un volumen en el que ya no pueden absorber energía, se vuelven inestables e implosionan violentamente en un proceso llamado cavitación transitoria. La implosión de la burbuja produce chorros de líquido de una velocidad de hasta 280 m/s, creando presiones elevadas de 2000 atm y temperaturas localizadas de 5000 K (Aarthy et al., 2018; Suslick K.S., 1998). Las cavitaciones estables son oscilaciones continuas que causan remolinos a microescala, las células se dañan cuando el tamaño de los microremolinos es del mismo orden o menor al de estas. La disrupción de las células puede ocurrir como resultado de gradientes de velocidad localizados dentro de un remolino o entre ellos; aunque la naturaleza exacta de las fuerzas hidrodinámicas del microremolino (corte, compresión, torsión o impacto) que causan la disrupción celular, no se conocen por completo. Los remolinos con escalas más grandes que el tamaño de la célula simplemente la transportan de un lugar a otro (Milledge, 2011). Por otra parte, la transmisión acústica es el mecanismo que facilita la mezcla de la suspensión y la distribución uniforme de la energía (Gerde et al, 2012; Prokop et al., 2015).

Hay dos tipos de sonicadores (figura 1.7): el baño de ultrasonido y el procesador ultrasónico. Los baños de ultrasonido utilizan transductores de intensidad fija, colocados en la parte inferior del recipiente para generar ondas ultrasónicas. Generalmente tienen capacidades, desde 0.8 hasta 28 L, aunque la disipación de energía con la distancia pone un límite en el tamaño del reactor, según la aplicación (Lee et al., 2012; Laval Lab, 2019); además de que la intensidad se ve atenuada por el agua contenida en el baño y el recipiente en donde se encuentra la muestra. Se ha observado que la disrupción celular no es uniforme, si no que varía en las diferentes partes del baño, debido a que la distribución de las ondas acústicas es muy desigual (McMillan et al., 2013).

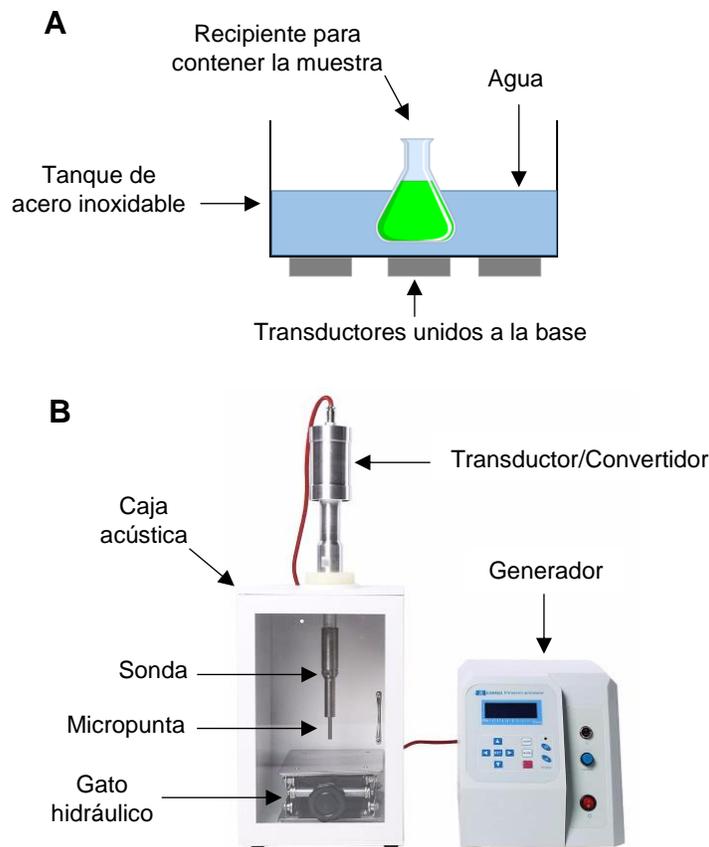


Figura 1.7. Baño de ultrasonido (A) y procesador ultrasónico (B).

El procesador ultrasónico consta de tres componentes principales: una fuente de alimentación ultrasónica (generador), un convertidor (transductor) y una sonda. La fuente de alimentación ultrasónica convierte la tensión de 50/60 Hz en energía eléctrica de alta frecuencia (20 kHz), esta energía eléctrica se transmite al transductor piezoeléctrico dentro del convertidor hecho de cristales de titanato zirconato de plomo, donde se transforma a vibraciones mecánicas. Las vibraciones longitudinales del convertidor son intensificadas por la sonda de titanio inmersa en el líquido, creando ondas de presión en la muestra (Sonics & Materials, Inc., 2005; Branson, 2011). Es importante tener una potencia alta en la punta de la sonda para crear cavitación con suficiente fuerza disruptiva, ya que la energía generada en la punta se disipa rápidamente con la distancia. Los volúmenes con los que se suele trabajar van desde aproximadamente 50 μ L a 2 L (Lee et al., 2012). El procesador ultrasónico es altamente reproducible, la energía en la punta de la sonda es enfocada, se puede ajustar y es al menos 50 veces mayor que la producida en un baño de ultrasonido (Sonics & Materials, Inc., 2005). Usualmente se usa

para extracción, lisis celular, reducción del tamaño de partículas, homogeneización, entre otros (Hielscher¹, 2019).

El procesador ultrasónico está diseñado para proporcionar una amplitud constante de las ondas sonoras, a medida que aumenta la resistencia al movimiento de la sonda, la fuente de alimentación suministra potencia adicional para garantizar que la amplitud en la punta de la sonda permanezca constante. La resistencia puede aumentar con la viscosidad y el volumen de la muestra, el tamaño de la sonda y la profundidad de inmersión. Las sondas con un diámetro pequeño producen una mayor intensidad de cavitación, pero la energía liberada se restringe a un campo estrecho y concentrado, principalmente debajo de la punta, por el contrario, las sondas de mayor diámetro producen menor intensidad, pero la energía se libera en un área más grande. Cuanto mayor sea el diámetro de la sonda, mayor será el volumen que se puede procesar, aunque a una intensidad reducida (Sonics & Materials, Inc., 2005).

La intensidad en el área superficial de la sonda durante el procesamiento ultrasónico depende principalmente de la amplitud (μm), la presión (bar), el volumen del reactor (mL), la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y la viscosidad (cP). Al aumentar la amplitud, la presión y la viscosidad, aumenta la intensidad en la sonda, mientras que, si se aumenta la temperatura y el volumen de la muestra, la intensidad en la sonda disminuye (Hielscher², 2019). El control total sobre los parámetros de sonicación garantiza la escalabilidad lineal y la obtención de resultados reproducibles (Sonics & Materials, Inc., 2005). Según estudios cinéticos, la constante de liberación de proteína es independiente de la concentración celular de bacterias y levaduras, en cambio, es inversamente proporcional al volumen y directamente proporcional a la potencia acústica (James et al., 1972; Kuboi, et al., 1995; Harrison, 1991).

La eficiencia de la disrupción por ondas ultrasónicas depende de la temperatura del medio, una temperatura más baja reduce la presión de vapor dentro de la burbuja de cavitación, lo que permite un colapso más rápido y una mayor fuerza de corte. A tiempos largos de operación, la cantidad de energía transmitida a la muestra es mayor, lo que permite que se rompan más células; sin embargo, parte de la energía se destina a continuar fragmentando los restos celulares, lo que puede inhibir la propagación de las ondas sonoras, reduciendo el volumen efectivo para la disrupción en la punta de la sonda;

de modo que, a medida que los fragmentos celulares se acumulan, el proceso se vuelve menos eficiente. Por otra parte, una menor viscosidad permite una mejor transmisión de las ondas sonoras, un colapso más violento y, por ende, una disrupción más efectiva, aunque se debe tomar en cuenta que la viscosidad aumenta a medida que se liberan más productos intracelulares (Lee et al., 2012).

Durante el proceso de sonicación puede darse la formación de espuma, lo cual reduce la efectividad del procesamiento ultrasónico y puede ser perjudicial para la actividad enzimática, porque la interfase gas-líquido presente en la espuma altera la conformación de las enzimas. También impide la correcta transmisión de la energía y produce un calentamiento excesivo de la parte superior. Para evitar este problema, la sonda se coloca lo más profundo posible, a fin de asegurar que no haya movimiento violento o agitación en la superficie, y después se aumenta gradualmente la intensidad en la sonda hasta el nivel deseado. La formación de espuma suele ocurrir en volúmenes pequeños de 0.3 a 5 mL (Branson, 2011; Chaplin et al., 1990). Dado que las altas temperaturas inhiben la cavitación, la temperatura de la muestra debe mantenerse lo más baja posible. Se recomienda preenfriar la muestra y mantenerla en un baño de hielo durante la sonicación, la elevación de la temperatura también se puede minimizar aplicando pulsos cortos de ultrasonido, de 5 a 10 segundos con pausas de 10 a 30 segundos, para permitir la disipación del calor. Asimismo, mantener baja la temperatura reduce el riesgo de desnaturalización de productos termosensibles como las enzimas (Hielscher³, 2019; Sonics & Materials, Inc., 2005).

El tiempo de sonicación y la potencia acústica son dos parámetros importantes que afectan la liberación y estabilidad de las enzimas extraídas (Singh, 2013). Para cada aplicación se requiere un conjunto de parámetros de procesamiento específicos; debido a la variación en el volumen y en la composición de la muestra, la amplitud óptima sólo puede determinarse empíricamente. Se recomienda que la amplitud se establezca primero al 50 % y luego se incremente o disminuya según sea necesario (Sonics & Materials, Inc., 2005). Por ejemplo, la extracción de ADN requiere una sonicación más suave, mientras que la extracción completa de proteína de las bacterias requiere un tratamiento de ultrasonido más intenso (Hielscher⁴, 2019).

Cuando se aplica el ultrasonido durante largos períodos de tiempo (300 a 3600 s), se producen radicales libres a partir de la descomposición de la molécula de agua, lo cual puede afectar la calidad del producto extraído (Gerde et al., 2012). Para evitar la reacción entre los radicales y las proteínas, polisacáridos o ácidos nucleicos, se recomienda agregar dióxido de carbono, cisteína, compuestos tiol o saturar la muestra con una atmósfera de helio o hidrógeno (Sonics & Materials, Inc., 2005). Igualmente, se debe evitar la inactivación y desnaturalización de las proteínas extraídas por efecto de un entorno no fisiológico, como un cambio brusco en el valor del pH; en general, la lisis se lleva a cabo en una disolución amortiguadora, la elección de la disolución amortiguadora dependerá del tipo de células y debe determinarse mediante pruebas (Hielscher⁵, 2019). La extracción de enzimas con ultrasonido se ha visto limitada por la labilidad conformacional que presentan algunas enzimas durante el proceso, ya que el calor producido cerca de la superficie de la sonda, el estrés de corte o la oxidación por radicales libres, puede ocasionar la desnaturalización de las enzimas circundantes (Chaplin et al., 1990; Geciova et al., 2002).

La manipulación del procesador ultrasónico es simple, no requiere equipos sofisticados, no se necesita una amplia capacitación técnica, se ejecuta en poco tiempo con una mayor reproducibilidad y la aplicación de energía es menor en comparación con otros métodos de disrupción mecánica (Chemat et al., 2011; Singh, 2013; Aarthy et al., 2018). Se puede emplear para tratar volúmenes que van desde microlitros hasta litros, y la sonda que se encuentra en contacto con la muestra es fácil de limpiar (Hielscher⁴, 2019). Los efectos mecánicos del ultrasonido proporcionan una penetración más rápida y completa del disolvente en las células, lo que mejora la transferencia de masa; en adición, la reducción del tamaño de partícula por la cavitación ultrasónica aumenta el área de contacto superficial entre el sólido y la fase líquida (Hielscher⁶, 2019). Además, el ultrasonido puede romper las células con menos pérdida de energía en comparación con los métodos de alta fuerza de corte, en los cuales, el consumo de energía es directamente proporcional a la presión de operación o la velocidad de flujo (Chisti et al., 1986; Wang et al., 2014). La efectividad del tratamiento con ultrasonido depende del tipo de célula a tratar. El tamaño y la forma de la célula, determinarán la interacción de esta con las ondas acústicas (Wang et al., 2014). Por ejemplo, los microorganismos con forma de barras

(bacilos) se desintegran con mayor facilidad que los esféricos (cocos) (Sonics & Materials, Inc., 2005).

1.6 Disrupción química

El método químico consiste en el empleo de sustancias que tienen la capacidad de solubilizar los componentes de la membrana celular, lo cual altera su permeabilidad y permite que las proteínas intracelulares se difundan al medio extracelular. Con este método, las células conservan su forma en comparación con la disrupción mecánica o biológica en donde los microorganismos se rompen en pequeños fragmentos; al evitar que las células se destruyan, la liberación de proteínas ocurre de forma selectiva (Pyle et al., 1990). La permeabilización de la membrana se puede realizar con antibióticos, agentes quelantes, agentes caotrópicos, detergentes, disolventes orgánicos, líquidos iónicos, nanopartículas metálicas, hidróxidos e hipocloritos (Geciova, 2002; Lee, 2017). Este método también se suele usar como pretratamiento para facilitar la lisis de las células durante la disrupción mecánica. El costo de operación es mínimo en comparación con la disrupción mecánica, sin embargo, las desventajas incluyen largos tiempos de extracción, la posible desnaturalización del producto y la posterior purificación por cromatografía o electroforesis en gel, lo cual consume tiempo y hace que el método de disrupción sea menos eficiente (Pyle et al., 1990; Alasuvanto et al., 2017). Si el objetivo de la lisis celular es purificar o probar la función de una proteína particular, se deben considerar los efectos que los reactivos de lisis puedan tener sobre la estabilidad y función de las enzimas de interés, ciertas sustancias pueden inactivar su función y afectar su estabilidad a largo plazo. Para mantener la estructura nativa de las enzimas, usualmente se eliminan los reactivos de lisis por diálisis y se estabilizan con disoluciones amortiguadoras que promueven el repliegue adecuado y mantienen su solubilidad (Thermo Fisher, 2019).

El tratamiento de microorganismos con detergentes es un método comúnmente usado para la liberación de componentes celulares en biología molecular. Los detergentes son moléculas anfipáticas compuestas por una cadena hidrocarbonada hidrofóbica de carácter alifático o aromático y un grupo hidrofílico en un extremo. Según la naturaleza del grupo hidrofílico, los detergentes se pueden clasificar en iónicos (catiónicos y

aniónicos), zwitteriónicos y no iónicos (Harrison, 1991; Hatti-Kaul et al., 2003; Nagappan, 2019). El aumento en la concentración del detergente más allá de la concentración micelar crítica, no favorece las interacciones de las moléculas de detergente con las proteínas de la membrana celular, ya que se da la autoasociación de las moléculas de detergente para formar micelas (Thermo Fisher, 2019). Detergentes aniónicos como el dodecilsulfato de sodio (SDS) y detergentes catiónicos como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) son capaces de disolver la membrana celular al romper las interacciones proteína-proteína, proteína-lípido y lípido-lípido. La unión del SDS a proteínas de membrana hidrófobas es cooperativa, cuando una molécula de SDS se une a una proteína, aumenta la posibilidad de que otra molécula de detergente también interactúe con la misma proteína. Los detergentes no iónicos como el Triton X-100, las sales biliares y los detergentes zwitteriones no rompen las interacciones entre proteínas y no presentan propiedades cooperativas de unión (Thermo Fisher, 2019).

Naglak et al. (1990) reportaron que la disrupción de la levadura para la extracción de proteínas usando clorhidrato de guanidina (2 M) y el detergente Triton X-100 (0.5 %), liberó la misma cantidad de material intracelular que con la disrupción mecánica o lisis enzimática, no obstante, el tiempo del tratamiento químico fue de 24 h, mientras que con los otros métodos el tiempo empleado fue de minutos a horas. Al combinar un agente caotrópico como el clorhidrato de guanidina con un detergente, estos interactúan de forma sinérgica para permeabilizar la membrana microbiana (Harrison, 1991; Hatti-Kaul et al., 2003). Por otro lado, el tratamiento de una suspensión bacteriana Gram-positiva con acetona, seguido del tratamiento con SDS al 1 %, mostró una liberación similar de proteína que con el uso de otros métodos como ultrasonido o agitación con cuentas de vidrio. Estudios con *E. coli* mostraron que la solubilización de la membrana es independiente de la concentración de detergente en el rango de 0.5-2.0 %, y la solubilidad de la membrana interna y externa se favorece al aumentar la temperatura. Asimismo, se estudió la disrupción química de las células por efecto del dodecilsulfato de sodio, mediante microscopía electrónica de transmisión y análisis bioquímico; se observó que después de la adición de SDS al medio de cultivo de *E. coli*, la membrana citoplasmática se disolvió, el citoplasma se separó en una región amorfa proteica y en una región compuesta por ARN, y luego, se produjo la fuga del material intracelular (Harrison, 1991).

Hasta la fecha, no se ha reportado un detergente de uso general que solubilice y estabilice por completo las proteínas de membrana, el uso de un tipo de detergente puede funcionar para una proteína específica mientras que para otras puede resultar ineficiente. La selección del detergente dependerá de la sensibilidad de las proteínas de la membrana y de las proteínas intracelulares liberadas al medio, así como de la naturaleza estructura de cada membrana celular (Hardy et al., 2018).

1.7 Extracción del material intracelular

En la revisión bibliográfica realizada a la fecha, se encontró una referencia (Subashchandrabose et al., 2017) sobre la extracción de la enzima dihidrolipoamida acetiltransferasa, que se piensa interviene en el proceso de degradación de HAPs en las microalgas. Las aplicaciones que mayor atención han recibido son la extracción de lípidos con el objetivo de producir biocombustibles y la extracción de proteínas para su comercialización. Diferentes estudios concuerdan en que el grado de disrupción y el rendimiento de la extracción del material intracelular dependen de la especie de microalga; y en que, la selección del método de ruptura dependerá de la estructura y composición de la pared celular (Prabakaran et al., 2011; Aarthy et al., 2018; Lee et al., 2010; Phong et al., 2018).

Entre los estudios realizados sobre la extracción de lípidos a partir de microalgas, Prabakaran et al. (2011) encontraron que el método de sonicación es el más eficiente para la extracción de lípidos en las especies *Chlorella sp.*, *Nostoc sp.* y *Tolypothrix sp.*, en comparación con otros métodos como choque osmótico, molino de perlas, autoclave y microondas. Keris-Sen et al. (2014) determinaron que la aplicación de ultrasonido desintegró las células de las microalgas verdes: *Scenedesmus sp.* y *Chlorococcum sp.*, liberando así el contenido intracelular para obtener proteínas, carbohidratos y lípidos. Plantean que la eficiencia en la disrupción celular disminuye cuando la intensidad de energía aplicada provoca la autoinhibición de las cavitaciones.

También se ha realizado la extracción de pigmentos (ficobiliproteínas) de las microalgas, ya que presentan actividades biológicas benéficas como anticancerígenos y antiinflamatorios. Cuellar-Bermudez et al. (2014) realizaron la extracción de ficocianina mediante la aplicación de ondas ultrasónicas, encontraron que las fuerzas de corte

Líquidas producidas por el ultrasonido no destruyen las ficobiliproteínas extraídas siempre que el tiempo de procesamiento de la muestra sea apropiado. También mencionan que el empleo de estabilizadores como glucosa y ácido ascórbico, previene la descomposición de las proteínas.

1.7.1 Extracción de proteínas

Se ha estudiado la ruptura de las células para la producción comercial de proteínas, especialmente en la industria alimenticia, nutracéutica y de la acuicultura. Las proteínas se encuentran presentes en diferentes sitios de la microalga, uno de ellos es en el citosol y en organelos internos como el pirenoide; tras la ruptura de la célula, estas proteínas migran rápidamente hacia el medio debido a un gradiente de concentración. Otra fuente de proteínas son las que tienen una función estructural, como las proteínas embebidas en la pared y membrana celular, la extracción de las cuales ha sido reportada mediante el uso de detergentes. Asimismo, en los cloroplastos se encuentran proteínas relacionadas con los sistemas de captación de luz. La mayor proporción de proteínas (72 %) se encuentra en la biomasa, por lo que para extraerlas se requiere un método que sea capaz de solubilizarlas (Suarez Garcia et al., 2018; Phong et al., 2018).

Soto Sierra et al. (2018), señalan que la sonicación de las microalgas permeabiliza tanto la pared celular como la membrana. Sin embargo, debido a la resistencia de estas estructuras celulares, se ha implementado la combinación del ultrasonido con otros métodos como el mezclado de alto cizallamiento, la hidrólisis enzimática de la pared celular o el tratamiento químico, para aumentar la liberación de proteínas solubles. Phong et al. (2018), mencionan que diferentes estudios coinciden en el efecto positivo del ultrasonido para la liberación de proteínas, ya que facilita la penetración del disolvente a través de la célula, lo que mejora la transferencia de masa. Además de que, en comparación con la homogeneización a alta presión, se requiere un consumo menor de energía; además, el uso de alta presión al igual que la molienda con perlas, generan fragmentos celulares muy finos que dificultan el proceso de separación y purificación. Concluyen que la máxima recuperación de proteínas a partir de *C. vulgaris* se obtiene al combinar el ultrasonido con un tratamiento alcalino. Lupatini et al. (2017) también desarrollaron un método de extracción basado en un tratamiento de ultrasonido con agitación mecánica en un medio alcalino, para la extracción de proteínas y carbohidratos

de la microalga *Spirulina platensis*, obteniendo un rendimiento del 75.76 % de proteína y 41.52 % de carbohidratos. Sin embargo, en ninguna de las investigaciones mencionadas se determinó el estado ni la estabilidad de las proteínas extraídas.

Suarez Garcia et al. (2018), realizaron la extracción de proteínas funcionales para aplicaciones alimenticias, utilizaron la molienda con perlas para la ruptura de la microalga *Tetraselmis suecica*, obteniendo en la fracción de sobrenadante un rendimiento en masa de 22.5 % de proteínas, 27.7 % de carbohidratos y 8.1% de lípidos. Estudiaron la actividad funcional de las proteínas extraídas, en términos de actividad superficial y comportamiento de gelificación, al comparar las muestras con aislado de proteína de suero; concluyeron que el extracto de proteína cruda resultante, mostró las propiedades esperadas, lo cual confirma la estructura funcional.

Por otra parte, Soto Sierra et al. (2017) determinaron que la disrupción enzimática de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* con autolisina para la extracción de lípidos y proteínas, dio los mejores resultados en comparación con otros métodos como la extracción con disolventes, detergente y extracción con ultrasonido. Safi et al. (2014), estudiaron la disrupción celular de las microalgas *H. pluvialis*, *N. occulta*, *C. vulgaris* y *A. platensis*, obteniendo una mayor liberación de proteínas mediante la homogeneización a alta presión, los otros métodos utilizados fueron tratamiento alcalino, ultrasonido y molienda a mano, siendo este último el método con el que se obtuvo el menor recobro. No obstante, no se realizó el estudio del efecto de los procesos de extracción sobre la conformación de las proteínas.

1.7.2 Extracción de enzimas involucradas en la degradación de HAPs

Aparte de las investigaciones para la extracción de lípidos y proteínas, poco se ha estudiado sobre la extracción de las enzimas encargadas de la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos de microalgas. Por ejemplo, Subashchandrabose et al. (2017) estudiaron el perfil de proteínas de la microalga *Chlorella sp.* MM3 cultivada en presencia y ausencia de pireno. La extracción de proteínas se realizó en una disolución de Tris-HCl 50 mM con inhibidores de proteasa, mediante un procesador ultrasónico, para después realizar la electroforesis y analizar las bandas de proteína mediante cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. Observaron la sobreexpresión de la enzima dihidrolipoamida acetiltransferasa (DLAT), a causa de las

condiciones de estrés inducidas sobre la microalga al exponerla a pireno, lo cual indica una posible función de esta enzima en el proceso de biodegradación. Plantean que la sobreexpresión de DLAT se realiza para satisfacer la demanda de energía celular bajo la influencia del agente xenobiótico, puesto que esta enzima cataliza la descarboxilación del piruvato para formar acetil-CoA y NADH durante la respiración celular. Es fundamental realizar estudios genéticos, proteómicos y metabolómicos para elucidar las vías y mecanismos catabólicos involucrados en la degradación por microalgas, ya que esto permitirá entender mejor el proceso de degradación.

La información que se tiene sobre el metabolismo de degradación de las microalgas es escasa en comparación con la información sobre las bacterias. A la fecha, se conocen las rutas metabólicas de degradación bacteriana de hidrocarburos como el naftaleno, fluoreno, pireno, fenantreno, fluoranteno y benzo(a)pireno; se sabe que diferentes especies de bacterias son capaces de utilizar estos compuestos como fuente de carbono y energía. Asimismo, se han purificado y caracterizado diferentes genes y enzimas involucradas en los procesos de biodegradación, como dioxigenasas, hidrolasas, deshidrogenasas, entre otras (Seo et al., 2009).

Kim et al. (2007) elucidaron la ruta metabólica completa de la bacteria *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, para la conversión del pireno a intermediarios del ciclo de Krebs, mediante análisis genómicos y proteómicos. Realizaron la extracción de proteína mediante perlas de vidrio en una disolución de lisis de SDS (0.3 %), nucleasa Benzonaasa (1 μ L) e inhibidores de proteasas (0.5 mg/mL). Las proteínas extraídas y los metabolitos de degradación fueron analizados por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas. Por otro lado, Jouanneau et al. (2006) realizaron la caracterización de una dioxigenasa capaz de dihidroxilar HAPs de cuatro y cinco anillos aromáticos, extraída de la cepa bacteriana CHY-1 mediante un tratamiento enzimático con lisozima (0.5 mg/mL) seguido de la aplicación de ultrasonido (5 min, 80 % intensidad, 5 s/pulso). La dioxigenasa aislada se constituye por tres componentes: NADH oxidorreductasa, ferrexidina y una oxigenasa. La disolución de lisis utilizada para la extracción de la oxidorreductasa fue Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), NaCl (0.5 M) y glicerol (10%), la disolución de lisis para la ferrexidina fue fosfato de potasio (50 mM, pH 7.5), NaCl (0.5 M), glicerol (10 %) y β -mercaptoetanol (2 mM), finalmente, la oxigenasa fue extraída en una disolución de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5). Después de aislar la dioxigenasa, esta se fortificó con algunos

HAPs como: criseno, fluoranteno, fluoreno, antraceno, naftaleno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno y analizaron la actividad de la enzima naftaleno dioxigenasa siguiendo la oxidación de NADH a 340 nm o midiendo la tasa de consumo de oxígeno mediante un electrodo. Los derivados dihidroxilados y monohidroxilados formados durante la reacción enzimática fueron extraídos con acetato de etilo y analizados por cromatografía de líquidos y detección ultravioleta en una columna de fase reversa C8; así como por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se reportó la formación de metabolitos monohidroxilados para el fluoranteno y fluoreno, mientras que para los demás hidrocarburos se detectaron derivados dihidroxilados; para el caso del BaP, se formó el 1,2,10,11-bis-dihidrodiol y el 9,10-dihidrodiol.

1.8 Extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus metabolitos oxigenados

El monitoreo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados oxigenados presentes en el medio ambiente, permite estudiar su distribución, transformaciones químicas y prevenir efectos toxicológicos graves. Para la determinación precisa de estos compuestos, especialmente en matrices ambientales y biológicas, es necesario preparar la muestra antes de realizar el análisis instrumental.

De manera general, la preparación de la muestra con frecuencia es un proceso elaborado que toma aproximadamente el 80 % del tiempo de análisis. Para asegurar la veracidad de los resultados analíticos, es necesario eliminar los interferentes que pueda contener la matriz, concentrar y estabilizar los analitos para su posterior detección y cuantificación (Buszewski et al, 2012).

Debido a que usualmente la mayoría de los contaminantes orgánicos como los HAPs se encuentran en concentraciones traza en muestras ambientales y biológicas, se debe realizar su extracción, purificación y preconcentración, para ello, se han desarrollado diferentes métodos de acuerdo al estado de la materia de la muestra. En el caso de muestras líquidas, el método comúnmente utilizado es la extracción líquido-líquido (ELL), sin embargo, con este método se utilizan grandes volúmenes de disolventes orgánicos y usualmente se requiere repetir el proceso de extracción varias veces (Thurman et al., 1998; Raza et al., 2018; Pulleyblank et al., 2019). Se han implementado otros métodos

para hacer más eficiente el proceso de preconcentración, entre estos se encuentra la extracción en fase sólida (EFS), donde los analitos se extraen de la fase líquida al retenerse en la superficie de un adsorbente contenido en una columna, cartucho o disco. Otro método es la microextracción en fase sólida (MEFS), en el que los analitos se adhieren al adsorbente que cubre la superficie de una fibra. Un método similar es la extracción en fase sólida sobre barras magnéticas (ESBM), donde los analitos se adhieren a una capa de polidimetilsiloxano (PDMS) que cubre una barra magnética empaquetada en una cubierta de vidrio (Raza et al., 2018; Pulleyblank et al., 2019). Por otro lado, también se ha implementado el uso de membranas de extracción, entre ellas se encuentra la extracción por membrana polimérica (EMP) y la extracción por solvente asistida por membrana (ESAM) (Jakubowska et al., 2005; Raza et al., 2018). También existen los métodos de microextracción en fase líquida, como la microextracción en una sola gota (MESG) y la microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD) (Raza et al., 2018; Pulleyblank et al., 2019). Recientemente se ha buscado el desarrollo de métodos de preconcentración que se ajusten a los principios de la química verde, a través de la miniaturización y el uso de nuevas fases de extracción como dendrímeros, inmunoadsorbentes, estructuras metálicas orgánicas, además de materiales nanoporosos y nanopartículas (Raza et al., 2018).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus productos de degradación también se pueden encontrar en muestras sólidas como suelo, sedimentos y materia orgánica. La recuperación de estas sustancias se puede realizar mediante la extracción Soxhlet que consiste en múltiples ciclos donde se pasa disolvente a través de la muestra, este proceso requiere tiempos largos de extracción y grandes volúmenes de disolvente orgánico. La extracción asistida por microondas, también ha sido utilizada para la concentración de compuestos orgánicos presentes en matrices ambientales, este método utiliza la radiación de energía de microondas para calentar la mezcla de la muestra con el disolvente de extracción. También se ha implementado la extracción con fluidos supercríticos, los cuales presentan baja viscosidad y alta difusividad, lo que aumenta la velocidad de transporte y permite disolver diversos materiales (Raza et al., 2018). Otro método que se basa en el aumento de la temperatura y la presión para cambiar las características fisicoquímicas de los disolventes, es la extracción con líquidos presurizados. La temperatura aumenta la solubilidad de los analitos y promueve una

mayor tasa de difusión del disolvente, lo que ayuda a romper las interacciones entre la matriz y el analito (Hoff et al., 2018; Pulleyblank et al., 2019). La extracción de analitos no polares en muestras biológicas como tejidos animales y alimentos sólidos o semisólidos también puede efectuarse comúnmente por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), técnica en donde la muestra se mezcla con un adsorbente para formar una mezcla homogénea y realizar su posterior elución con un disolvente apropiado (Raza et al., 2018). La EFS y DMFS se emplearon en el presente trabajo por lo que se discuten a continuación.

1.8.1 Extracción en Fase Sólida

La Extracción en Fase Sólida (EFS) es un método de preparación de muestras que permite concentrar y purificar los analitos mediante la sorción de estos a una fase estacionaria sólida, para después ser eluidos con un disolvente apropiado (Thurman et al., 1998). Durante la EFS, se establece un equilibrio entre la muestra líquida, la superficie de la fase sólida por adsorción y mediante la penetración de la capa externa de las moléculas en la superficie sólida. La EFS se convirtió en una técnica científica a partir de la década de los años 1970; la introducción de adsorbentes estables y covalentemente unidos, especialmente de fase reversa, mejoraron la recuperación de analitos orgánicos presentes en muestras acuosas, lo que permitió su aplicación en el análisis de muestras ambientales, clínicas y farmacéuticas (Simpson, 2000).

El proceso de EFS se realiza en varios pasos; el primer paso es acondicionar el adsorbente, lo cual consiste en pasar un disolvente a través de él, con el objetivo de humedecerlo y solvatar los grupos funcionales; además, de eliminar el aire presente en el cartucho al llenar los espacios vacíos con el disolvente. Para tratar muestras acuosas, la columna o cartucho se activa usualmente con metanol seguido de agua o una disolución amortiguadora acuosa. De ser necesario, antes del acondicionamiento se puede realizar la limpieza de la fase sólida, para eliminar cualquier impureza en el material de empaque (Thurman et al., 1998). Los cartuchos de extracción se empacan colocando un filtro en la parte inferior para retener la fase sólida, posteriormente se agrega el adsorbente y finalmente se coloca otro filtro en la parte superior para evitar pérdidas y mantener la homogeneidad en la superficie de la fase sólida.

El siguiente paso consiste en pasar la muestra por el cartucho, con el objetivo de retener al analito de interés en la fase sólida, para ello, es necesario que los analitos presenten una mayor afinidad por el adsorbente que por la matriz en la que están contenidos. Las muestras pueden ser de 1 mL hasta 1 L, la carga de la muestra se puede hacer por gravedad, por bombeo, aspirado con vacío o por un sistema automatizado. Los mecanismos que intervienen en la retención del analito dependen de la naturaleza de la fase sólida, las interacciones del analito con los grupos funcionales del adsorbente, pueden ser interacciones de van der Waals (no polares), puentes de hidrógeno y fuerzas dipolo-dipolo (polares), intercambio de cationes y aniones, así como tamaño de exclusión (Thurman et al., 1998; Zwir-Ferenc et al., 2006). Durante la carga de la muestra, es posible que diversos componentes de la matriz también se retengan en la fase sólida y es probable que al recuperar el analito, estas otras sustancias coeluyan. Por lo que, el siguiente paso consiste en realizar uno o más lavados de la fase sólida, con el propósito de eliminar las sustancias indeseadas (interferentes) que podrían causar imprecisiones en el análisis, mientras que el analito se mantiene retenido en el adsorbente. Si la matriz de la muestra es acuosa, los lavados se pueden realizar con una disolución amortiguadora acuosa o mezclas de agua con un disolvente orgánico (Thurman et al., 1998; Simpson, 2000).

El último paso es la elución del analito con un disolvente apropiado. El disolvente se selecciona específicamente para romper las interacciones entre el analito y los grupos funcionales del adsorbente, asimismo, debe remover la menor cantidad de cualquier otra sustancia que haya quedado adsorbida en el cartucho (Thurman et al., 1998; Marcé et al., 2000). La extracción en fase sólida se puede realizar con diferentes tipos de adsorbentes, la elección de este depende de la afinidad de la estructura química de los analitos que se pretende extraer. La extracción en fase reversa se realiza cuando el analito de interés es poco polar o apolar, la matriz en la que se encuentra suele ser polar o moderadamente polar y la fase estacionaria es no polar. La retención de las sustancias no polares se debe principalmente a las interacciones carbono-hidrógeno, entre el analito y los grupos funcionales de la superficie del adsorbente. La elución se realiza con un disolvente no polar que sea afín a los analitos y sea capaz de romper las interacciones entre el analito y el adsorbente. La fase estacionaria puede ser de materiales hechos a base de carbono, polímeros, o sílice unida químicamente a otras moléculas como

hidrocarburos o aminas. (Thurman et al., 1998; Zwir-Ferenc et al., 2006). Se suelen usar siloxanos sustituidos con octadecilo, octilo, ciclohexilo, butilo y fenilo para extraer analitos no polares y analitos polares pequeños. La sílice sustituida con octadecilo y octilo son los adsorbentes de extracción universal (Zwir-Ferenc et al., 2006). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus metabolitos oxigenados usualmente presentes en matrices acuosas, tienen baja polaridad, por lo que su tratamiento se realiza mediante extracción en fase reversa.

En conclusión, la técnica de EFS permite concentrar los analitos en un volumen menor de disolvente, remueve las sustancias interferentes presentes en muestras complejas y permite modificar la matriz en la que se preconcentran. Con este método, se obtiene una alta recuperación, se pueden extraer simultáneamente compuestos con diferentes polaridades, es fácil de automatizar, es compatible con el análisis instrumental, y se reduce el tiempo de extracción y el consumo de disolventes orgánicos (Marcé et al., 2000; Simpson, 2000, Zwir-Ferenc et al., 2006).

Debido a que la solubilidad de los HAPs y sus metabolitos es baja, en especial aquellos de alto peso molecular, se recomienda adicionar a las muestras acuosas un volumen pequeño de metanol, acetonitrilo, 2-propanol o algún surfactante, antes de realizar la extracción en fase sólida. Esto aumentará la solubilidad de los compuestos, para evitar problemas de adsorción durante el tratamiento de la muestra, e incrementará la recuperación. La cantidad de disolvente orgánico adicionado a la muestra debe optimizarse, porque si es muy bajo, los analitos de alto peso molecular podrían no solubilizarse y habría pérdidas por adsorción durante el muestreo o almacenamiento, en cambio, si la cantidad adicionada es muy grande, los compuestos de menor peso molecular podrían fugarse (Marcé et al., 2000).

1.8.2 Dispersión de Matriz en Fase Sólida

La Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) es una técnica de preparación de muestra introducida en 1989 por Barker y colaboradores, para la extracción de drogas en tejido animal. Inicialmente fue desarrollada para el análisis de muestras sólidas, pero su aplicación se ha extendido a muestras semisólidas y líquidos viscosos. El procedimiento de DMFS consiste en integrar la muestra con el material adsorbente, en el caso de

muestras líquidas viscosas o semisólidas, la dispersión de la matriz en la superficie del adsorbente se puede lograr mediante agitación. Mientras que, para las muestras sólidas, es necesario fraccionar el sólido en pedazos pequeños, con la finalidad de modificar la estructura original y obtener una distribución homogénea de la muestra sobre las partículas de la fase sólida. Este proceso aumenta el área superficial de la muestra, lo que mejora la eficiencia de los procesos de transferencia de masa, logrando así, un recobro alto con volúmenes pequeños de disolvente (García-López et al., 2008; Ibáñez et al., 2017).

Los adsorbentes de fase reversa más utilizados son octadecilsilano C18, octilsilano C8 y materiales C30, mientras que la alúmina, sílice y florisil son los adsorbentes comúnmente utilizados en fase normal. Recientemente, se han empleado nuevos materiales como grafeno y nanotubos de carbono de pared múltiple (Capriotti et al., 2015; Ibáñez et al., 2017). Los adsorbentes deben preacondicionarse antes de mezclarse con la muestra, para hidratarlos y activar los grupos funcionales unidos. Adicionalmente, antes de la activación, se puede lavar la fase sólida para eliminar posibles interferencias (Barker, 2000). El tamaño de partícula de los adsorbentes usualmente es de 40 - 100 μm , la proporción en la que se mezcla la muestra con el adsorbente debe ser suficiente para garantizar la distribución homogénea, normalmente, la proporción de muestra:adsorbente que se utiliza es de 1:1 o 1:4, sin embargo, la cantidad adecuada depende de la aplicación (Ibáñez et al., 2017).

Una vez que se completa el proceso de mezclado, la muestra integrada con el adsorbente se transfiere a una columna o cartucho que contiene un filtro en la parte inferior para retener la mezcla. Luego, si se requiere, se coloca un segundo filtro en la parte superior y se comprime. Para asegurar una extracción eficiente, se debe evitar sobrecomprimir la mezcla y evitar la formación de espacios vacíos en el cartucho (Barker, 2000). Este método ha sido ampliamente utilizado en la extracción de analitos con polaridad media y baja, usando adsorbentes de fase reversa como sílice C18, aminopropil o amina primaria y secundaria (PSA). Las partículas de sílice ayudan a desintegrar la muestra, mientras que las cadenas alquílicas unidas contribuyen a disolver los componentes no polares. Las sustancias más polares interactúan con grupos silanol en la superficie de las partículas de sílice y dentro de los poros del soporte sólido, aparte de interactuar con

componentes de la matriz capaces de formar puentes de hidrógeno (García-López et al., 2008).

El siguiente paso, consiste en usar un disolvente apropiado o una secuencia de disolventes para aislar el compuesto de interés, los disolventes de elución deben extraer los analitos de forma cuantitativa y selectiva. En la elución secuencial, los compuestos interferentes de la matriz se eliminan de la columna a través de lavados con diferentes disolventes para después realizar la elución selectiva de los analitos de interés. Los analitos de polaridad baja se pueden recuperar utilizando disolventes apolares, como hexano o diclorometano, también se suele usar acetonitrilo, acetona, acetato de etilo, mezclas de agua con alcoholes e incluso agua caliente (García-López et al., 2008; Ibáñez et al., 2017).

La miniaturización de la DMFS se ha realizado con cantidades de muestra menores a 0.5 g, esto ha contribuido a desarrollar procesos analíticos que generan menos desechos y consumen una menor cantidad de tiempo (Ibáñez et al., 2017). Asimismo, esta técnica no descarta componentes de la muestra, sino que, toda la muestra se unifica con el adsorbente para su tratamiento, en contraste con el método de EFS (Barker, 2007).

Ambas técnicas de extracción con adsorbentes sólidos (EFS y DMFS) no requieren instrumentación cara, disminuyen el consumo de disolvente orgánico, se realizan bajo condiciones ambientales de temperatura y presión, y permiten analizar muestras pequeñas donde la concentración de los analitos se encuentra a nivel de trazas.

1.9 Análisis instrumental de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus metabolitos oxigenados

Comúnmente se emplean técnicas cromatográficas para el análisis de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus productos de degradación porque permiten determinar concentraciones individuales. Algunas de estas técnicas de separación son: cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases (CG), cromatografía de fluidos supercríticos (CFS), electrocromatografía capilar (ECC) y cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM) (Marcé et al., 2000).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) permite la rápida separación y cuantificación de analitos en una mezcla, mediante múltiples interacciones entre el analito, la fase estacionaria y la fase móvil. La separación se puede realizar por fase normal, fase reversa, intercambio iónico, afinidad y exclusión por tamaño, dependiendo de la naturaleza de los analitos que se desean separar y de la matriz que los contenga. Los parámetros cromatográficos como el factor de retención, factor de separación y la resolución se utilizan para medir la adsorción del analito y realizar la separación en un tiempo de análisis razonable (Nesterenko et al., 2019).

En general, la instrumentación para realizar esta técnica consiste en un reservorio para la fase móvil líquida, una bomba para el suministro de fase móvil a alta presión, una cámara de mezclado para incorporar los disolventes en la proporción deseada, una válvula de inyección para cargar la muestra, una columna cromatográfica equipada con un horno para calefacción y una precolumna para proteger la columna de posibles daños o contaminación irreversible, un detector (absorbancia, fluorescencia, índice de refracción, espectrometría de masas, etc.), un programa informático para la operación del instrumento y un sistema de procesamiento de datos (figura 1.8) (Rathore et al., 2019; Nesterenko et al., 2019).

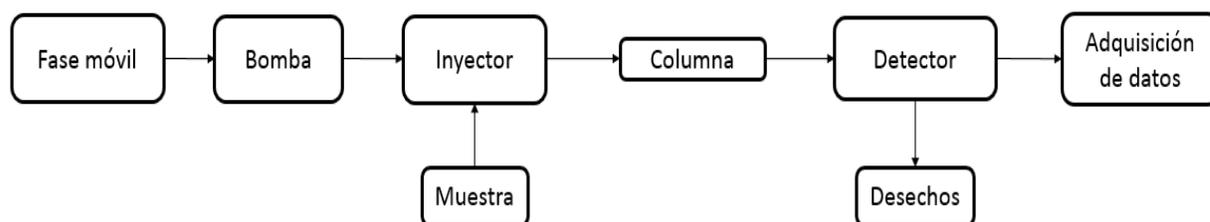


Figura 1.8. Esquema de los componentes principales del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Esta técnica utiliza columnas hechas de acero inoxidable capaces de soportar presiones de 30-50 MPa. La fase estacionaria de las columnas debe ser incompresible, insoluble en la fase móvil y no debe interactuar de manera irreversible con el analito. La muestra que se inyecta en el sistema cromatográfico no debe ser corrosiva, debe estar libre de partículas que puedan dañar la columna, y debe tener una concentración y composición adecuada para su correcta detección. La elución de la muestra se puede realizar de forma isocrática, manteniendo constante la composición de la fase móvil durante la separación,

o, mediante un gradiente, modificando la polaridad de la fase móvil a través del tiempo (Nesterenko et al., 2019; Rathore et al., 2018).

La técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución es utilizada para el análisis de HAPs y sus metabolitos (OHHAPs) no volátiles de alto peso molecular. La selectividad se consigue modificando la fase estacionaria y la fase móvil, usualmente estos compuestos son separados por cromatografía de fase reversa, la fase estacionaria octadecilsilano (C18) es la más utilizada porque ha dado mejores resultados que otros grupos alquílicos (C6-C22) (Gachanja et al., 2019). Las estructuras químicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus metabolitos, muestran una fuerte absorción de energía ultravioleta característica para cada compuesto, presentan fluorescencia, además de luminiscencia bajo condiciones de quimioluminiscencia de peróxi-oxalato (Gachanja et al., 2019). El análisis de HAPs y OHHAPs en muestras ambientales normalmente se realiza mediante un detector de absorbancia UV a 254 nm o un detector de fluorescencia. La cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia es una técnica muy sensible, apta para el análisis de isómeros; la identificación se basa en el tiempo de retención y en las propiedades de fluorescencia de cada sustancia (Marcé et al., 2000; Pulleyblank et al., 2019). Se han estudiado HAPs y OHHAPs en muestras acuosas ambientales y de desecho, en muestras biológicas como orina y en medios de cultivo de diversos microorganismos (Pulleyblank et al., 2019; Raza et al., 2018).

1.10 Validación

La validación de los métodos analíticos desarrollados por laboratorios es necesaria para confirmar a través de la aportación de evidencia objetiva, que se cumplen los requisitos para una aplicación específica prevista (ISO 9000, 2005). La extensión o alcance de la validación dependerá del uso, la naturaleza de los cambios realizados y de las circunstancias en que el método se va a utilizar (INAB, 2012; Eurolab, 2016).

1.10.1 Parámetros de desempeño y criterios de aceptación

La Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura de la Secretaría de Salud (CCAyAC), desarrolló un documento sobre los criterios mínimos para la validación de métodos fisicoquímicos. Con el objetivo de confirmar que los métodos se pueden aplicar correctamente, antes de utilizarlos para los ensayos analíticos. Aplica a los métodos fisicoquímicos cromatográficos empleados en el análisis de agua, alimentos, fármacos, productos biológicos, bebidas alcohólicas, entre otros (CCAyAC, 2011). A continuación, se muestran los parámetros bajo los cuales el resultado de una prueba será considerado como aceptable según la CCAyAC:

Tabla 1.2. Criterios de aceptación

Parámetro	Criterio de aceptación
Intervalo lineal	a) Comportamiento lineal en la gráfica de concentración vs respuesta analítica b) Datos aleatorios en el gráfico de residuales
Intervalo de trabajo	a) Pendiente: valor cercano a 1 b) Coeficiente de correlación: r \geq 0.98 para cuantificación de residuos e impurezas r \geq 0.99 para cuantificación de contenido e ingrediente activo
Límite de cuantificación práctico	Nivel inferior estimado en el intervalo de trabajo
Límite de cuantificación estimado	Menor o igual al nivel inferior estimado en el intervalo de trabajo
Recuperación	Los establecidos en la referencia original del método. Si no se dispone de estos datos, utilizar como guía las tablas 1.3 y 1.4.
Repetibilidad	
Reproducibilidad	

Tabla 1.3. Recuperación para residuos y contaminantes en alimentos y agua

Concentración del analito	Criterio de aceptación
< 1 µg/kg o µg/L	50-120 %
1 a 10 µg/kg o µg/L	60-120 %
10 a 100 µg/kg o µg/L	70-120 %
0.1 a 100 mg/kg o mg/L	70-110 %
100 a 1000 mg/kg o mg/L	85-110 %

Tabla 1.4. Repetibilidad y reproducibilidad para residuos y contaminantes en alimentos y agua

Concentración del analito	Repetibilidad (r)	Reproducibilidad (R)
< 1 µg/kg o µg/L	$CV_r \leq 35 \%$	$CV_R \leq 53 \%$
1 a 10 µg/kg o µg/L	$CV_r \leq 30 \%$	$CV_R \leq 45 \%$
10 a 100 µg/kg o µg/L	$CV_r \leq 20 \%$	$CV_R \leq 32 \%$
0.1 a 100 mg/kg o mg/L	$CV_r \leq 15 \%$	$CV_R \leq 23 \%$
100 a 1000 mg/kg o mg/L	$CV_r \leq 10 \%$	$CV_R \leq 16 \%$

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Equipo y material

2.1.1 Sistema cromatográfico

Sistema 1. Análisis del benzo(a)pireno.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian con bomba ProStar 210, la fase móvil utilizada fue de 100 % metanol con un flujo de 1 mL/min, la inyección de la muestra fue de 20 μ L. Se trabajó a temperatura ambiente con una columna analítica Thermo Scientific Hypersil ODS (150 mm x 4.6 mm D.I.; diámetro de partícula de 5 μ m), conectada a una precolumna de acero inoxidable (20 mm x 2.0 mm D.I.) empacada con sílice Nucleosil C18 (diámetro de partícula de 5 μ m). Se empleó un detector de UV con arreglo de diodos Varian modelo Polychrom 9065 ($\lambda_{\text{max}} = 263$ nm). Las señales se interpretaron mediante el programa informático de control y procesamiento de datos “Varian Star Chromatography Workstation”, versión 6.0 1989-2003.

Sistema 2. Análisis de metabolitos.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Lab Alliance Serie II. La fase móvil utilizada fue una mezcla de 65:35 v/v metanol:agua con un flujo de 1 mL/min; la inyección de la muestra fue de 20 μ L. Se utilizó una columna analítica Perkin Elmer Spheri-5-ODS (250 mm x 4.6 mm D.I.; diámetro de partícula de 5 μ m), conectada a una precolumna de acero inoxidable (20 mm x 2.0 mm D.I.) empacada con sílice Nucleosil C18 (diámetro de partícula de 5 μ m); la temperatura de la columna y precolumna se mantuvo a 30 °C usando un horno de columna Phenomenex, modelo TS-130. Se empleó un detector de fluorescencia Linear Instruments modelo LC 305 ($\lambda_{\text{ex}} = 264$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm). Las señales se interpretaron mediante el programa informático de control y procesamiento de datos “Clarity Chromatography Station”, versión 2.8.1.584.

2.1.2 Disolventes

Agua destilada, agua desionizada obtenida del desionizador Millipore modelo Simplicity UV (resistividad de 18.2 MΩ/cm) y metanol, acetonitrilo e isopropanol grado cromatográfico (J. T. Baker).

2.1.3 Estándares de hidrocarburo y metabolitos

Benzo(a)pireno de pureza > 99.2 % (CHEMSERVICE, EUA), 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno de pureza > 99 % (MRI Global Research Institute Missouri, EUA).

2.1.4 Sistema de Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida

Sílice Supelco Supelclean LC-18 diámetro de partícula de 45 µm, cartuchos de extracción de polipropileno de 1 mL y 6 mL, filtros circulares de polietileno de 20 µm (diámetro de 6.4 mm y 12.7 mm), jeringa de plástico de 20 mL con adaptador, viales de vidrio transparentes y ámbar de 4 mL, matraz Kitasato con tapón monohoradado y aguja unido al sistema de vacío, mortero de ágata con pistilo.

2.1.5 Lisis celular

Baño de ultrasonido Branson modelo 1510 (47 kHz), procesador ultrasónico Cole Parmer modelo CPX 130 PB (130 watts, 50/60 kHz) con micropunta de 1/8 de pulgada, procesador ultrasónico digital Branson modelo 450 (400 watts, 50/60 kHz) con micropunta de 3/16 de pulgada, vaso de precipitados de 100 mL, viales de vidrio transparentes de 10 mL, gato hidráulico, termómetro, microscopio óptico National Optica, hielo, sal de mar comercial (cloruro de sodio).

2.1.6 Determinación de proteínas totales (Método de Lowry)

Tubos de microcentrífuga de polipropileno de 1.5 mL, gradilla, agitador tipo vórtex Thermo Scientific modelo Maxi Mix, espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Genesys 10S, celdas de metacrilato, carbonato de sodio (J.T.Baker), tartrato de sodio y potasio (Sigma-Aldrich), sulfato de cobre (J.T.Baker), hidróxido de sodio (J.T.Baker), dodecilsulfato de sodio (Kodak), reactivo de Folin (Sigma-Aldrich), albúmina de suero bovino (Sigma).

2.1.7 Cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum*

Medio líquido: medio líquido Bristol (la composición se describe en el anexo 1) y peptona proteosa (MCD LAB). Medio sólido: medio líquido Bristol con peptona proteosa y agar bacteriológico (MCD LAB). Matraces Erlenmeyer de 200 mL y 500 mL, algodón, gasas, mechero de Bunsen, asa bacteriológica, lámpara fluorescente de 14 W, temporizador, agitador orbital Thermo Scientific modelo 2346.

2.1.8 Ensayos biológicos

Lámpara de luz amarilla de 20 W, incubadora Jeio Tech modelo SI-600R con temperatura y agitación controlada, matraces Erlenmeyer de 50 mL, agitador orbital Thermo Scientific modelo Compact Digital Mini Rotator.

2.1.9 Equipo, material y reactivos de usos múltiples

Centrífuga Fisher Scientific modelo 225, balanza analítica Ohaus modelo Adventurer Pro AV114C, autoclave eléctrica Tuttnauer modelo 2540EL, medidor de pH Corning modelo 220, tubos cónicos de polipropileno para centrifuga de 15 mL, material de vidrio de laboratorio, micropipetas Eppendorf de 20-250 μL , 100-1000 μL y 2-20 μL , dodecilsulfato de sodio (Kodak), tris(hidroximetil)aminometano (Bio-Rad).

2.2 Cultivo de crecimiento de la microalga *S. capricornutum*

La cepa de la microalga *Selenastrum capricornutum* se adquirió de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Austin, Texas. La microalga se sembró en medio Bristol sólido y líquido (figura 2.1). La composición de los medios se encuentra descrita en el anexo 1. Los cultivos sólidos se sembraron por estría simple, estos se utilizaron para sembrar los medios líquidos en condiciones de esterilidad mediante una asada en caldo. Los cultivos de crecimiento líquidos de 250 mL se agitaron a 100 rpm durante 2 h al día en un agitador orbital para favorecer su crecimiento.

Los cultivos sólidos y líquidos se mantuvieron a temperatura ambiente, iluminados con luz blanca fluorescente de 14 W en ciclos de luz y oscuridad de 16 h y 8 h, respectivamente. Se monitoreó el crecimiento de los medios de cultivo líquido mediante mediciones espectrofotométricas a 685 nm hasta que se obtuvo un valor de absorbancia

de 1, en aproximadamente 30 días, lo que corresponde a una concentración aproximada de 5×10^6 células/mL (Olmos Espejel, 2013). Se utilizaron 15 mL de los medios de cultivo líquido con absorbancia de 1, porque el crecimiento de las células corresponde a la fase exponencial.



Figura 2.1. Medio líquido (A) y medio sólido (B) de la microalga *S. capricornutum*.

2.3 Metodología

A continuación, en la figura 2.2, se muestra un esquema que representa las tres etapas del desarrollo experimental: 1. Optimización de la metodología analítica, 2. Validación de métodos, 3. Bioensayos de exposición: a) activación de medios de cultivo de la microalga *S. capricornutum*, b) actividad enzimática en los extractos intracelular y extracelular y c) control metabólico. Las actividades correspondientes a cada etapa se incluyen en el esquema.

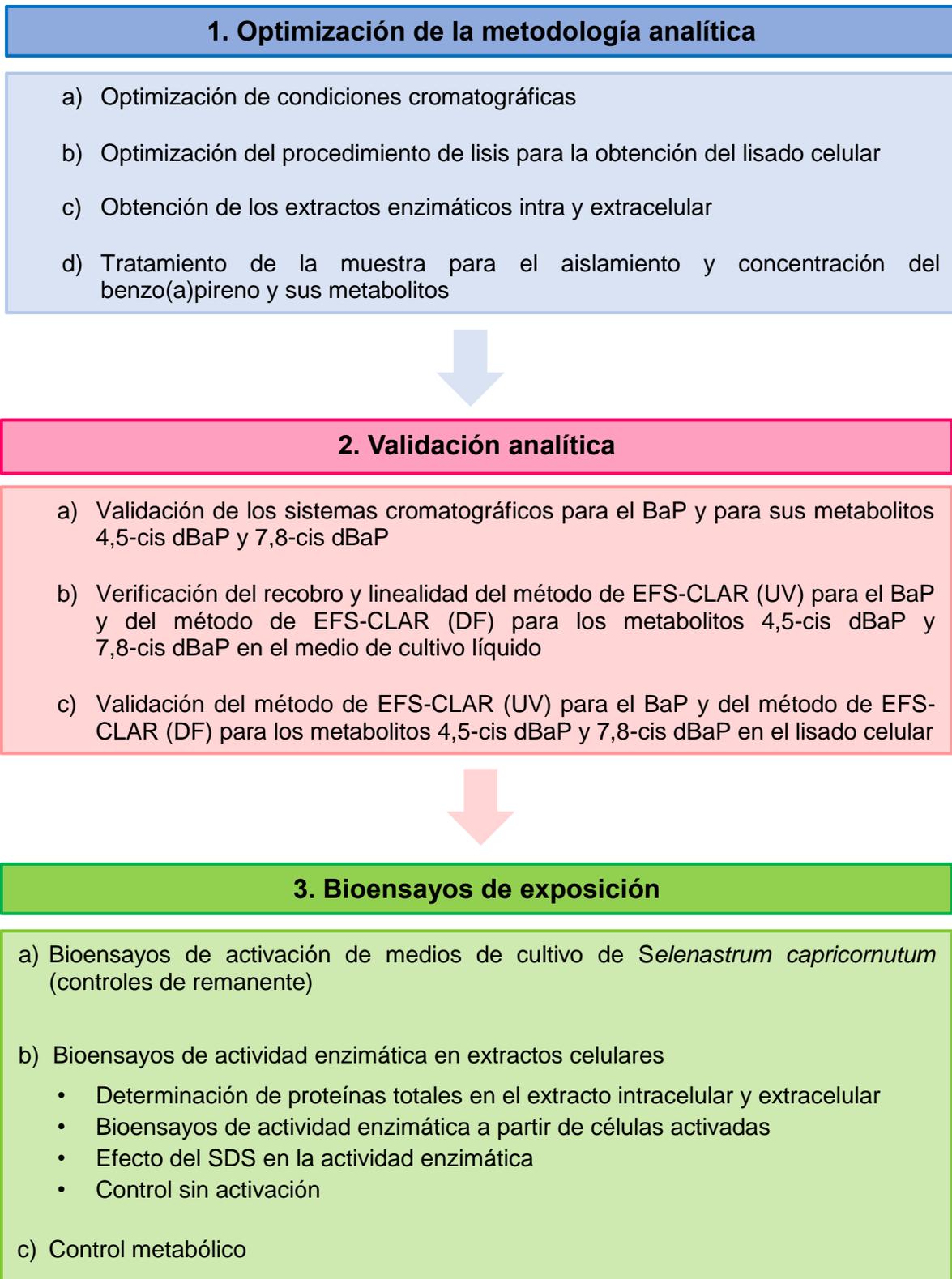


Figura 2.2. Esquema general del procedimiento experimental.

2.3.1 Optimización de la metodología analítica

2.3.1.1 Optimización de condiciones cromatográficas

2.3.1.1.1 Condiciones cromatográficas para el análisis del benzo(a)pireno

Las condiciones cromatográficas para el análisis de BaP fueron obtenidas de la referencia de García de Llasera et al. (2016) y se encuentran descritas en la sección 2.1.1.

2.3.1.1.2 Optimización de las condiciones cromatográficas para el análisis de los metabolitos del benzo(a)pireno

Selección de columna cromatográfica y fase móvil

Con el objetivo de conseguir la mejor separación entre los metabolitos 4,5-cis dBaP, 11,12- dBaP y 7,8- cis dBaP, compuestos isómeros, se probaron tres diferentes columnas cromatográficas: 1) Hypersil Green PAH, ThermoQuest (100 mm x 4.6 mm D.I.), 2) Spherisorb 5 ODS, Phenomenex (250 mm x 4.6 mm D.I.) y 3) Spheri-5-ODS, Perkin Elmer (250 mm x 4.6 mm D.I.), todas con diámetro de partícula de 5 μm . Se utilizó una muestra que contenía a los metabolitos producidos por las microalgas (4,5-dBaP, 11,12-dBaP y 7,8-cis dBaP) por exposición a BaP bajo luz amarilla durante 3 h a 25 °C. Se trabajó a temperatura ambiente probando las fases móviles de metanol:agua, 65:35 y 60:40 v/v con un flujo de 1 mL/min, y detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}}= 264 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}= 390 \text{ nm}$).

Selección de la temperatura

La temperatura de la columna cromatográfica se manejó a 25 °C y a 30 °C con la columna Spheri-5-ODS, Perkin Elmer (250 mm x 4.6 mm D.I.), fase móvil de metanol:agua 65:35 v/v, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}}= 264 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}= 390 \text{ nm}$).

2.3.1.2 Optimización del procedimiento para la obtención del lisado celular

Para optimizar la metodología de lisis celular se utilizaron muestras de 15.0 mL de medio de cultivo de microalgas con absorbancia de 1, la muestra se centrifugó durante 15 min a 3900 rpm para obtener la biomasa, la cual se resuspendió en diferentes disoluciones (ver tabla 2.1) en un volumen de 5 mL. Una vez resuspendida, se colocó en un vial de vidrio de 10 mL y se sometió al proceso de sonicación de dos maneras, de forma independiente: a. en baño ultrasónico y b. con sonda ultrasónica en un baño de

hielo usando dos diferentes procesadores. Después de haber realizado la lisis celular de las microalgas, los 5 mL de muestra se centrifugaron durante 15 min a 3900 rpm para obtener el lisado celular libre de residuos sólidos y así determinar el grado de lisis.

Para la determinación de la eficiencia en la lisis celular, se midió la absorbancia de la clorofila extraída de las microalgas como indicación de la posible ruptura de las células, por mediciones espectrofotométricas a 685 nm. También se observaron las células lisadas en el microscopio óptico y se realizó la prueba de Lowry de los lisados celulares obtenidos con los procesadores ultrasónicos, para cuantificar la cantidad de proteínas totales que se extrajeron de la microalga durante el procedimiento. En la figura 2.3, se muestra el esquema de los experimentos para la optimización de la lisis celular. El método de Lowry se describe en el anexo 2.

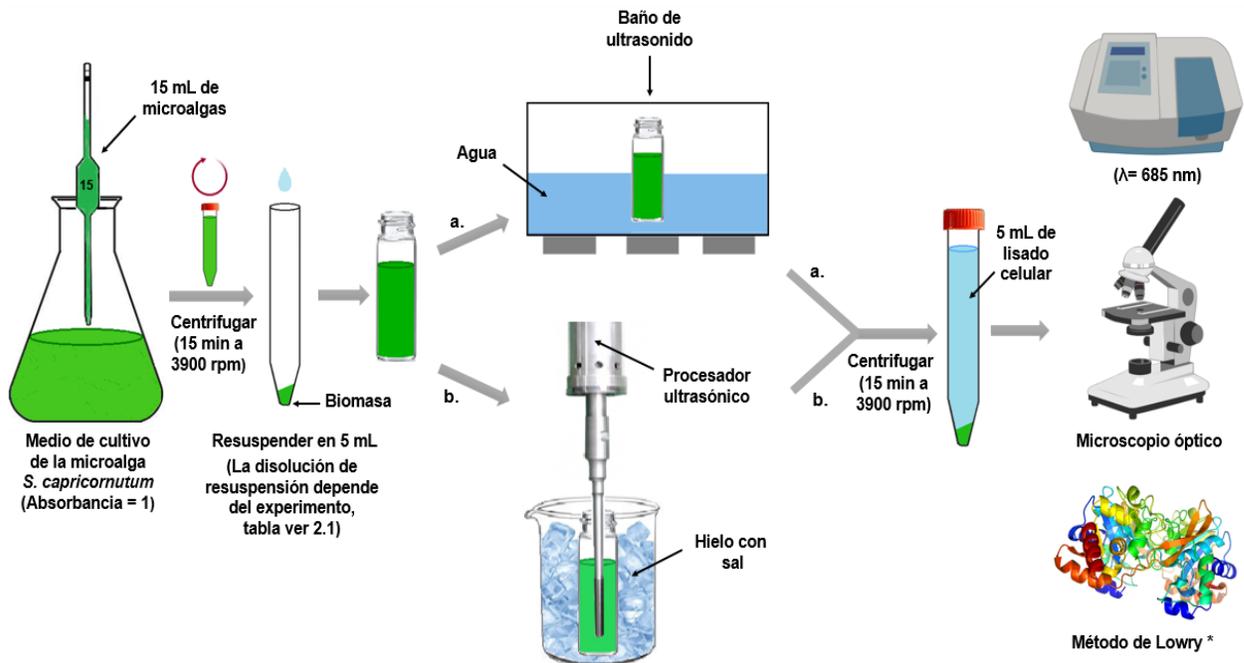


Figura 2.3. Experimentos para la optimización del método de lisis celular, a. Baño ultrasónico, b. Procesador ultrasónico (los procedimientos a y b se realizaron de forma independiente). * El método de Lowry se aplicó únicamente a los lisados obtenidos con el procedimiento b.

Inicialmente se utilizó el procedimiento a. con el baño de ultrasonido, modificando el tiempo de procesamiento y la presión osmótica de las células mediante las disoluciones de lisis mostradas en la tabla 2.1. Después del tratamiento, se midió la absorbancia del lisado celular a 685 nm y se observaron las células al microscopio para estudiar su morfología.

Posteriormente, se utilizó el procesador ultrasónico Cole-Parmer modelo CPX 130 PB, variando la intensidad de la sonda, el tiempo de sonicación y las disoluciones de lisis (ver tabla 2.1). Se determinó la absorbancia de la clorofila liberada, la cantidad de proteínas extraídas y se observó la apariencia de las células al microscopio.

Finalmente, en el grupo de trabajo se realizó la optimización de la lisis con el procesador ultrasónico digital Branson modelo 450 por tener una mayor potencia de salida. El grado de lisis se determinó mediante determinaciones espectrofotométricas de clorofila y la cuantificación de proteínas totales. Los resultados de las condiciones probadas aún no se encuentran publicados. Las disoluciones de lisis y las condiciones finales de procesamiento seleccionadas para la obtención del lisado se presentan en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Condiciones de los ensayos para la optimización de la lisis celular

Aparato	Disolución de lisis (5 mL)	Tiempo de procesamiento	Amplitud de la sonda
Baño de ultrasonido	Agua desionizada	15 min 30 min	NA
	NaCl (0.9 %)		
	NaCl (3 %)		
Procesador ultrasónico Cole-Parmer modelo CPX 130 PB	NaCl (0.9 %)	2 min 4 min 6 min	80 %
	NaCl (0.9 %)	6 min	30 % 60 %
	Tris-HCl (50 mM)	6 min	80 %
	Tris-HCl (50 mM) + NaCl (3 %)		
	Tris-HCl (50 mM) + SDS (1 %)		
	Tris-HCl (50 mM) + Lisozima (0.4 mg/mL)		
Procesador ultrasónico digital Branson modelo 450	Tris-HCl (50 mM)	5 min (pulsos de 10 s con pausas de 5 s)	40 %
	Tris-HCl (50 mM) + SDS (1 %)		

El pH de la disolución de Tris-HCl (50 mM) fue de 7.5 en todos los casos.

NA= No aplica

2.3.1.3 Obtención de los extractos enzimáticos intra y extracelular

Los extractos intracelular y extracelular son utilizados para los bioensayos de actividad enzimática que se describirán más adelante; en esta sección sólo se describirá su preparación. El extracto intracelular (Ei) representa al lisado celular obtenido de la biomasa separada por centrifugación y proveniente de un cultivo previamente activado en exposición primaria al benzo(a)pireno. El extracto extracelular (Ee) representa al sobrenadante del mismo cultivo. A continuación, se describe con más detalle la obtención de cada extracto.

2.3.1.3.1 Obtención del extracto enzimático extracelular (Ee)

Después de realizar la exposición primaria durante 72 h a dos temperaturas: 25 °C y 34 °C (ver sección 2.3.3.1.1), los 15 mL de medio de cultivo, se centrifugaron durante 15 min a 3900 rpm y el sobrenadante obtenido se transfirió a otro matraz Erlenmeyer de 50 mL. Luego se le adicionaron 375 μ L de Tris-HCl 2 M, para tener una concentración final de 50 mM y pH de 7.5, con el propósito de mantener la estabilidad de las enzimas excretadas por la microalga durante su activación y proceder al bioensayo de actividad enzimática. El esquema del procedimiento se muestra en la figura 2.4.

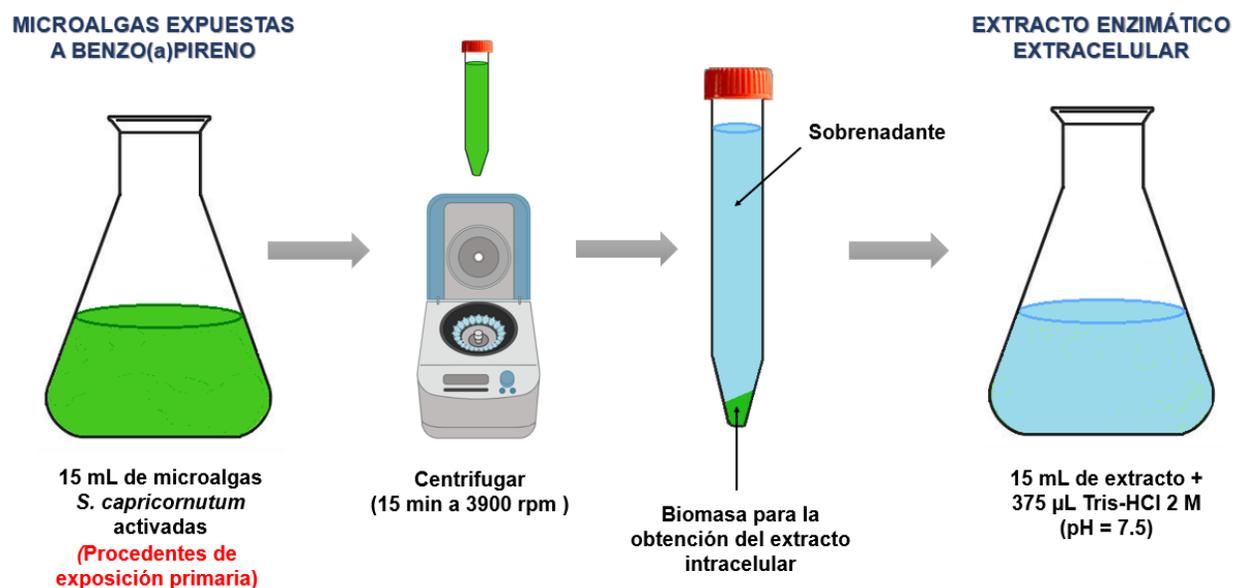


Figura 2.4. Procedimiento para la obtención del extracto enzimático extracelular.

2.3.1.3.2 Obtención del extracto enzimático intracelular (Ei)

Después de realizar la exposición primaria de las microalgas durante 72 h a dos temperaturas: 25 °C y 34 °C (ver sección 2.3.3.1.1), los 15 mL de medio de cultivo se centrifugaron durante 15 min a 3900 rpm. La biomasa resultante se resuspendió en 3 mL de una disolución de Tris-HCl 50 mM (pH = 7.5), para lavar las células y remover de ellas el BaP y los metabolitos residuales. Luego, se volvió a centrifugar durante 15 min a 3900 rpm, el sobrenadante se desechó y la biomasa se resuspendió en 5.0 mL de una disolución de Tris-HCl 50 mM (pH= 7.5). En seguida, la muestra se transfirió a un vial de vidrio de 10 mL y se mantuvo en el congelador a -12 °C por 20 min, con el objetivo de

enfriar la muestra aproximadamente de 0 a 4 °C, antes de realizar el proceso de lisis. La ruptura de las microalgas se realizó con el procesador ultrasónico digital Branson modelo 450, el vial se colocó en un vaso de precipitados con hielo y sal para evitar su calentamiento y preservar la estabilidad de las proteínas extraídas. La micropunta de la sonda se colocó al fondo del vial para evitar la formación de espuma; la sonicación de la muestra se realizó a una amplitud del 40 % (17 ± 2 watts) durante 5 min, mediante pulsos de 10 s con pausas de 5 s. La temperatura de la muestra se midió antes y después del proceso.

Posteriormente, se centrifugaron los 5 mL del lisado durante 15 min a 3900 rpm para eliminar los residuos sólidos. El sobrenadante se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se le agregó 10 mL de una disolución de Tris-HCl 50 mM (pH = 7.5) para mantener la estabilidad de la enzima extraída de la microalga; el volumen final de 15 mL, correspondió al extracto enzimático intracelular. El esquema del procedimiento experimental se presenta en la figura 2.5.

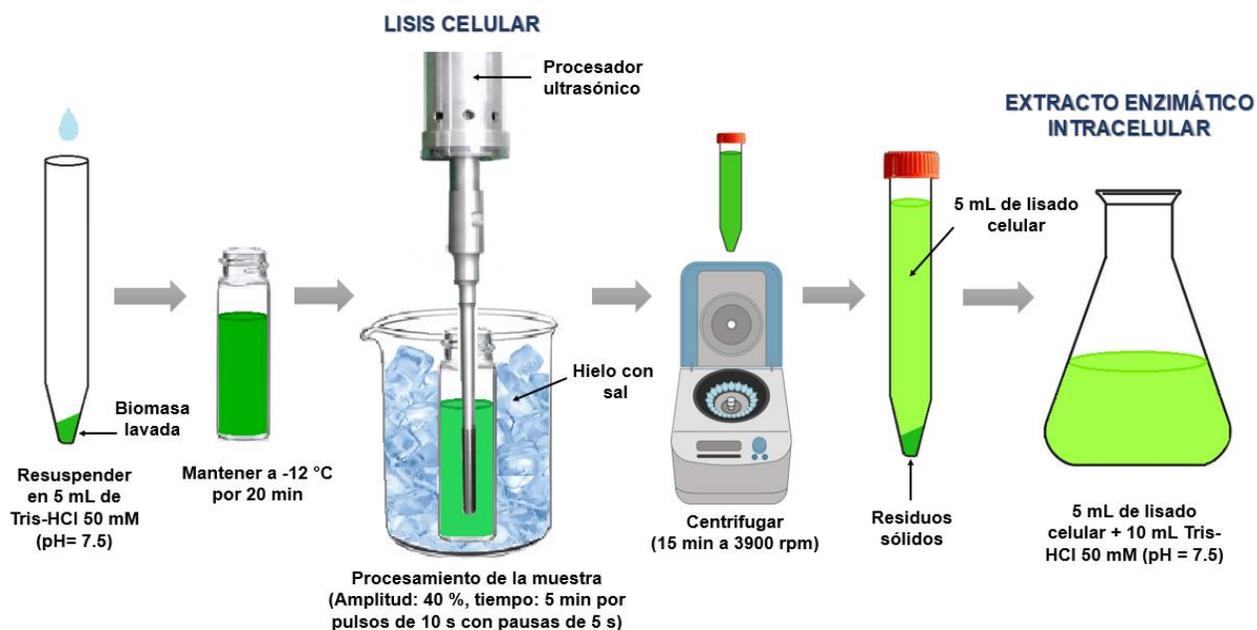


Figura 2.5. Condiciones para la obtención del extracto enzimático intracelular.

2.3.1.4 Tratamiento de la muestra para el aislamiento y concentración del benzo(a)pireno y sus metabolitos

2.3.1.4.1 Método de Extracción en Fase Sólida

La extracción de los analitos en el medio de cultivo líquido mediante Extracción en Fase Sólida (EFS) se desarrolló anteriormente en el grupo de trabajo (García Cicourel, 2015), por lo que se decidió probar el mismo procedimiento para el tratamiento de las muestras líquidas analizadas en este trabajo.

El procedimiento de EFS consistió en empacar un cartucho de polipropileno de 6 mL con 300 mg de sílice C18, primero se introdujo un filtro en la base del cartucho, se agregó el adsorbente y se colocó otro filtro en la parte superior del cartucho, cuidando que la sílice se encontrara distribuida de manera uniforme. Después se activó la sílice C18 con 1 mL de metanol y se equilibró con 15 mL de agua desionizada. Mediante este proceso, se eliminaron posibles impurezas en la sílice y se solvataron las moléculas del adsorbente para favorecer la interacción entre los grupos funcionales de este y los analitos.

Después del acondicionamiento, se cargaron los 15 mL de muestra en el cartucho, eluyendo a gravedad. Luego se realizaron lavados para eliminar interferentes e impurezas de la muestra, con mezclas de agua desionizada y acetonitrilo, en el siguiente orden: 10 mL de agua desionizada, 10 mL de acetonitrilo al 10 %, 3 mL de acetonitrilo al 20 % y 1 mL de acetonitrilo al 30 %. Los eluentes de lavado se aplicaron con ayuda del vacío a un flujo aproximado de 1 mL/min.

Posteriormente, la elución de los metabolitos se realizó con 3.0 mL de acetonitrilo al 55 % (Fracción A), recolectados en un vial de vidrio color ámbar, finalmente se eluyó el benzo(a)pireno con 4.0 mL de acetonitrilo al 100 % (Fracción B), recolectado en un vial de vidrio transparente; los analitos se eluyeron a gravedad.

Las fracciones obtenidas en el procedimiento de EFS se analizaron por cromatografía de líquidos para corroborar que el proceso de limpieza y recuperación de los analitos fuera adecuado. El procedimiento esquematizado de la extracción en fase sólida de los extractos enzimáticos se muestra en la figura 2.6.

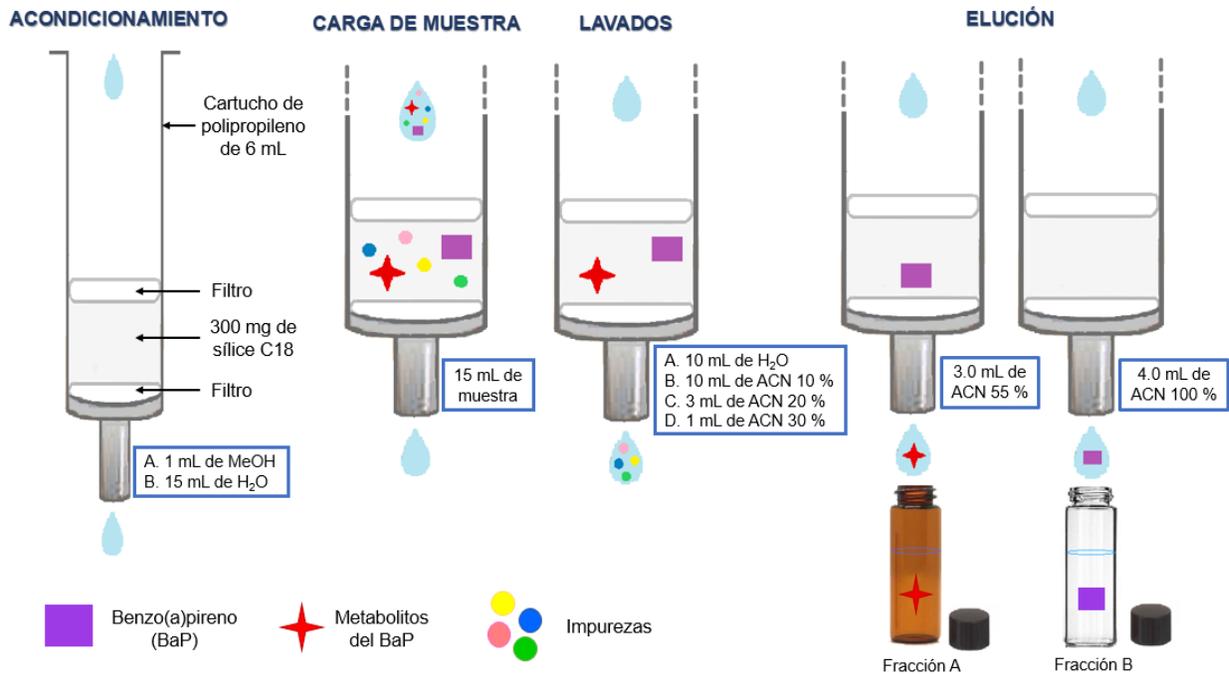


Figura 2.6. Procedimiento de extracción en fase sólida empleado para aislar y concentrar el BaP y sus metabolitos de las muestras.

2.3.1.4.2 Método de Dispersión de Matriz en Fase Sólida

La extracción del benzo(a)pireno y sus metabolitos de la biomasa microalgal se realizó mediante la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) siguiendo la metodología desarrollada por García Cicourel, 2015; esquematizada en la figura 2.7. Consistió en colocar la biomasa en un portaobjetos para dejarla secar por 24 h, posteriormente se raspó y se pesó en la balanza microanalítica, el peso aproximado fue de 5 mg. Con el mortero de ágata se homogeneizó la biomasa con 100 mg de sílice C18 seca, previamente activada con metanol (3.5 mL/g); después se empacó la mezcla en un cartucho de polipropileno de 1 mL, colocando filtros en la parte inferior y superior. El lavado de interferencias se realizó con mezclas de agua desionizada y acetonitrilo en el siguiente orden: 10 mL de agua desionizada, 10 mL de acetonitrilo al 10 % y 5 mL de acetonitrilo al 20 %. Para eluir los metabolitos se utilizaron 1.5 mL de acetonitrilo al 40 % (Fracción A) y se recolectaron en un vial de vidrio color ámbar, finalmente el benzo(a)pireno se eluyó con 1.0 mL de acetonitrilo al 90 % (Fracción B), y se recolectó

en un vial de vidrio transparente; todo el procedimiento se realizó con ayuda del vacío a un flujo aproximado de 1 mL/min.

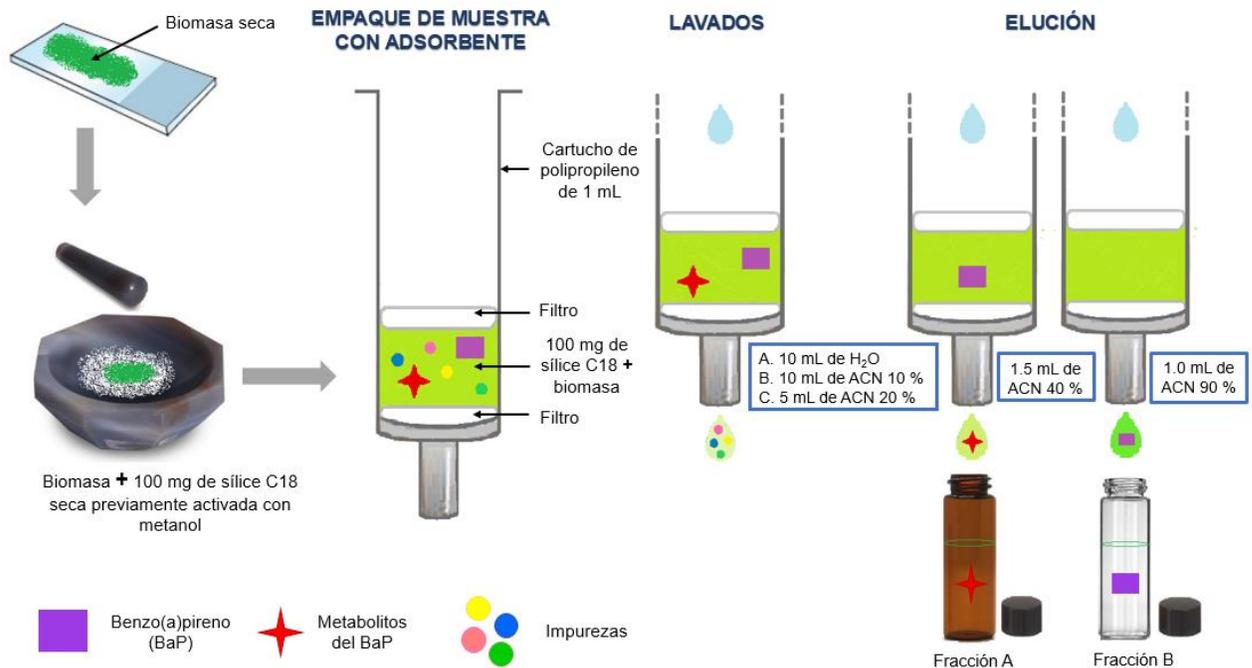


Figura 2.7. Procedimiento de dispersión de matriz en fase sólida para aislar y concentrar el BaP y sus metabolitos de la biomasa de la microalga *S. capricornutum*.

2.3.2 Validación de analítica

2.3.2.1 Validación del sistema cromatográfico para el benzo(a)pireno y sus metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP

2.3.2.1.1 Benzo(a)pireno

Para la validación del sistema cromatográfico se prepararon disoluciones estándar de benzo(a)pireno en metanol.

Determinación de los parámetros de desempeño:

Intervalo lineal

La determinación del intervalo lineal se realizó mediante la elaboración de curvas de calibración preparadas por triplicado de manera independiente. Los niveles de concentración de benzo(a)pireno seleccionados fueron los siguientes: 0.10 mg/L, 0.25 mg/L, 0.50 mg/L, 0.75 mg/L, 1.0 mg/L, 1.25 mg/L, 1.50 mg/L y 1.75 mg/L. Mediante la señal del instrumento y la concentración de los estándares de BaP se realizó el análisis estadístico de mínimos cuadrados.

Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se obtuvieron mediante el análisis de la señal del detector al inyectar 3 veces disoluciones diluidas de BaP: 0.05 mg/L y 0.025 mg/L. El límite de detección se consideró como la concentración a la cual la respuesta fue aproximadamente 3 veces mayor que el nivel de ruido de fondo y el límite de cuantificación correspondió a la concentración cuya señal obtenida fue aproximadamente 10 veces mayor que el nivel de ruido.

También fueron estimados mediante un análisis estadístico con los datos obtenidos para la determinación del intervalo lineal, se consideraron las 3 concentraciones más bajas: 0.10 mg/L, 0.25 mg/L, 0.50 mg/L. Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$\text{a) } LD = \frac{3.3 sb_0}{m} \qquad \text{b) } LC = \frac{10 sb_0}{m}$$

Donde sb_0 es la desviación estándar de la ordenada al origen y m es la pendiente de la recta obtenida en la regresión lineal de la respuesta analítica contra el nivel de concentración.

Precisión

Se seleccionaron tres diferentes concentraciones de benzo(a)pireno, las disoluciones se analizaron por triplicado en dos días diferentes. El nivel inferior fue de 0.1 mg/L, el nivel medio fue de 1.0 mg/L y el nivel superior de 1.75 mg/L. Se calculó el porcentaje del coeficiente de variación para cada concentración de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$c) \quad CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Donde s es la desviación estándar del área y \bar{x} es el promedio de las áreas

2.3.2.1.2 Metabolitos 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno

Para la validación del sistema cromatográfico se prepararon disoluciones estándar de 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en una mezcla acetónitrilo:agua, 55:45 v/v. Conservadas en viales de vidrio ámbar.

Determinación de los parámetros de desempeño:

Intervalo lineal

La determinación del intervalo lineal se realizó mediante la elaboración de curvas de calibración de la mezcla de los metabolitos preparadas por triplicado de manera independiente. Los niveles de concentración de 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP seleccionados fueron los siguientes: 10 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L, 75 µg/L, 100 µg/L, 125 µg/L y 150 µg/L. Mediante la respuesta del detector de fluorescencia y la concentración de los estándares de los metabolitos se realizó el análisis estadístico de mínimos cuadrados.

Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se obtuvieron mediante el análisis de la señal del detector al inyectar 3 veces disoluciones diluidas de la mezcla de los metabolitos: 5 µg/L y 2.5 µg/L. El límite de detección se consideró como la concentración a la cual la señal de fluorescencia fue aproximadamente 3 veces mayor que el nivel de ruido de fondo y el límite de cuantificación correspondió a la concentración cuya señal obtenida fue aproximadamente 10 veces mayor que el nivel de ruido.

También fueron estimados mediante un análisis estadístico con los datos obtenidos para la determinación del intervalo lineal, se consideraron las 5 concentraciones más bajas: 10 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L, 75 µg/L y 100 µg/L. Empleando las ecuaciones a y b.

Precisión

Se seleccionó la concentración de 75 µg/L de ambos metabolitos para evaluar la reproducibilidad. Se realizaron 5 inyecciones en 3 días diferentes, calculando el coeficiente de variación en cada caso de acuerdo a la ecuación c.

2.3.2.2 Verificación del recobro y linealidad del método de EFS-CLAR (UV) para el BaP y del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en el medio de cultivo líquido

Velasco Cruz (2011) y Olmos Espejel (2013) desarrollaron una metodología para el análisis de los analitos de estudio en el medio líquido. Investigaron el efecto en el recobro de los analitos por la adición de diferentes porcentajes de isopropanol a la muestra antes de la extracción, determinaron la linealidad, la recuperación global, la precisión y la robustez del método.

Con la finalidad de verificar el desempeño del método por comparación con los resultados de los trabajos previamente citados y así confirmar la capacidad para ser aplicado adecuadamente en el laboratorio para la presente investigación, se realizaron experimentos de recuperación en el medio de cultivo líquido. Para ello, se tomaron 15.0 mL de medio de cultivo de la microalga *S. capricornutum* con absorbancia de 1 y se centrifugaron durante 15 min a 3900 rpm; el sobrenadante se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 mL para fortificarlo con el BaP y sus metabolitos. Las concentraciones de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en la muestra fueron de 5 µg/L, 17 µg/L, 30 µg/L y 40 µg/L; las concentraciones de benzo(a)pireno en la muestra fueron de 0.027 mg/L, 0.133 mg/L y 0.267 mg/L.

Posteriormente se adicionaron 3.75 mL de isopropanol a la muestra de 15 mL para tener una concentración de 20 % v/v de isopropanol y así aumentar la solubilidad del BaP. Finalmente se aplicó el método de extracción en fase sólida descrito en la sección 2.3.1.4.1 y se analizó la fracción A por CLAR (DF) y la fracción B por CLAR (UV) para determinar la recuperación global.

2.3.2.3 Validación del método de EFS-CLAR (UV) para el BaP y del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en el lisado celular

2.3.2.3.1 Tratamiento del lisado celular

A diferencia del medio de cultivo, el lisado celular obtenido mediante la ruptura de las microalgas, presentó una composición más heterogénea. Compuesto principalmente por lípidos, proteínas, polisacáridos, clorofila, ADN y ARN, lo que aumentó la solubilidad del hidrocarburo y los dihidrodioles en la muestra. Por esta razón, en la preparación previa del lisado celular para realizar la EFS de los analitos, se omitió la adición de isopropanol, en comparación a como habitualmente se maneja el medio líquido.

2.3.2.3.2 Evaluación de interferentes en la matriz

El lisado celular, hasta el momento, no se había estudiado cromatográficamente en el grupo de trabajo, ni se encontró información referente reportada en la literatura, por lo que fue necesario evaluar la presencia de interferentes que pudieran impedir la óptima detección del BaP y los metabolitos 4,5-cis dBaP, 7,8-cis dBaP y 11,12-cis dBaP. El lisado celular de 15 mL se obtuvo como se describió en la sección 2.3.1.3.2. No obstante, es importante señalar que este lisado proviene de la biomasa de cultivo líquido sin exposición primaria, por lo que se omitió el lavado de las células, y además, la disolución de lisis utilizada fue Tris-HCl 50 mM (pH= 7.5) con SDS al 1 %. Este lisado celular se utilizó como matriz para evaluar la presencia de interferentes, y también para realizar la validación del método al fortificarlo con los estándares de los analitos.

Se realizó la extracción en fase sólida de los 15 mL de lisado celular, para obtener las fracciones A y B que contendrían a los metabolitos y al benzo(a)pireno, respectivamente. El procedimiento de EFS se describió en la sección 2.3.1.4.1. Finalmente, la fracción A (3.0 mL de acetonitrilo al 55 %) se analizó por CLAR-DF y la fracción B (4 mL de acetonitrilo al 100 %) por CLAR-UV; con el objetivo de visualizar las señales correspondientes a la matriz.

2.3.2.3.3 Fortificación del lisado celular

Para realizar la validación del método, se obtuvieron porciones representativas del material intracelular (lisado). A cada muestra de 15 mL del lisado celular, se le adicionó el BaP y los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP. Las concentraciones seleccionadas

para el benzo(a)pireno fueron: 0.027 mg/L, 0.067 mg/L, 0.167 mg/L, 0.267 mg/L y 0.400 mg/L. Los niveles de concentración de los metabolitos fueron: 5 µg/L, 10 µg/L, 15 µg/L, 20 µg/L y 30 µg/L. Las muestras fortificadas se sometieron al procedimiento de EFS y análisis cromatográfico, previamente descritos.

2.3.2.3.4 Benzo(a)pireno

Determinación de los parámetros de desempeño:

Intervalo lineal

La determinación del intervalo lineal se realizó mediante la elaboración de curvas de calibración preparadas por triplicado de manera independiente. Los niveles de concentración de BaP seleccionados se mencionan en la sección 2.3.2.3.3. Mediante la respuesta del detector ultravioleta y la concentración de BaP adicionada se realizó el análisis estadístico de mínimos cuadrados.

Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se obtuvieron mediante el análisis de la señal del detector al inyectar 3 veces las muestras de concentración: 0.020 mg/L y 0.013 mg/L. El límite de detección se consideró como la concentración a la cual la señal del detector ultravioleta fue aproximadamente 3 veces mayor que el nivel de ruido de fondo y el límite de cuantificación como la concentración cuya señal fue aproximadamente 10 veces mayor que el nivel de ruido.

También fueron estimados mediante un análisis estadístico con los datos obtenidos para la determinación del intervalo lineal; se consideraron las 4 concentraciones más bajas: 0.027 mg/L, 0.067 mg/L, 0.167 mg/L y 0.267 mg/L. Se emplearon las ecuaciones a y b.

Precisión

Se seleccionaron dos diferentes concentraciones para evaluar la reproducibilidad, las muestras se analizaron por triplicado en dos días diferentes. La concentración del nivel inferior fue de 0.027 mg/L, y del nivel superior de 0.167 mg/L. Se calculó el porcentaje del coeficiente de variación para cada concentración de acuerdo a la ecuación c.

Recobro

Se graficó la concentración de BaP recuperada en función de la concentración de BaP adicionada, la pendiente de la recta multiplicada por 100 correspondió al porcentaje de recobro global.

2.3.2.3.5 Metabolitos 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno

Determinación de los parámetros de desempeño:

Intervalo lineal

La determinación del intervalo lineal se realizó mediante la elaboración de curvas de calibración de la mezcla de los metabolitos preparadas por triplicado de manera independiente. Los niveles de concentración de 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP seleccionados se mencionan en la sección 2.3.2.3.3. Mediante la respuesta del detector de fluorescencia y la concentración adicionada se realizó el análisis estadístico de mínimos cuadrados.

Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se obtuvieron mediante el análisis de la señal del detector de fluorescencia. Seleccionando concentraciones bajas de la mezcla de metabolitos: 1 µg/L y 0.5 µg/L. El límite de detección se consideró como la concentración a la cual la señal de fluorescencia fue aproximadamente 3 veces mayor que el nivel de ruido de fondo y el límite de cuantificación como la concentración cuya señal fue aproximadamente 10 veces mayor que el nivel de ruido.

También fueron estimados mediante un análisis estadístico empleando las ecuaciones a y b, con los datos obtenidos en la determinación del intervalo lineal. Para el 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno se consideraron las concentraciones: 5 µg/L, 10 µg/L, 15 µg/L, 20 µg/L y 30 µg/L; para el 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno se consideraron las 3 concentraciones más bajas: 5 µg/L, 10 µg/L y 15 µg/L.

Precisión

Se seleccionó la concentración de 15 µg/L de ambos metabolitos para evaluar la reproducibilidad. Las muestras se analizaron por triplicado en dos días diferentes, calculando el coeficiente de variación de acuerdo a la ecuación c.

Recobro

Se graficó la concentración de metabolito recuperada en función de la concentración de metabolito adicionada, la pendiente de la recta multiplicada por 100 correspondió al porcentaje de recobro global.

2.3.2.3.6 Robustez

Debido a que el método fue optimizado inicialmente para la lisis celular con una concentración de SDS al 1 %, se verificó también la capacidad del método analítico de permanecer inalterado ante la variación en el proceso de lisis celular, al omitir el empleo de dodecilsulfato de sodio. Para ello, se realizaron experimentos de recuperación en el lisado celular obtenido sin SDS; a cada muestra de lisado se le adicionó una mezcla de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP para obtener concentraciones de 5 µg/L, 10 µg/L, 15 µg/L y 20 µg/L. Para el benzo(a)pireno se siguió el mismo procedimiento, se realizaron adiciones del hidrocarburo para obtener concentraciones de 0.027 mg/L, 0.133 mg/L, 0.267 mg/L y 0.400 mg/L. Posteriormente, se realizó el procedimiento de EFS y el análisis cromatográfico.

2.3.3 Bioensayos de exposición

Descripción de los ensayos biológicos

A. Los bioensayos de activación consistieron en realizar la exposición primaria de las microalgas enteras al benzo(a)pireno, con el propósito de preparar a los microorganismos para realizar la biodegradación, induciendo la producción de las enzimas degradadoras. La cantidad de BaP residual y los metabolitos producidos fueron determinados por separado en el medio líquido y la biomasa, después de la exposición bajo luz amarilla y agitación orbital durante un tiempo y temperatura específica. Los tiempos y temperaturas

manejados fueron de 3, 48 y 72 h a 34 °C, y de 48 y 72 h a 25 °C. Estos experimentos de activación fueron considerados como “control de remanentes”.

B. Los bioensayos de actividad enzimática son experimentos realizados con las enzimas liberadas presentes en los extractos intracelular y extracelular, obtenidos a partir de cultivos de la microalga *S. capricornutum* previamente activados en una exposición primaria de 72 h a dos temperaturas diferentes: 25 °C y 34 °C. Estos extractos se pusieron en contacto con el benzo(a)pireno (exposición secundaria), a fin de estudiar la degradación efectuada por las enzimas excretadas por las células al medio en el extracto extracelular (Ee) y las enzimas extraídas de las células en el extracto intracelular (Ei). La evaluación de la actividad enzimática se realizó cuantificando el BaP y sus metabolitos después de la exposición de 3 h a temperatura ambiente, bajo luz natural y agitación orbital. También se manejaron extractos enzimáticos de microalgas que no fueron expuestas al hidrocarburo (no activadas), como controles para efecto de comparación. Los extractos Ee y Ei se prepararon en la disolución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, como se describe en la sección 2.3.1.3. Además, se estudió la actividad enzimática en extractos intracelulares obtenidos en la disolución de lisis de Tris-HCl 50 mM pH 7.5 más dodecilsulfato de sodio al 1 %, para evaluar el efecto del detergente.

C. Por otra parte, el control metabólico es un bioensayo en el cual se realizó la exposición primaria de las células durante 72 h a 34 °C y posteriormente con las mismas células enteras se realizó la exposición secundaria a benzo(a)pireno durante 3 h a 34 °C. Este control se efectuó para evaluar el metabolismo de las microalgas después de haber sido sometidas a un proceso previo de degradación.

En la tabla 2.2, se compilan los ensayos biológicos realizados, con su correspondiente nombre y objetivo. En la figura 2.8, se ilustra en un esquema el procedimiento experimental que se llevó a cabo para realizar cada uno de ellos, la numeración de los experimentos corresponde con la identificación que se muestra en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Identificación y objetivo de los ensayos biológicos

Número	Exposición	Nombre	Objetivo
1	Exposición primaria (con células enteras)	Control de remanente: 3 h a 34 °C	Activación de las células y cuantificación del benzo(a)pireno y sus metabolitos remanentes en el medio líquido y en la biomasa después de la exposición.
2		Control de remanente: 48 h a 25 °C	
3		Control de remanente: 48 h a 34 °C	
4		Control de remanente: 72 h a 25 °C	
5		Control de remanente: 72 h a 34 °C	
6	Exposición secundaria (con extractos celulares)	Actividad enzimática a partir de células activadas	Estudiar la actividad enzimática en los extractos intracelular y extracelular provenientes de microalgas activadas. Exposición de 3 h a TA.
7		Actividad enzimática a partir de células no activadas	Verificar si es necesaria la activación de las células (exposición primaria a benzo(a)pireno) para la producción enzimática. Exposición de 3 h a TA.
8		Actividad enzimática en presencia de SDS	Estudiar la actividad enzimática en el extracto intracelular (obtenido en un medio de lisis de SDS 1 % y Tris-HCl 50 mM, pH = 7.5) proveniente de microalgas activadas.
9	Exposición primaria y secundaria (con células enteras)	Control metabólico	Determinar la capacidad de degradación de las células enteras (activadas) en una segunda exposición a benzo(a)pireno durante 3 h a 34 °C.

Notas: Los bioensayos 6 y 7 se efectuaron con extractos intracelulares obtenidos en un medio de lisis de Tris-HCl 50 mM, pH = 7.5.

Cada exposición a BaP se realizó fortificando la muestra con 4 µg (0.266 mg/L)

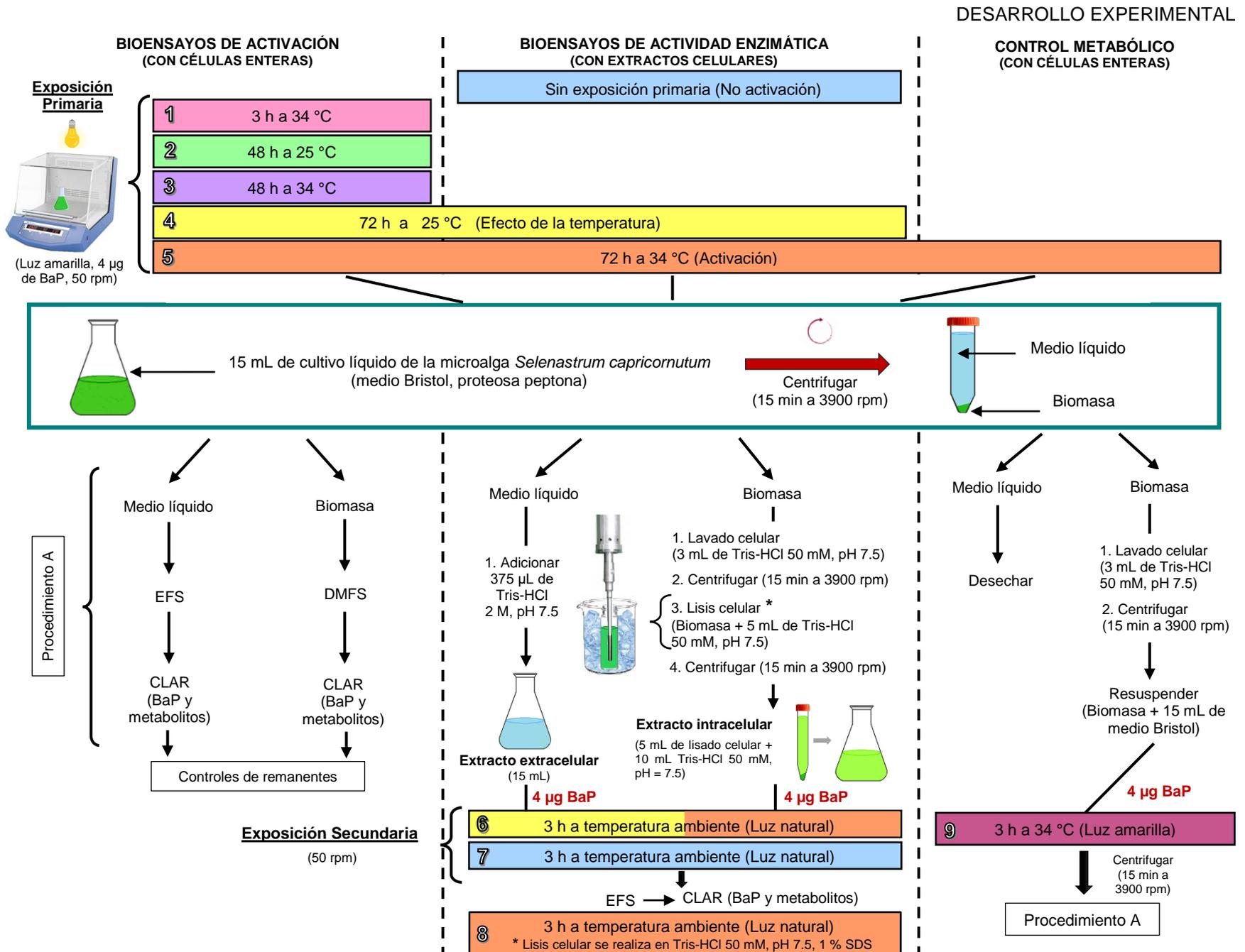


Figura 2.8. Procedimiento general de los ensayos biológicos.

2.3.3.1 Bioensayos de activación de medios de cultivo de *Selenastrum capricornutum* (controles de remanente)

En condiciones de esterilidad se vertieron 15.0 mL de medio de microalgas *S. capricornutum* con absorbancia de 1 en un matraz Erlenmeyer estéril de 50 mL, se agregaron 4 µg de benzo(a)pireno, se homogeneizó y se le colocó un tapón de gasa para mantener la esterilidad. Las microalgas se mantuvieron en una incubadora con temperatura controlada y agitación orbital continua de 50 rpm, bajo luz amarilla (20 W); los ensayos de exposición se realizaron a 25 °C durante 48 y 72 h, y a 34 °C durante 3, 48 y 72 h. Este proceso de “activación”, promueve la producción enzimática. Los extractos de EFS y DMFS obtenidos representan los controles de remanente.

Posterior a la incubación, se realizó el tratamiento de la muestra, los 15 mL de medio de cultivo se centrifugaron durante 15 min a 3900 rpm, el sobrenadante obtenido se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 mL, se le agregaron 3.75 mL de isopropanol y se homogeneizó. La muestra se procesó mediante la técnica de extracción en fase sólida descrita en la sección 2.3.1.4.1 y finalmente se analizaron las fracciones obtenidas por CLAR.

Por otro lado, la biomasa se lavó mediante la resuspensión en 3 mL de Tris-HCl 50 mM (pH = 7.5), se centrifugó durante 15 min a 3900 rpm y el sobrenadante se desechó para después procesar la biomasa mediante la técnica de dispersión de matriz en fase sólida descrita en la sección 2.3.1.4.2. Las fracciones obtenidas se analizaron por CLAR. Cabe mencionar que para la exposición de 3 h a 34 °C, no se lavó la biomasa, ya que este bioensayo fue utilizado para comparar la cantidad de los analitos en la exposición primaria contra la cantidad de analitos en el control metabólico.

2.3.3.2 Bioensayos de actividad enzimática en extractos celulares

2.3.3.2.1 Determinación de proteínas totales en el extracto intracelular y extracelular

Se realizó la determinación de proteínas totales mediante el método de Lowry en el Ei y Ee, provenientes de cultivos de microalgas expuestos y no expuestos a BaP durante 72 h a 34 °C. El objetivo fue comparar la cantidad de proteína en cada extracto y determinar si la activación de las microalgas propició el aumento en la producción de proteínas. El procedimiento experimental para la cuantificación de proteínas totales se describe en el anexo 2.

2.3.3.2.2 Bioensayos de actividad enzimática a partir de células activadas

Los bioensayos de actividad enzimática se realizaron con las enzimas excretadas al medio líquido por las microalgas (Ee) y extraídas de ellas por el procedimiento de lisis (Ei), utilizando cultivos activados por exposición primaria. La activación de las microalgas se realizó durante 72 h a 34 °C, condiciones en donde se presentó el menor remanente de los metabolitos. Necesario para poder diferenciar la nueva producción de los mismos, en la segunda exposición con los extractos enzimáticos intra y extracelular. También se realizó la activación de las microalgas durante 72 h a 25 °C para corroborar el efecto de la temperatura en la producción de enzimas degradadoras del BaP. La variación en la temperatura de activación influye en el metabolismo de las microalgas, lo que está directamente relacionado con su capacidad de degradación y producción enzimática. La obtención de los extractos enzimáticos se describió en la sección 2.3.1.3.

La exposición secundaria consistió en adicionar a los extractos Ei y Ee, de manera independiente, 4 µg de BaP; los extractos se mantuvieron en agitación constante (50 rpm) bajo luz natural durante 3 h a temperatura ambiente. Trascurrido el tiempo de exposición, al Ee se le adicionaron 3.75 mL de isopropanol y posteriormente se realizó la EFS de ambos extractos como se señala en la sección 2.3.1.4.1. Finalmente se analizaron las fracciones obtenidas de la EFS, mediante CLAR. El procedimiento general de los bioensayos de actividad enzimática se encuentra esquematizado en la figura 2.9.



Figura 2.9. Bioensayos de actividad enzimática: exposición de los extractos enzimáticos a benzo(a)pireno, tratamiento de la muestra y su análisis.

2.3.3.2.3 Evaluación de la actividad enzimática del extracto intracelular proveniente de microalgas lisadas en presencia de dodecilsulfato de sodio

Se estudió la influencia del dodecilsulfato de sodio (SDS), agregado durante la lisis celular, sobre la degradación enzimática del BaP. Observando de forma indirecta el efecto en la cantidad de enzima extraída y su estabilidad en el extracto intracelular, mediante la cuantificación de los metabolitos de degradación producidos. De manera que, se realizó la exposición secundaria del Ei, obtenido a partir de la lisis de las microalgas con el tensoactivo y el procesador ultrasónico.

El Ei se obtuvo a partir de microalgas preexpuestas a BaP bajo luz amarilla y agitación constante durante 72 h a 34 °C, como se describe en la sección 2.3.1.3.2. Sin embargo, en el procedimiento, después de lavar las células, la biomasa se resuspendió en 5 mL de una disolución de Tris-HCl 50 mM (pH = 7.5) y 1 % de SDS para su posterior lisis. Una vez obtenido el extracto intracelular, se le adicionaron 4 µg de BaP y se mantuvo en agitación constante (50 rpm) bajo luz natural durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la EFS de la muestra y se analizaron los analitos mediante CLAR.

2.3.3.2.4 Evaluación de la actividad enzimática de extractos celulares provenientes de microalgas no activadas

Se estudió la degradación del benzo(a)pireno en los extractos enzimáticos obtenidos a partir de microalgas no activadas, con el propósito de determinar si es necesario realizar la activación de las microalgas para favorecer la producción enzimática. Los extractos Ei y Ee se obtuvieron a partir de 15.0 mL de medio de cultivo con absorbancia de 1, sin previa exposición a BaP. Para obtener el extracto extracelular, los 15 mL de medio se centrifugaron durante 15 min a 3900 rpm y el sobrenadante se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 mL, al cual se le adicionaron 375 μ L de Tris-HCl 2 M (pH = 7.5).

En el caso de la obtención del extracto intracelular, la biomasa resultante después de la centrifugación de los 15 mL de medio de cultivo, se resuspendió en 5 mL de una disolución de Tris-HCl 50 mM (pH = 7.5) y se transfirió a un vial de vidrio de 10 mL para realizar el proceso de lisis celular en el procesador ultrasónico, descrito en la sección 2.3.1.3.2. Posteriormente el lisado celular de 5 mL se centrifugó durante 15 min a 3900 rpm para retirar los restos celulares, el sobrenadante se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se le adicionaron 10 mL de una disolución de Tris-HCl 50 mM (pH = 7.5).

Ambos extractos se fortificaron de forma independiente con 4 μ g de BaP y se mantuvieron en agitación constante (50 rpm) durante 3 h a temperatura ambiente. Después de la exposición a BaP, al extracto extracelular se le adicionaron 3.75 mL de isopropanol y posteriormente se realizó la EFS de ambos extractos como se señala en la sección 2.3.1.4.1. El análisis de las fracciones obtenidas del proceso de EFS se llevó a cabo mediante CLAR.

2.3.3.3 Control metabólico

El control metabólico de las células se realizó con el propósito de estudiar el metabolismo de degradación del BaP por las microalgas después de haber sido previamente expuestas a BaP durante 72 h a 34 °C. La exposición primaria se realizó como se explica en la sección anterior 2.3.3.1.1 con incubación de 72 h a 34 °C. Posterior a la incubación, los 15 mL de medio se centrifugaron durante 15 min a 3900 rpm, el sobrenadante obtenido se desechó y la biomasa se resuspendió en 3 mL de Tris-HCl 50 mM (pH = 7.5) para lavar las células. Después se volvió a centrifugar durante 15 min a 3900 rpm y la biomasa se resuspendió en 15.0 mL de medio Bristol en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, para efectuar así la segunda exposición de las microalgas con 4 µg de benzo(a)pireno. La muestra se mantuvo en una incubadora con agitación orbital continua (50 rpm) bajo luz amarilla por 3 h a 34 °C.

Transcurrido el tiempo de exposición, se centrifugó la muestra durante 15 min a 3900 rpm. El sobrenadante obtenido se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 mL, se le agregaron 3.75 mL de isopropanol, se homogeneizó y se procesó por EFS como se describe en la sección 2.3.1.4.1. La biomasa se procesó mediante la técnica de dispersión de matriz en fase sólida, descrita en la sección 2.3.1.4.2. Por último, las fracciones obtenidas de la EFS y DMFS se analizaron por CLAR.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Cultivo de crecimiento de la microalga *S. capricornutum*

Las microalgas se cultivaron periódicamente en 250 mL de medio líquido para usarlas en los ensayos biológicos. Se monitoreó el crecimiento celular de los cultivos al relacionar la cantidad de clorofila que contienen las microalgas con la cantidad de células por volumen. En condiciones de esterilidad se tomó una muestra de aproximadamente 2 mL cada 2 o 3 días para medir la absorbancia de la clorofila. Las mediciones espectrofotométricas se realizaron a 685 nm, que corresponde a la longitud de onda de absorción de la clorofila en la zona roja del espectro visible. Se graficó la absorbancia promedio de tres cultivos diferentes en función del tiempo para construir la curva de crecimiento microbiano que se presenta en la figura 3.1.

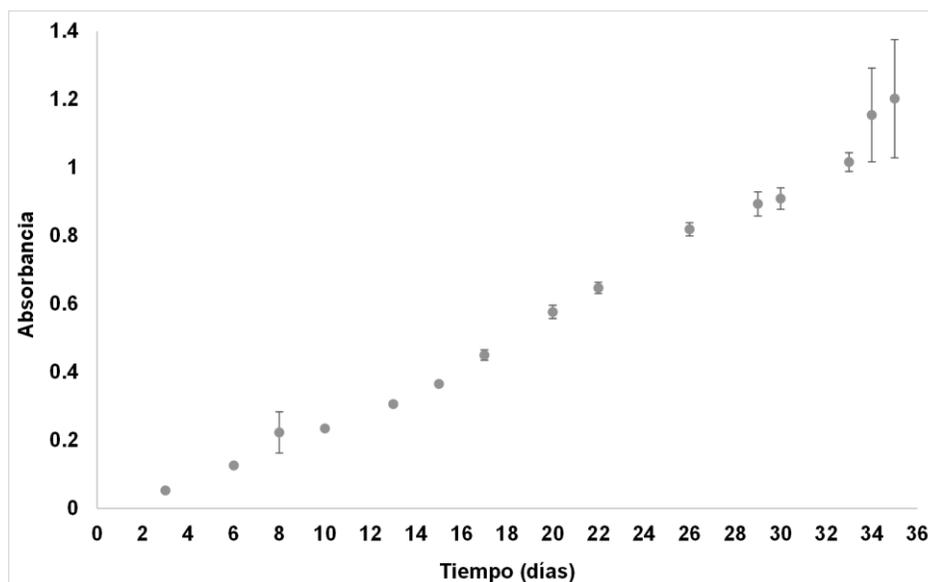


Figura 3.1. Curva de crecimiento de la microalga *S. capricornutum* en 250 mL de medio de cultivo Bristol con proteosa peptona.

El monitoreo del crecimiento se realizó durante 35 días, alcanzando una absorbancia de 1 a los 33 días desde la inoculación. La fase exponencial se dio a partir del día 13 hasta alcanzar un valor de absorbancia de 1, aquí se observa un aumento constante en el crecimiento celular. Durante este periodo, el metabolismo se acelera para obtener energía química del entorno y almacenarla, con el fin de formar y degradar moléculas necesarias que cumplen funciones específicas. Los bioensayos de exposición se realizaron con células que se encontraban en esta fase de crecimiento, para aprovechar el aumento en el metabolismo y con ello, maximizar la degradación del hidrocarburo.

3.2 Optimización de la metodología analítica

3.2.1 Optimización de condiciones cromatográficas

3.2.1.1 Condiciones cromatográficas para el análisis del benzo(a)pireno

En la figura 3.2, se muestra un cromatograma representativo para el benzo(a)pireno, el tiempo de retención fue de aproximadamente 5 min. El número de platos teóricos fue de $N = 39\ 349$, el factor de capacidad de $k' = 1.998$. Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis del hidrocarburo se presentan en la sección 2.1.1.

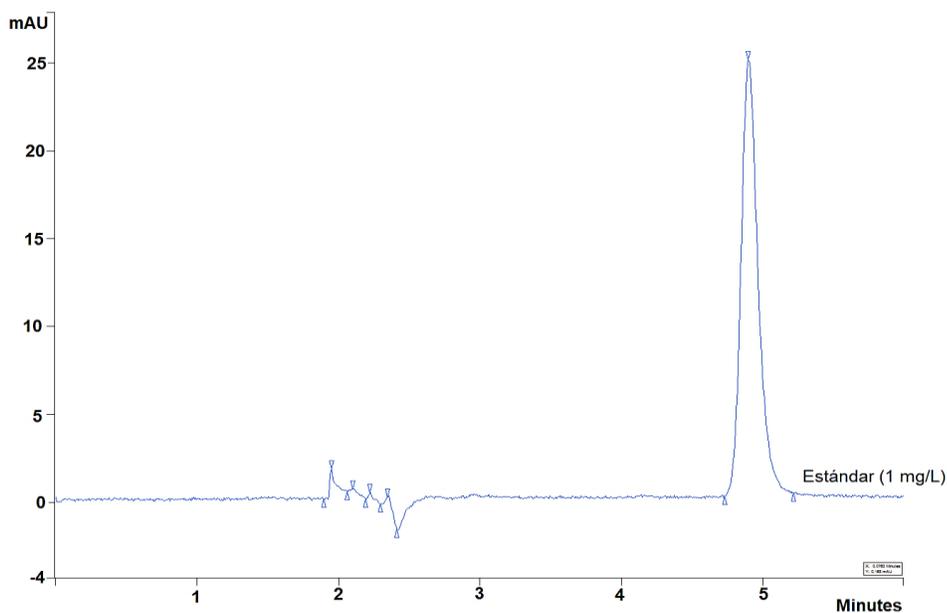


Figura 3.2. Cromatograma de la disolución estándar de benzo(a)pireno de 1 mg/L en acetonitrilo, $t_0 = 1.653$, $t_r = 4.956$.

3.2.1.2 Optimización de las condiciones cromatográficas para el análisis de los metabolitos del benzo(a)pireno

Se ha reportado que durante la degradación del benzo(a)pireno por la microalga *S. capricornutum* se producen los metabolitos de degradación: 4,5-cis, 7,8-cis y 11,12-cis dihidrodiol benzo(a)pireno (Lindquist et al., 1985). Al no contar con un estándar para confirmar la identidad de este último compuesto, se asumió que la señal detectada entre el metabolito 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP correspondía al 11,12-cis dBaP, de acuerdo a lo que reporta García de Llasera et al. (2016).

Para optimizar el análisis cromatográfico del 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP se buscó la máxima separación entre los metabolitos, por lo que se probaron tres columnas cromatográficas y diferentes condiciones de elución.

Selección de columna cromatográfica

La primera columna que se utilizó fue la Hypersil Green PAH, en la figura 3.3 se muestra el cromatograma de los metabolitos de degradación producidos por la microalga *S. capricornutum* a partir de una exposición primaria al BaP de 3 h a 25 °C. En el cromatograma se observa la señal para el metabolito 4,5-cis dBaP ($t_r = 5.468$) y el 7,8-cis dBaP ($t_r = 6.488$); sin embargo, bajo estas condiciones, no se observó el metabolito 11,12-cis dBaP, el cual se sabe eluye entre estos dos. Lo más probable es que coeluyera junto con el 4,5-cis dBaP; en consecuencia, se decidió cambiar la longitud de la columna y la fase estacionaria para aumentar la retención de los tres analitos, el número de platos teóricos, e incidir de manera favorable en la resolución de los mismos.

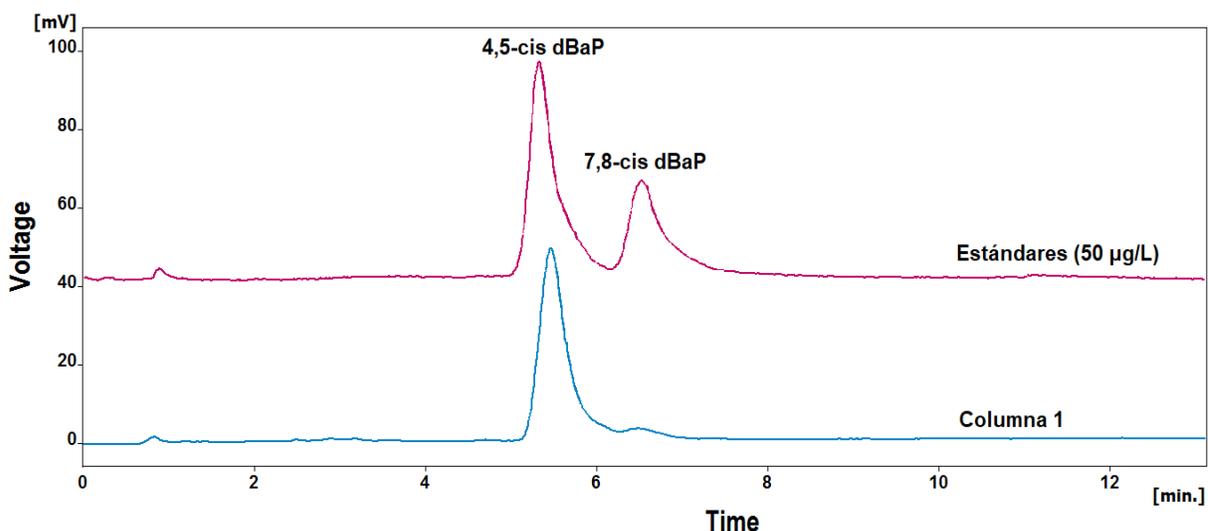


Figura 3.3. Cromatograma de los estándares de los metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dBaP (50 µg/L) en disolución 55:45 v/v acetonitrilo:agua ($R_{4,5\text{-cis dBaP}, 7,8\text{-cis dBaP}} = 1.921$, $\alpha_{4,5\text{-cis dBaP}, 7,8\text{-cis dBaP}} = 1.129$), y cromatograma de los metabolitos en el medio líquido de la microalga *S. capricornutum* expuesta a BaP durante 3 h a 25 °C. Columna Hypersil Green PAH, ThermoQuest (100 mm x 4.6 mm D.I.; diámetro de partícula de 5 µm). Temperatura ambiente, fase móvil 65:35 v/v metanol:agua, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 264$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 390$ nm).

Por lo anterior, se seleccionaron dos columnas más de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno. La columna 2 con la fase Spherisorb 5 ODS (Phenomenex) y la columna 3 con la fase Spheri-5-ODS (Perkin Elmer). En la figura 3.4 se presentan los cromatogramas correspondientes, en donde se observa que con la columna 2 tampoco se logró distinguir al metabolito 11,12 dihidrodiol benzo(a)pireno. Por el contrario, la separación en la columna 3 fue suficiente para lograr identificar la señal correspondiente a este metabolito. Los tiempos de retención de los metabolitos en la columna 3 fueron de 19.300 min para el 4,5-cis dBaP, 19.868 min para el 11,12-cis dBaP y 21.312 min para el 7,8-cis dBaP. Se observa que no hay una buena resolución entre los compuestos, lo que es muy difícil de lograr ya que son isómeros entre sí.

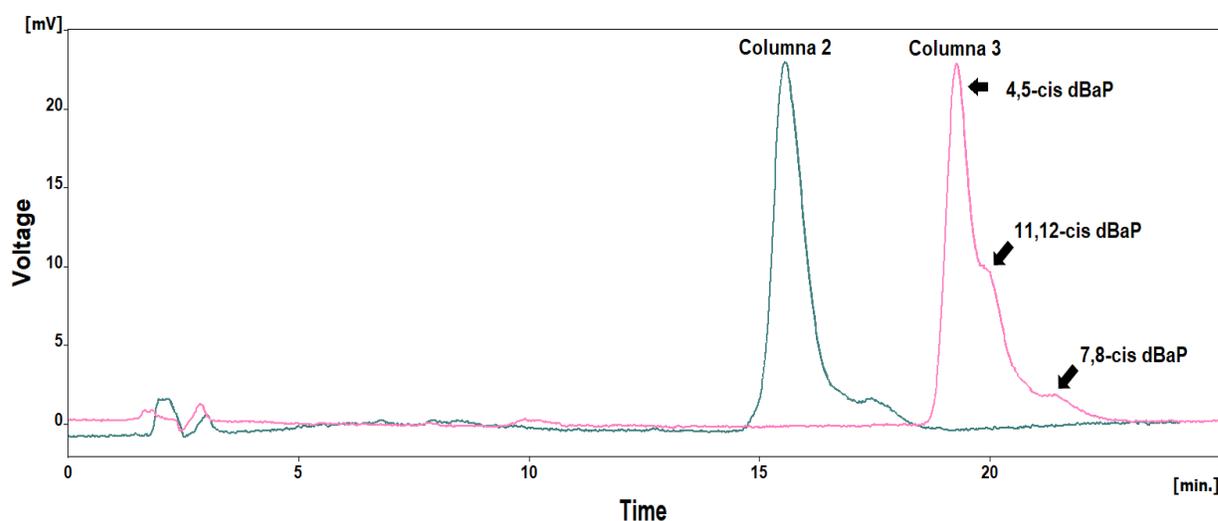


Figura 3.4. Cromatograma de los metabolitos en el medio líquido de la microalga *S. capricornutum* expuesta a BaP durante 3 h a 25 °C, en la columna 2 Spherisorb 5 ODS (Phenomenex) y la columna 3 Spheri-5-ODS (Perkin Elmer); ambas de 250 mm x 4.6 mm D.I. Temperatura ambiente, fase móvil 65:35 v/v metanol:agua, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 264$ nm; $\lambda_{em} = 390$ nm).

Selección de la fase móvil

Como se mencionó, al utilizar una fase móvil 65:35 v/v metanol:agua en el análisis con la columna 3, no se resolvió por completo la señal entre el metabolito 11,12-cis dBaP y el 4,5-cis dBaP; sin embargo, la separación obtenida fue adecuada para no sobreestimar el área del 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno (α 4,5 cis dBaP, 11,12-cis dBaP= 1.033).

Con la finalidad de realizar una elución más lenta e intentar mejorar la separación del metabolito 11,12-cis dBaP del 4,5-cis dBaP, se aumentó la polaridad de la fase móvil al disminuir la cantidad de metanol y aumentar la proporción de agua. Sin embargo, al emplear una fase móvil 60:40 v/v metanol:agua, la señal correspondiente al metabolito 11,12-cis dihidrodiol benzo(a)pireno tampoco se logró separar por completo. En la figura 3.5 se comparan ambos cromatogramas, se observa que las señales de los tres metabolitos se ensanchan con la fase 60:40 v/v metanol:agua, disminuyen sus alturas, se incrementa apreciablemente su tiempo de retención y en consecuencia el tiempo de análisis. Los tiempos de retención de los analitos obtenidos al aumentar la polaridad de la fase móvil fueron de 30.464 min para el 4,5-cis dBaP, 31.656 min para el 11,12-cis dBaP y 33.720 min para el 7,8-cis dBaP.

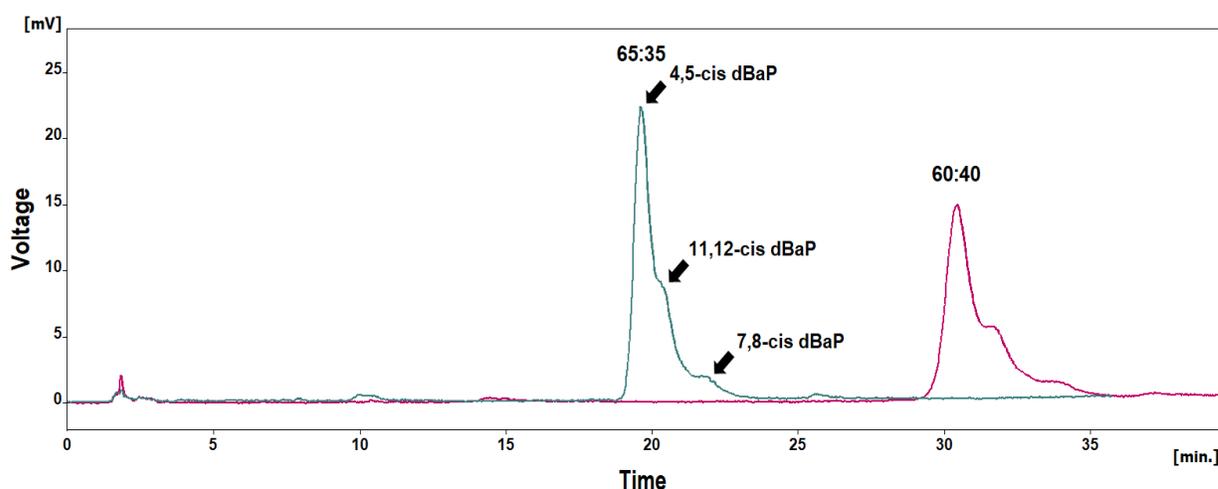


Figura 3.5. Cromatograma de los metabolitos en el medio líquido de la microalga *S. capricornutum* expuesta a BaP durante 3 h a 25 °C, utilizando la columna 3 Spheri-5-ODS, Perkin Elmer (250 mm x 4.6 mm D.I.; diámetro de partícula de 5 μ m). Analizados en una fase móvil 65:35 (azul) y 60:40 (roja), metanol:agua en ambos casos. Temperatura ambiente, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia (λ_{ex} = 264 nm; λ_{em} = 390 nm).

Por lo tanto, aumentar la polaridad de la fase móvil no benefició la separación de los analitos, de manera que se decidió utilizar la fase móvil menos polar, 65:35 v/v (metanol:agua); con esta condición, el desplazamiento en la elución de los tres isómeros estructurales fue suficiente para detectar la presencia del metabolito 11,12-cis dBaP; aparte de disminuir aproximadamente 10 min el tiempo de análisis con respecto a la fase más polar. La integración de las señales de cada compuesto se realizó con líneas verticales en los valles que separan picos individuales.

Selección de la temperatura

Una vez que se seleccionó la fase móvil, se decidió aumentar la temperatura de la columna para disminuir la presión del sistema, el tiempo de elución y afinar la forma de los picos. En la figura 3.6, se observa que el tiempo de retención de los analitos disminuyó cuando la temperatura de la columna se aumentó a 30 °C. Los tiempos de retención de los analitos a 30 °C fueron de 13.916 min para el 4,5-cis dBaP, 14.304 min para el 11,12-cis dBaP y 15.400 min para el 7,8-cis dBaP.

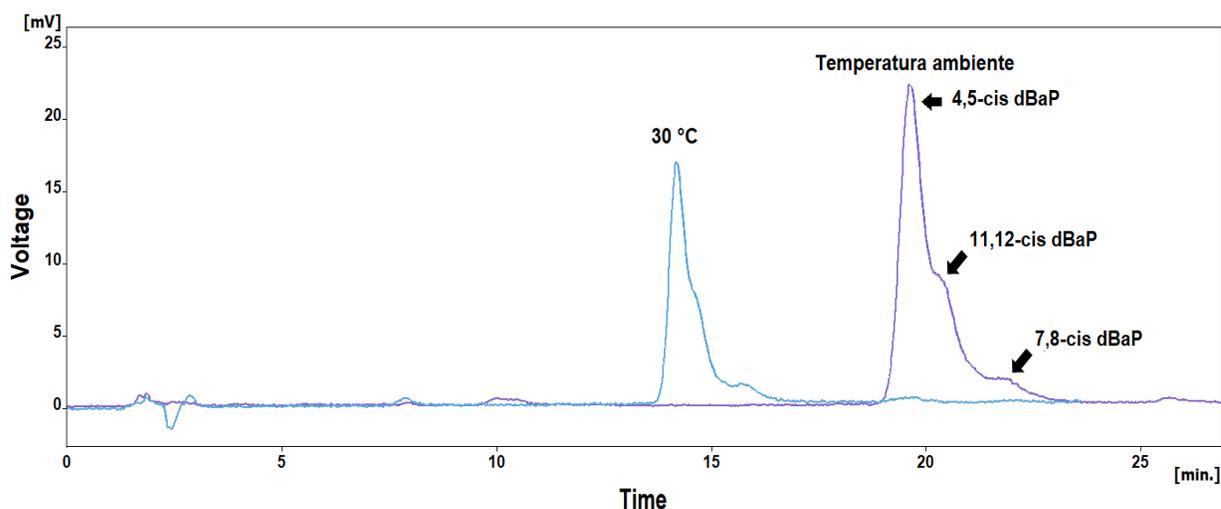


Figura 3.6. Cromatograma de los metabolitos en el medio líquido de la microalga *S. capricornutum* expuesta a BaP durante 3 h a 25 °C. Utilizando la columna 3 Spheri-5-ODS, Perkin Elmer (250 mm x 4.6 mm D.I.; diámetro de partícula de 5 μ m); a diferentes temperaturas de análisis: temperatura ambiente y 30 °C. Fase móvil 65:35 metanol:agua, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia (λ_{ex} = 264 nm; λ_{em} = 390 nm).

En la tabla 3.1, se compara el factor de capacidad y la selectividad de los metabolitos a ambas temperaturas. La resolución entre los analitos no se reporta porque la medición de la anchura de la base de cada señal no es precisa de acuerdo al tipo de integración realizada. El cambio en la temperatura disminuyó la viscosidad de la fase móvil, por lo que se mantuvo una presión más baja y estable; aparte de reducir el tiempo de análisis.

Tabla 3.1. Parámetros cromatográficos para los metabolitos del BaP analizados a temperatura ambiente y a 30 °C

Parámetro	Temperatura ambiente	30 °C
t_0 (min)	1.940	
t_r 4,5-cis dBaP (min)	19.300	13.916
t_r 11,12-cis dBaP (min)	19.868	14.304
t_r 7,8-cis dBaP (min)	21.312	15.400
k' 4,5-cis dBaP (min)	8.948	6.173
k' 11,12-cis dBaP (min)	9.241	6.373
k' 7,8-cis dBaP (min)	9.985	6.938
α 4,5-cis dBaP, 11,12-cis dBaP	1.033	1.032
α 4,5-cis dBaP, 7,8-cis dBaP	1.116	1.124

3.2.1.3 Condiciones cromatográficas finales para el análisis de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP

Se utilizó la columna 3 Spheri-5-ODS, Perkin Elmer (250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno; diámetro de partícula de 5 μm); como fase móvil una mezcla 65:35 v/v (metanol:agua); temperatura de 30 °C utilizando un horno de columna, flujo de 1 mL/min y detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}}= 264 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}= 390 \text{ nm}$).

3.2.3 Optimización del procedimiento para la obtención del lisado celular

Baño ultrasónico

Con el fin de romper las células de las microalgas para extraer las enzimas intracelulares, se realizó un primer intento mediante ondas acústicas ultrasónicas en un baño de ultrasonido. Las diferentes condiciones utilizadas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Experimentos de lisis celular de la microalga *Selenastrum capricornutum* empleando un baño de ultrasonido (Branson, modelo 1510 de 47 kHz)

Disolución de lisis	Agua desionizada		NaCl 0.9 %		NaCl 3.0 %	
	15 min	30 min	15 min	30 min	15 min	30 min
Tiempo de procesamiento	15 min	30 min	15 min	30 min	15 min	30 min
Absorbancia (685 nm)	0.028	0.033	0.026	0.034	0.038	0.017
Lisado celular	Transparente e incoloro					
Biomasa	Sin cambio aparente					
Observación microscópica	Células completas					

Las células se resuspendieron en agua desionizada para generar un medio hipotónico, esperando que la difusión de agua a través de la membrana semipermeable provocara el hinchamiento o turgencia de las células, favoreciendo su ruptura al sobrepasar la elasticidad de la membrana. También se utilizó una disolución isotónica (NaCl 0.9 %) para promover el equilibrio osmótico en las células. Por otro lado, el efecto de la disolución hipertónica de NaCl al 3 %, fue producir la plasmólisis de las células por la pérdida de agua.

La absorbancia de la clorofila extraída de las células durante el proceso de ultrasonido, suspendidas en la disolución hipotónica o isotónica, fue medida y se encontró prácticamente igual con o sin sal. La pared celular de las microalgas verdes está compuesta mayoritariamente por celulosa; lo que le da una rigidez tal, que la presión interna no fue suficiente para que la célula estallara. También se observó que al duplicar el tiempo del proceso de sonicación de 15 a 30 min, hubo un incremento de aproximadamente el 25 % en el valor de absorbancia de la clorofila liberada. En el caso de la disolución de NaCl al 3 %, el valor de absorbancia de clorofila a los 15 min de tratamiento fue mayor que la absorbancia medida a los 30 min de tratamiento.

Esta serie de experimentos realizados en disoluciones con diferentes concentraciones de sal, sugieren que el cambio en la presión osmótica no tuvo influencia en la lisis; lo que concuerda con lo reportado por Safi et al. (2014), quienes mencionan que el fenómeno de ósmosis no es efectivo en las microalgas verdes debido a la dureza de su pared celular. Los experimentos no se repitieron porque en todos los casos, las evidencias de la ruptura celular fueron insuficientes; en los lisados celulares obtenidos no se percibió a simple vista la coloración verde característica de la clorofila, no hubo cambio en la apariencia de la biomasa después del proceso y las células observadas al microscopio se notaron integra.

El baño ultrasónico no funcionó para romper las microalgas debido a que la distribución de los transformadores en la base del aparato ocasiona que la cavitación se disperse uniformemente a lo largo del depósito (diseñado de esta manera para mejorar los procesos de limpieza, y desgasificación), por lo que las ondas acústicas no se encuentran enfocadas hacia la muestra. Además, la muestra no se encuentra en contacto directo con el ultrasonido, si no que se suele utilizar un contenedor sumergido en el depósito, lo que crea una barrera. Por estas razones, se decidió implementar el uso de un procesador ultrasónico con sonda para asegurar que la máxima potencia se encontrara localizada y que las células interactuaran directamente con las ondas sonoras.

Procesador ultrasónico

Entonces, se realizaron experimentos utilizando el procesador ultrasónico Cole-Parmer modelo CPX 130 PB (130 watts, 50/60 kHz) con una micropunta de 3 mm. Las células se resuspendieron en una disolución isotónica de NaCl al 0.9 % y se sometieron al proceso de lisis en diferentes tiempos e intensidades. En la tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al color del lisado, la absorbancia de clorofila y su observación microscópica.

Tabla 3.3. Lisis de la microalga *Selenastrum capricornutum* en una disolución de cloruro de sodio 0.9 %, empleando el procesador ultrasónico Cole-Parmer modelo CPX 130 PB, variando el tiempo de procesamiento y la amplitud de las ondas acústicas

Tiempo de procesamiento	Amplitud	Lisado celular	Absorbancia (685 nm)	Observación microscópica
2 min	80 %	Color verde transparente	0.487	Células completas
4 min			0.621	
6 min	30 %		0.260	Células completas y vacías
	60 %		0.378	
	80 %	0.413		

El lisado celular de todos los experimentos mencionados sí presentó un color verde transparente, midiéndose una mayor absorbancia de clorofila para el lisado procesado durante 4 min y 80 % de amplitud ($A = 0.621$). En los lisados procesados durante 6 min a 30, 60 y 80 % de amplitud, se identificaron estructuras celulares vacías, se cree que el material intracelular fue liberado. Además, el medio que rodeaba a las células presentó una coloración verde de apariencia irregular/grumosa, lo que se piensa corresponde al citoplasma que contenía a los cloroplastos. Sin embargo, con ninguna condición se observó la ruptura de las células.

Dado que a los 6 min y 80 % de amplitud se observó un aumento en la absorbancia de la clorofila y células vacías, se seleccionaron estas condiciones para los experimentos posteriores en donde las células se resuspendieron en las disoluciones de lisis mostradas en la tabla 3.4. La disolución con cloruro de sodio se empleó para modificar la presión osmótica de las células y favorecer la plasmólisis; el dodecilsulfato de sodio y la lisozima se utilizaron para permear la membrana celular y permitir la liberación de las enzimas. También se estudió la lisis de las microalgas únicamente por disrupción mecánica, utilizando como disolución de lisis, solamente el amortiguador Tris-HCl. En todos los casos, la muestra de microalgas se enfrió con una mezcla de hielo y sal durante el proceso de ultrasonido, para evitar el sobrecalentamiento. En la tabla 3.4, se muestran

los resultados de las observaciones microscópicas de las algas después de su procesamiento, las mediciones de absorbancia y la cuantificación de proteína en el lisado celular, al procesar las microalgas durante 6 min a una amplitud del 80 %.

Tabla 3.4. Lisis de la microalga *Selenastrum capricornutum*, empleando el procesador ultrasónico Cole-Parmer modelo CPX 130 PB. Tiempo de procesamiento de 6 min a una amplitud del 80 %, variando el medio de resuspensión de las células

Medio de resuspensión	Absorbancia (685 nm)	Proteínas totales (µg)	Observación microscópica
NaCl (3 %) + Tris-HCl (50 mM)	0.355 ± 0.059	415 ± 75 *	Células completas
Tris-HCl (50 mM)	0.367 ± 0.019 *	282 ± 25	
SDS (1%) + Tris-HCl (50 mM)	0.074 ± 0.003	302 ± 12	Células completas y vacías
Lisozima (0.4 mg/mL) + Tris-HCl (50 mM)	0.023 ± 0.006	40 ± 1.2	Células parcialmente deformadas

El pH de la disolución de Tris-HCl (50 mM) fue de 7.5 en todos los casos

* Valores máximos

La tabla 3.4 muestra que la mayor extracción de clorofila ocurrió en las disoluciones de Tris-HCl 50 mM ($A = 0.367$) y en la de Tris-HCl 50 mM con 3 % de NaCl ($A = 0.355$). La menor extracción de clorofila se observó en las disoluciones de Tris-HCl 50 mM con 1 % de SDS ($A = 0.074$) y Tris-HCl 50 mM con 0.4 mg/mL de lisozima ($A = 0.023$). Las observaciones al microscopio mostraron que una fracción de las células se encontraron vacías después del proceso de ultrasonido, en la disolución con dodecilsulfato de sodio, mientras que en presencia de lisozima se observaron deformaciones en las células, aunque no se encontró evidencia clara de ruptura celular. El valor de absorbancia muestra la relación de la clorofila extraída de las células por posibles daños en los cloroplastos por efecto de la cavitación, o la relación con la cantidad de restos celulares muy pequeños de color verde que no precipitaron durante la centrifugación (Safi et al., 2014). Sin embargo, la clorofila liberada no es una referencia certera para poder afirmar que también se extrajeron proteínas de las microalgas. Aunque las observaciones

microscópicas permitieron identificar cualitativamente cambios en la estructura de las microalgas, y en el caso de las células vacías, se infirió que las proteínas intracelulares fueron liberadas al medio extracelular.

Para comprobar esta teoría, se realizó la cuantificación de las proteínas totales extraídas de las microalgas mediante el método de Lowry; esperando que la enzima encargada de la degradación de los hidrocarburos se encontrara entre ellas. Se observó que se extrajo una mayor cantidad de proteínas en el lisado celular obtenido al sonicar las microalgas en una disolución de Tris-HCl 50 mM con 3 % de NaCl ($415 \pm 75 \mu\text{g}$ de proteínas); aunque, microscópicamente no se observaron cambios notables en la apariencia de las células. En la disolución de Tris-HCl 50 mM con 1 % de SDS se observó menor proteína extraída pero las células se encontraron vacías. En el lisado celular obtenido en la disolución de Tris-HCl 50 mM pH = 7.5, se cuantificó baja concentración de proteína y no se observaron células rotas ni vacías. Finalmente, la extracción proteica con lizozima fue la más pobre, al obtener únicamente $40 \mu\text{g}$ de proteína en el lisado, aunque se deformó la estructura de las células. Esto se puede deber, a que, para romper la compleja estructura celular de las microalgas, es necesario el empleo de más de un tipo de enzimas, para actuar sobre cada macromolécula de la pared y membrana celular (Soto Sierra, 2018). Se sabe que el tratamiento enzimático depende de la composición de la membrana de cada especie, las enzimas comúnmente empleadas son la celulasa, lizozima, tripsina, autolisina, pectinasa, macerozima, entre otras (Soto Sierra, 2018 y 2017; Waghmare et al., 2019).

Con base en estos resultados, se consideró que la mejor condición de lisis celular fue: 6 min de procesamiento a 80 % de amplitud en una disolución de Tris-HCl 50 mM con 3 % de NaCl; debido a que se extrajo una mayor cantidad de proteínas y clorofila de la microalga *S. capricornutum*. A pesar de no haber observado cambios evidentes en la estructura de las células, el proceso de lisis pudo haber permeado la membrana, sin destruirlas ni modificar su forma.

Como no se evidenció claramente la ruptura celular, en el grupo de trabajo se realizaron experimentos subsecuentes con el procesador ultrasónico digital Branson modelo 450 con una micropunta de 5 mm, el cual tenía una mayor potencia de salida (400 watts) en comparación con el procesador ultrasónico Cole Parmer (130 watts). Las condiciones que

se optimizaron fueron el tiempo de procesamiento y las disoluciones de lisis, obteniendo los mejores resultados con un tratamiento de 5 min por pulsos de 10 s con pausas de 5 s, las disoluciones de lisis que resultaron más eficientes fueron amortiguador de Tris-HCl (50 mM, pH = 7.5) y una mezcla de SDS (1 %) con la disolución amortiguadora (resultados aún no publicados). La amplitud de las ondas acústicas a la que se trabajó fue del 40 %, porque según la especificación del fabricante, corresponde a la energía mecánica límite de tensión del titanio y si se aumenta la amplitud, la micropunta de 5 mm podría romperse.

En la optimización de las condiciones de lisis, se usó como criterio la cantidad de clorofila y de proteína total extraída, esta última siendo de mayor importancia. Sin embargo, el método de Lowry aun cuando determina la cantidad total de proteínas en el lisado celular, no puede diferenciar si las sustancias añadidas para la disrupción química y las ondas acústicas para la disrupción mecánica favorecen la extracción de las enzimas específicas para la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Por lo que se planeó realizar bioensayos para probar la actividad enzimática en los lisados, la formación de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP indicaría la presencia de las enzimas encargadas de la degradación del BaP. Estos experimentos corresponden a los bioensayos de actividad enzimática, presentados más adelante en la sección 3.4.2.2.

La validación del método analítico (EFS-CLAR) se realizó con lisados obtenidos en presencia de SDS por considerarse una muestra más compleja que cuando se maneja únicamente el amortiguador Tris-HCl. En adición, el SDS se empleó con el fin de solubilizar las proteínas de la membrana celular para permitir la liberación de las enzimas intracelulares y embebidas en ella (Harrison, 1991; Hardy et al., 2018). Sin embargo, el uso de SDS provocó la formación de espuma, lo que impidió la manipulación efectiva de la muestra. El proceso de sonicación se realizó con especial cuidado para evitar la formación de espuma, ya que el gas impide la transmisión eficiente de las ondas acústicas en el medio líquido y, por lo tanto, la efectividad del fenómeno de cavitación disminuye. Para evitar este problema, la potencia de la sonda se incrementó lentamente, vigilando en todo momento la apariencia de la muestra. Esto ocasionó que parte del tiempo destinado a sonicar las células no se realizara con 40 % de amplitud (17 ± 2 watts), pues se necesitó aproximadamente 1 min para llegar a la intensidad deseada sin que la

muestra se tornara por completo en espuma. Por lo tanto, el uso del detergente fue impráctico para la manipulación ultrasónica y desde el punto de vista biológico, pudo modificar la estructura de las enzimas e inhibir su actividad.

Por las razones anteriores, en los estudios de actividad enzimática se omitió la adición de SDS. El extracto intracelular fue obtenido únicamente mediante la disrupción mecánica con el procesador ultrasónico Branson modelo 450, empleando una disolución amortiguadora de Tris-HCl (50 mM, pH = 7.5), la muestra se procesó a una amplitud de 40 %, durante 5 min por pulsos de 10 s con pausas de 5 s. Según Jouanneau et al. (2006), a partir de la bacteria recombinante *P. putida* KT244, es posible extraer la enzima dioxigenasa (PhnI) que dihidroxila HAPs de 4 y 5 anillos aromáticos, utilizando ondas ultrasónicas en una disolución de lisis de Tris-HCl (50 mM, pH = 7.5). Con esta consideración, se esperó que así funcionará para las microalgas, con lo cual, se evitaría la posterior eliminación del SDS. No obstante, al final del proyecto, se evaluó el efecto del dodecilsulfato de sodio en la actividad enzimática del extracto intracelular, los resultados obtenidos se exhiben en la sección 3.4.2.3.

Análisis microscópico

Las imágenes microscópicas de las células de la microalga *S. capricornutum* antes y después del proceso de lisis en una disolución de Tris-HCl (50 mM, pH = 7.5) se muestran en la figura 3.7.

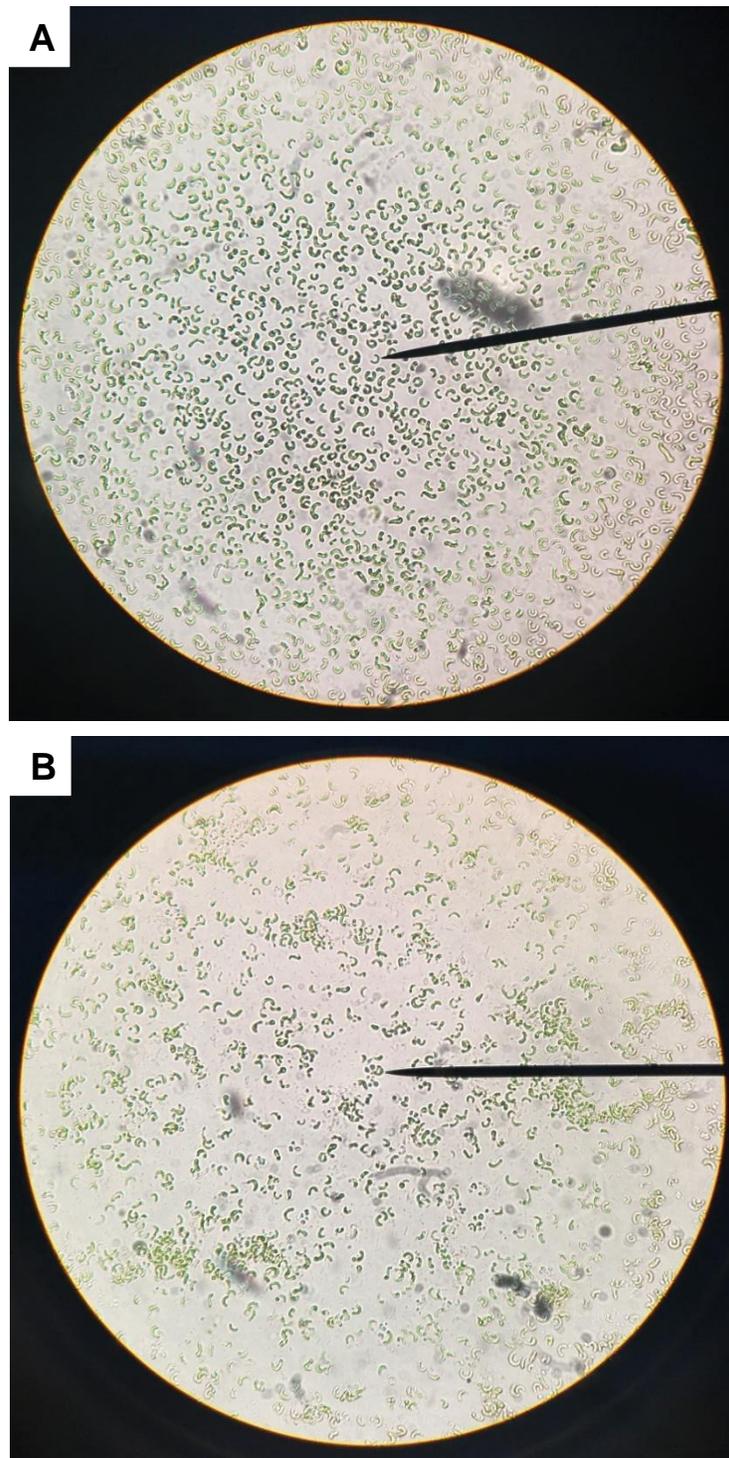


Figura 3.7. Microalgas *Selenastrum capricornutum* antes (A) y después (B) de haber sido sometidas al proceso de lisis celular durante 5 min por pulsos de 10 s con pausas de 5 s a una amplitud del 40 %, usando el procesador ultrasónico digital Branson modelo 450 (técnica de observación en fresco, objetivo 40 X).

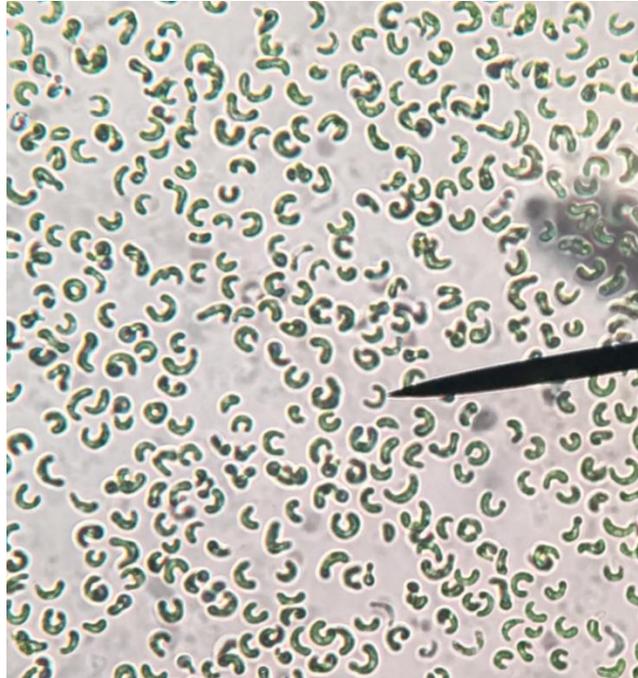


Figura 3.8. Células enteras de las microalgas *S. capricornutum* (técnica de observación en fresco, objetivo 40 X).

En la figura 3.7 (A), se muestran las células de las microalgas antes de someterlas al proceso de lisis; presentan la estructura característica de media luna y se aprecia la tonalidad verde uniforme en todas las células por la clorofila que contienen. La distribución de las microalgas fue homogénea en todo el campo de observación, repitiéndose el mismo patrón. En la figura 3.8, se muestra un acercamiento de las microalgas *S. capricornutum*, en donde se aprecia con mayor claridad la forma y color de las células.

En la figura 3.7 (B), se observan las microalgas después del proceso de lisis; la estructura de media luna permaneció en algunas células, mientras que otras se observaron distorsionadas o fragmentadas en gránulos pequeños. La muestra en todo el campo de observación fue heterogénea y en general presentó un mayor desorden respecto a las células no procesadas. En la figura 3.9, se muestran diferentes acercamientos de las algas lisadas.

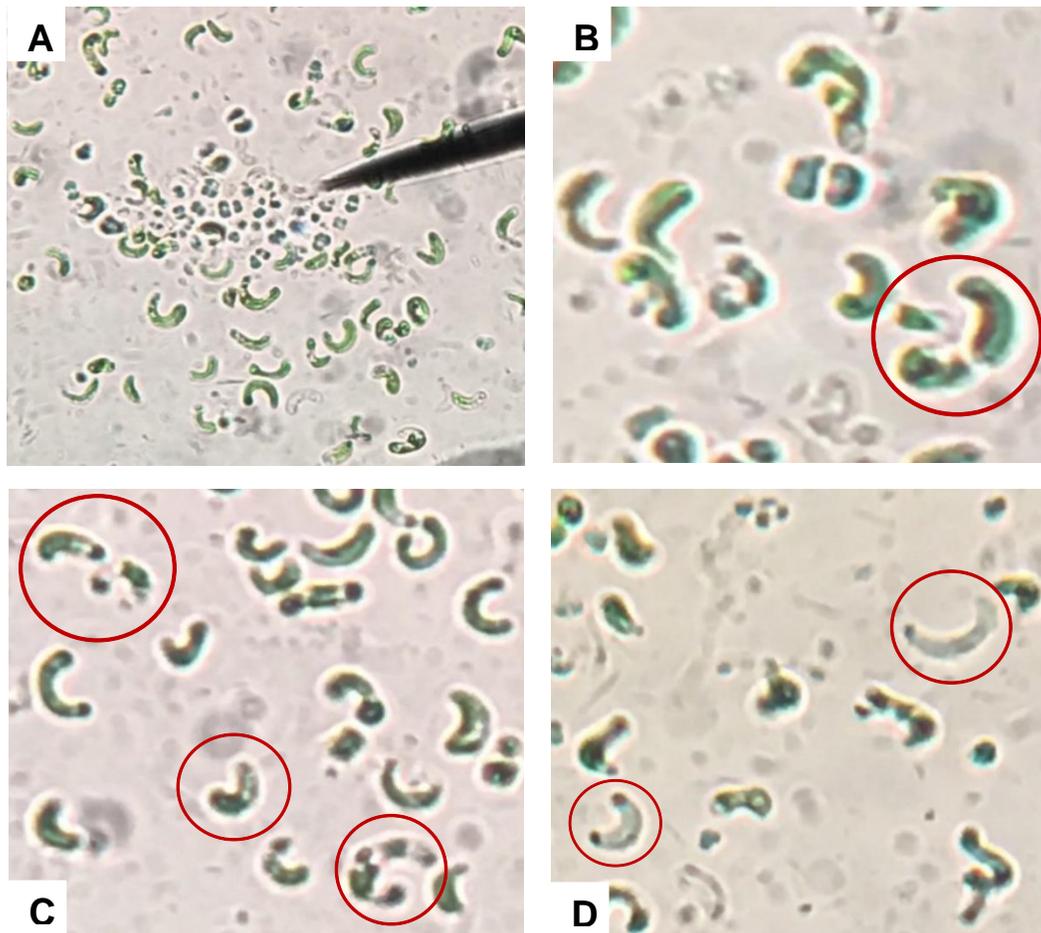


Figura 3.9. Células de la microalga *S. capricornutum* después del proceso de lisis; A. Fragmentos celulares, B. Célula dividida por la mitad, C. Células semivacías, D. Células vacías (técnica de observación en fresco, objetivo 40 X).

Después de haber sometido los microorganismos a ondas de alta frecuencia, se observaron conjuntos de restos celulares o gránulos color verde de varias formas, figura 3.9 (A). Se cree que los fragmentos celulares se formaron por la ruptura de las microalgas, gracias a las fuerzas de corte producidas por el fenómeno de cavitación. En la figura 3.9 (B), se aprecia una célula que parece estar rota por la mitad, pues hay una discontinuidad en el material intracelular. Por otro lado, en la figura 3.9 (C) se nota que en varias células falta material intracelular, puesto que la coloración verde se ve discontinua; mientras que en la figura 3.9 (D) algunas células se observan totalmente vacías. Si se comparan las figuras mencionadas con la figura 3.8 de las células enteras, las diferencias entre ellas son evidentes.

3.3 Validación analítica

3.3.1 Validación del sistema cromatográfico para el benzo(a)pireno y sus metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP

3.3.1.1 Benzo(a)pireno (BaP)

Determinación de los parámetros de desempeño:

Intervalo lineal

Se comprueba la linealidad del sistema cromatográfico para el benzo(a)pireno en el intervalo de concentraciones de 0.10 a 1.75 mg/L, el coeficiente de correlación (r) de la curva de calibración fue mayor a 0.98, de acuerdo a los criterios de validación de métodos fisicoquímicos que establece la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC) de la Secretaría de Salud.

En la figura 3.10, se muestra la curva de calibración obtenida para el benzo(a)pireno en el intervalo lineal de 0.10 a 1.75 mg/L, donde la sensibilidad del método fue 16838.850 ± 526.288 mAU·L/mg.

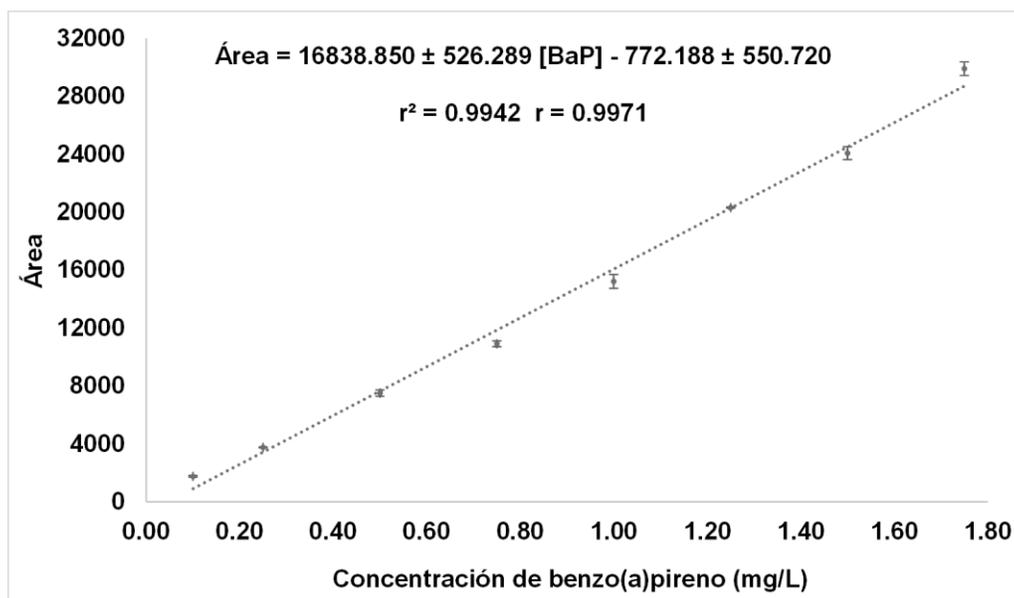


Figura 3.10. Curva de calibración obtenida para el benzo(a)pireno mediante cromatografía de líquidos con detección ultravioleta ($\lambda_{\max} = 263$ nm), $n = 3$.

Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) para el benzo(a)pireno, determinados mediante la relación de señal / ruido, y el análisis estadístico de la curva de calibración, se presentan en la tabla 3.5. La concentración del LD obtenida con la curva de calibración fue ligeramente menor que la concentración conforme a la señal cromatográfica.

Tabla 3.5. Límites de detección y cuantificación del sistema para el benzo(a)pireno

Método de estimación	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)
Basado en la relación señal / ruido	0.05 mg/L ^a	0.10 mg/L ^b
Basado en la curva de calibración	0.03 mg/L	0.10 mg/L

^a Concentración de BaP que proporciona una señal 3 veces mayor que el nivel de ruido de fondo.

^b Concentración de BaP que proporciona una señal 10 veces mayor que el nivel de ruido de fondo.

Precisión

La reproducibilidad (n=3 en dos días diferentes) expresada como el coeficiente de variación (CV %) fue de 2.38 % para 0.1 mg/L, 0.94 % para 1.00 mg/L y 0.91 % para 1.75 mg/L. La metodología de trabajo fue precisa, ya que, en todos los casos, el coeficiente de variación fue menor al 15 %, límite establecido por la CCAYAC para concentraciones comprendidas entre 0.1 y 100 mg/L de residuos y contaminantes en alimentos y agua.

3.3.1.2 Metabolitos 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno

Determinación de los parámetros de desempeño:

Intervalo lineal

Se observó una relación lineal entre la respuesta del detector y las concentraciones entre 10 y 150 $\mu\text{g/L}$ para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP. El coeficiente de correlación (r) de la curva de calibración fue mayor a 0.98 para ambos metabolitos, de acuerdo a los criterios de validación que establece la CCAyAC para la cuantificación de residuos e impurezas. En la figura 3.11, se muestran las curvas de calibración obtenidas para el 4,5- cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno con sus respectivas ecuaciones lineales, coeficientes de correlación y determinación.

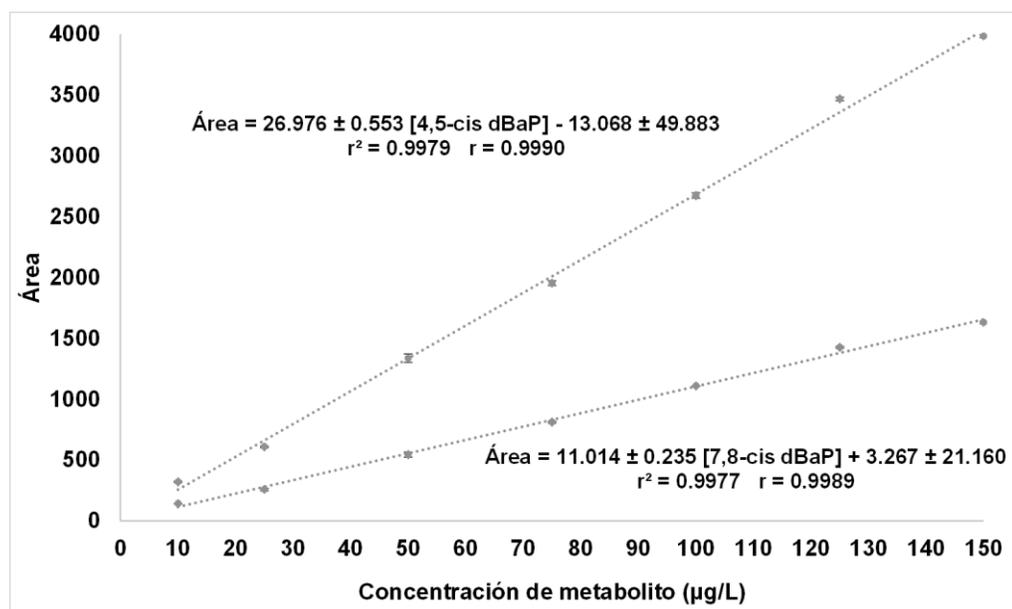


Figura 3.11. Curvas de calibración obtenidas para el 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno mediante cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 264 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$), $n = 3$.

Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación para el 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP, determinados mediante la relación señal/ruido, y el análisis estadístico de la curva de calibración, se presentan en la tabla 3.6. Los límites de detección y cuantificación fueron menores para el método basado en la relación señal/ruido.

Tabla 3.6. Límites de detección y cuantificación del sistema para los metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno

Metabolito	4,5-cis dBaP		7,8-cis dBaP	
	LD	LC	LD	LC
Método de estimación				
Basado en la relación señal / ruido	2.5 µg/L ^a	5.0 µg/L ^b	5.0 µg/L ^a	10.0 µg/L ^b
Basado en la curva de calibración	5.4 µg/L	16.3 µg/L	5.6 µg/L	17.0 µg/L

^a Concentración de metabolito que proporciona una señal 3 veces mayor que el nivel de ruido de fondo. ^b Concentración de metabolito que proporciona una señal 10 veces mayor que el nivel de ruido de fondo.

Precisión

La reproducibilidad (n=5 en tres días diferentes) expresada por medio del coeficiente de variación de una disolución de 75 µg/L de 4,5-cis dBaP fue de 1.085 %; en el caso del 7,8-cis dBaP a la misma concentración fue de 2.421 %. El método es preciso porque en ambos casos, el coeficiente de variación fue menor al 20 %, de acuerdo a lo establecido por la CCAyAC para concentraciones comprendidas entre 10 y 100 µg/L de residuos y contaminantes en alimentos y agua.

3.3.2 Verificación del recobro y linealidad del método de EFS-CLAR (UV) para el BaP y del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en el medio de cultivo líquido

En este trabajo, se verificó la eficiencia de la extracción de los analitos en el medio de cultivo líquido para confirmar su correcta aplicación. Los experimentos consistieron en determinar la cantidad de analitos recuperados en muestras de medio de cultivo adicionadas, cuando estas fueron manejadas a través del método analítico completo, EFS-CLAR. En la figura 3.12, se muestra la gráfica de la concentración de benzo(a)pireno recuperada contra la adicionada en un intervalo de concentraciones de 0.027 a 0.267 mg/L, su coeficiente de correlación y determinación. El porcentaje de recuperación global, representada por la pendiente de la recta, fue del 77 %. Cumpliendo con el recobro

establecido por la CCAyAC: 70-110 % para concentraciones de 0.01 a 100 mg/L de residuos y contaminantes en alimentos y agua.

Del mismo modo, se determinó el porcentaje de recuperación para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en muestras de 15 mL de medio líquido. En la figura 3.13 y 3.14, se muestran las gráficas de recuperación de los metabolitos en un intervalo de concentración de 5 a 40 µg/L, sus coeficientes de correlación y determinación. La recuperación global para el 4,5-cis dBaP fue del 87 % y para el 7,8-cis dBaP fue del 91 %, lo cual cumple con lo establecido por la CCAyAC: 70-120 % para concentraciones de 1 a 100 µg/L. Velasco Cruz (2011) y Olmos Espejel (2013), quienes realizaron la optimización y validación de los métodos de EFS-CLAR en el medio líquido de cultivo, reportaron un recobro de 67 % para el benzo(a)pireno y de 82 % para el metabolito 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno.

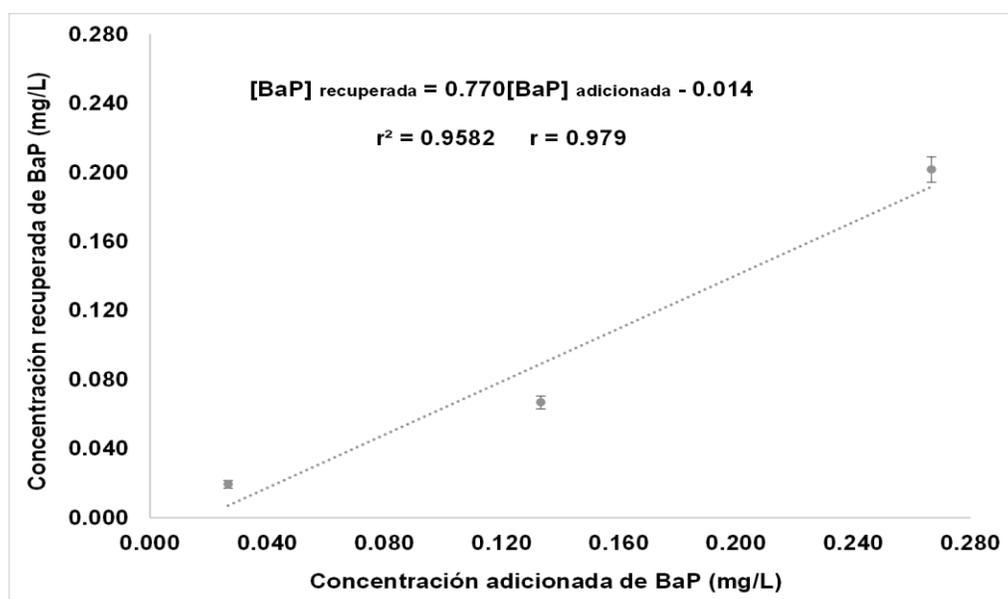


Figura 3.12. Concentración recuperada de benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de medio de cultivo líquido.

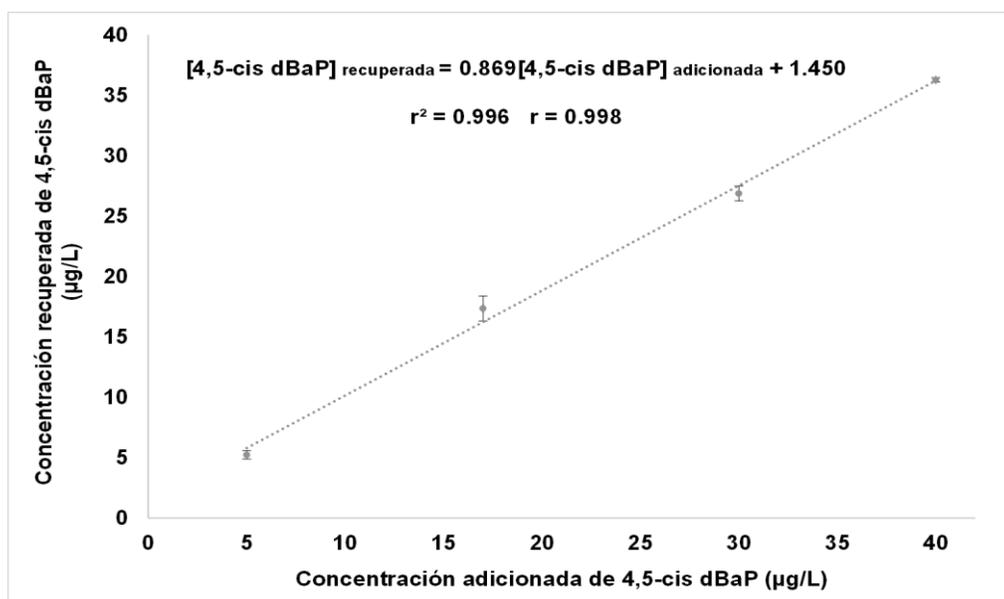


Figura 3.13. Concentración recuperada de 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de medio de cultivo líquido.

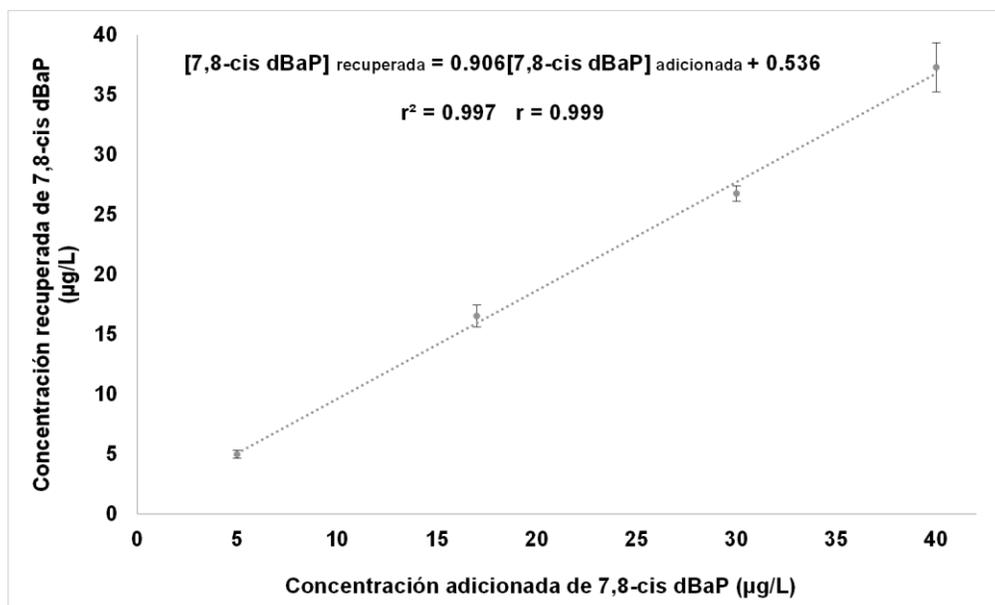


Figura 3.14. Concentración recuperada de 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a las muestras de medio de cultivo líquido.

3.3.3 Validación del método de EFS-CLAR (UV) para el BaP y del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en el lisado celular

3.3.3.1 Evaluación de interferentes en la matriz

Para evaluar los interferentes presentes en el lisado celular, se realizó el análisis cromatográfico de las fracciones A y B obtenidas mediante el proceso de extracción en fase sólida, para constatar que el proceso de limpieza fuera adecuado. En la fracción A (3.0 mL de 55:45 v/v acetonitrilo:agua), se recuperarían los metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dBaP producidos en los ensayos biológicos, por lo que fue importante que la matriz no mostrara interferencias en los tiempos de retención de estos analitos. En la figura 3.15, se observa el cromatograma correspondiente a la fracción A proveniente de la muestra blanco, y un cromatograma de una disolución estándar (25 µg/L) de los metabolitos a estudiar; con esta información, se concluye que el proceso de limpieza de la muestra fue adecuado, al no encontrar interferencias en los tiempos de retención en los que se obtiene la señal cromatográfica de los metabolitos.

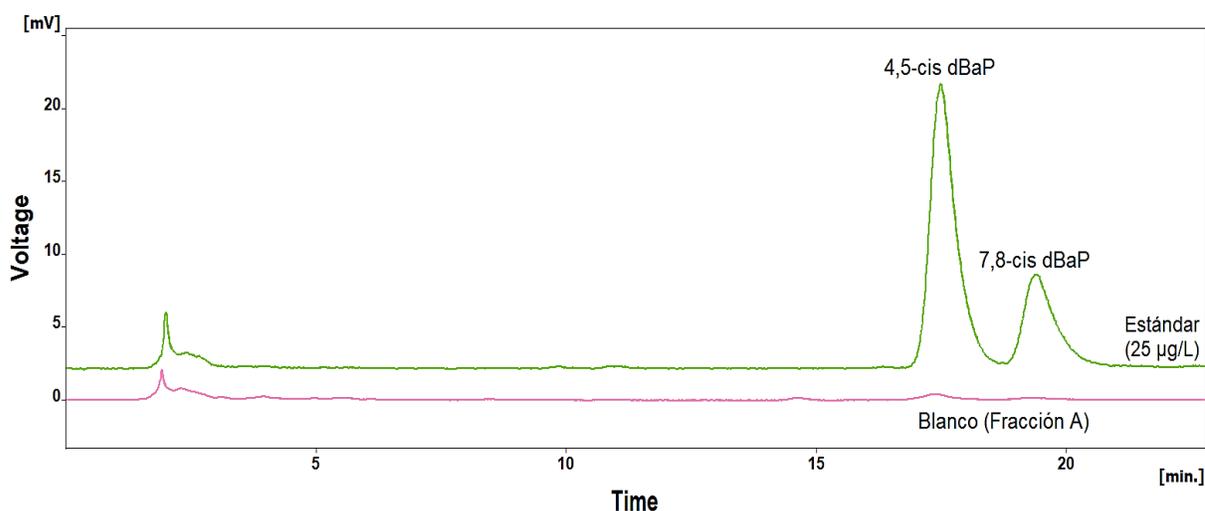


Figura 3.15. Cromatogramas de un extracto blanco (fracción A) y una disolución estándar de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP de 25 µg/L en 55:45 v/v, acetonitrilo:agua (Las condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

De igual manera, se comprobó que la fracción B (4.0 mL de 100 % acetonitrilo) del lisado celular no presentara interferencias que afectaran la correcta cuantificación del benzo(a)pireno. En la figura 3.16, se muestra el cromatograma de la fracción B de la muestra blanco y el cromatograma de la disolución estándar de benzo(a)pireno (0.1 mg/L), en su límite de cuantificación del sistema; se aprecia que en el tiempo de

retención del BaP no se observan señales en la matriz de la muestra, por lo que, igualmente se concluye que el procedimiento de limpieza de la muestra fue adecuado para la posterior elución del hidrocarburo en los ensayos biológicos.

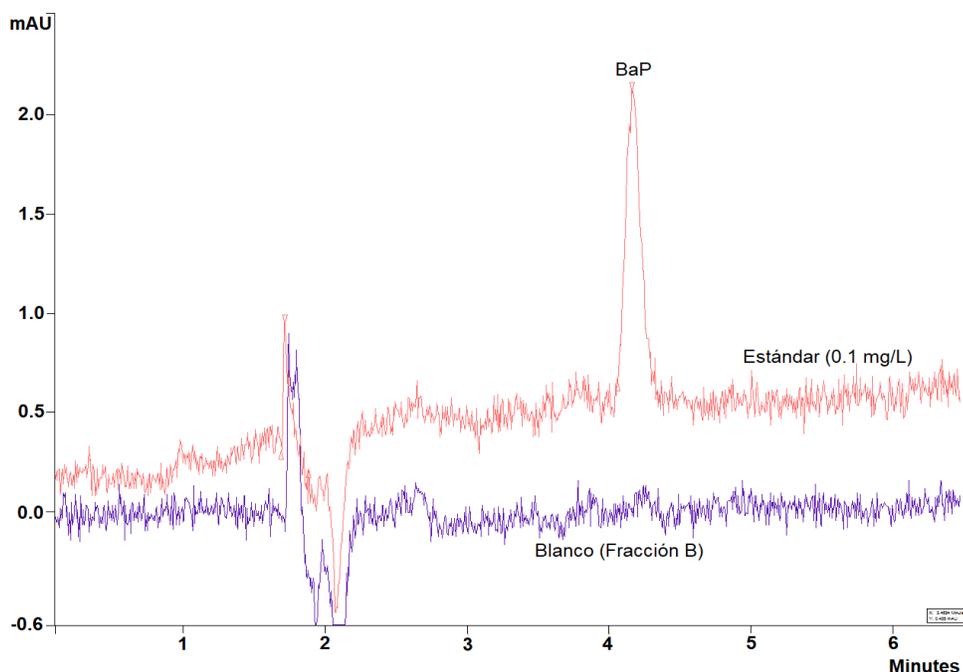


Figura 3.16. Cromatogramas de un extracto blanco (fracción B) y de una disolución estándar de benzo(a)pireno de 0.1 mg/L en acetonitrilo (las condiciones cromatográficas se describen en la sección 2.1.1).

3.3.3.2 Benzo(a)pireno

Determinación de los parámetros de desempeño:

Intervalo lineal

Se observó una relación lineal entre la respuesta del detector ultravioleta y las concentraciones de benzo(a)pireno comprendidas entre 0.027 y 0.400 mg/L. El coeficiente de correlación (r) de la curva de calibración fue mayor a 0.98, de acuerdo a los criterios de validación que establece la CCAyAC para la cuantificación de residuos e impurezas. En la figura 3.17 se muestra la curva de calibración obtenida para el benzo(a)pireno, la ecuación lineal, el coeficiente de correlación y determinación.

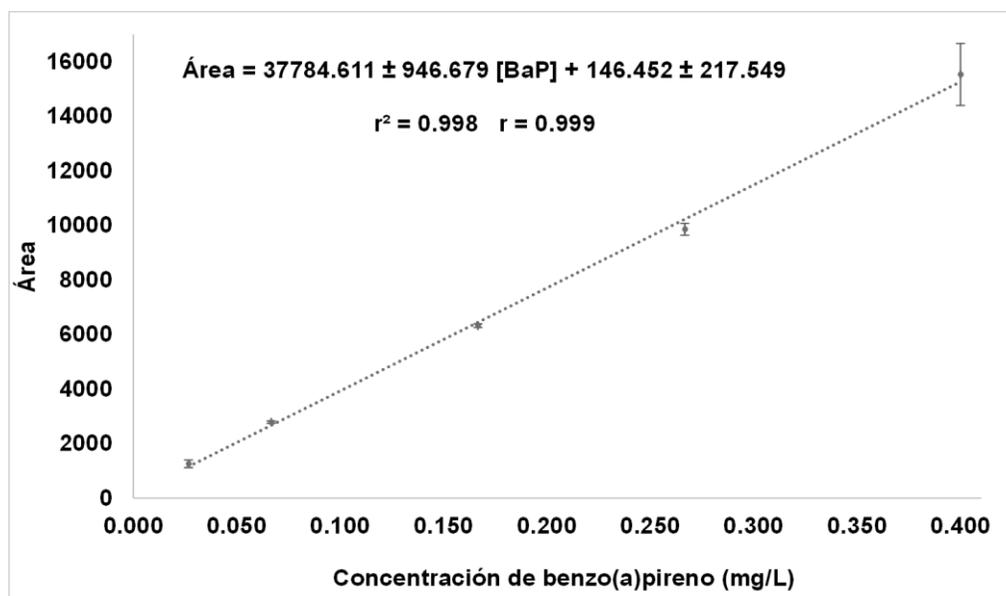


Figura 3.17. Curva de calibración obtenida para el benzo(a)pireno en muestras de lisado celular mediante cromatografía de líquidos con detección ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 263 \text{ nm}$), $n=3$.

Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación para el benzo(a)pireno, determinados mediante la relación de señal/ruido, y el análisis estadístico de la curva de calibración, se presentan en la tabla 3.7. Las concentraciones del LD y LC obtenidas con la curva de calibración fueron aproximadamente 2 veces menores, que las concentraciones obtenidas conforme a la señal cromatográfica.

Tabla 3.7. Límites de detección y cuantificación del método de EFS-CLAR (UV) para el benzo(a)pireno en el lisado celular

Método de estimación	Límite de detección (LD)	Límite de cuantificación (LC)
Basado en la relación señal / ruido	0.013 mg/L ^a	0.027 mg/L ^b
Basado en la curva de calibración	0.004 mg/L	0.012 mg/L

^a Concentración de BaP que proporciona una señal 3 veces mayor que el nivel de ruido de fondo.

^b Concentración de BaP que proporciona una señal 10 veces mayor que el nivel de ruido de fondo.

Precisión

Se determinó la reproducibilidad ($n = 3$ en dos días diferentes) mediante el coeficiente de variación para dos diferentes niveles de concentración comprendidos en el intervalo lineal. El coeficiente de variación para la concentración de 0.027 mg/L fue de 4.90 %, mientras que para la concentración de 0.167 mg/L fue de 1.52 %. Se concluye que la metodología de trabajo fue precisa, porque se obtuvieron coeficientes de variación menores al 20 % para concentraciones de 0.01 a 0.1 mg/L y menores al 15 % para concentraciones de 0.1 a 100 mg/L, de acuerdo a lo que establece la CCAyAC para residuos y contaminantes en alimentos y agua.

Recobro

Se realizaron experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas del lisado celular para realizar una evaluación práctica de la veracidad del método. El recobro global para el benzo(a)pireno fue del 75 % como se muestra en la figura 3.18; cumpliendo con el criterio de aceptación para la recuperación establecida por la CCAyAC: 70-110 % para un intervalo de concentración de 0.010 a 100 mg/L de residuos y contaminantes en alimentos y agua.

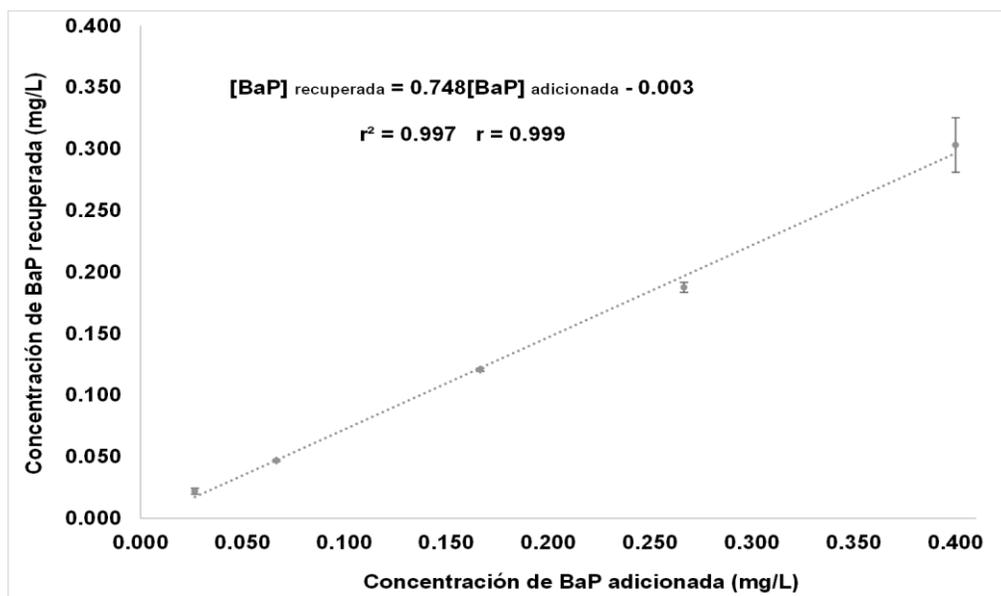


Figura 3.18. Concentración recuperada de benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular.

3.3.3.3 Metabolitos 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno

Determinación de los parámetros de desempeño:

Intervalo lineal

En el intervalo de 5 a 30 $\mu\text{g/L}$ se observó una relación lineal entre la respuesta del instrumento y la concentración de los metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dBaP. En la figura 3.19, se muestran las curvas de calibración obtenidas para los metabolitos con sus respectivas ecuaciones lineales, coeficientes de correlación y determinación. El coeficiente de correlación (r) de la curva de calibración de ambos metabolitos es mayor a 0.98, por lo que cumple con el criterio de aceptación que establece la CCAyAC para la cuantificación de residuos e impurezas.

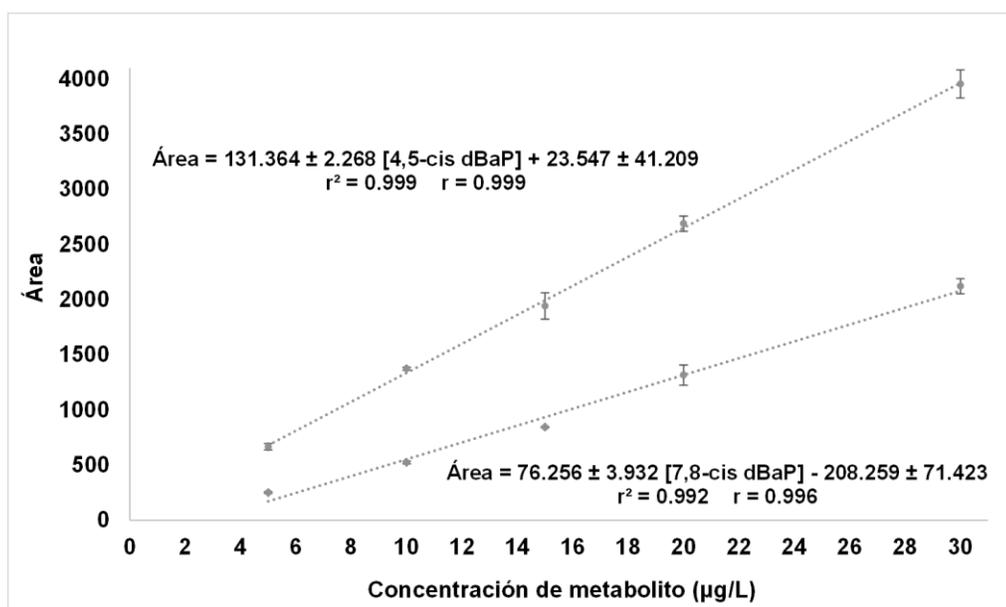


Figura 3.19. Curvas de calibración obtenidas para el 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en el lisado celular mediante cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 264 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 390 \text{ nm}$), $n = 3$.

Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación para el 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP, determinados mediante la relación de señal/ruido, y el análisis estadístico de la curva de calibración, se presentan en la tabla 3.8. Los LD y LC fueron menores mediante el método basado en la relación señal/ruido.

Tabla 3.8. Límites de detección y cuantificación del método de EFS-CLAR (DF) para los metabolitos 4,5-cis y 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en el lisado celular

Metabolito	4,5-cis dBaP		7,8-cis dBaP	
	LD	LC	LD	LC
Basado en la relación señal / ruido	0.5 µg/L ^a	1.0 µg/L ^b	1.0 µg/L ^a	2.0 µg/L ^b
Basado en la curva de calibración	1.0 µg/L	3.1 µg/L	1.7 µg/L	5.1 µg/L

^a Concentración de metabolito que proporciona una señal 3 veces mayor que el nivel de ruido de fondo. ^b Concentración de metabolito que proporciona una señal 10 veces mayor que el nivel de ruido de fondo.

Precisión

Se determinó la reproducibilidad para los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP a una concentración de 15 µg/L (n = 3 en dos días diferentes). El coeficiente de variación obtenido para el 4,5-cis dBaP fue de 4.393 %, en el caso del 7,8-cis dBaP fue de 2.801 %. El método fue preciso porque se obtuvieron coeficientes de variación menores al 20%, de acuerdo a lo establecido por la CCAyAC para concentraciones de 10 a 100 µg/L de residuos y contaminantes en alimentos y agua.

Recobro

Los experimentos de recuperación utilizando muestras adicionadas del lisado celular se realizaron para evaluar la veracidad del método. El recobro global para el metabolito 4,5-cis dBaP fue de 98 % y el recobro global para el 7,8-cis dBaP fue de 102 %; cumpliendo con el criterio de aceptación establecido por la CCAyAC: 70 - 120 % para un intervalo de concentración de 1 a 100 µg/L de residuos y contaminantes en alimentos y agua. En las figuras 3.20 y 3.21, se muestran los gráficos de la concentración recuperada de los metabolitos contra la concentración adicionada a las muestras en el intervalo de 5 a 30 µg/L.

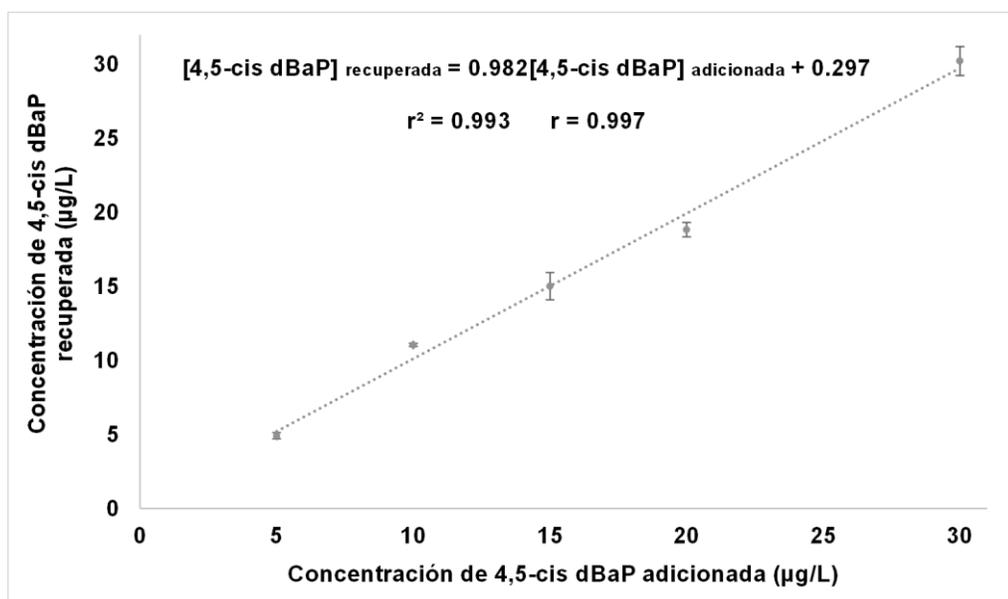


Figura 3.20. Concentración recuperada de 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular.

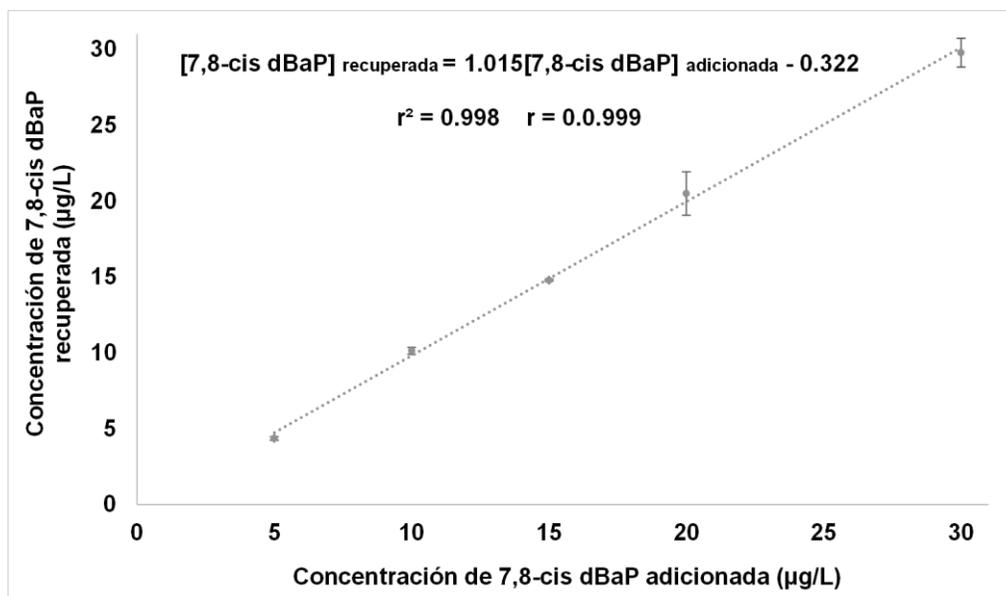


Figura 3.21. Concentración recuperada de 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular.

3.3.3.4 Robustez

Se recuerda que la validación del método se realizó con lisados obtenidos en una disolución de lisis de Tris-HCl (50 mM, pH = 7.5) más SDS (1 %), por lo que en esta sección se verificó que el desempeño del método no se viera afectado por la modificación de la disolución usada en el proceso de lisis celular, al omitir el uso de dodecilsulfato de sodio. Para esto, se realizaron experimentos de recuperación en la matriz del lisado celular obtenida sin SDS. Se corroboró que el cambio en la composición no afectara el proceso de extracción en fase sólida, específicamente en la limpieza de la muestra y la elución de los analitos.

En la figura 3.22, se muestra la gráfica de la concentración de BaP recuperada en función de la concentración adicionada a la muestra. El recobro global fue de 82 %, cumpliendo con el porcentaje de recuperación estipulado por la CCAyAC: 70-110 % para un intervalo de concentración de 0.01 a 100 mg/L para residuos y contaminantes en alimentos y agua.

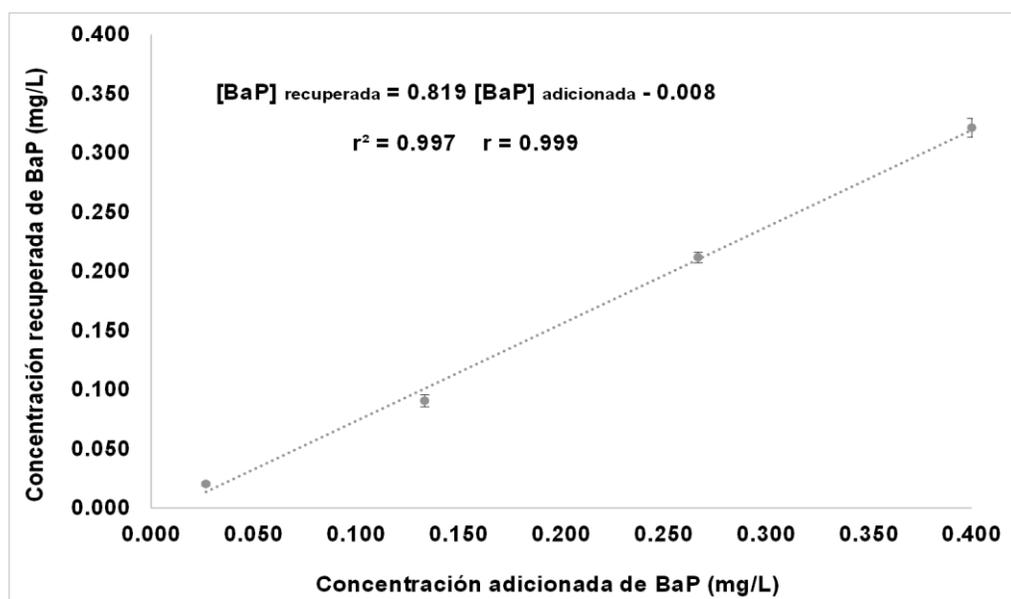


Figura 3.22. Concentración recuperada de benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular sin SDS.

Por otro lado, el recobro global para el metabolito 4,5-cis dBaP fue de 105 % y para el metabolito 7,8-cis dBaP fue de 96 %, ver figuras 3.23 y 3.24. Ambas recuperaciones cumplen con el criterio de aceptación para la recuperación de residuos y contaminantes en alimentos y agua, establecido por la CCAyAC entre el 70 - 120 % para un intervalo de concentraciones de 1 a 100 µg/L.

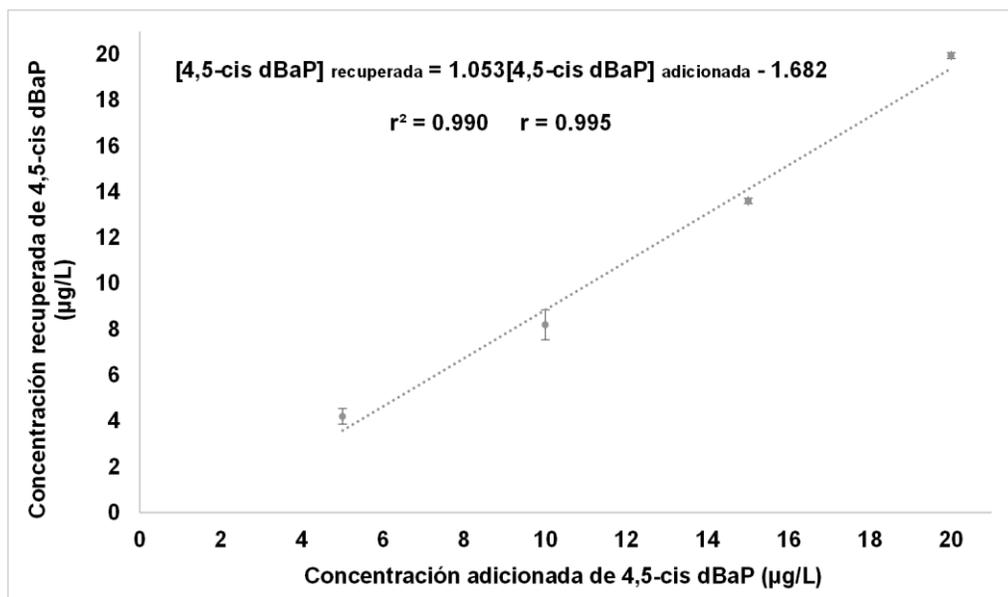


Figura 3.23. Concentración recuperada de 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular sin SDS.

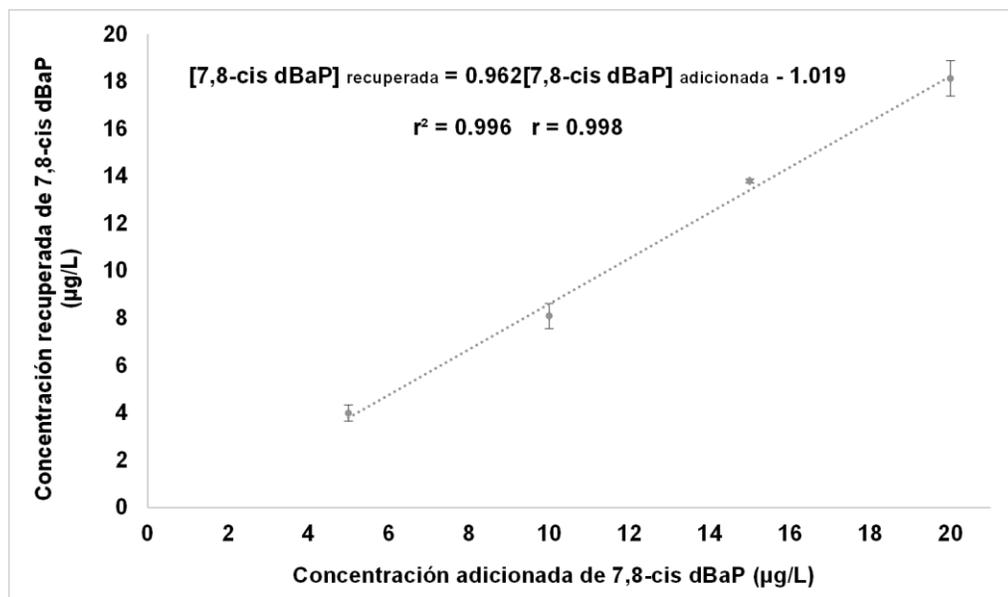


Figura 3.24. Concentración recuperada de 7,8-cis dihidrodiol benzo(a)pireno en función de la concentración adicionada a la muestra de lisado celular sin SDS.

En la tabla 3.9, se compilan los valores de los recobros obtenidos para los analitos en los lisados celulares, obtenidos con y sin el empleo de dodecilsulfato de sodio (SDS). En todos los casos, el recobro se encuentra dentro del intervalo de 70 - 120 %, como especifica la CCyAC para la validación de métodos fisicoquímicos.

Al comparar los recobros, según las pruebas de hipótesis del anexo 3, se concluye que el recobro del BaP, y de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP en el lisado celular que contenía SDS es igual al recobro obtenido en el lisado celular sin SDS. De esta manera, se confirma que la capacidad del método analítico permaneció inalterada, mostrando confiabilidad en los resultados obtenidos con el método de EFS-CLAR (UV/DF) al variar la composición de la matriz del lisado celular.

Tabla 3.9. Comparación entre los experimentos de recuperación en el lisado celular con y sin dodecilsulfato de sodio (SDS), n = 3

Analito	Pendiente		Recobro	
	Lisado celular con SDS	Lisado celular sin SDS	Lisado celular con SDS	Lisado celular sin SDS
BaP	0.748 ± 0.048	0.746 ± 0.061	75 ± 5 %	75 ± 6 %
4,5-cis dBaP	0.984 ± 0.028	1.027 ± 0.071	98 ± 3 %	103 ± 7 %
7,8-cis dBaP	1.016 ± 0.061	0.935 ± 0.044	102 ± 6 %	93 ± 4 %

3.4 Bioensayos de exposición

3.4.1 Bioensayos de activación de medios de cultivo de *Selenastrum capricornutum* (controles de remanente)

Los bioensayos de activación o exposición primaria, tuvieron como objetivo activar las microalgas para la producción de enzimas, cuantificar la cantidad de benzo(a)pireno remanente que no fue degradado por las células y cuantificar la cantidad de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP presentes en el medio líquido y en la biomasa.

Experimentos de exposición a 25 °C

En el grupo de investigación, los estudios previos sobre la degradación de BaP se realizaron exponiendo las microalgas a BaP bajo luz amarilla a 25 °C. Olmos Espejel (2013) y García Cicourel (2015) evaluaron la biodegradación del BaP durante diferentes periodos de tiempo desde 1.5 h hasta 48 h de exposición, con el monitoreo de las concentraciones formadas de los metabolitos de degradación. Con base a estos trabajos, en la presente investigación se realizó la degradación durante 48 h y 72 h, al exponer las microalgas a 4 µg de BaP bajo luz amarilla y agitación orbital. Se utilizaron tiempos largos de incubación, no sólo para activar la producción de la enzima degradadora, sino para obtener una cantidad baja de metabolitos remanentes. De tal manera que en los bioensayos de actividad enzimática no encubrieran la respuesta de los metabolitos formados en la segunda exposición. La exposición primaria de las microalgas se realizó con luz amarilla para evitar la fotooxidación del BaP y favorecer la fotosíntesis; para así, propiciar la producción de los metabolitos de tipo dihidrodiol, por la ruta enzimática de la dioxigenasa, según lo reportado por Warshawsky et al. (1988, 1995).

En la tabla 3.10, se presenta la cantidad de benzo(a)pireno y sus metabolitos, que fueron cuantificados en el medio líquido y la biomasa, después de la exposición primaria de las microalgas a 4 µg de BaP durante 48 y 72 h a 25 °C.

Tabla 3.10. Cantidad de benzo(a)pireno y sus metabolitos en el medio líquido y la biomasa, después de la exposición primaria de 48 h y 72 h a 25 °C

Tiempo de exposición	48 h			72 h		
Analito	Medio líquido	Biomasa	Total	Medio líquido	Biomasa	Total
BaP (µg)	0.432 ± 0.020	0.206 ± 0.003	0.638 ± 0.021	0.325 ± 0.076	Señal a nivel de ruido	0.325 ± 0.076
4,5-cis dBaP (µg)	0.326 ± 0.041	0.083 ± 0.025	0.409 ± 0.048	0.018 ± 0.002	LD*	0.018 ± 0.002
7,8-cis dBaP (µg)	No detectado	0.026 ± 0.0002	0.026 ± 0.0002	No detectado	No detectado	-
% Remoción	89 %			92 %		
% Degradación	84 %			92 %		

*LD = 0.00008 µg/mg o 0.0004 µg en 5 mg, según lo reportado por Velasco Cruz (2011).

En general, se observó que a las 72 h de exposición, la cantidad de analitos fue menor que a las 48 h. La cantidad de BaP que fue sorbida por las células se representa con el porcentaje de remoción, a las 48 h de exposición la remoción fue del 89 %, mientras que a las 72 h fue del 92 %. El porcentaje de BaP degradado por las microalgas fue del 84 % a las 48 h y del 92 % a las 72 h. En la figura 3.25, se muestran las señales cromatográficas del BaP que no fue degradado en la exposición primaria.

La cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido disminuyó considerablemente de 48 h a 72 h de exposición; y en la biomasa, a las 72 h de exposición, la señal cromatográfica de este metabolito se encontró en el límite de detección. El 7,8-cis dBaP fue detectado en la biomasa sólo a las 48 h como se muestra en la figura 3.26; en el medio líquido no se detectó su presencia a las 48 h ni 72 h de degradación. En la figura 3.27 se realizó un acercamiento de los cromatogramas obtenidos para la exposición primaria de 72 h, tiempo donde se obtuvo un menor remanente de metabolitos.

García de Llasera et al. (2016), realizaron el monitoreo de estos metabolitos en el medio líquido y la biomasa, reportan que la máxima producción del 7,8-cis dBaP ocurre a las 3 h de exposición y a las 6 h para el 4,5-cis dBaP; después, la cantidad de ambos metabolitos decae. La disminución de la concentración se corroboró con estos experimentos.

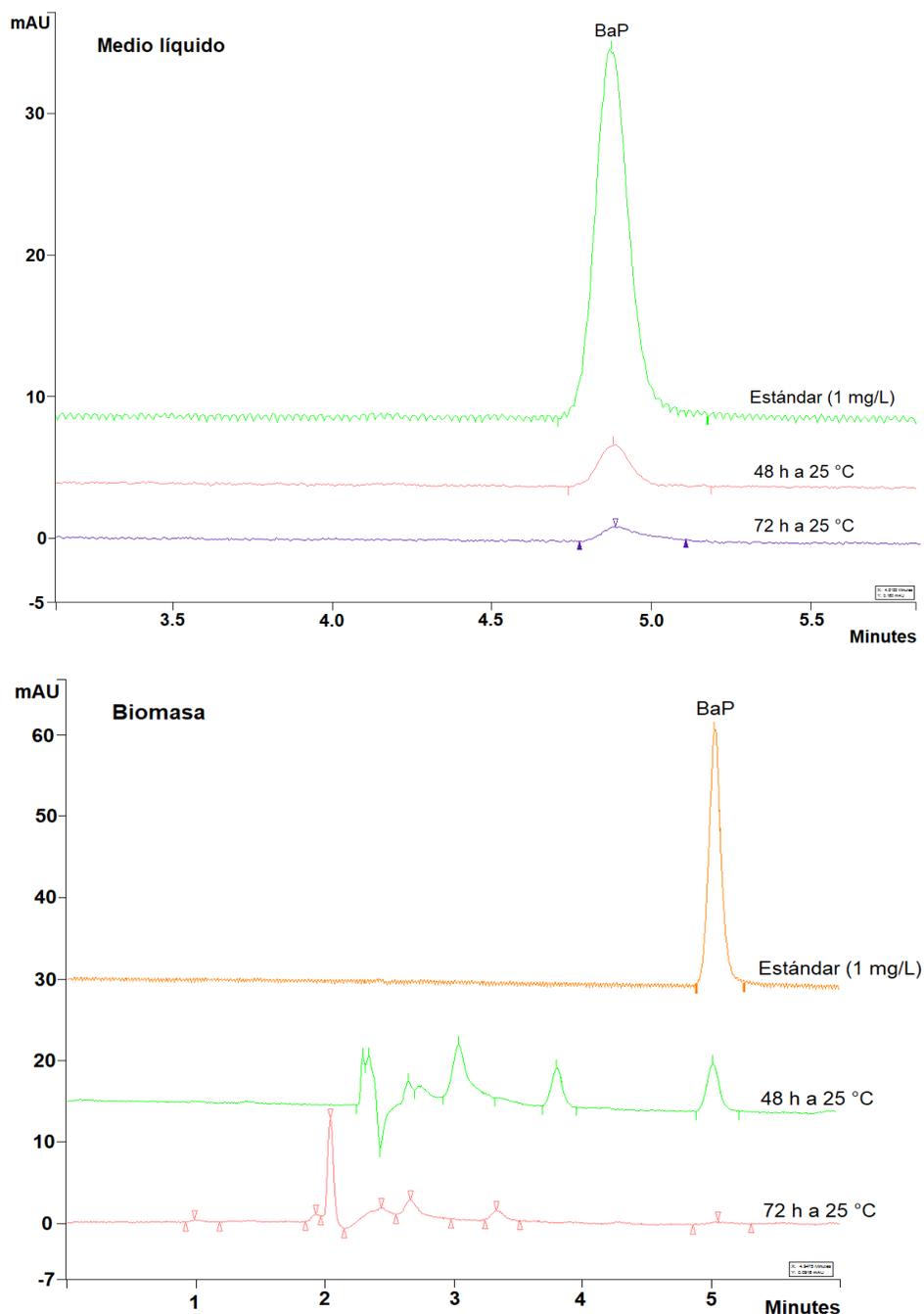


Figura 3.25. Cromatogramas del extracto de benzo(a)pireno proveniente del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 48 h y 72 h a 25 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 2.1.1).

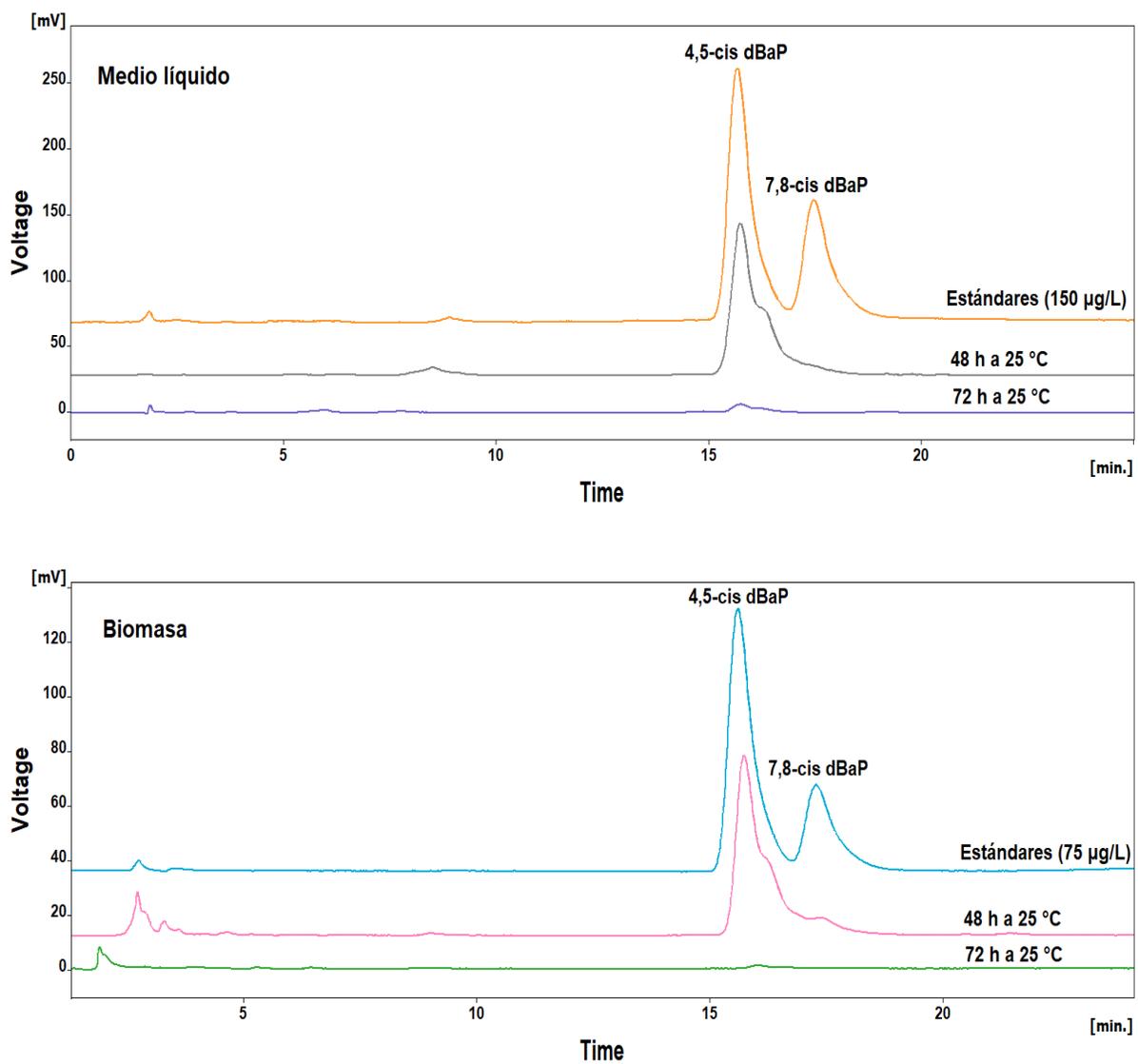


Figura 3.26. Cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 48 h y 72 h a 25 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

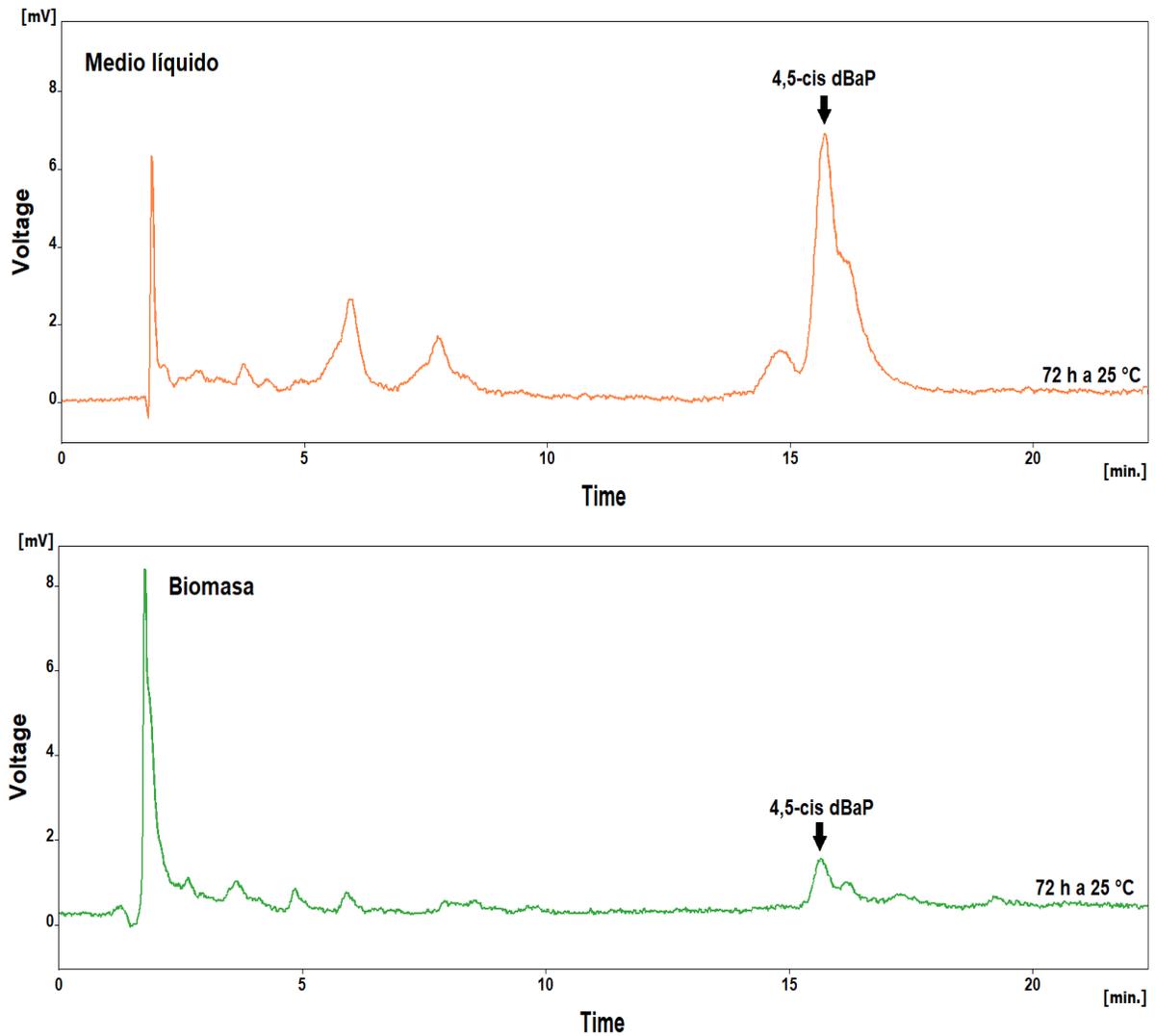


Figura 3.27. Acercamiento de los cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 72 h a 25 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

Experimentos de exposición a 34 °C

Se decidió aumentar la temperatura a la que se realizaron las exposiciones de las microalgas con la finalidad de estudiar su efecto en la biodegradación; esperando que se maximizara el metabolismo para favorecer la tasa de crecimiento y la producción de las enzimas responsables de la degradación del hidrocarburo. Se estudió la degradación durante 3 h, 48 h y 72 h, exponiendo las microalgas a 4 µg de benzo(a)pireno bajo luz amarilla y agitación orbital. Se utilizó un tiempo corto de incubación (3 h a 34 °C) para comparar con el “control metabólico” que fue expuesto bajo las mismas condiciones en dos ocasiones (bioensayo presentado en la sección 3.4.3).

En la tabla 3.11, se presentan las cantidades encontradas de los analitos en el medio líquido y la biomasa para los diferentes tiempos de exposición. Se observa que, a las 3 h de incubación, la cantidad de benzo(a)pireno remanente total fue de 1.769 ± 0.125 µg, mucho más alta que la que se encontró a las 48 h (0.233 ± 0.030 µg). A las 3 h, se encontró una mayor cantidad de hidrocarburo en la biomasa en comparación con el medio líquido, esto demuestra que el BaP primero se retiene en la biomasa para después ser metabolizado.

En el caso del metabolito 4,5-cis dBaP, a las 3 h se cuantificó casi el doble en el medio líquido en comparación con la biomasa, sumando la cantidad total de 0.075 ± 0.005 µg. La producción de metabolito parece ser muy baja, indicando que apenas comienza a aparecer. Como se encuentra en mayor cantidad en el medio líquido, se podría decir que el metabolito se forma en la célula y después se excreta al medio exterior o que fue metabolizado mayoritariamente por las enzimas presentes en el medio líquido que fueron excretadas por las microalgas.

Por otra parte, a las 3 h, la cantidad del metabolito 7,8-cis dBaP en el medio líquido no se logró cuantificar debido a que la señal cromatográfica no estaba bien definida. Sin embargo, en la biomasa fue posible distinguir con mayor claridad la señal correspondiente al 7,8-cis dBaP, obteniendo así una masa de 0.012 ± 0.002 µg. En la figura 3.28, se muestran los cromatogramas de los extractos de los metabolitos en el medio líquido y la biomasa a las 3 h de exposición.

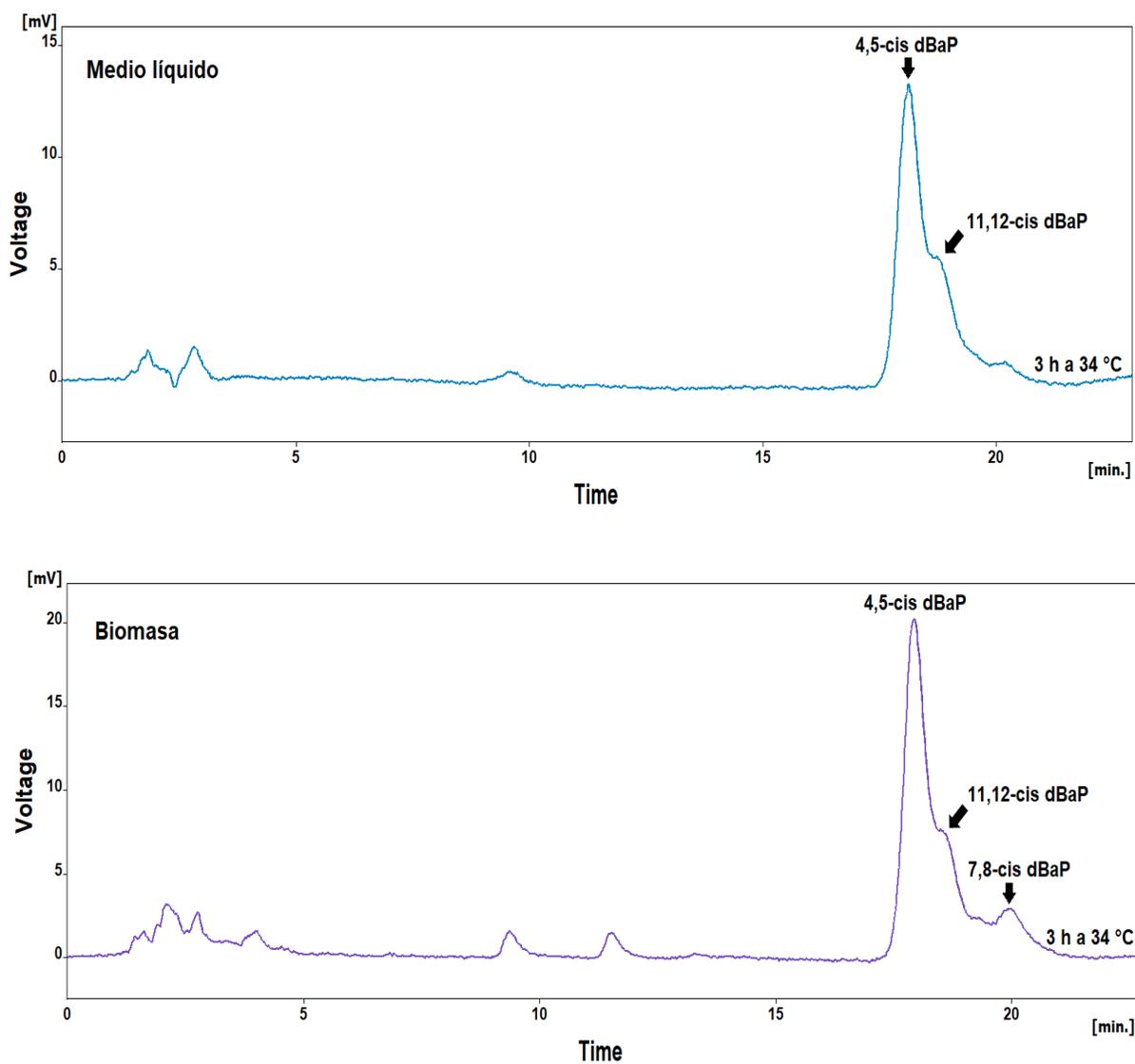


Figura 3.28. Cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 3 h a 34 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

Tabla 3.11. Cantidad de benzo(a)pireno y sus metabolitos en el medio líquido y la biomasa, después de la exposición primaria a BaP de 3 h, 48 h y 72 h a 34 °C

Tiempo de exposición	3 h			48 h			72 h		
Analito	Medio líquido	Biomasa	Total	Medio líquido	Biomasa	Total	Medio líquido	Biomasa	Total
BaP (µg)	0.206 ± 0.013	1.563 ± 0.124	1.769 ± 0.125	0.187 ± 0.029	0.046 ± 0.004	0.233 ± 0.030	No detectado	No detectado	-
4,5-cis dBaP (µg)	0.046 ± 0.003	0.029 ± 0.004	0.075 ± 0.005	0.519 ± 0.020	0.157 ± 0.024	0.676 ± 0.032	0.244 ± 0.019	0.058 ± 0.008	0.302 ± 0.019
7,8-cis dBaP (µg)	Señal indefinida	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002	No detectado	No detectado	-	No detectado	No detectado	-
% Remoción	95 %			95 %			~ 100 %		
% Degradación	56 %			94 %			~ 100 %		

En la tabla 3.11, también se observa que a las 48 h, la cantidad total de benzo(a)pireno disminuyó considerablemente con respecto a las 3 h. A las 72 h ya no se detectó hidrocarburo en el medio líquido ni en la biomasa. Por otro lado, la remoción a las 3 h y a las 48 h es igual, pero no el porcentaje de degradación, este varía del 56 % al 94 %, respectivamente. Mientras que a las 72 h, la remoción y degradación fue aproximadamente del 100 %.

La cantidad de metabolito 4,5-cis dBaP en el medio líquido y en la biomasa aumentó considerablemente de las 3 h a las 48 h, y luego disminuyó notoriamente a las 72 h. Lo anterior indica que después de alcanzar una producción máxima, la concentración del metabolito decae con el tiempo. El metabolito 7,8-cis dBaP no fue detectado, en el medio líquido ni en la biomasa tanto a las 48 h como a las 72 h de exposición.

En resumen, se concluye que a las 3 h del inicio de la exposición, la mayor cantidad de BaP se encontró sorbido en la biomasa debido a su naturaleza hidrófoba, conforme transcurrió el tiempo, a las 48 h, la cantidad de BaP retenido en la biomasa disminuyó por degradación, y a las 72 h ya no se detectó la presencia del hidrocarburo en la biomasa ni en el medio líquido.

En la figura 3.29, se muestran los cromatogramas de los extractos de BaP remanente en el medio de cultivo líquido y la biomasa; corresponden al BaP no degradado durante las exposiciones primarias de 3 h, 48 h y 72 h a 34 °C. Mientras que en la figura 3.30, se observan los cromatogramas de los extractos de los metabolitos presentes en el medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas bajo las mismas condiciones.

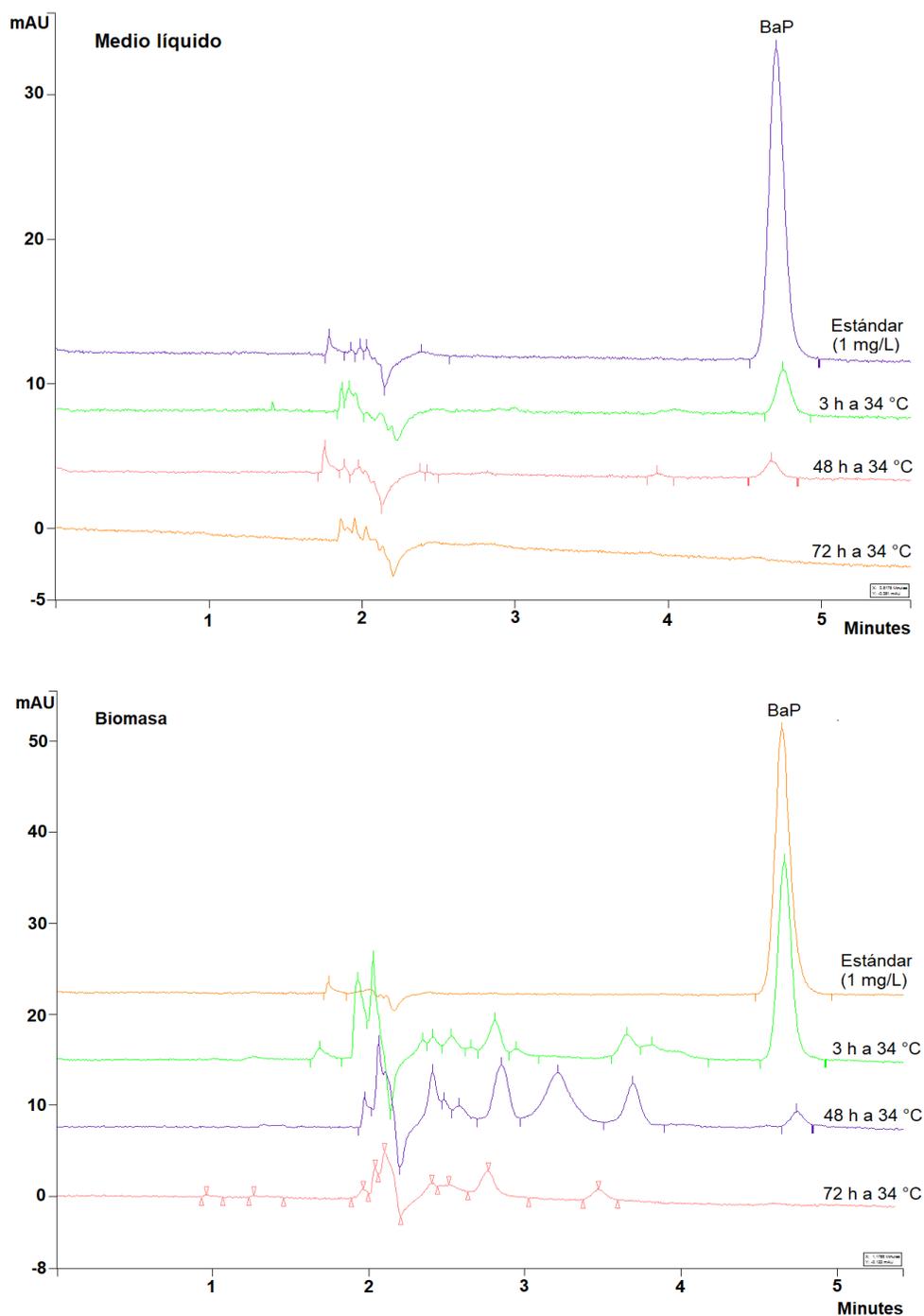


Figura 3.29. Cromatogramas del extracto de benzo(a)pireno proveniente del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 3 h, 48 h y 72 h a 34 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 2.1.1).

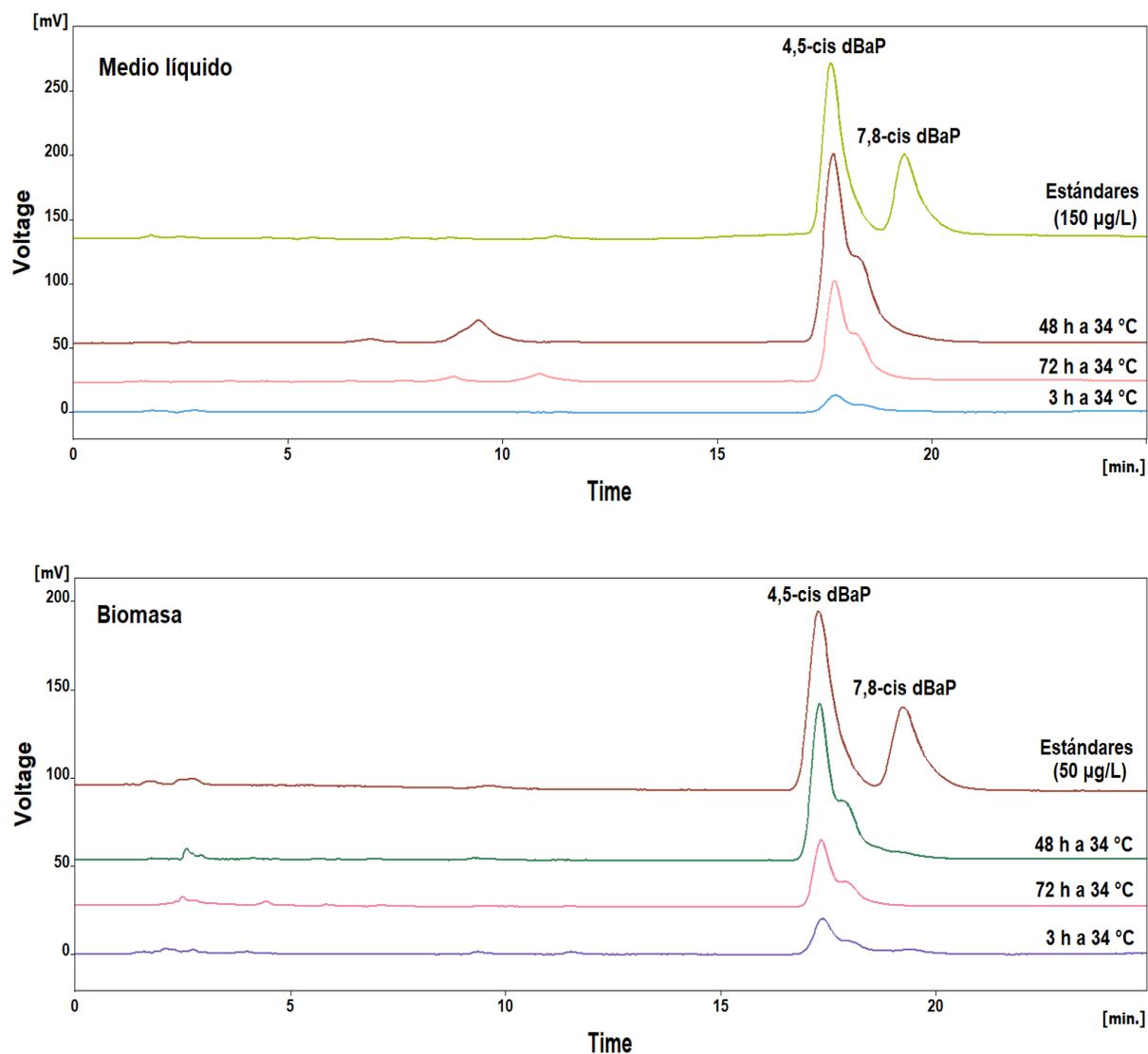


Figura 3.30. Cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa después de la exposición primaria de las microalgas durante 3 h, 48 h y 72 h a 34 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

Comparación de las cantidades de analitos presentes a diferentes temperaturas de exposición primaria

En general, en ambas temperaturas manejadas (25 y 34 °C), se observó una mayor concentración de metabolito 4,5-cis dBaP en el medio líquido en comparación con la biomasa; pues debido a que su polaridad es mayor respecto a la del hidrocarburo, se favorece su distribución en la fase acuosa, aparte de que, las moléculas de hidrocarburo que fueron metabolizadas en el interior de las células, después de ser transformadas en moléculas dihidroxiladas (metabolito), podrían ser excretadas al medio líquido. La producción del metabolito 4,5-cis dBaP fue mayor cuando se realizaron los experimentos de exposición primaria a 34 °C. La mayor cantidad de metabolito encontrada a 34 °C coincide con la menor cantidad de BaP remanente encontrada a esta misma temperatura, en comparación con 25 °C. Lo anterior indica que probablemente al someter las células a una mayor temperatura, el metabolismo de las microalgas se incrementa, degradando así una mayor cantidad de benzo(a)pireno, que a una temperatura menor, en el mismo periodo de tiempo.

En las figuras 3.31 y 3.32, se muestran las gráficas de la evolución de la cantidad total de BaP no degradado o remanente y la cantidad total del metabolito 4,5-cis dBaP, presentes en el medio líquido y la biomasa a diferentes temperaturas, contra el tiempo de exposición. Se observó que, a las 72 h, tanto a 25 °C como a 34 °C, la producción de 4,5-cis dBaP decayó después de llegar a un máximo en su producción; posiblemente porque este siguió siendo metabolizado por las microalgas, transformándolo por completo en otras sustancias, o, a consecuencia de su inestabilidad en el medio. Se observa que la cantidad de BaP remanente después de la exposición de 72 h a 34 °C, fue inferior al límite de detección, mientras que el remanente de BaP de la exposición a 25 °C, todavía fue cuantificable.

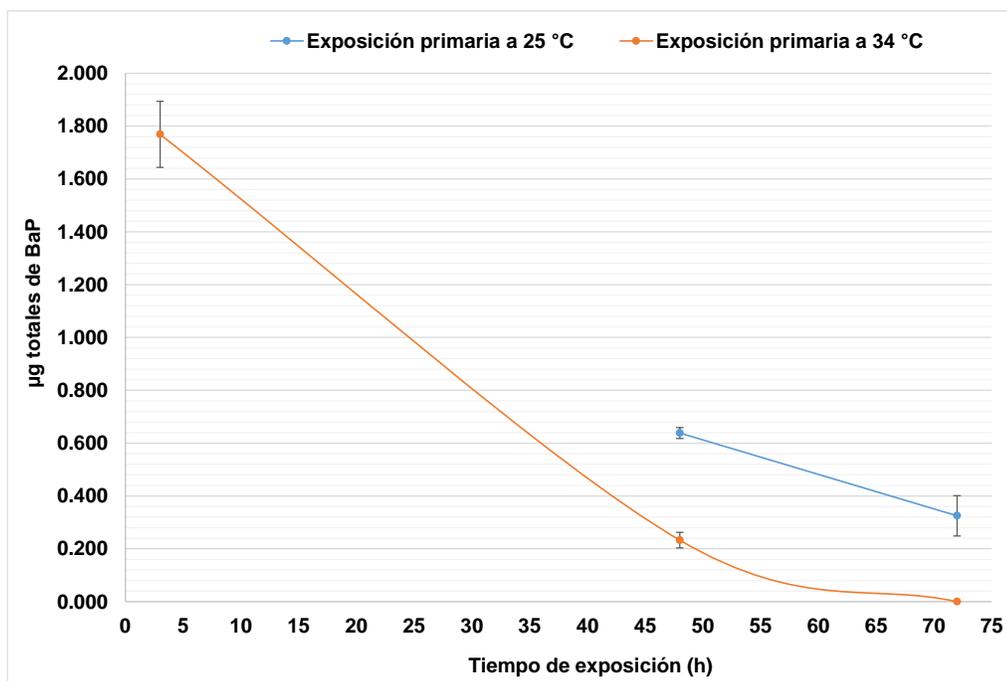


Figura 3.31. Microgramos totales (medio líquido + biomasa) de benzo(a)pireno presentes después de la exposición primaria en diferentes periodos de tiempo a 25 °C y 34 °C.

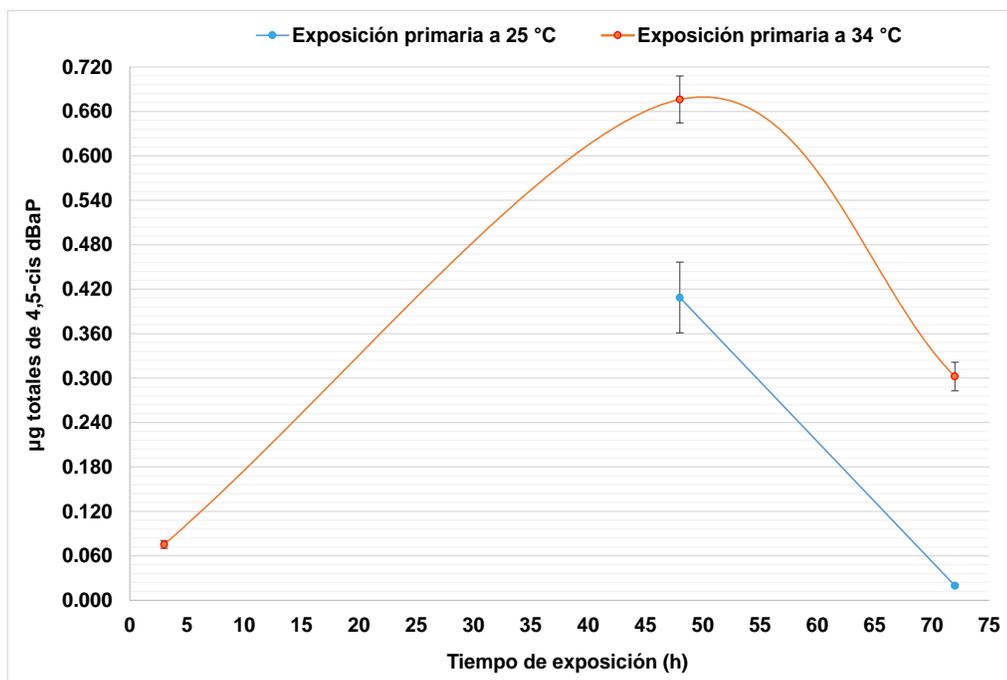


Figura 3.32. Microgramos totales (medio líquido + biomasa) del metabolito 4,5-cis dihidrodiol benzo(a)pireno presentes después de la exposición primaria en diferentes periodos de tiempo a 25 °C y 34 °C.

Es de notarse que el remanente de metabolito a las 72 h es mucho menor que el que se tiene a 48 h, siendo así, se consideró que una exposición primaria de 72 h sería óptima para realizar los subsecuentes bioensayos de actividad enzimática. De esta manera, el remanente de la primera exposición no interferiría para analizar las cantidades formadas de metabolito por las enzimas extraídas de las microalgas o excretadas por ellas. En cuanto a la temperatura, se presentó como mejor opción la de 34 °C, dado que a esta temperatura se indujo una mayor producción de metabolito, y se esperaría una mayor producción de enzimas. Sin embargo, también se trabajó con la temperatura de 25 °C en los ensayos de actividad enzimática, para efecto de comparación.

Estos ensayos de exposición primaria con células enteras fueron la base para seleccionar las condiciones de activación de los medios de cultivo microalgales para los bioensayos de actividad enzimática, ya que los extractos intracelular y extracelular, se obtienen a partir de la biomasa y el medio líquido, respectivamente. El estudio de la actividad enzimática se realizó mediante el monitoreo de la producción de los metabolitos y la desaparición del BaP adicionado. Por lo que fue fundamental conocer las cantidades remanentes de estos analitos, tanto en la biomasa como en el medio líquido, para manejarlos como “control de remanentes”.

3.4.2 Bioensayos de actividad enzimática en extractos celulares

Antes de efectuar los bioensayos de actividad enzimática, se cuantificó la cantidad de proteína total en los extractos Ei y Ee para compararlos entre sí, pues una mayor cantidad de proteína podría indicar el aumento de las enzimas específicas para la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. También se determinó si la activación de los cultivos de las microalgas, a partir de los cuales se obtuvieron los extractos celulares, provocó el incremento en la cantidad total de proteína en los extractos.

Los bioensayos de actividad enzimática se efectuaron con extractos provenientes de medios de cultivos activados en una exposición primaria de las células enteras. Los extractos enzimáticos Ei y Ee se expusieron a 4 µg de BaP bajo luz natural y agitación orbital durante 3 h a temperatura ambiente para evaluar la degradación del hidrocarburo por las enzimas liberadas. La actividad enzimática en los extractos Ei y Ee, se evaluó mediante la cuantificación de los productos de degradación del BaP formados.

Se estudió la biodegradación en los extractos Ei y Ee, obtenidos a partir de microalgas activadas durante 72 h a dos temperaturas: 25 °C y 34 °C, con el propósito de investigar si la temperatura de la exposición primaria (activación) influyó en la producción enzimática. Por los experimentos realizados con las células enteras, se sabe que, al aumentar la temperatura de exposición de las microalgas al BaP, se produce una mayor cantidad de metabolitos, lo cual está directamente relacionado con el aumento del metabolismo y la producción de las enzimas encargadas de la degradación. De esta manera, se esperó que la liberación de las enzimas en el medio extracelular aumentara, o bien, que incrementara la concentración de enzimas dentro de las microalgas, para poder extraer de ellas una mayor cantidad, mediante la ruptura de las células.

Asimismo, recordando que el extracto enzimático extracelular fue obtenido a partir del medio líquido del cultivo microalgal activado, y el extracto enzimático intracelular fue obtenido a partir de la biomasa del mismo cultivo de microalgas activadas, fue importante cuantificar la cantidad de analitos remanentes en la primera exposición; estas cantidades se consideraron como “controles de remanentes”. Para conocer las cantidades de metabolitos formadas por efecto de las enzimas presentes en los extractos Ei y Ee, los controles de remanentes se usaron para corregir las cantidades de los analitos determinados en los bioensayos de actividad enzimática. De no ser así, se sobreestimaría

la producción de los metabolitos y se tendría error al afirmar que el BaP fue degradado por las enzimas liberadas.

Los extractos Ei y Ee se manejaron por separado, considerando que en el Ee se encontrarían las enzimas excretadas por las microalgas durante su activación, y que en el Ei, las enzimas producidas en el interior de las microalgas durante su activación serían extraídas mediante el proceso de lisis celular. Cada extracto se fortificó con 4 µg de BaP, se agitaron durante 3 h a temperatura ambiente y después se extrajeron los analitos presentes en cada uno. En caso de detectar la formación de los metabolitos, producto de la degradación del benzo(a)pireno, se podría confirmar la presencia de las enzimas específicas para la transformación del hidrocarburo.

La actividad enzimática se estudió en el extracto intracelular obtenido mediante la ruptura de las microalgas en una disolución de lisis de Tris-HCl (50 mM, pH = 7.5). Inicialmente se planteó la posibilidad de también usar dodecilsulfato de sodio (SDS) para sinergizar el proceso de lisis, ya que este detergente permea la membrana de las células al solubilizar las proteínas y lípidos, lo que facilita la extracción de las proteínas intracelulares y de membrana. Sin embargo, para estudiar la función de las enzimas extraídas de las células podría ser necesario eliminar el SDS de la muestra, consumiéndose tiempo y recursos; además de que su uso en el tratamiento de la muestra sería impráctico por la tendencia a formar espuma. No obstante, después se decidió realizar la lisis de las microalgas en la disolución de Tris-HCl con SDS al 1 %, con la finalidad de comparar la actividad enzimática con ambas disoluciones de lisis. En este bioensayo, se evaluó el efecto del SDS en la extracción enzimática para la degradación del benzo(a)pireno.

Finalmente, se determinó si la activación de las microalgas mediante una exposición primaria al hidrocarburo, es necesaria para estimular la producción de las enzimas degradadoras de HAPs. Realizando bioensayos de actividad enzimática con extractos celulares obtenidos de cultivos no activados, es decir, no expuestos a BaP.

3.4.2.1 Determinación de proteínas totales en el extracto intracelular y extracelular

El método de Lowry se realizó para conocer la diferencia de concentración proteica en el Ei y Ee; además de determinar si la exposición primaria de las microalgas a benzo(a)pireno (activación) ocasionaba un aumento en la cantidad de proteínas totales en los extractos. Para ello, se realizó la curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA), como se muestra en la figura 3.33, en un intervalo de concentración de 1 a 29 $\mu\text{g/mL}$.

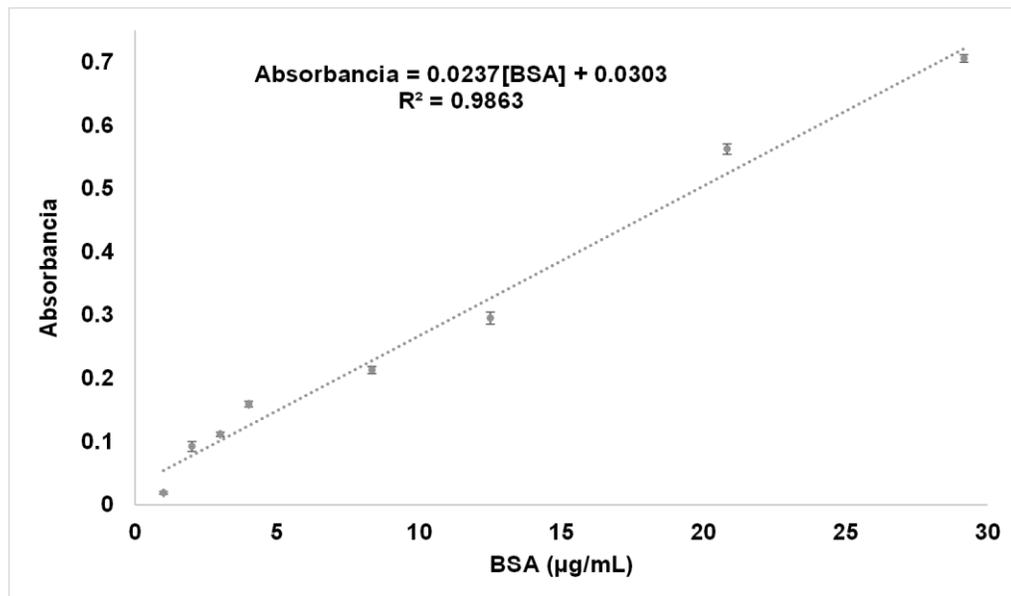


Figura 3.33. Curva de calibración espectrofotométrica de la proteína albúmina de suero bovino para la determinación de proteínas por el método de Lowry, $n = 2$.

A continuación, se muestra la cantidad de proteína total cuantificada con el método de Lowry para los extractos enzimáticos intra y extracelular procedentes de microalgas expuestas y no expuestas a BaP.

Tabla 3.12. Determinación de proteínas totales en los extractos enzimáticos obtenidos a partir de microalgas expuestas y no expuestas a BaP durante 72 h a 34 °C

Extracto enzimático	Extracelular		Intracelular	
	Microalgas expuestas a BaP	Microalgas no expuestas a BaP	Microalgas expuestas a BaP	Microalgas no expuestas a BaP
Muestra de microalgas				
Proteína total (µg)	4144.838 ± 160.159	3942.150 ± 116.104	1373.083 ± 161.118	1398.419 ± 159.677

Microalgas expuestas a BaP = Células activadas

Microalgas no expuestas a BaP = Células no activadas

Según las pruebas de hipótesis desarrolladas en el anexo 4, hay una diferencia significativa entre la cantidad de proteína en el extracto extracelular y la cantidad de proteína en el extracto intracelular, tanto para los extractos provenientes de microalgas activadas, como no activadas. La cantidad de proteína en el extracto extracelular fue aproximadamente 3 veces mayor, el total de proteína en este extracto incluye a las enzimas excretadas por las células, y también a la proteosa peptona que no fue consumida por las microalgas; sin embargo, no se conoce la contribución de cada una.

La cantidad de proteína en ambos extractos enzimáticos fue similar al emplear microalgas que fueron o no, expuestas previamente a BaP. Según las pruebas de hipótesis, se concluye que no hay suficiente evidencia para afirmar que la producción enzimática haya sido mayor al haber activado las microalgas. Esto sugiere que la cantidad extra de proteínas producidas en los extractos provenientes de cultivos activados, en comparación con los extractos obtenidos a partir de cultivos no activados, fue baja y la técnica no fue lo suficientemente sensible para detectar pequeños incrementos en la concentración.

3.4.2.2 Bioensayos de actividad enzimática a partir de células activadas

Evaluación de la actividad enzimática (activación de 72 h a 25 °C)

Luego de realizar la activación de las células durante 72 h a 25 °C, se efectuó la exposición de los extractos enzimáticos Ei y Ee a 4 µg de benzo(a)pireno durante 3 h a TA. Los microgramos de los analitos determinados en los extractos se presentan en la tabla 3.13.

Cabe destacar que estas cantidades contienen los microgramos formados en la exposición enzimática más los microgramos remanentes de la exposición primaria de 72 h a 25 °C (tabla 3.10). Por lo tanto, al hacer la sustracción de los microgramos remanentes, se obtuvieron los microgramos netos producidos por la exposición con las enzimas liberadas, exposición identificada como secundaria.

Tabla 3.13. Cantidad de analitos obtenidos en los extractos extracelular e intracelular después de realizar los bioensayos enzimáticos y en los controles de remanentes; (activación: 72 h a 25 °C, exposición enzimática: 3 h a TA)

Extracto enzimático	Extracto extracelular			Extracto intracelular		
	Bioensayo de actividad enzimática (Remanente + exposición enzimática)	Control de remanente en medio líquido	Exposición enzimática (Valor neto)	Bioensayo de actividad enzimática (Remanente + exposición enzimática)	Control de remanente en biomasa	Exposición enzimática (Valor neto)
BaP (µg)	1.764 ± 0.066	0.325 ± 0.076	1.438 ± 0.101 ^a	2.322 ± 0.241	Señal a nivel de ruido	2.322 ± 0.241 ^a
4,5-cis dBaP (µg)	0.109 ± 0.007	0.018 ± 0.002	0.091 ± 0.007 ^b	0.0083 ± 0.002*	LD**	0.0083 ± 0.002 ^b
7,8-cis dBaP (µg)	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado

Cada extracto enzimático fue fortificado de manera independiente con 4 µg de benzo(a)pireno (BaP).

*LD = 0.5 µg/L o 0.0075 µg en 15 mL, según la relación de señal/ruido; ver sección 3.3.3.3.

**LD = 0.00008 µg/mg o 0.0004 µg en 5 mg, según lo reportado por Velasco Cruz (2011).

^a BaP no degradado en la exposición enzimática, ^b 4,5-cis dBaP neto producido por la degradación enzimática del BaP.

La prueba estadística del anexo 5 indicó que la cantidad del metabolito 4,5-cis dBaP cuantificada en el Ee ($0.109 \pm 0.066 \mu\text{g}$) fue significativamente diferente de la cantidad remanente en el medio líquido después de la exposición primaria ($0.018 \pm 0.002 \mu\text{g}$). Por lo tanto, se concluye que las microalgas excretaron enzimas al medio extracelular para la degradación del BaP, produciendo $0.091 \pm 0.007 \mu\text{g}$ netos de este metabolito. Se observó que este microorganismo favorece la formación del metabolito 4,5-cis dBaP. En cambio, la cantidad neta del metabolito 4,5-cis dBaP producida por las enzimas extraídas de las microalgas en el extracto intracelular fue de $0.0083 \pm 0.002 \mu\text{g}$.

El metabolito 7,8-cis dBaP no fue detectado, aunque se sabe que su producción por *S. capricornutum* es baja y su estabilidad en disoluciones acuosas disminuye a través el tiempo (García Ciroucel, 2015); además, después de que los metabolitos se forman, probablemente siguen siendo metabolizados. Por otra parte, se recuperó aproximadamente 1.6 veces más benzo(a)pireno no degradado en el Ei ($2.322 \pm 0.241 \mu\text{g}$) en comparación con el Ee ($1.438 \pm 0.101 \mu\text{g}$).

En la figura 3.34, se observan los cromatogramas de los extractos del benzo(a)pireno provenientes del Ei y Ee, en cada caso se muestra el BaP recuperado del bioensayo enzimático y el BaP remanente de la exposición primaria de 72 h a 25 °C (control de remanente).

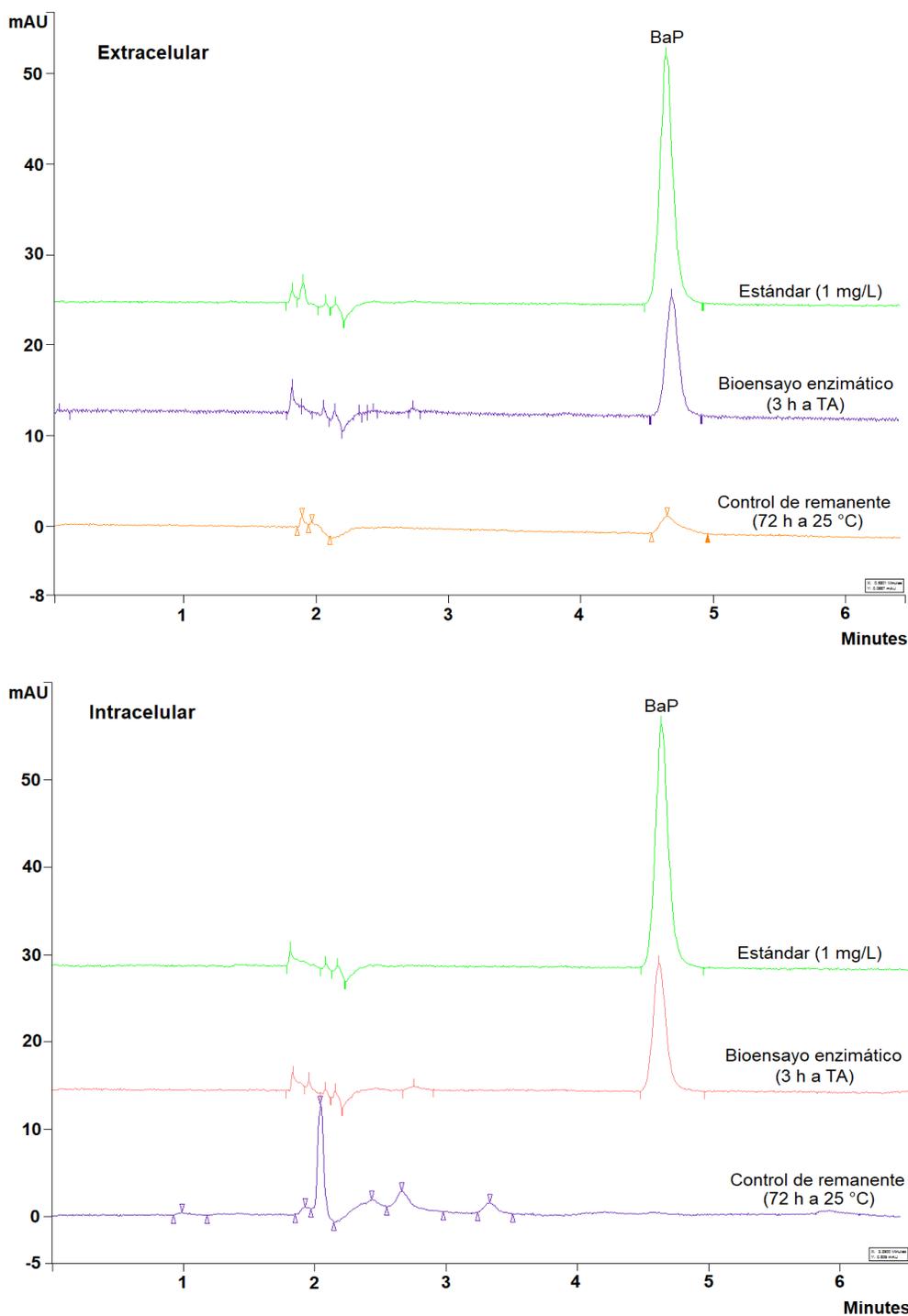


Figura 3.34. Cromatogramas del benzo(a)pireno en el extracto extracelular e intracelular, se compara el BaP obtenido después del bioensayo enzimático y el BaP remanente después de la exposición primaria de 72 h a 25 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 2.1.1).

En la figura 3.35 se presentan los cromatogramas de los extractos de los metabolitos. En el extracto extracelular del bioensayo de actividad enzimática, se observa que el área del 4,5-cis dBaP es más grande que el área del metabolito en el control de remanente. En el extracto intracelular del bioensayo de actividad enzimática, se observó la misma tendencia, aunque la señal del metabolito en el control de remanente se encontró en el límite de detección.

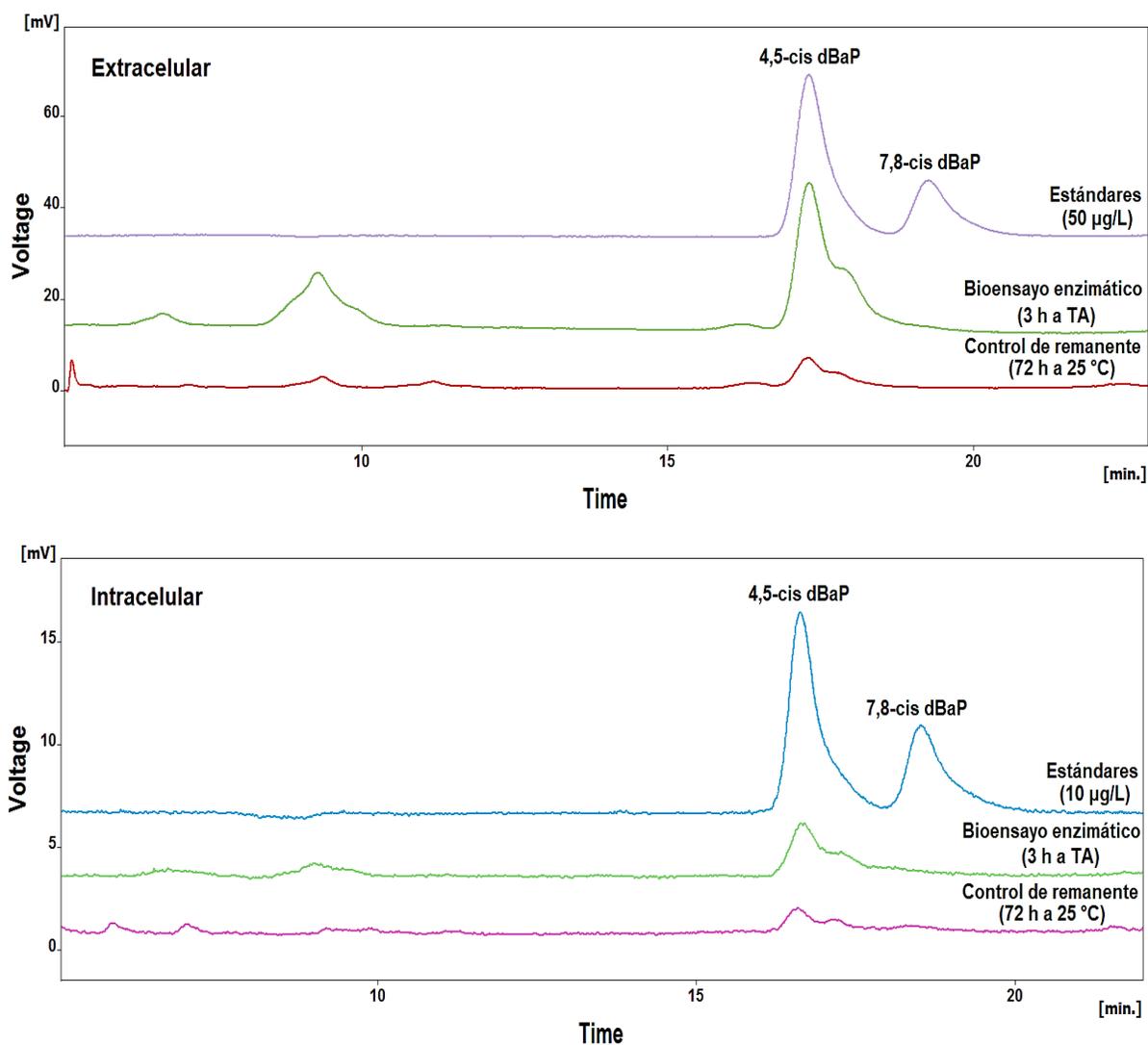


Figura 3.35. Cromatograma de los metabolitos en el extracto extracelular e intracelular, se comparan los metabolitos obtenidos después del bioensayo enzimático contra el remanente después de la exposición primaria de 72 h a 25 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

Evaluación de la actividad enzimática (activación de 72 h a 34 °C)

Luego de realizar la activación de las células durante 72 h a 34 °C, se efectuó la exposición del extracto enzimático Ei y Ee a 4 µg de benzo(a)pireno durante 3 h a TA. Los microgramos de los analitos determinados en los extractos del bioensayo enzimático se presentan en la tabla 3.14. Cabe destacar que estas cantidades también contienen los microgramos remanentes de la exposición primaria de 72 h a 34 °C del bioensayo de activación (tabla 3.11); por lo que, se realizó la sustracción para obtener los microgramos netos presentes después de realizar la exposición enzimática. Las pruebas de hipótesis para comparar la cantidad de analitos en el bioensayo enzimático y el control de remanente, se presentan en el anexo 6.

Tabla 3.14. Cantidad de analitos obtenidos en los extractos extracelular e intracelular después de realizar los bioensayos enzimáticos y en los controles de remanentes; (activación: 72 h a 34 °C, exposición enzimática: 3 h a TA)

Extracto enzimático	Extracto extracelular			Extracto intracelular		
	Bioensayo de actividad enzimática (Remanente + exposición enzimática)	Control de remanente en medio líquido	Exposición enzimática (Valor neto)	Bioensayo de actividad enzimática (Remanente + exposición enzimática)	Control de remanente en biomasa	Exposición enzimática (Valor neto)
BaP (µg)	1.631 ± 0.083	No detectado	1.631 ± 0.083 ^a	2.501 ± 0.134	No detectado	2.501 ± 0.134 ^a
4,5-cis dBaP (µg)	0.439 ± 0.029	0.244 ± 0.019	0.195 ± 0.029 ^b	0.144 ± 0.014	0.058 ± 0.008	0.085 ± 0.014 ^b
7,8-cis dBaP (µg)	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado

Cada extracto enzimático fue fortificado de manera independiente con 4 µg de benzo(a)pireno (BaP).

^a BaP no degradado en la exposición enzimática, ^b 4,5-cis dBaP neto producido por la degradación enzimática del BaP.

Según las pruebas de hipótesis, la cantidad de metabolito 4,5-cis dBaP remanente en el medio líquido y la biomasa de la exposición primaria de 72 h a 34 °C, es significativamente diferente a la cantidad encontrada después de realizar los bioensayos de actividad enzimática en el Ee y Ei. Se cuantificaron 0.439 ± 0.029 µg de 4,5-cis dBaP en el extracto extracelular y el metabolito remanente en el medio líquido de la exposición primaria fue de 0.244 ± 0.019 µg. De modo que, los microgramos netos de 4,5-cis dBaP producidos por la degradación del BaP, gracias a las enzimas excretadas, fueron 0.195 ± 0.029 µg. La producción del metabolito 7,8-cis dBaP en el Ee no fue detectada, mientras que la cantidad de benzo(a)pireno no degradado por las enzimas durante el bioensayo enzimático fue de 1.631 ± 0.083 µg.

Por otra parte, la cantidad de metabolito 4,5-cis dBaP en el extracto intracelular fue de 0.144 ± 0.014 µg y la cantidad remanente de la exposición primaria de 72 h a 34 °C fue de 0.058 ± 0.008 µg. Al hacer la sustracción, se obtiene, que la cantidad neta del metabolito 4,5-cis dBaP producida por las enzimas extraídas de las microalgas, fue de 0.085 ± 0.014 µg. En el Ei tampoco se detectó la formación del metabolito 7,8-cis dBaP. En comparación con el Ee, en el Ei se recuperó una mayor cantidad de benzo(a)pireno no degradado (2.501 ± 0.134 µg), aproximadamente 1.5 veces más.

En la figura 3.36, se presentan los cromatogramas del benzo(a)pireno para los extractos Ei y Ee. Se muestran los cromatogramas del BaP no degradado después de realizar los bioensayos de actividad enzimática y los cromatogramas de los controles de remanentes, donde se observa que no aparece la señal del BaP, después de realizar la exposición primaria de 72 h a 34 °C.

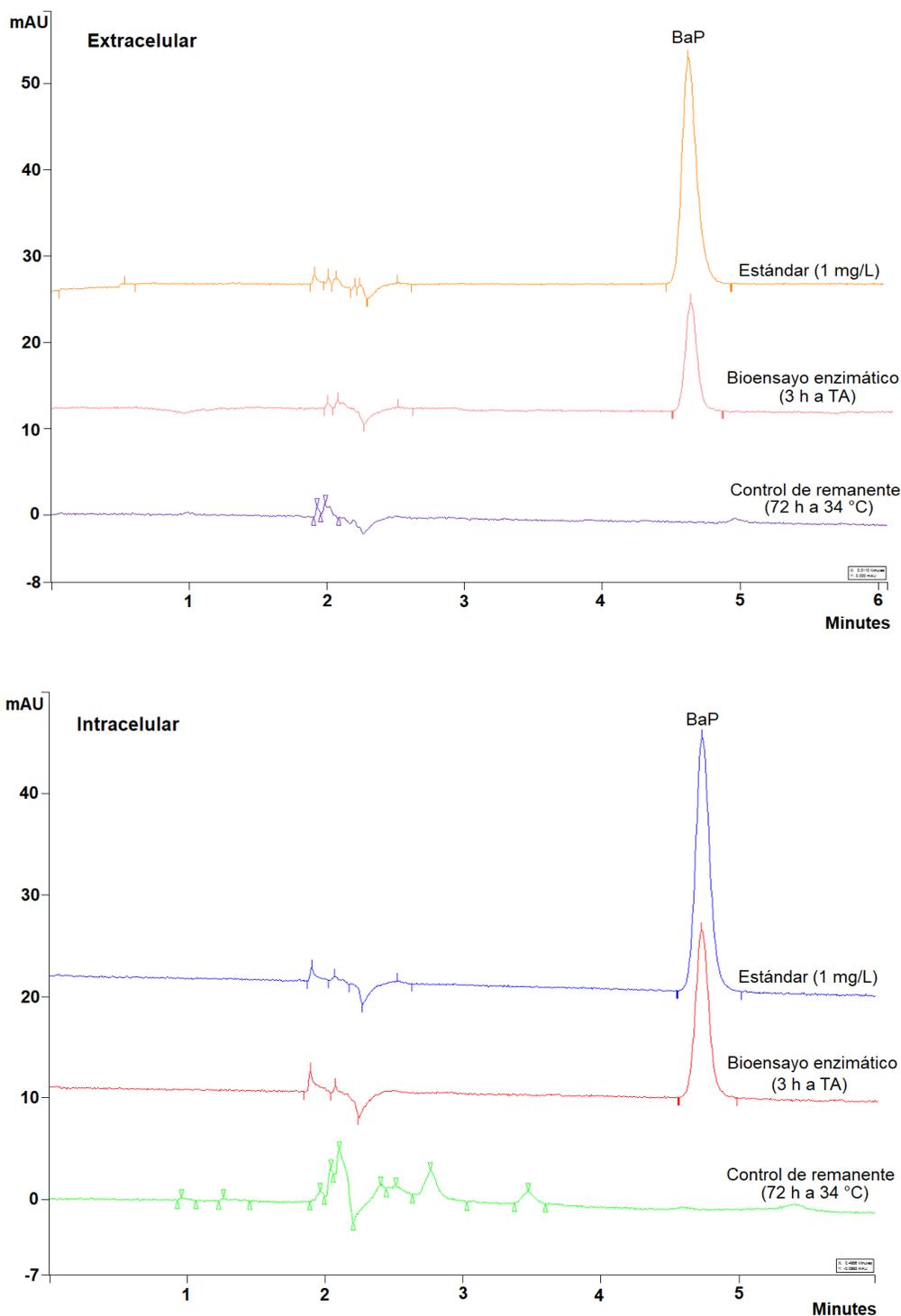


Figura 3.36. Cromatogramas del benzo(a)pireno en el extracto extracelular e intracelular, se compara el BaP obtenido después del bioensayo enzimático y el BaP remanente después de la exposición primaria de 72 h a 34 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 2.1.1).

En la figura 3.37 se presentan los cromatogramas de los metabolitos en los extractos Ei y Ee, después de realizar los bioensayos de actividad enzimática de 3 h a temperatura ambiente; así como, los cromatogramas de los metabolitos de los controles de remanente, provenientes de la exposición primaria. En todos los bioensayos, se observa que no aparece la señal correspondiente al metabolito 7,8-cis dBaP.

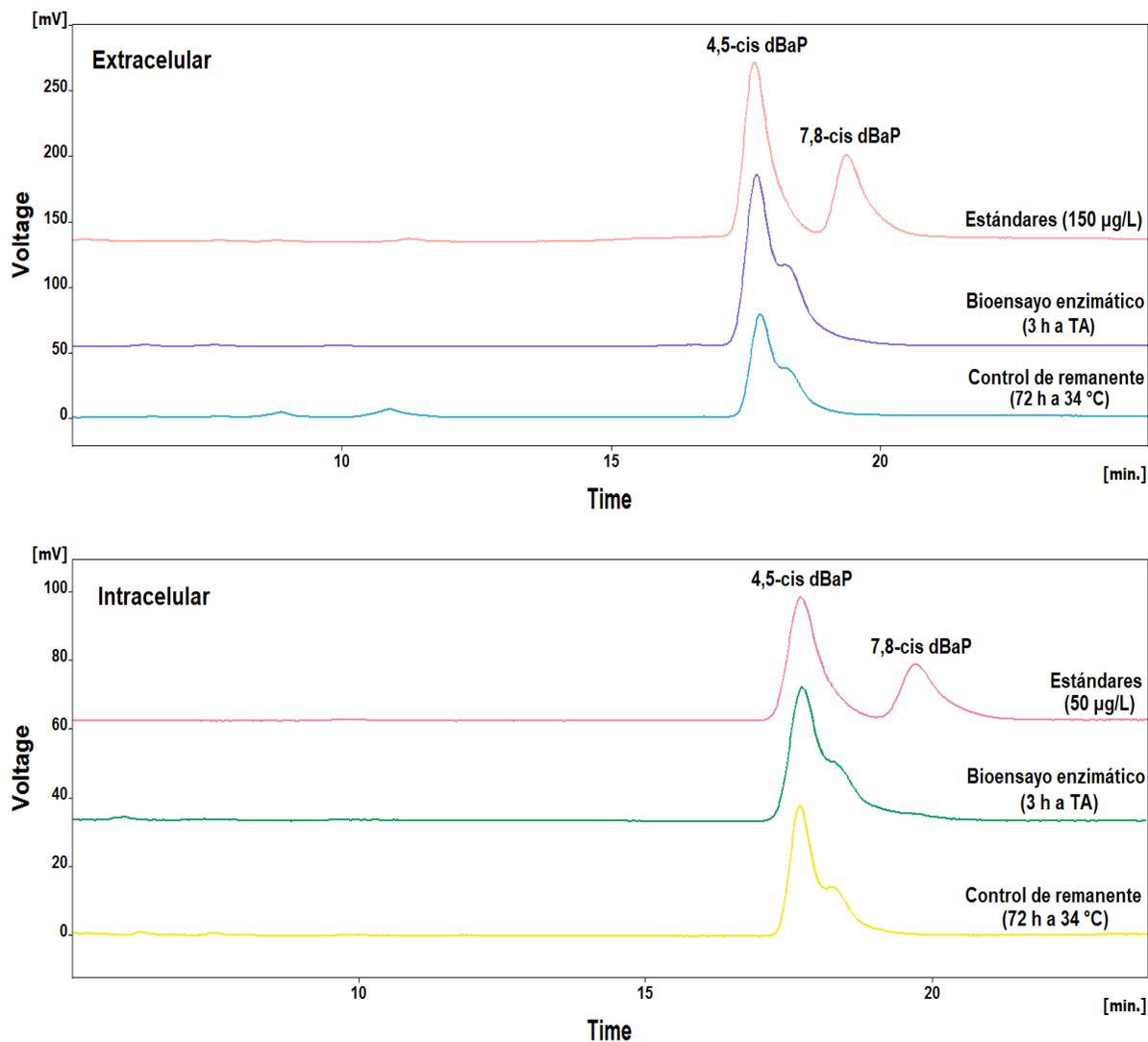


Figura 3.37. Cromatograma de los metabolitos en el extracto extracelular e intracelular, donde se comparan los metabolitos obtenidos después del bioensayo enzimático contra los metabolitos remanentes después de la exposición primaria de 72 h a 34 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

Comparación de la actividad enzimática según la temperatura de activación de las microalgas

Si se comparan los bioensayos de actividad enzimática realizados con medios de cultivo activados a 25 °C, contra los bioensayos de actividad enzimática realizados con medios de cultivo activados a 34 °C, se observa que a 34 °C se produce una mayor cantidad del metabolito 4,5-cis dBaP en el extracto intracelular y extracelular. Por esta razón, se infiere que se liberó una mayor cantidad de enzimas al medio extracelular y se extrajeron más enzimas de las microalgas, cuando estas fueron previamente activadas a una mayor temperatura.

En la figura 3.38, se aprecia que los microgramos netos producidos de 4,5-cis dBaP en el Ee, obtenido de la activación de las microalgas a 34 °C, fue aproximadamente el doble que la cantidad neta presente en el Ee, obtenido de la activación de las microalgas a 25 °C. En el caso del Ei, la diferencia fue de aproximadamente 10 veces más producción del metabolito cuando la temperatura de activación fue superior. También es de notarse que en las dos temperaturas usadas para la activación, siempre se tiene mayor cantidad de metabolitos en el Ee. Este hecho evidencia que la enzima es excretada de la célula al medio de cultivo.

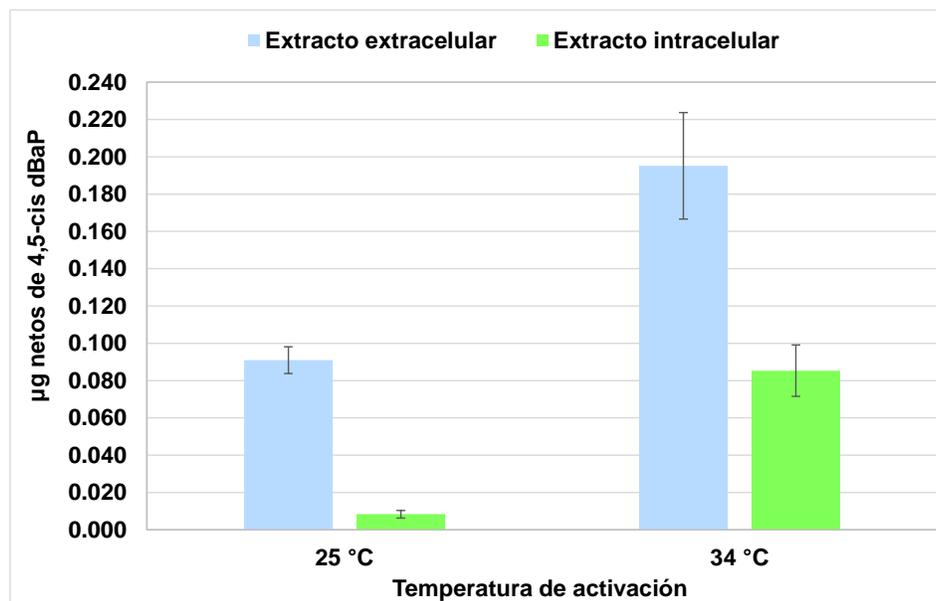


Figura 3.38. Microgramos netos del metabolito 4,5-cis dBaP producidos por las enzimas presentes en los extractos intracelular y extracelular, obtenidos a partir de medios de cultivo activados durante 72 h a 25 °C y 34 °C.

En la figura 3.39, se muestran los microgramos de benzo(a)pireno que no fueron degradados por las enzimas presentes en los Ei y Ee. Se observa que independientemente de la temperatura de activación, se recuperó una menor cantidad de BaP en el Ee, lo cual indica que hubo una mayor degradación en este extracto en comparación con el Ei.

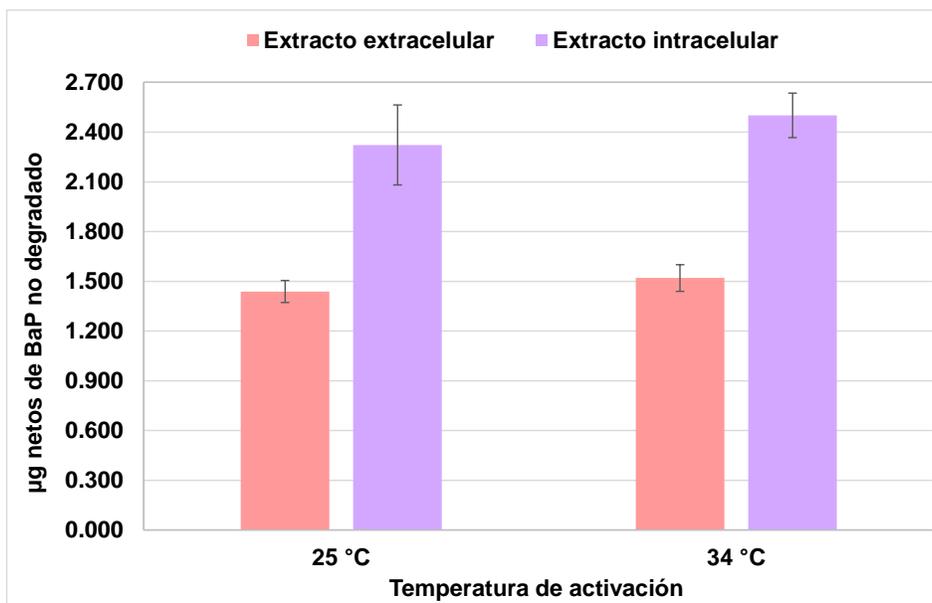


Figura 3.39. Microgramos netos de BaP recuperados, que no fueron degradados por las enzimas presentes en los extractos intracelular y extracelular, obtenidos a partir de medios de cultivo activados durante 72 h a 25 °C y 34 °C.

Por otro lado, según las pruebas de hipótesis desarrolladas en el anexo 7, la cantidad de benzo(a)pireno recuperada en el extracto extracelular, obtenido a partir de medios de cultivo activados a 25 °C, fue igual a la cantidad de benzo(a)pireno recuperada en el extracto extracelular, obtenido a partir de medios de cultivo activados a 34 °C. El mismo comportamiento se observó para la cantidad de benzo(a)pireno recuperada en los extractos intracelulares activados a las dos temperaturas. Lo anterior hiciera suponer que el aumento en la temperatura de activación no acelera la degradación del BaP. Sin embargo, según los datos de la cantidad de metabolito 4,5-cis dBaP producido por la degradación del hidrocarburo, el aumento de la temperatura de activación de 25 a 34 °C, sí favoreció la degradación del BaP. Por lo que se plantea la posibilidad de que la cantidad extra de BaP degradada en los extractos obtenidos mediante la activación a 34 °C, no fue suficientemente grande para poder detectar un cambio significativo en la

concentración respecto a la cantidad de BaP degradada en los extractos enzimáticos obtenidos mediante la activación a 25 °C. La diferencia entre la cantidad de BaP no degradado en los extractos celulares podría ser notoria con la temperatura de activación, si los bioensayos de actividad enzimática se efectuaran por tiempos más largos. En este trabajo se manejaron 3 h de incubación y este tiempo parece indicar que apenas es el inicio de la biodegradación.

De todas formas, se confirmó mayor actividad enzimática a 34 °C que a 25 °C, en los extractos Ei y Ee por la cantidad de metabolito encontrado. Se plantea la posibilidad de que la degradación del benzo(a)pireno se realice en el medio extracelular, por enzimas excretadas por las microalgas, y también que una parte de estas enzimas encargadas de la degradación del BaP se conservan en el interior de las células. Es posible que la degradación del BaP ocurra simultáneamente dentro y fuera de las células de la microalga *Selenastrum capricornutum*; ya que, según Takáčová A. et al (2014), estudios obtenidos con el microscopio de fluorescencia muestran la penetración del BaP en las células de la microalga *Chlorella kessleri*, observando su degradación dentro de las células después de 144 h. Subashchandrabose et al. (2017) también observaron la captación de pireno en cuerpos lipídicos por la microalga *Chlorella sp. MM3*.

Por otra parte, de acuerdo a la mayor cantidad de metabolito encontrado en el extracto extracelular, se supone que la concentración de enzimas sea superior que en el extracto intracelular; esto puede explicarse si se considera que las microalgas liberaron al medio extracelular la mayoría de las enzimas que produjeron, por lo que al romper las células, la cantidad extraída fue menor.

3.4.2.3 Evaluación de la actividad enzimática del extracto intracelular proveniente de microalgas lisadas en presencia de dodecilsulfato de sodio

Se realizó el bioensayo enzimático del Ei obtenido mediante la ruptura mecánica y química de las células, a través de la aplicación de ultrasonido y la adición del detergente SDS al 1 % en la disolución de lisis. Las microalgas utilizadas para obtener el Ei fueron previamente activadas durante 72 h a 34 °C.

La finalidad del bioensayo fue determinar el efecto del dodecilsulfato de sodio en la extracción y actividad enzimática. El extracto intracelular se expuso a 4 µg de BaP

durante 3 h a temperatura ambiente para estudiar la degradación del hidrocarburo; los resultados obtenidos de la exposición enzimática se presentan en la tabla 3.15 y se comparan con los obtenidos en ausencia de SDS.

Tabla 3.15. Cantidad de analitos obtenidos en el bioensayo de actividad enzimática con SDS en comparación con el bioensayo de actividad enzimática sin SDS; (activación: 72 h a 34 °C, exposición enzimática: 3 h a TA)

Analito	Bioensayo de actividad enzimática con SDS (Remanente + exposición enzimática)	Control de remanente en biomasa	Exposición enzimática con SDS (Valor neto)	Exposición enzimática sin SDS (Valor neto)*
BaP (µg)	2.460 ± 0.049	No detectado	2.460 ± 0.049 ^a	2.501 ± 0.134 ^a
4,5-cis dBaP (µg)	0.107 ± 0.026	0.058 ± 0.008	0.049 ± 0.029 ^b	0.085 ± 0.014 ^b
7,8-cis dBaP (µg)	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado

* Los valores netos de los analitos resultantes del bioensayo de actividad enzimática sin SDS, se extrajeron de la tabla 3.14. ^a BaP no degradado en la exposición enzimática, ^b 4,5-cis dBaP neto producido por la degradación enzimática del BaP.

Al hacer la comparación de los valores netos de benzo(a)pireno encontrados en los extractos con y sin SDS, se observa que las cantidades recuperadas fueron similares. Por otro lado, mediante el uso de dodecilsulfato de sodio se extrajo una cantidad de enzima total, para producir 0.049 ± 0.029 µg netos del metabolito 4,5-cis dBaP, mientras que, en la exposición enzimática sin SDS, se produjo casi el doble, 0.085 ± 0.014 µg, por lo que se observa una diferencia significativa en la actividad enzimática con y sin SDS, lo cual se confirma con la prueba de hipótesis desarrollada en el anexo 8. En ambos bioensayos enzimáticos con y sin SDS, el metabolito 7,8-cis dBaP no fue detectado.

En las figuras 3.40 y 3.41, se muestran los cromatogramas de los extractos de benzo(a)pireno y los metabolitos recuperados después de exponer los extractos intracelulares, obtenidos con y sin dodecilsulfato de sodio, a 4 μg de BaP durante 3 h a temperatura ambiente (bioensayos enzimáticos).

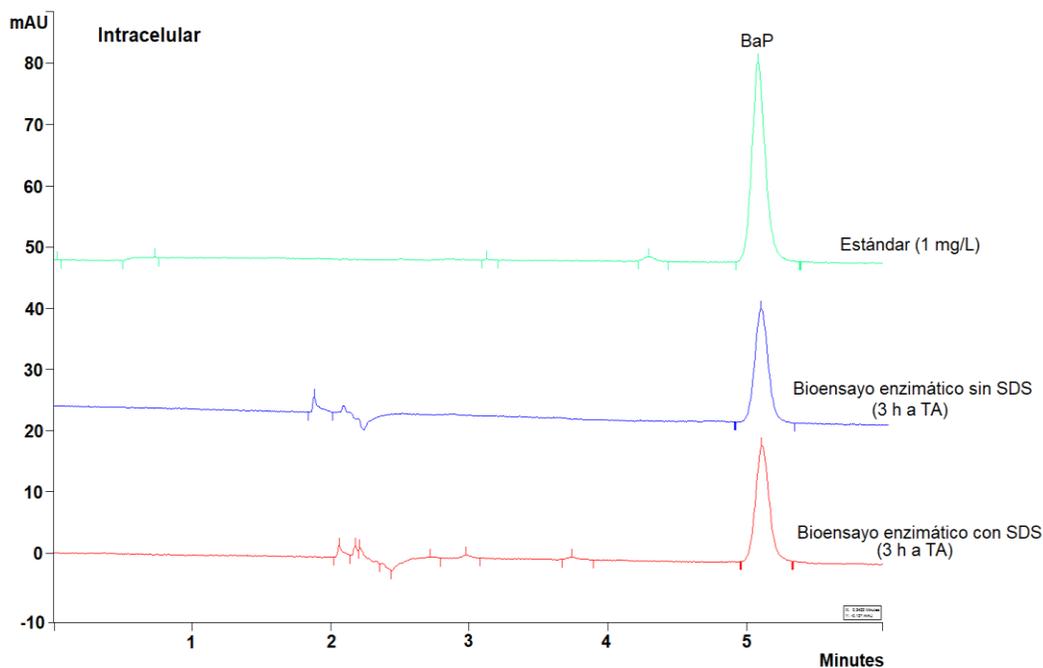


Figura 3.40. Cromatogramas del benzo(a)pireno en el extracto intracelular, donde se compara el BaP recuperado después de realizar el bioensayo enzimático con y sin SDS (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 2.1.1).

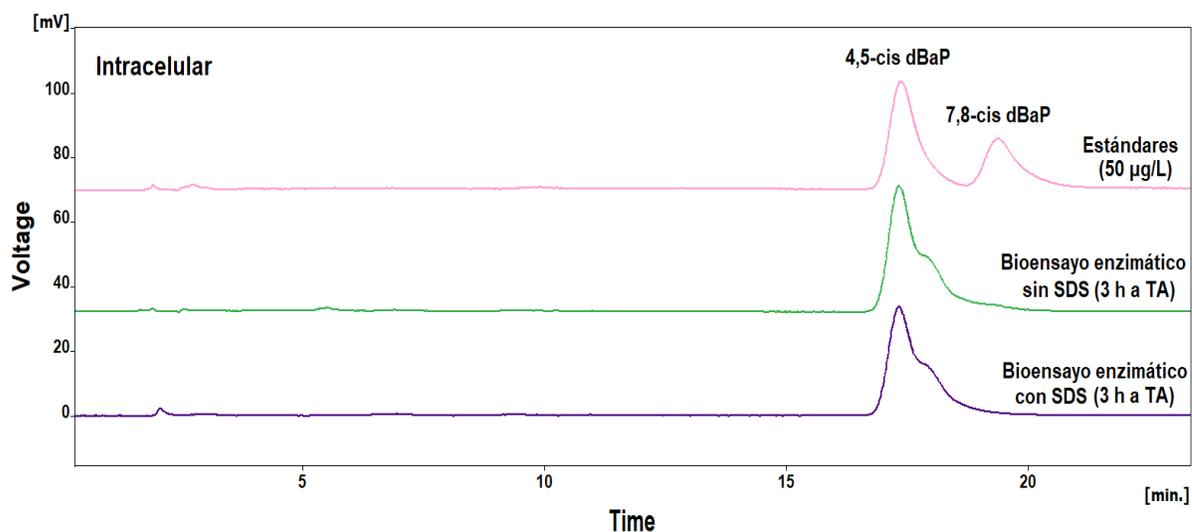


Figura 3.41. Cromatogramas de los metabolitos en el extracto intracelular, donde se comparan los metabolitos recuperados después del bioensayo enzimático con y sin SDS (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

En la figura 3.42, se observa que se produjo casi el doble de 4,5-cis dBaP en el extracto intracelular obtenido a partir de las lisis de las microalgas sin SDS; debido a lo cual, se sospecha que en el extracto intracelular obtenido a partir de la lisis con SDS, una parte de las enzimas extraídas perdieron su conformación nativa por efecto de las interacciones no covalentes con el detergente. También es posible que el SDS favoreciera la extracción de otro tipo de enzimas presentes en la membrana de las microalgas; o bien, que disminuyera la eficiencia de la ruptura celular, pues el uso del dodecilsulfato de sodio favoreció la formación de espuma, lo cual pudo haber ocasionado que la propagación de las ondas sonoras en la muestra no fuera homogénea ni reproducible.

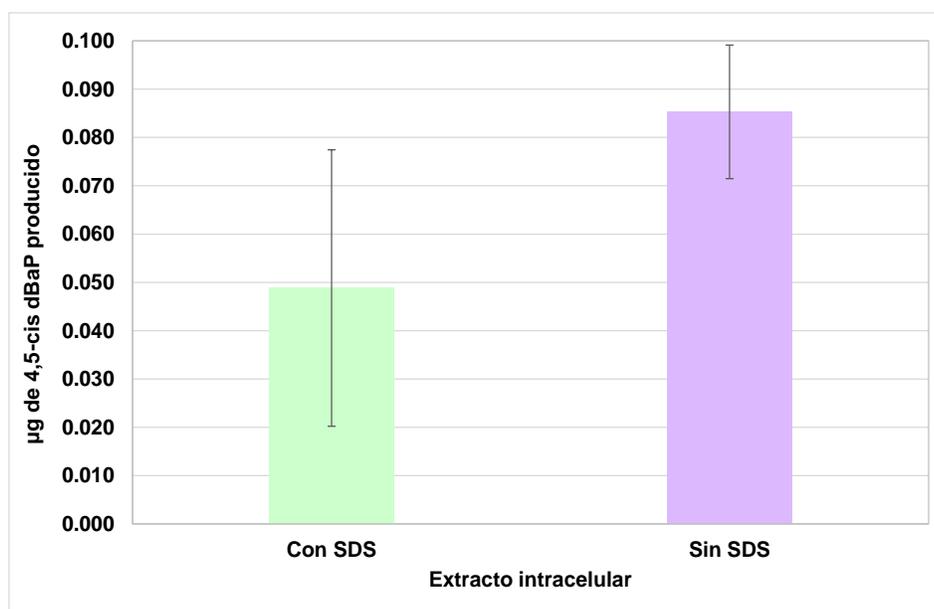


Figura 3.42. Cantidad neta del metabolito 4,5-cis dBaP producida por las enzimas presentes en los extractos intracelulares obtenidos a partir de microalgas activadas durante 72 h a 34 °C y lisadas con el procesador ultrasónico, en disoluciones con y sin dodecilsulfato de sodio.

En los bioensayos enzimáticos usando SDS como disruptor químico, la variación de los resultados fue amplia, en las barras de error se observa que el valor mínimo de 4,5-cis dBaP producido fue de 0.02 µg y el máximo de 0.078 µg. La dispersión en los resultados se atribuye al proceso de lisis, puesto que la eficacia del procesador ultrasónico depende de la transmisión efectiva de las ondas sonoras a través del líquido para producir el fenómeno de cavitación de manera uniforme. En cada muestra, la

formación de espuma por el fenómeno de cavitación dependió de la velocidad con la que se aumentó la energía emitida por la sonda, ya que para evitar que la muestra se tornara en espuma, la amplitud de las ondas se tuvo que aumentar gradualmente hasta llegar al 40 %. Por tanto, el uso del dodecilsulfato de sodio acoplado a la disrupción mecánica ultrasónica no fue favorable, debido a su baja reproducibilidad.

Se concluye que el uso del detergente no benefició la extracción enzimática y es posible que la presencia del SDS desestabilizara las enzimas extraídas, modificando su estructura, y por tanto, su actividad.

3.4.2.4 Evaluación de la actividad enzimática de extractos celulares provenientes de microalgas no activadas

Como control de activación, los extractos enzimáticos Ei y Ee, se obtuvieron a partir de cultivos de microalgas no expuestos a benzo(a)pireno, como se describe en la sección 2.3.3.2.4. Los bioensayos de actividad enzimática se realizaron exponiendo cada extracto a 4 µg de BaP durante 3 h a temperatura ambiente, con el propósito de estudiar la formación de los productos de degradación del hidrocarburo, sin la previa activación de las microalgas.

Como se muestra en la figura 3.43, después de llevar a cabo los bioensayos enzimáticos, en ninguno de los extractos se observó la formación de los metabolitos de degradación; lo cual indicó la ausencia de las enzimas, o bien, que la cantidad de enzimas liberadas por las microalgas y extraídas de ellas fue escasa, de manera que la producción de los metabolitos fue tan baja que no fue posible detectar su presencia.

Por tanto, se deduce que es necesario realizar la exposición primaria de los cultivos de microalgas al hidrocarburo (activación), para estimular la producción de las enzimas encargadas de la degradación del contaminante, y así, obtener una mayor concentración de enzimas excretadas al medio extracelular y una mayor cantidad de enzimas extraídas al romper las células.

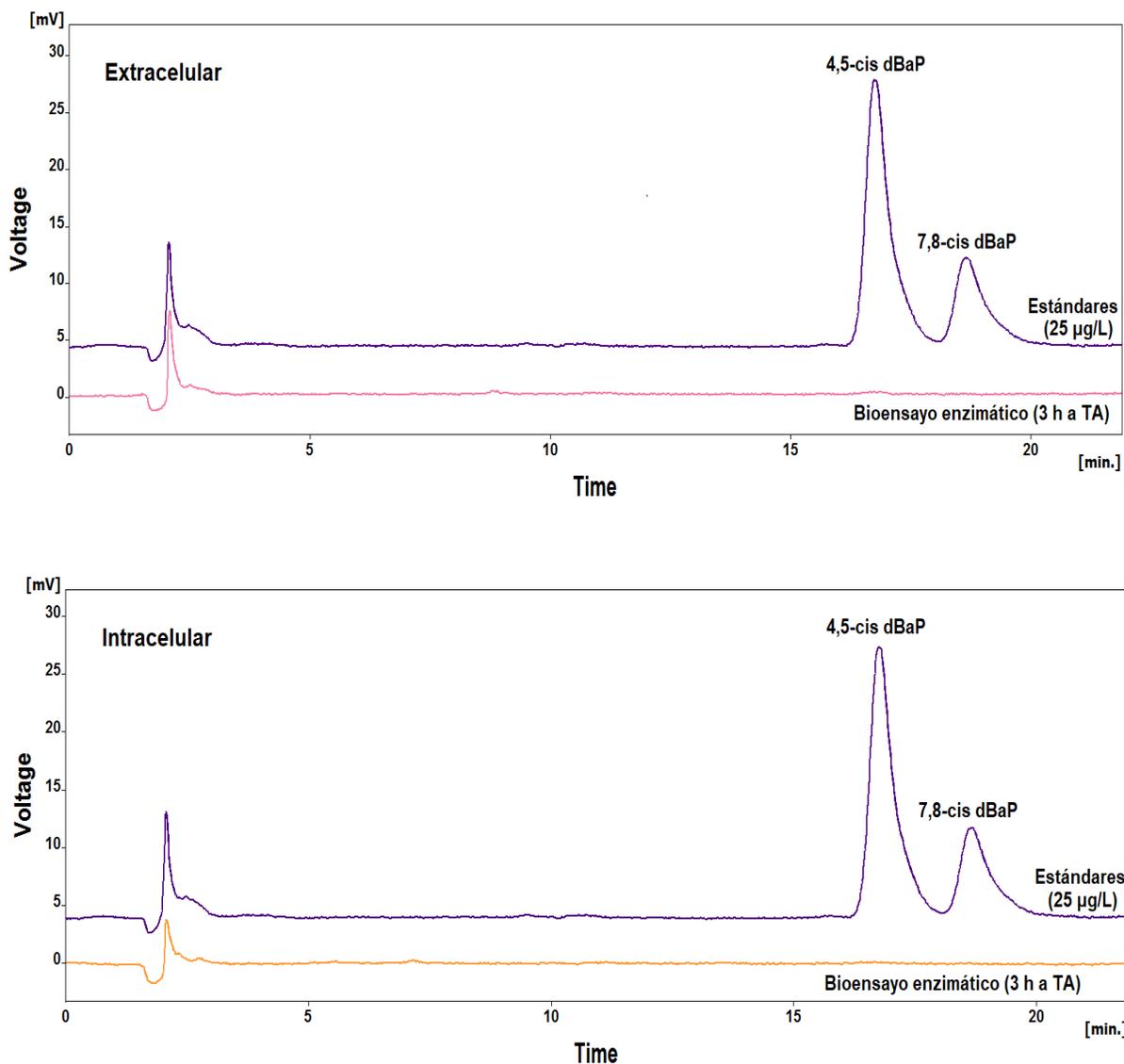


Figura 3.43. Cromatogramas de los metabolitos en el extracto intracelular y extracelular, obtenidos a partir de microalgas no activadas, después de realizar los bioensayos enzimáticos (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

3.4.3 Control metabólico

Para conocer si el metabolismo de las microalgas se mantenía en buenas condiciones después de ser sometidas a una primera exposición a 4 µg de BaP durante 72 h a 34 °C; se realizó el bioensayo de exposición primaria mencionado, para después recuperar la biomasa, lavarla y resuspenderla nuevamente en 15 mL de medio Bristol, con el fin de realizar una segunda exposición de las células a 4 µg de BaP durante 3 h a 34 °C. A este bioensayo se le llamó control metabólico (CM), para su posterior identificación. Es de notarse que las exposiciones primaria y secundaria se realizaron con las células enteras.

Entonces, para conocer si el metabolismo de las microalgas activadas se incrementaba, decaía o permanecía inalterado al someter las células a una segunda exposición de 3 h a 34 °C, se comparó la cantidad de analitos formados en el control metabólico con la cantidad formada en una exposición primaria de las microalgas, durante 3 h a 34 °C bajo luz amarilla y agitación constante (microalgas que no fueron activadas previamente).

En la tabla 3.16, se muestran los microgramos cuantificados de BaP y sus metabolitos en el control metabólico, así como la cantidad de analitos en la exposición primaria de 3 h a 34 °C. Con el fin de no sobreestimar la producción del metabolito 4,5-cis dBaP en el control metabólico, se restaron los microgramos remanentes en la biomasa, provenientes de la exposición de activación de 72 h a 34 °C (control de residuales), reportados en la tabla 3.11.

Tabla 3.16. Cantidad de benzo(a)pireno y sus metabolitos presentes en el medio líquido y la biomasa después de realizar el bioensayo de control metabólico y la exposición primaria de 3 h a 34 °C

Bioensayo	Control metabólico			Exposición primaria (3h a 34 °C)		
Analito	Medio líquido	Biomasa*	Total	Medio líquido	Biomasa	Total
BaP (µg)	0.268 ± 0.088	1.132 ± 0.140	1.400 ± 0.165	0.206 ± 0.013	1.563 ± 0.124	1.769 ± 0.125
4,5-cis dBaP (µg)	0.172 ± 0.015	0.116 ± 0.019	0.288 ± 0.026	0.046 ± 0.003	0.030 ± 0.004	0.076 ± 0.005
7,8-cis dBaP (µg)	No detectado	0.047 ± 0.004	0.047 ± 0.004	Señal indefinida	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.002

* A las cantidades de los analitos en la biomasa reportadas para el control metabólico, se les restó la cantidad de analitos remanentes de la activación o primera exposición de 72 h a 34 °C, por lo que los valores reportados corresponden a la cantidad neta cuantificada después de la segunda exposición (la cantidad de analitos remanentes de la exposición primaria se muestra en la tabla 3.11).

Según las pruebas de hipótesis desarrolladas en el anexo 9, se concluye que la cantidad de benzo(a)pireno remanente en la biomasa fue significativamente menor en el bioensayo del control metabólico; en el medio líquido, los microgramos recuperados en la exposición primaria de 3 h a 34 °C y en el control metabólico, fueron significativamente similares. La diferencia en la degradación del BaP a las 3 h de exposición es evidente en la biomasa, ya que al ser un compuesto hidrofóbico, se encuentra en su mayoría, sobido en las células; lo que favorece su degradación. Comparando las cantidades totales de BaP (biomasa + medio líquido) no degradado en el control metabólico y en la exposición primaria, se observa que es menor en el control metabólico. Las cantidades de BaP no degradado para cada bioensayo se esquematizan en barras, en la figura 3.44.

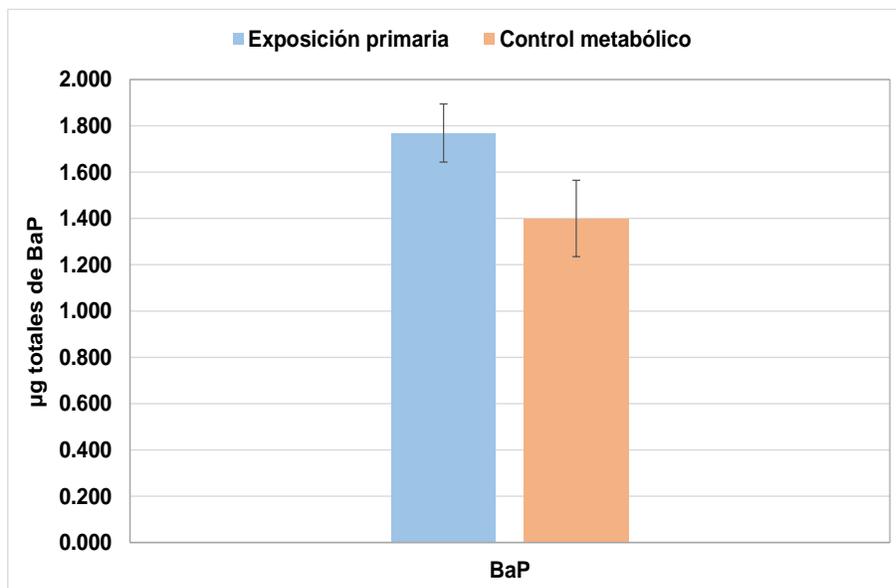


Figura 3.44. Microgramos totales de benzo(a)pireno no degradado después de la exposición primaria de 3 h a 34 °C y después de realizar el control metabólico (exposición primaria de 72 h a 34 °C seguido de la exposición secundaria de las células enteras durante 3 h a 34 °C).

La cantidad total de BaP remanente en el control metabólico ($1.400 \pm 0.165 \mu\text{g}$) fue menor que la cantidad total de BaP remanente en la exposición primaria ($1.769 \pm 0.125 \mu\text{g}$); por tanto, se presume que la velocidad de degradación del hidrocarburo es mayor en las células de *S. capricornutum* del control metabólico, es decir, en las células previamente activadas.

En la figura 3.45, se presentan los cromatogramas de los extractos de BaP provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa, donde se muestra el benzo(a)pireno no degradado después de realizar el control metabólico y el benzo(a)pireno no degradado en la exposición primaria de 3 h a 34 °C. Para el análisis de la biomasa, no se observó señal correspondiente a benzo(a)pireno en el control de remanente (exposición primaria de 72 h a 34 °C, para activar las células). En el caso del medio líquido, no se incluye el control de remanente, debido a que después de la exposición primaria de 72 h, se retiró el medio de cultivo para lavar las células y resuspenderlas en medio Bristol libre de benzo(a)pireno.

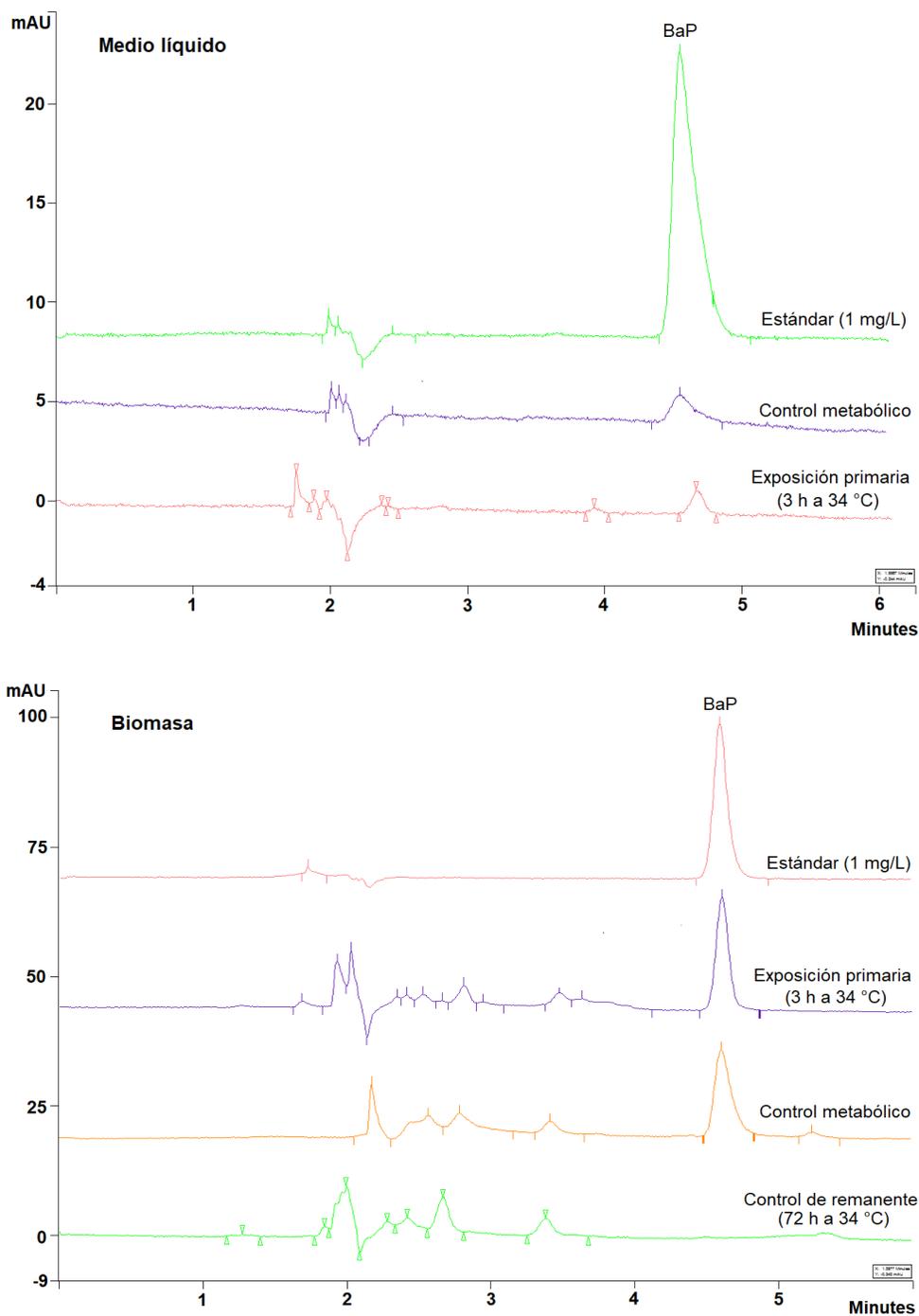


Figura 3.45. Cromatogramas del extracto de benzo(a)pireno proveniente del medio de cultivo líquido y la biomasa para el control metabólico, la exposición primaria de 3 h a 34 °C y el BaP remanente en la biomasa después de la exposición primaria de 72 h a 34 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 2.1.1).

Regresando a la tabla 3.16, se puede observar que las cantidades del metabolito 4,5-cis dBaP presentes en el medio líquido y la biomasa para el control metabólico, fueron aproximadamente 4 veces mayores, en comparación con las cantidades producidas por las microalgas que fueron sometidas sólo a la exposición primaria. Lo mismo sucede con la formación del 7,8-cis dBaP, aunque este sólo se pudo cuantificar en la biomasa. En las pruebas de hipótesis se confirma que las cantidades de los metabolitos en el medio líquido y la biomasa del control metabólico son significativamente diferentes que las cantidades de metabolitos en el medio líquido y la biomasa de la exposición primaria.

Asímismo, se observa que la cantidad total producida de 4,5-cis dBaP (biomasa + medio líquido) fue mayor en el control metabólico. Por tanto, se demuestra que la célula activada tiene una capacidad de degradación mayor, seguramente por el incremento en la producción de la enzima responsable de la degradación del hidrocarburo.

En la figura 3.46, se presentan los cromatogramas de los metabolitos para el medio líquido y la biomasa. Se aprecia que el área de la señal de los metabolitos fue mayor para el control metabólico, donde las microalgas fueron previamente activadas durante 72 h, en comparación con la exposición primaria de 3 h a 34 °C.

Para el análisis de la biomasa, se muestra el cromatograma de los metabolitos remanentes después de la exposición primaria de 72 h a 34 °C (control de remanente), se observa que el área de los metabolitos remanentes a las 72 h fue menor que el área del control metabólico. En el caso del medio líquido, no se incluye el control de remanente, debido a que después de la exposición primaria de 72 h, se retiró el medio de cultivo para lavar las células y resuspenderlas en medio Bristol libre de metabolitos.

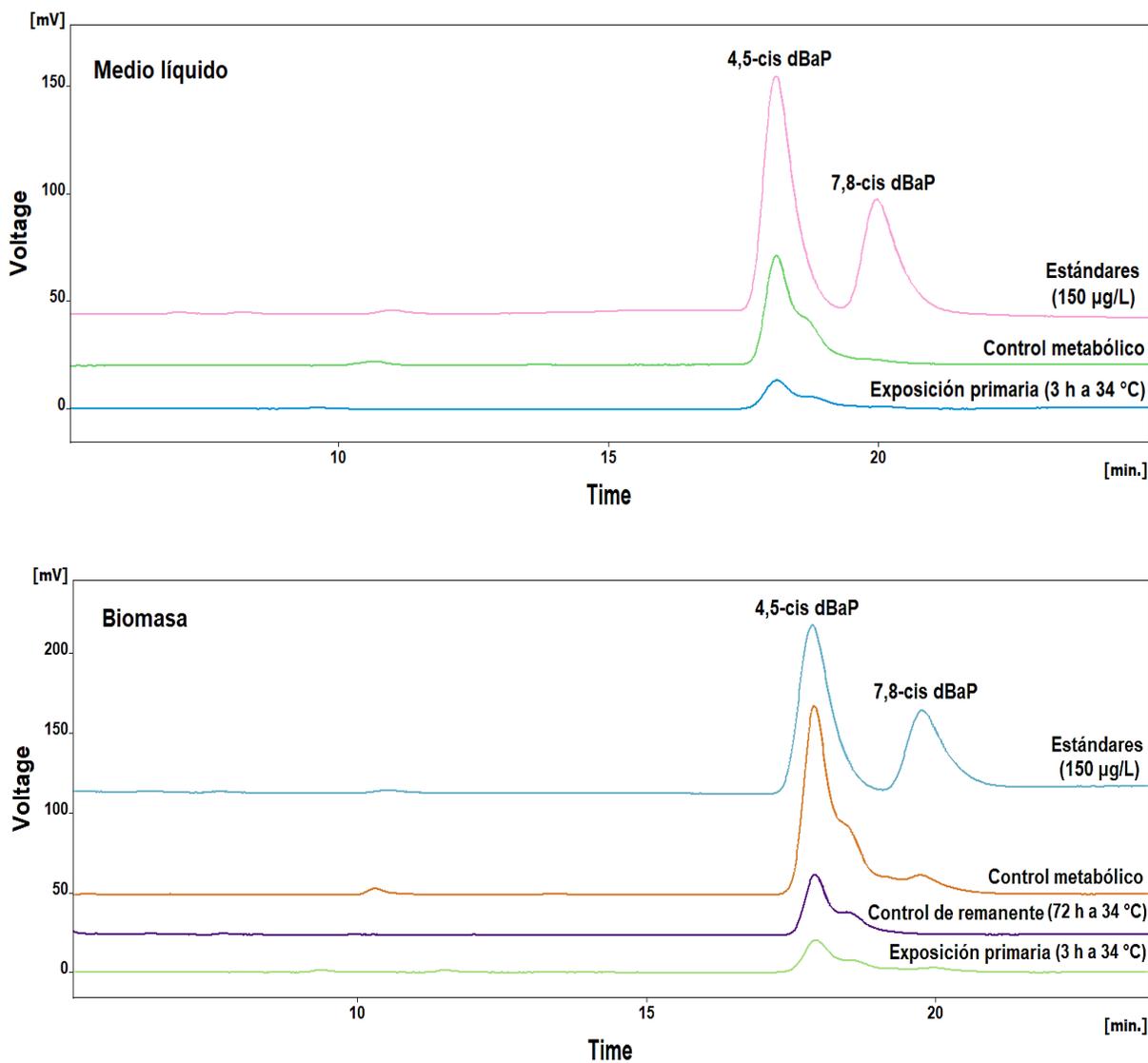


Figura 3.46. Cromatogramas del extracto de los metabolitos provenientes del medio de cultivo líquido y la biomasa para el control metabólico, la exposición primaria de 3 h a 34 °C, y los metabolitos remanentes en la biomasa después de la exposición primaria de 72 h a 34 °C (condiciones cromatográficas se presentan en la sección 3.2.1.3).

En la figura 3.47, se observa claramente una mayor cantidad de metabolitos producidos en el bioensayo donde se utilizaron microalgas previamente expuestas a BaP (control metabólico). Se plantea la posibilidad de que el metabolismo de las microalgas se haya acelerado después de previamente haber degradado 4 µg de BaP durante 72 h a 34 °C (exposición primaria) y que las células se encontraron en condiciones óptimas para seguir con el proceso de degradación cuando se realizó la segunda adición del hidrocarburo (exposición secundaria). De esta manera, la velocidad de las reacciones metabólicas aumentó y, en consecuencia, la degradación del benzo(a)pireno se realizó con mayor rapidez. Por lo tanto, la activación lograda en una exposición primaria sí favorece una mayor producción de la enzima responsable de la degradación.

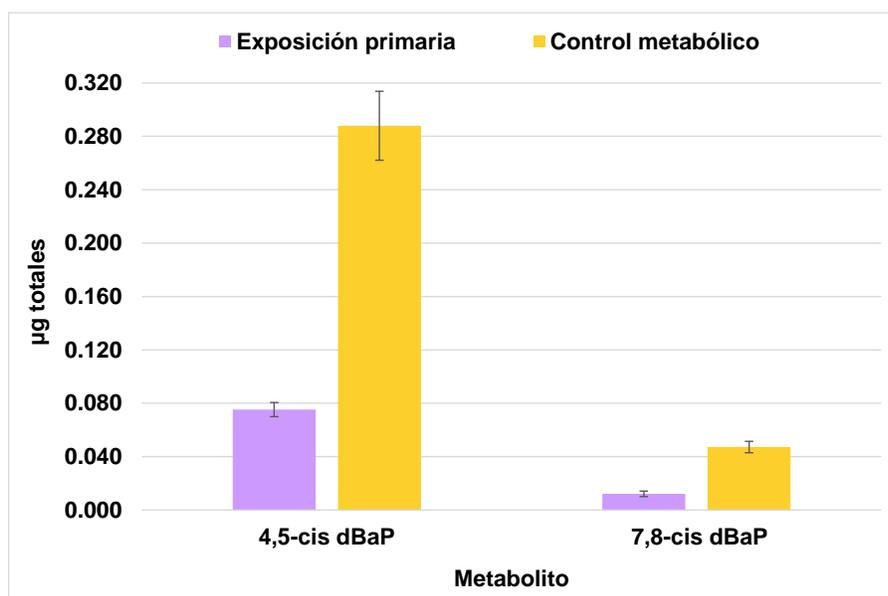


Figura 3.47. Microgramos totales de los metabolitos 4,5-cis dBaP y 7,8-cis dBaP presentes en la exposición primaria de 3 h a 34 °C y en el bioensayo de control metabólico (exposición primaria de 72 h a 34 °C seguido de una exposición secundaria de las células enteras durante 3 h a 34 °C).

4. CONCLUSIÓN

Los métodos analíticos empleados, basados en la técnica de extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos de alta resolución, permitieron la óptima cuantificación de los analitos estudiados para evaluar la actividad enzimática mediante la degradación del benzo(a)pireno (BaP), en los extractos intracelular y extracelular provenientes de medios de cultivo líquido activados de la microalga *Selenastrum capricornutum*. Los parámetros de desempeño cumplen con los criterios de aceptación para la validación de métodos fisicoquímicos, establecidos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura de la Secretaría de Salud.

Se comprobó la actividad enzimática en el extracto extracelular, por tanto, se confirma la hipótesis de que las microalgas excretan las enzimas degradadoras de HAPs, durante su exposición a benzo(a)pireno (proceso de activación). También se observó actividad enzimática en el extracto intracelular, por lo cual, se confirma que el proceso de lisis celular implementado, permitió la recuperación de enzimas funcionales encargadas de la oxidación del benzo(a)pireno. La producción del metabolito 4,5-cis dBaP, indicó que las enzimas o al menos una fracción de ellas, conservaron su estructura terciaria después de haber sido extraídas con el procesador ultrasónico. Asimismo, el uso de hielo evitó el calentamiento de la muestra, lo que ayudó a prevenir la desnaturalización; antes de iniciar el proceso de lisis, la temperatura de la muestra fue de -1 ± 2 °C y al final del proceso fue de 16 ± 4 °C. Se desconoce la proporción de enzimas degradadoras presentes en el lisado celular obtenido mediante el método mecánico de ultrasonido, ya que no se conoce la cantidad de enzimas totales en la microalga, ni se comparó este método de disrupción mecánica con algún otro. La aplicación de las ondas sonoras en combinación con el método químico usando dodecilsulfato de sodio, no fue satisfactoria, puesto que los resultados obtenidos no fueron reproducibles.

Por otro lado, fue evidente que el aumento de la temperatura promueve la aceleración del metabolismo de las microalgas, dado que en las exposiciones a 34 °C, en comparación con las llevadas a cabo a 25 °C, se observó una mayor producción de los metabolitos de degradación; y en los extractos enzimáticos intra y extracelular provenientes de la activación a 34 °C, la actividad enzimática fue mayor. También se observó que de acuerdo al “control metabólico”, el metabolismo de las microalgas enteras

en una segunda exposición a benzo(a)pireno fue mayor, lo cual se evidenció, en el aumento de la cantidad de metabolito formado. Asimismo, se determinó que el proceso de activación de las microalgas, al realizar la exposición primaria de las células a benzo(a)pireno, es necesario para estimular la producción enzimática y poder detectar actividad en los extractos intra y extracelular.

Perspectivas del trabajo

La metodología analítica desarrollada se podrá aplicar para evaluar la actividad enzimática en extractos celulares obtenidos bajo otras condiciones, para estudiar el efecto de: diferentes temperaturas de activación, el método de disrupción celular, la composición y pH de la disolución de lisis, así como, la influencia del tiempo y la temperatura en las exposiciones enzimáticas.

La obtención de enzimas funcionales encargadas de la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, en los extractos intracelular y extracelular, permitirá aislar y estudiar las enzimas, a fin de conocer más sobre las rutas metabólicas involucradas en la biodegradación.

REFERENCIAS

- Aarthy A., Kumari S., Turkar P., Subramanian S. (2018). An insight on algal cell disruption for biodiesel production. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(2), 21-26.
- Abdel-Shafy H.I., Mansour M. S.M. (2015). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25, 107-123.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1995). *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (update)*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012). *Case Studies in Environmental Medicine. Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services.
- Alasuvanto E., Hertzberg R., Pajari S. (2017). *Cell Disruption Methods. Bioprocess technology II*. Finland: Aalto University School of Chemical Technology.
- Ali O.A., Tarek S.J. (2009). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from Ismailia Canal water by chlorine, chlorine dioxide and ozone. *Desalination and Water Treatment*, 1, 289-298.
- Barker S. A. (2000). Review. Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885, 115–127.
- Barker S. A. (2007). Review. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, 70, 151–162.
- Barker S. A., Long A. R., Short C. R. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography*, 475, 353-361.
- Bosma T. N. P., Middeldorp P. J. M., Schraa G. & Zehnder A. J. B. (1997). Mass Transfer Limitation of Biotransformation: Quantifying Bioavailability. *Environmental Science & Technology*, 31, 248-252.
- Branson Ultrasonics Corporation. (2011). *250-450 Sonifier Analog Cell Disruptor User's Manual*. EDP 100-413-016. Rev. C.
- Buszewski B., Szultka M. (2012). Past, Present and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42, 198-213.
- Capriotti A. L., Cavaliere C., Foglia P., Samperi R., Stampachiacchiere S., Ventura S., Laganà A. (2015). Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 186-193.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2018). *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. Updated Tables, Volume One. U.S. Department of Health and Human Services.
- Chan S. M. N., Luan T., Wong M. H., Yee Tam N. F. (2006). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7), 1772-1779.
- Chaplin M., Bucke C. (1990). *Enzyme Technology*. London, United Kingdom: Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Chemat F., Zill-e-Huma, Kamran Khan M. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835.

- Chisti Y., Moo-Young M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 194-204.
- Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC). (2011). Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. México: Secretaría de Salud.
- Cuellar-Bermudez S. P., Aguilar-Hernández I., Cardenas-Chavez D. L., Ornelas-Soto N., Romero-Ogawa M. A., Parra-Saldivar R. (2014). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8, 190–209.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2008). *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. Office of Solid Waste. Washington, DC, US.
- Environmental Protection Series (EPS). (2007). *Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using a Freshwater Alga*. (2a ed.) Canada: Environment Canada.
- Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados*. (1a ed.) España: Eurachem.
- Evans G. M., Furlong J. C. (2003). *Environmental Biotechnology. Theory and Application*. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2008). *Proposed draft code of practice for the reduction of contamination of food with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from smoking and direct drying processes*. World Health Organization, Codex alimentarius commission. The Hague, The Netherlands.
- Gachanja A. N., Maritim P. K. (2019). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Determination. *Encyclopedia of Analytical Science*, (3ra ed.) Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, 328-340.
- García Cicourel A. (2015). *Caracterización cromatográfica y espectral de compuestos de degradación provenientes de los HAPs con aplicación a su monitoreo en cultivos de microalgas*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García-López M., Canosa P., Rodríguez I. (2008) Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 963-974.
- García de Llasera M. P., Olmos-Espejel J., Díaz-Flores G., Montañó-Montiel 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.
- Geciova J., Bury D., Jelen P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review. *International Dairy Journal*, 12, 541-553.
- Gerde J. A., Montalbo-Lomboy M., Yao L., Grewell D., Wang T. (2012). Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*, 125, 175–181.
- Ghosal D., Ghosh S., Dutta T. K., Ahn Y. (2016). Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7(369), 1-27.
- Hatti-Kaul R., Mattiasson B. (2003). *Isolation and purification of proteins*. Sweden: Marcel Dekker, Inc.

- Hardy D., Mandon D. E., Rothnie A. J., Jawhari A. (2018). The yin and yang of solubilization and stabilization for wild-type and full-length membrane protein. *Methods*, 147, 118-125.
- Haritash A. K., Kaushik C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Material*, 169(1), 1-15.
- Harrison S. T. L. (1991). Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnology Advances*, 9, 217-240.
- Hernández Blanco F. J., García de Llasera M. P. (2016). Monitoring dihydrodiol polyaromatic hydrocarbon metabolites produced by the freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere*, 158, 80-90.
- Hielscher₁ Ultrasound Technology. (2019). *Ultrasonic Laboratory Devices*. Recuperado el 20 de mayo de 2019, de <https://www.hielscher.com/lab.htm>.
- Hielscher₂ Ultrasound Technology. (2019). *Probe-Type Sonication vs. Ultrasonic Bath: An Efficiency Comparison*. Recuperado el 20 de mayo de 2019, de <https://www.hielscher.com/probe-type-sonication-vs-ultrasonic-bath-an-efficiency-comparison.htm>.
- Hielscher₃ Ultrasound Technology. (2019). *Ultrasonic Lysis of E. Coli*. Recuperado el 20 de mayo de 2019, de <https://www.hielscher.com/ultrasonic-lysis-of-e-coli.htm>.
- Hielscher₄ Ultrasound Technology. (2019). *Ultrasonic Lysis: Cell Disruption & Extraction*. Recuperado el 20 de mayo de 2019, de <https://www.hielscher.com/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm>.
- Hielscher₅ Ultrasound Technology. (2019). *Ultrasonic Protein Extraction from Tissue and Cell Cultures*. Recuperado el 20 de mayo de 2019, de <https://www.hielscher.com/ultrasonic-protein-extraction-from-tissue-and-cell-cultures.htm>.
- Hielscher₆ Ultrasound Technology. (2019). *Ultrasonic Extraction and Preservation*. Recuperado el 20 de mayo de 2019, de https://www.hielscher.com/extraction_01.htm.
- Hoff Barcellos R., Pizzolato Mara T. (2018). Combining extraction and purification steps in simple preparation for environmental matrices: a review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 109, 83-96.
- Hsu G. W. , Huang X., Luneva N. P., Geacintov N.E., Bees L. S. (2005). Structure of a High Fidelity DNA Polymerase Bound to a Benzo[a]pyrene Adduct That Blocks Replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3764-3770.
- Ibáñez E., Cifuentes A. (2017). *Comprehensive Analytical Chemistry*. Green Extraction Techniques: Principles, Advances and Applications. Vol. 76. Elsevier B. V. & Book Aid International.
- Irish National Accreditation Board (INAB). (2012). *Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories*, Guide PS15. Ireland.
- ISO 9000 (2005). *Quality management systems – Fundamentals and vocabulary*, ISO Geneva.
- Jakubowska N., Polkowska Z., Jacek Namiesnik J., Przyjazny A. (2005). Analytical Applications of Membrane Extraction for Biomedical and Environmental Liquid Sample Preparation. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 35, 217–235.
- James C. J., Coakley W. T., Hughes D. E. (1972). Kinetics of Protein Release from Yeast Sonicated in Batch and Flow Systems at 20 kHz. *Biotechnology and Bioengineering*, XIV, 33-42.

- Johansen Melanie N. (2012). *Microalgae: biotechnology, microbiology and energy*. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Jouanneau Y., Meyer C., Jakoncic J., Stojanoff V., Gaillard J. (2006). Characterization of a Naphthalene Dioxygenase Endowed with an Exceptionally Broad Substrate Specificity toward Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biochemistry*, 45(40), 12380-12391.
- Juhasz A. L., Naidu R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, 57-88.
- Kaushik C.P., Haritash A. K. (2006). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Environmental Health. *Our earth*, 3(3), 1-7.
- Ke L., Luo L., Wang P., Luan T., Fung-Yee Tam N. (2010). Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology*, 101, 6950–6961.
- Kenneway E. (1955). The identification of a carcinogenic compound in coal-tar. *British Medical Journal*, 4942, 749-752.
- Keris-Sen U. D., Sen U., Soydemir G., Gurol M. D. (2014). An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. *Bioresource Technology*, 152, 407-413.
- Kim Se-Kwon. (2015). *Handbook of marine microalgae*. Biotechnology advances. United Kingdom: Academic Press, Elsevier Inc.
- Kim S., Kweon O., Jones R. C., Freeman J. P., Edmondson R. D., Cerniglia C. E. (2007). Complete and Integrated Pyrene Degradation Pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 Based on Systems Biology. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 464-472.
- Krienitz L., Bock C., Nozaki H., Wolf M. (2011). SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga “*Selenastrum capricornutum*” recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped chlorophyta. *Journal of Phycology*, 47, 880-893.
- Krush, Anne J. (1982). A Cancer of Environmental and Occupational Etiology and a Thigh Tumor Described by Sir Percivall Pott in the Eighteenth Century. *Transactions of the Nebraska Academy of Sciences and Affiliated Societies*, 496, 63-65.
- Kuboi R., Umakoshi H., Takagi N., Komasa I. (1995). Optimal Disruption Methods for the Selective Recovery of β -Galactosidase from *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(4), 335-341.
- Kumar S. N., Verma P., Bastia B., Jain A. (2014). Health Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review. *Journal of Pathology and Toxicology*, 1, 16-30.
- Kuo C., Chen H., Che J. (2004). Determination of 1-hydroxypyrene in children urine using column-switching liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 805, 187-193.
- Laval Lab Generating creative solutions. Economy Ultrasonic Cleaners Elmasonic Easy. Canadá. Recuperado el 19 de mayo de 2019, de <https://lavallab.com/products/ultrasonic-cleaners/economy-ultrasonic-cleaners/>
- Lee A. K., Lewis D. M., Ashman P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and bioenergy*, 46, 89-101.

- Lee J., Yoo C., Jun S., Ahn C., Oh H. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Tecnology*, 101, 575-577.
- Lee S. Y., Cho M. J., Chang K.Y, Oh You-Kwan. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244, 1317-1328.
- Lei A.P., Wong Y.S, Tam N.F.Y. (2002). Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Science and Technology*, 46(11-12), 195-201.
- Lin C. H., Huang X., Kolbanovskii A., Hingerty B.E., Amin S., Broyde S., Geacintov N. E., Patel D. J. (2001). Molecular Topology of Polycyclic Aromatic Carcinogens Determines DNA Adduct Conformation: A Link to Tumorigenic Activity. *Journal of Molecular Biology*, 306, 1059-1080.
- Lindquist B., Warshawsky D. (1985). Identification of the 11,12-dihydro-11,12-dihydroxybenzo(a)pyrene as a major metabolite produced by the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 130(1), 71-75.
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A. L, Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lupatini A. L., De Oliveira Bispo L., Colla L. M., Vieira Costa J. A., Canan C., Colla E. (2017). Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. *Food Research International*, 99, 1028-1035.
- Machado M. D., Soares E. V. (2014). Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. *Aquatic Toxicology*, 147, 1-6.
- Marcé R. M., Borrull F. (2000). Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *Journal of Chromatography A*, 885, 273–290.
- Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N.E. (1978). A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples. *Analytical Biochemistry*, 87, 206-210.
- 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.
- McMillan J. R., Watson I. A., Ali M., Jaafar W. (2013). Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Applied Energy*, 103,128-134.
- Menegazzo L. M., Fonseca G. G. (2019). Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 87-107.
- Milledge J. J. (2011). Disc Stack Centrifugation Separation and Cell Disruption of Microalgae: A Technical Note. *Environment and Natural Resources Research*, 1(1), 17-24.
- Morales Castillo G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).
- Nagappan S., Devendran S., Tsai P., Dinakaran S, Dahms H., Ponnusamy V. K. (2019). Passive cell disruption lipid extraction methods of microalgae for biofuel production - A review. *Fuel*, 252, 699-709.

- Naglak T. J., Wang H. Y. (1990). Protein release from the yeast *Pichia pastoris* by chemical permeabilization: comparison to mechanical disruption and enzymatic lysis. *Separations for Biotechnology* 2, 55-64. United Kingdom: SCI, Elsevier Science Publishers LTD.
- Nesterenko P. N., Palamareva M. D. (2019). Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Analytical Science* (3ra ed, Volumen 6). Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elsevier, 174-181 y 231-237.
- Olmos Espejel J. (2013). *Metodologías cromatográficas en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microorganismos*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Patnaik P. (2007). *A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances*. (3a ed.) New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Phillips D. H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research*, 443,139-147.
- Phong W. N., Show L. P., Le C. F., Tao Y., Chang J., Ling C. T. (2018). Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. *Biochemical Engineering Journal*, 135, 83-90.
- Prabakaran P., Ravindran A. D. (2011). A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 150-154.
- Prokop A., Bajpai R. K., Zappi M. E. (2015). *Algal Biorefineries Volume 2: Products and Refinery Design*. USA: Springer International Publishing
- Pulleyblank C., Cipullo S., Campo P., Kelleher B., Coulon F. (2019). Analytical progress and challenges for the detection of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbon transformation products in aqueous and soil environmental matrices: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49 (5), 357-409.
- Pyle D. L. et al. (1990). *Separations for biotechnology*. United Kingdom: SCI, Elsevier Science Publishers LTD.
- Rathore A. S., Joshi, S. (2019). Liquid Chromatography: Historical Development. *Encyclopedia of Analytical Science*, (3ra ed.) Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 86-92. Elsevier.
- Raza N., Hashemi B., Kim K., Lee S., Deep A. (2018). Aromatic hydrocarbons in air, water and soil: Sampling and pretreatment techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 103, 56 -73.
- Robles-Ozuna L.E., Ochoa-Martínez L.A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(2), 109-122.
- Roca P., Oliver J., Rodríguez A. M. (2003). *Bioquímica. Técnicas y métodos* (p. 157). Madrid: Editorial Hélice.
- Rodríguez T. Gamboa, Aldeco R. Gamboa, Alvarez H. Bravo, Ostrosky Wegman P. (2008). Genotoxicity in child populations exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the air from Tabasco, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5(5), 349-355.
- Rubio-Clemente A., Torres-Palma R. A., 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.

- Safi C., Alina Violeta Ursu A. V., Laroche C., Zebib B., Merah O., Pontalier P., Vaca-Garcia C. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3, 61-65.
- Semple K., Cain R., Schmidt S. (1999). Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 291-300.
- Semple K. T., Morriss A. W. J., Paton G. I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, 54, 809-818.
- Seo J., Keum Y., Li Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6, 278-309.
- Shen Chang-Hui. (2019). Quantification and Analysis of Proteins. *Diagnostic Molecular Biology*, 187-214. Academic Press, Elsevier Inc.
- Simpson N. J. K. (2000). *Solid-Phase Extraction. Principles, Techniques and Applications*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Singh A., Ward O. P. (2004). *Biodegradation and Bioremediation*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Singh R S. (2013). A comparative study on cell disruption methods for release of aspartase from *E. coli* K-12. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51, 997-1003.
- Skupinska K., Misiewicz I., Kasprzycka-Guttman T. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons: physiochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 61(3), 233-240.
- Sonics & Materials, Inc. (2005). *Vibracell catalog. Introducing the VCX Series*. Ultrasonic Liquid processing.
- Soto Sierra L., Dixon C. K., Wilke L. R. (2017). Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. *Algal research*, 25, 149-159.
- Soto-Sierra L., Stoykovab P., Nikolov Z. L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, 36, 175-192.
- Stellman J., McCann M., Warshaw L., Brabant C., Osinsky D., Markkanen P. (1998). Hidrocarburos poliaromáticos. Volumen IV, Guía de productos Químicos (104.310). *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. (3a ed.) Madrid, España: Organización Internacional del Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales - Subdirección General de Publicaciones.
- Suarez Garcia E., J. van Leeuwen, Safi C., Sijtsma L., Eppink M.H.M., Wijffels R.H., C. van den Berg. (2018). Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications. *Bioresource Technology*, 268, 197-203.
- Subashchandrabose S. R., Logeshwaran P., Venkateswarlu K., Naidu R., Megharaj M. (2017). Pyrene degradation by *Chlorella* sp. MM3 in liquid medium and soil slurry: Possible role of dihydrolipoamide acetyltransferase in pyrene biodegradation. *Algal Research*, 23, 223-232.
- Suslick K.S. (1998). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, (4a ed.) vol. 26, 517-541. New York: J. Wiley & Sons.
- Takáčová A., Smolinská M., Ryba J., Mackuľak T., Jokrllová J., Hronec P., Čík G. (2014). Biodegradation of Benzo[a]Pyrene through the use of algae. *Central European Journal of Chemistry*, 12(11), 1133-1143.

- Thermo Fisher Scientific. (2019). *Detergents for cell lysis and protein extraction*. Recuperado el 24 de junio de 2019, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/detergents-cell-lysis-protein-extraction.html>.
- Tebbani S., Lopes F., Filali R., Dumur D., Pareau D. (2014). *CO₂ Biofixation by Microalgae. Modeling, Estimation and Control*. United Kingdom: ISTE Ltd y John Wiley & Sons, Inc.
- Thurman E. M., Mills M. S. (1998). *Solid-Phase Extraction. Principles and Practice*, USA & Canada: John Wiley & Sons.
- Tortora Gerard J., Funke Berdell R., Case Christine L. (2013). *Microbiology: An Introduction*. (11a ed.) USA: Pearson Education, Inc.
- Van Agteren M. H., Keuning S., Janssen D. B. (1998). *Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*. Netherlands: Springer-Science+Business Media, B.V.
- Velasco Cruz M. (2011). *Metodología analítica cromatográfica para la determinación de metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microalgas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Waghmare A., Nagula K., Pandit A., Arya S. (2019). Hydrodynamic cavitation for energy efficient and scalable process of microalgae cell disruption. *Algal Research*, 40, 101496, 1-9.
- Wang D., Li Y., Hu X., Su W., Zhong M. (2015). Combined Enzymatic and Mechanical Cell Disruption and Lipid Extraction of Green Alga *Nannochloris oleabundans*. *International Journal of Molecular Science*, 16, 7707-7722.
- Wang M., Yuan W., Jiang X., Jing Y., Wang Z. (2014). Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound. *Bioresource Technology*, 153, 315–321.
- Warshawsky D., Radike M., Jayasimhulu K., Cody T. (1988). Metabolism of benzo(a)pyrene by a dioxygenase enzyme system of the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152(2), 540-544.
- 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.
- Zwir-Ferenc A., Biziuk M., (2006). Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677- 690.

ANEXOS

Anexo 1

Medio de cultivo Bristol

El medio de cultivo Bristol es una disolución de las sales mostradas en la tabla 6.1, que ayudan al crecimiento de los microorganismos; el pH del medio debe ser un valor cercano a 7. Al medio Bristol se le agrega proteosa peptona como fuente de péptidos de bajo peso molecular en una concentración de 1 mg/mL. Esta mezcla se esteriliza y posteriormente se inocula con la microalga *S. capricornutum*.

Se recomienda almacenar el medio Bristol sin proteosa peptona a 0 °C para evitar la contaminación por bacterias y adicionar los péptidos en el momento de usarse.

Tabla 1. Composición del medio Bristol

Sales	Concentración (mM)
NaNO ₃	2.94
NaCl	0.43
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.17
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.30
KH ₂ PO ₄	1.29
K ₂ HPO ₄	0.43

Para preparar el medio sólido, al medio Bristol con proteosa peptona se le agrega 1.5 % p/v de agar bacteriológico. La mezcla de agar se coloca en tubos de ensayo de vidrio, se esteriliza y se deja solidificar en tubos inclinados, para posteriormente inocular con la microalga *S. capricornutum*.

Anexo 2

Determinación de proteínas totales en el extracto intracelular y extracelular por el método de Lowry

Para cuantificar el contenido proteico, se realizó una curva de calibración usando albúmina de suero bovino (BSA) en un intervalo de concentración de 1 µg/mL a 29 µg/mL. Las muestras de 15 mL de los extractos enzimáticos se obtuvieron por triplicado con el procedimiento descrito en las secciones 2.3.1.3. En el caso de los extractos provenientes de cultivos de microalgas no activadas, no se realizó la adición de los 4 µg del hidrocarburo en la exposición primaria de los 15.0 mL de medio de la microalga *S. capricornutum*, no obstante, se realizó la incubación bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura.

En un tubo de microcentrífuga de polipropileno de 1.5 mL se agregó en el siguiente orden: agua desionizada, el reactivo A y la muestra (proteína); se mezclaron las sustancias en un agitador tipo vórtex y después se adicionó el reactivo B, obteniendo un volumen final de 1.2 mL. Se volvió a agitar el tubo y se

incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos; posteriormente, se midió la absorbancia a 750 nm de cada una de las muestras. La composición de los reactivos CTC, A y B se presentan en la tabla 6.2. En la tabla 6.3, se muestran concentraciones y volúmenes añadidos para realizar la curva patrón de BSA y la determinación de la concentración de proteína de los extractos enzimáticos.

Tabla 2. Reactivos y concentraciones para el método de Lowry

Reactivo	Composición	Observación
Reactivo de tartrato carbonato de cobre (CTC)	Carbonato de sodio 10 % p/v, tartrato de sodio y potasio 0.2 % p/v, sulfato de cobre 0.1 % p/v	Estabilidad por 2 meses
Reactivo A	1 mL de reactivo CTC, 1 mL de hidróxido de sodio 0.8 M, 1 mL de dodecilsulfato de sodio 10 % p/v y 1 mL de agua desionizada	Preparar inmediatamente antes de usar
Reactivo B	Agua desionizada y reactivo de Folin-Ciocalteu en una proporción de 5:1	Preparar preferentemente antes de usarse

Tabla 3. Reactivos y cantidades añadidas para realizar la curva patrón de BSA y la determinación de la concentración de proteínas utilizando el método de Lowry

Concentración de BSA (µg/mL)	H ₂ O (µL)	BSA (µL)	Reactivo A (µL)	Reactivo B (µL)
0.0	450	0	500	250
1.0	438	12 ^a		
2.0	426	24 ^a		
3.0	414	36 ^a		
4.0	390	60 ^a		
8.0	440	10 ^b		
12.5	435	15 ^b		
21.0	425	25 ^b		
29.0	415	35 ^b		
Muestra (Extractos enzimáticos / lisado celular)	400	50		

^a A partir de una disolución de BSA de 0.1 mg/mL, ^b A partir de una disolución de BSA de 1 mg/mL. Los extractos enzimáticos con activación previa provienen de medios de cultivo de microalgas expuestos a 4 µg de BaP durante 72 h a 34 °C bajo luz amarilla y agitación orbital de 50 rpm. Los extractos enzimáticos sin activación previa provienen de medios de cultivo de microalgas no expuestos a BaP e incubados por 72 h a 34 °C.

Anexo 3

Pruebas de hipótesis aplicadas a los resultados del recobro global en el lisado celular obtenido con y sin SDS

Los datos se ajustan a una distribución normal a menos que se indique lo contrario

1.- Prueba de hipótesis para comparar el recobro global de BaP en los lisados celulares obtenidos con y sin SDS

H_1 = La varianza de los recobros es diferente

H_0 = La varianza de los recobros es igual

Parámetro	Recobro del lisado celular con SDS (%)	Recobro del lisado celular sin SDS (%)
n	3	3
x	74.783	74.613
s^2	178.55	37.25

x= recobro global de BaP (%), s^2 = varianza muestral

$$F_{calculada} = 4.7933 \quad F_{critico} = 19.0000$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Recobro\ del\ lisado\ sin\ SDS}^2 = S_{Recobro\ del\ lisado\ con\ SDS}^2$$

H_1 = El recobro de BaP en el lisado celular obtenido con SDS y sin SDS es diferente

H_0 = El recobro de BaP en el lisado celular obtenido con SDS y sin SDS es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	4

$$t_{calculada} = 1.1967 \quad t_{critico} = 2.1318$$

$$t_{calculada} < t_{critico} \quad \therefore H_0 \quad |\bar{X}_{Recobro\ del\ lisado\ sin\ SDS} - \bar{X}_{Recobro\ del\ lisado\ con\ SDS}| = 0$$

No hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula: El recobro de BaP en el lisado celular obtenido con SDS, es igual al recobro de BaP obtenido en el lisado celular obtenido sin SDS.

2.- Prueba de hipótesis para comparar el recobro global de 4,5-cis dBaP en los lisados celulares obtenidos con y sin SDS

H_1 = La varianza de los recobros es diferente

H_0 = La varianza de los recobros es igual

Parámetro	Recobro del lisado celular con SDS (%)	Recobro del lisado celular sin SDS (%)
n	3	3
x	98.433	102.667
s ²	7.806	50.849

x= recobro global de 4,5-cis dBaP (%), s² = varianza muestral

$$F_{calculada} = 6.5141 \quad F_{critico} = 19.0000$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Recobro\ del\ lisado\ sin\ SDS}^2 = S_{Recobro\ del\ lisado\ con\ SDS}^2$$

H_1 = El recobro de 4,5-cis dBaP en el lisado celular obtenido con SDS y sin SDS es diferente

H_0 = El recobro de 4,5-cis dBaP en el lisado celular obtenido con SDS y sin SDS es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	4

$$t_{calculada} = 0.9574 \quad t_{critico} = 2.1318$$

$$t_{calculada} < t_{critico} \quad \therefore H_0 \quad |\bar{X}_{Recobro\ del\ lisado\ sin\ SDS} - \bar{X}_{Recobro\ del\ lisado\ con\ SDS}| = 0$$

No hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula: El recobro de 4,5-cis dBaP en el lisado celular obtenido con SDS, es igual al recobro de 4,5-cis BaP obtenido en el lisado celular obtenido sin SDS.

3.- Prueba de hipótesis para comparar el recobro global de 7,8-cis dBaP en los lisados celulares obtenidos con y sin SDS

H_1 = La varianza de los recobros es diferente

H_0 = La varianza de los recobros es igual

Parámetro	Recobro del lisado celular con SDS (%)	Recobro del lisado celular sin SDS (%)
n	3	3
x	101.566	93.457
s ²	36.669	19.204

x= recobro global de 7,8-cis dBaP (%), s² = varianza muestral

$$F_{calculada} = 1.9095 \quad F_{critico} = 19.0000$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Recobro\ del\ lisado\ sin\ SDS}^2 = S_{Recobro\ del\ lisado\ con\ SDS}^2$$

H₁= El recobro de 7,8-cis dBaP en el lisado celular obtenido con SDS y sin SDS es diferente

H₀= El recobro de 7,8-cis dBaP en el lisado celular obtenido con SDS y sin SDS es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	4

$$t_{calculada} = 1.8792 \quad t_{critico} = 2.1318$$

$$t_{calculada} < t_{critico} \quad \therefore H_0 \quad |\bar{X}_{Recobro\ del\ lisado\ sin\ SDS} - \bar{X}_{Recobro\ del\ lisado\ con\ SDS}| = 0$$

No hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula: El recobro de 7,8-cis dBaP en el lisado celular obtenido con SDS, es igual al recobro de 7,8-cis dBaP obtenido en el lisado celular obtenido sin SDS.

Anexo 4

Pruebas de hipótesis aplicadas a los resultados de la determinación de proteínas totales en el extracto enzimático intracelular y extracelular

Los datos se ajustan a una distribución normal a menos que se indique lo contrario

1.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de proteínas totales en el extracto enzimático intracelular y extracelular provenientes de microalgas activadas

H₁= La varianza de las dos muestras es diferente

H₀= La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Extracto extracelular	Extracto intracelular
n	3	3
x	4144.838	1373.083
s ²	25650.897	25958.849

x= cantidad de proteínas (μ g), s² = varianza muestral

$$F_{calculada} = 1.0120 \quad F_{critico} = 19.0000$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Extracelular}^2 = S_{Intracelular}^2$$

H_1 = La cantidad de proteína en los extractos intracelular y extracelular es diferente

H_0 = La cantidad de proteína en los extractos intracelular y extracelular es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	4

$$t_{calculada} = 21.1324 \quad t_{critico} = 2.1318$$

$$t_{calculada} > t_{critico} \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Extracelular} - \bar{X}_{Intracelular}| \neq 0$$

Se acepta la hipótesis alternativa: La cantidad de proteína en el extracto intracelular es diferente a la cantidad de proteína presente en el extracto extracelular.

2.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de proteínas totales en el extracto enzimático intracelular y extracelular provenientes de microalgas no activadas

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Extracto extracelular	Extracto intracelular
n	3	3
x	3942.150	1398.419
s^2	13480.171	25496.683

x= cantidad de proteínas (μg), s^2 = varianza muestral

$$F_{calculada} = 1.8914 \quad F_{critico} = 19.0000$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Extracelular}^2 = S_{Intracelular}^2$$

H_1 = La cantidad de proteína en el extracto intracelular y extracelular es diferente

H_0 = La cantidad de proteína en el extracto intracelular y extracelular es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	4

$$t_{calculada} = 22.3166 \quad t_{critico} = 2.1318$$

$$t_{calculada} > t_{critico} \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Extracelular} - \bar{X}_{Intracelular}| \neq 0$$

Hay suficiente evidencia para aceptar la hipótesis alternativa: La cantidad de proteína en el extracto intracelular, es diferente a la cantidad de proteína presente en el extracto extracelular.

3.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de proteínas totales en el extracto enzimático extracelular (Ee) proveniente de microalgas activadas y no activadas

H₁= La varianza de las dos muestras es diferente

H₀= La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Extracto extracelular de microalgas activadas	Extracto extracelular de microalgas no activadas
n	3	3
x	4144.838	3942.150
s ²	25650.897	13480.171

x= cantidad de proteínas en extracto extracelular (µg), s² = varianza muestral

$$F_{calculada} = 1.9030 \quad F_{critico} = 19.0000$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Ee}^2 \text{ de microalgas activadas} = S_{Ee}^2 \text{ de microalgas no activadas}$$

H₁= La cantidad de proteína en el extracto extracelular proveniente de microalgas activadas y no activadas es diferente

H₀= La cantidad de proteína en el extracto extracelular proveniente de microalgas activadas y no activadas es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	4

$$t_{calculada} = 1.7747 \quad t_{critico} = 2.1318$$

$$t_{calculada} < t_{critico} \quad \therefore H_0 \quad |\bar{X}_{Extracelular} - \bar{X}_{Intracelular}| = 0$$

No hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula: La cantidad de proteína en el extracto extracelular proveniente de microalgas activadas, es igual a la cantidad de proteínas en el extracto extracelular proveniente de microalgas no activadas.

4.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de proteínas totales en el extracto enzimático intracelular (Ei) proveniente de microalgas activadas y no activadas

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Extracto intracelular de microalgas activadas	Extracto intracelular de microalgas no activadas
n	3	3
x	1373.083	1398.419
s ²	25958.849	25496.693

x= cantidad de proteínas en extracto intracelular (μg), s² = varianza muestral

$$F_{calculada} = 1.0181 \quad F_{critico} = 19.0000$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Ei \text{ de microalgas activadas}}^2 = S_{Ei \text{ de microalgas no activadas}}^2$$

H_1 = La cantidad de proteína en el extracto intracelular proveniente de microalgas activadas y no activadas es diferente

H_0 = La cantidad de proteína en el extracto intracelular proveniente de microalgas activadas y no activadas es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	4

$$t_{calculada} = 0.1934 \quad t_{critico} = 2.1318$$

$$t_{calculada} < t_{critico} \quad \therefore H_0 \quad |\bar{X}_{Extracelular} - \bar{X}_{Intracelular}| = 0$$

No hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula: La cantidad de proteína en el extracto intracelular proveniente de microalgas activadas, es igual a la cantidad de proteína en el extracto intracelular proveniente de microalgas no activadas.

Anexo 5

Pruebas de hipótesis para la evaluación de la actividad enzimática en el extracto extracelular, obtenido a partir de microalgas expuestas a BaP durante 72 h a 25 °C

Los datos se ajustan a una distribución normal

1.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido de la exposición primaria y en el extracto extracelular

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Exposición primaria (72 h a 25 °C)	Extracto extracelular
N	3	4
\bar{X}	0.0177	0.1087
s^2	3.61×10^{-6}	5.14×10^{-5}

x = cantidad de 4,5-cis dBaP (μg), s^2 = varianza muestral

$$F_{calculada} = 14.2511 \quad F_{critico} = 19.1643$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Exp\ primaria}^2 = S_{Extracto\ extracelular}^2$$

H_1 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido de la exposición primaria y en el extracto extracelular es diferente

H_0 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido de la exposición primaria y en el extracto extracelular es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	5

$$t_{calculada} = 20.9605 \quad t_{critico} = 2.0150$$

$$t_{calculada} > t_{critico} \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Exp\ primaria} - \bar{X}_{Extracto\ extracelular}| \neq 0$$

Se acepta la hipótesis alternativa: La cantidad de 4,5-cis dBaP remanente en el medio líquido de la exposición primaria, es diferente a la cantidad de 4,5-cis dBaP presente en el extracto extracelular.

Anexo 6

Pruebas de hipótesis para la evaluación de la actividad enzimática en los extractos intracelular y extracelular, obtenidos a partir de microalgas expuestas a BaP durante 72 h a 34 °C.

Los datos se ajustan a una distribución normal

1.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido de la exposición primaria y en el extracto extracelular

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Exposición primaria (72 h a 34 °C)	Extracto extracelular
n	4	4
x	0.2440	0.4389
s^2	1.78×10^{-3}	8.12×10^{-4}

x= cantidad de 4,5-cis dBaP (μg), s^2 = varianza muestral

$$F_{calculada} = 2.1972 \quad F_{critico} = 9.2766$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Exp\ primaria}^2 = S_{Extracto\ extracelular}^2$$

H_1 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido de la exposición primaria y en el extracto extracelular es diferente

H_0 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido de la exposición primaria y en el extracto extracelular es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	6

$$t_{calculada} = 7.6502 \quad t_{critico} = 1.9432$$

$$t_{calculada} > t_{critico} \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Exp\ primaria} - \bar{X}_{Extracto\ extracelular}| \neq 0$$

Se acepta la hipótesis alternativa: La cantidad de 4,5-cis dBaP remanente en el medio líquido para la exposición primaria, es diferente a la cantidad de 4,5-cis dBaP presente en el extracto extracelular.

2.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de 4,5-cis dBaP en la biomasa de la exposición primaria y en el extracto intracelular

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Exposición primaria (72 h a 34 °C)	Extracto intracelular
n	3	3
x	0.0583	0.1437
s^2	5.83×10^{-5}	1.90×10^{-4}

x= cantidad de 4,5-cis dBaP (μg), s^2 = varianza muestral

$$F_{calculada} = 3.2629 \quad F_{critico} = 19.0000$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Exp\ primaria}^2 = S_{Extracto\ intracelular}^2$$

H_1 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en la biomasa de la exposición primaria y en el extracto intracelular es diferente

H_0 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en la biomasa de la exposición primaria y en el extracto intracelular es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	4

$$t_{calculada} = 9.3728 \quad t_{critico} = 2.1318$$

$$t_{calculada} > t_{critico} \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Exp\ primaria} - \bar{X}_{Extracto\ intracelular}| \neq 0$$

Se acepta la hipótesis alternativa: La cantidad de 4,5-cis dBaP remanente en la biomasa de la exposición primaria, es diferente a la cantidad de 4,5-cis dBaP presente en el extracto intracelular.

Anexo 7

Pruebas de hipótesis para evaluar la cantidad de benzo(a)pireno no degradado en los extractos intracelular y extracelular, obtenidos de la activación de medios de cultivo de microalgas a 25 °C y 34 °C, después de realizar los bioensayos enzimáticos.

Los datos se ajustan a una distribución normal

1.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de BaP recuperada en el extracto extracelular (Ee) proveniente de la activación a 25 °C y el extracto extracelular proveniente de la activación a 34 °C.

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Ee (Activación = 25 °C)	Ee (Activación = 34 °C)
n	4	5
x	1.438	1.520
s ²	4.34 x 10 ⁻³	6.50 x 10 ⁻³

x= cantidad de BaP (μ g), s²= varianza muestral

$$F_{calculada} = 1.4992 \quad F_{critico} = 9.1172$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Ee(Act=25^\circ C)}^2 = S_{Ee(Act=34^\circ C)}^2$$

H_1 = La cantidad de BaP recuperada en el extracto extracelular es diferente dependiendo de la temperatura a la que se activaron las microalgas.

H_0 = La cantidad de BaP recuperada en el extracto extracelular es igual, independientemente de la temperatura a la que se activaron las microalgas.

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	7

$$t_{calculada} = 1.6323 \quad t_{critico} = 1.8946$$

$$t_{calculada} < t_{critico} \quad \therefore H_0 \quad \left| \bar{X}_{Ee (Act=25^\circ C)} - \bar{X}_{Ee (Act=34^\circ C)} \right| = 0$$

Se acepta la hipótesis nula: La cantidad de BaP recuperada en el extracto extracelular es igual, independientemente de la temperatura a la que se activaron las microalgas.

2.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de BaP recuperada en el extracto intracelular (E_i) proveniente de la activación a 25 °C y el extracto intracelular proveniente de la activación a 34 °C.

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferentes

H_0 = La varianza de las dos muestras es iguales

Parámetro	E_i (Activación = 25 °C)	E_i (Activación = 34 °C)
n	4	4
x	2.3223	2.5005
s^2	5.81×10^{-2}	1.81×10^{-2}

x= cantidad de BaP (μg), s^2 = varianza muestral

$$F_{calculada} = 3.2111 \quad F_{critico} = 9.2766$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{E_i (Act=25^\circ C)}^2 = S_{E_i (Act=34^\circ C)}^2$$

H_1 = La cantidad de BaP recuperada en el extracto intracelular es diferente, dependiendo de la temperatura a la que se activaron las microalgas.

H_0 = La cantidad de BaP recuperada en el extracto intracelular es igual, independientemente de la temperatura a la que se activaron las microalgas.

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	6

$$t_{calculada} = 1.2920 \quad t_{critico} = 1.8946$$

$$t_{calculada} < t_{critico} \quad \therefore H_0 \quad \left| \bar{X}_{Ei(Act=25^\circ C)} - \bar{X}_{Ei(Act=34^\circ C)} \right| = 0$$

Se acepta la hipótesis nula: La cantidad de BaP recuperada en el extracto intracelular es igual, independientemente de la temperatura a la que se activaron las microalgas.

Anexo 8

Pruebas de hipótesis para la evaluación de la actividad enzimática del extracto intracelular proveniente de microalgas lisadas en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS)

Los datos se ajustan a una distribución normal

1.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de 4,5-cis dBaP en el extracto intracelular (Ei) después de realizar los bioensayos enzimáticos con y sin SDS

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Ei con SDS	Ei sin SDS
n	5	3
x	0.0488	0.0853
s ²	8.18 x 10 ⁻⁴	1.92 x 10 ⁻⁴

x= cantidad de 4,5-cis dBaP (μ g), s² = varianza muestral

$$F_{calculada} = 4.2799 \quad F_{critico} = 19.2468$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Ei\ con\ SDS}^2 = S_{Ei\ sin\ SDS}^2$$

H_1 = La cantidad de 4,5-cis dBaP producida en el extracto intracelular es diferente dependiendo de si se realiza la lisis celular con o sin SDS.

H_0 = La cantidad de 4,5-cis dBaP producida en el extracto intracelular es igual, independientemente de si se realiza la lisis celular con o sin SDS.

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	6

$$t_{calculada} = 2.0224 \quad t_{critico} = 1.9431$$

$$t_{calculada} > t_{critico} \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Ei \text{ con SDS}} - \bar{X}_{Ei \text{ sin SDS}}| \neq 0$$

Se acepta la hipótesis alternativa: La cantidad de 4,5-cis dBaP producida en el extracto intracelular es diferente, dependiendo de si se realiza la lisis celular con o sin dodecilsulfato de sodio (SDS).

Anexo 9

Pruebas de hipótesis para el control metabólico de las microalgas *Selenastrum capricornutum*

Los datos se ajustan a una distribución normal a menos que se indique lo contrario

1.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido proveniente del control metabólico (CM) y la exposición primaria

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Exposición primaria (3 h a 34 °C)	Control metabólico
n	4	3
x	0.0456	0.1716
s ²	0.000011	0.00024

x= cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido (μg), s² = varianza muestral

$$F_{calculada} = 21.8199 \quad F_{critico} = 9.5521$$

$$F_{calculada} > F_{critico} \quad \therefore H_1 \quad S_{Exp \text{ primaria}}^2 \neq S_{Control \text{ metabólico}}^2$$

H_1 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido para la exposición primaria y el control metabólico es diferente

H_0 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido para la exposición primaria y el control metabólico es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	2

$$t_{calculada} = 13.9322 \quad t_{critico} = 2.9200$$

$$t_{calculada} > t_{critico} \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Exp\ primaria} - \bar{X}_{Control\ metabólico}| \neq 0$$

Se acepta la hipótesis alternativa: La cantidad de 4,5-cis dBaP en el medio líquido, para la exposición primaria es diferente a la cantidad presente en el control metabólico.

2.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de 4,5-cis dBaP en la biomasa proveniente del control metabólico (CM) y la exposición primaria

H_1 = Los datos no cumplen una distribución normal

H_0 = Los datos cumplen una distribución normal

Prueba de normalidad Shapiro - Wilk			
Bioensayo	Estadístico	gl	Sig. asintótica bilateral
Exposición primaria (3 h a 34 °C)	0.907	3	0.407
Control metabólico	0.772	3	0.049

$$0.407 > 0.05 \quad \therefore H_0$$

$$0.049 < 0.05 \quad \therefore H_1$$

Según la prueba de Shapiro-Wilk, los resultados del control metabólico no presentan una distribución normal, por lo que se decidió aplicar la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras independientes.

H_1 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en la biomasa para la exposición primaria y el control metabólico es diferente

H_0 = La cantidad de 4,5-cis dBaP en la biomasa para la exposición primaria y el control metabólico es igual

Prueba de U de Mann-Whitney	
Parámetro	Valor
p critico	0.050
Sig. Asintótica bilateral	0.024

$$0.024 < 0.050 \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Exp\ primaria} - \bar{X}_{Control\ metabólico}| \neq 0$$

Se acepta la hipótesis alternativa: La cantidad de 4,5-cis dBaP en la biomasa, para la exposición primaria es diferente a la cantidad de 4,5-cis dBaP presente en el control metabólico.

3.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de 7,8-cis dBaP en la biomasa proveniente del control metabólico (CM) y la exposición primaria

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Exposición primaria (3 h a 34 °C)	Control metabólico
n	4	3
x	0.0121	0.0473
s^2	0.0000043	0.000018

x= cantidad de 7,8-cis dBaP en la biomasa (μg), s^2 = varianza muestral

$$F_{calculada} = 4.2021 \quad F_{critico} = 9.5521$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Exp\ primaria}^2 = S_{Control\ metabólico}^2$$

H_1 = La cantidad de 7,8-cis dBaP en la biomasa para la exposición primaria y el control metabólico es diferente

H_0 = La cantidad de 7,8-cis dBaP en la biomasa para la exposición primaria y el control metabólico es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	5

$$t_{calculada} = 14.7106 \quad t_{critico} = 2.0150$$

$$t_{calculada} > t_{critico} \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Exp\ primaria} - \bar{X}_{Control\ metabólico}| \neq 0$$

Se acepta la hipótesis alternativa: La cantidad de 7,8-cis dBaP en la biomasa, para la exposición primaria es diferente a la cantidad de 7,8-cis dBaP presente en el control metabólico.

4.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de BaP en el medio líquido proveniente del control metabólico (CM) y la exposición primaria

H₁= La varianza de las dos muestras es diferente

H₀= La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Exposición primaria (3 h a 34 °C)	Control metabólico
n	4	3
x	0.206	0.268
s ²	0.00017	0.0078

x= cantidad de BaP en el medio líquido (µg), s² = varianza muestral

$$F_{calculada} = 45.8156 \quad F_{critico} = 9.5521$$

$$F_{calculada} > F_{critico} \quad \therefore H_1 \quad S_{Exp\ primaria}^2 \neq S_{Control\ metabólico}^2$$

H₁= La cantidad de BaP en el medio líquido para la exposición primaria y el control metabólico es diferente

H₀= La cantidad de BaP en el medio líquido para la exposición primaria y el control metabólico es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	2

$$t_{calculada} = 1.2053 \quad t_{critico} = 2.9199$$

$$t_{calculada} < t_{critico} \quad \therefore H_0 \quad |\bar{X}_{Exp\ primaria} - \bar{X}_{Control\ metabólico}| = 0$$

No hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula: La cantidad de BaP en el medio líquido, para la exposición primaria es igual a la cantidad de BaP presente en el control metabólico.

5.- Prueba de hipótesis para comparar la cantidad de BaP en la biomasa proveniente del control metabólico (CM) y la exposición primaria

H_1 = La varianza de las dos muestras es diferente

H_0 = La varianza de las dos muestras es igual

Parámetro	Exposición primaria (3 h a 34 °C)	Control metabólico
n	3	3
x	1.563	1.132
s^2	0.0154	0.0194

x= cantidad de BaP en la biomasa (μg), s^2 = varianza muestral

$$F_{calculada} = 1.2605 \quad F_{critico} = 19.0000$$

$$F_{calculada} < F_{critico} \quad \therefore H_0 \quad S_{Exp\ primaria}^2 = S_{Control\ metabólico}^2$$

H_1 = La cantidad de BaP en la biomasa para la exposición primaria y el control metabólico es diferente

H_0 = La cantidad de BaP en la biomasa para la exposición primaria y el control metabólico es igual

Parámetro	Valor
Significancia (α)	0.05
Grados de libertad	4

$$t_{calculada} = 4.0011 \quad t_{critico} = 2.1318$$

$$t_{calculada} > t_{critico} \quad \therefore H_1 \quad |\bar{X}_{Exp\ primaria} - \bar{X}_{Control\ metabólico}| \neq 0$$

Hay suficiente evidencia para aceptar la hipótesis alternativa: La cantidad de BaP en la biomasa, para la exposición primaria es diferente a la cantidad de BaP presente en el control metabólico.