



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA REMOCIÓN DE  
BENZO[A]PIRENO Y BENZO[A]ANTRACENO POR LA MICROALGA  
*SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*: ESTUDIO COMPARATIVO CON  
CÉLULAS ENTERAS Y CON EXTRACTOS ENZIMÁTICOS  
ENCAPSULADOS EN ALGINATO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMICO**

**PRESENTA**

**GERARDO PERALTA MARÍN**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: Dra. Martha Patricia García Camacho  
VOCAL: Dra. Evangelina Camacho Frías  
SECRETARIO: Dr. Luis Alejandro Díaz Flores  
1er SUPLENTE: QFB. Genaro Jiménez Reyes  
2do SUPLENTE: M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Facultad de Química, Edificio F, Laboratorio de Análisis de Trazas 227. Circuito Exterior s/n, Coyoacán, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México, México.

**Asesor del Tema:**

---

Dra. Martha Patricia García Camacho

**Supervisor Técnico:**

---

M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera

**Sustentante:**

---

Gerardo Peralta Marín

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, que me han dado la oportunidad para desarrollarme académica, profesional y personalmente. Incluso con sus áreas de mejora, representan el ideal de progresar y acceder al conocimiento para mejorar nuestra comunidad.

Al proyecto CONACyT CB-283377, “Actividad enzimática en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por microalgas”, por el apoyo presupuestal y la beca otorgada.

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.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho, por la oportunidad de integrarme a su equipo de investigación, su asesoría, orientación y paciencia para la elaboración del presente trabajo.

A la M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera, por su apoyo y retroalimentación en las actividades realizadas.

A mis compañeros en el Laboratorio 227, en particular al M. en C. José Eduardo Becerril Mercado, por su apoyo y especialmente por su amistad.

## **Dedicatorias**

A mi familia, por sus esfuerzos que han permitido llevar a cabo este proyecto, siendo parte de mi formación y crecimiento.

Para Mauricio Peralta, por su amor y respaldo incondicional, que me ha enseñado a seguir mis convicciones e impulsarme a formar mi propio camino. Por ser un ejemplo de integridad, empatía y entusiasmo.

A Brenda Marín, por su compromiso de hacer lo mejor posible en el momento. Incluso cuando se han presentado diferencias, prevalece su afecto.

A mi abuela Gregoria, por recibirme y tener inconmensurables consideraciones que hicieron más llevadero este proceso. Por mostrarme la importancia de la perseverancia y siempre tener un momento para escuchar.

A Stephany Arenas, por todo el cariño, paciencia y atención que muestras día a día, animándome a mejorar y compartir tanto los éxitos como dificultades, aceptándome tal como soy. Por recordarme que el trayecto y los pequeños momentos que lo conforman son más importantes.

Para las personas que a través de los años se han convertido en parte de mi familia: Jhonatan Hernández, a pesar de la distancia siempre hay un momento en el que compartimos una risa y me haces ver que la vida puede ser más sencilla.

Yasmín Reyes, por estar presente, especialmente en los momentos más difíciles y tu amistad, en la que siempre hay un buen momento acompañado de chistes malos.

A mis amigos con los que he recorrido este camino, el grupo de Químicos con los equipos más caóticos, divertidos y efectivos en los que he tenido el gusto de participar: Adrián Minutti, Antonio Aguirre, Leonardo Rodríguez y Luis Vázquez. Al grupo que formamos desde primer semestre, en especial a Fabrizio Miranda, Miguel Esquivel y Alejandro Luna. Ustedes hicieron especial cada momento que compartimos, mostrándome que entre todos podemos llegar más lejos. Son las personas más nobles que tuve la fortuna de conocer.

Para todos los que hicieron más amenos los días: Alexis, Anahí, Armando, Balam, Dafne, Emilia, Lasha, Limón y muchos más. Cada uno a su forma ha sido parte y aprecio el tiempo que hemos compartido.

Sin todos ustedes esto sería completamente diferente y no lo cambiaría por ninguna otra forma. Gracias, totales.

## Índice

Introducción.....	1
Objetivos .....	3
1. Antecedentes .....	4
1.1 Generalidades de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) .....	4
1.1.1 Características fisicoquímicas .....	5
1.1.2 Toxicidad .....	5
1.1.3 Fuentes.....	6
1.1.3.1 Agua .....	7
1.1.3.2 Aire .....	8
1.1.3.3 Alimentos.....	9
1.1.3.4 Suelo .....	11
1.2 Métodos de tratamiento .....	11
1.2.1 Adsorción.....	12
1.2.2 Químicos .....	12
1.2.3 Térmicos.....	13
1.2.4 Biorremediación.....	14
1.2.4.1 Bacterias .....	15
1.2.4.2 Hongos.....	16
1.2.4.3 Microalgas .....	16
1.2.4.3.1 <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	18
1.3 Enzimas .....	20
1.3.1 Uso en biorremediación.....	23
1.3.2 Efecto de la temperatura .....	24
1.3.3 Lisis ultrasónica para la extracción de biomoléculas .....	24
1.3.4 Inmovilización .....	25
1.4 Métodos de preparación de muestra con adsorbentes .....	28
1.4.1 Extracción en Fase Sólida.....	29
1.4.2 Dispersión de Matriz en Fase Sólida.....	30
1.5 Análisis cromatográfico.....	31
1.5.1 Validación del método .....	32

2. Desarrollo experimental .....	34
2.1 Equipo, material de uso y reactivos .....	34
2.2 Planteamiento general .....	36
2.3 Preparación de muestra e inmovilización .....	36
2.3.1 Crecimiento y mantenimiento de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	36
2.3.2 Separación de la biomasa del medio líquido .....	37
2.3.3 Obtención de extractos intracelulares.....	38
2.3.4 Inmovilización de extractos intracelulares .....	38
2.4 Metodología analítica.....	40
2.4.1 Validación de sistemas cromatográficos.....	40
2.4.2 Validación de metodologías de extracción .....	42
2.4.2.1 Extracción en Fase Sólida de medio líquido.....	42
2.4.2.2 Extracción en Fase Sólida de extractos enzimáticos desinmovilizados .....	43
2.4.2.3 Dispersión de Matriz en Fase Sólida de biomasa .....	44
2.5 Bioensayos de exposición .....	45
2.5.1 Degradación de benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno con células de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	45
2.5.2 Degradación de benzo[a]pireno con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	46
3. Resultados y discusión .....	48
3.1 Preparación de muestra e inmovilización .....	48
3.1.1 Crecimiento y mantenimiento de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	48
3.1.2 Inmovilización de extractos enzimáticos intracelulares.....	49
3.2 Metodología analítica.....	49
3.2.1 Validación de sistemas cromatográficos.....	49
3.2.1.1 Disoluciones estándar .....	49
3.2.1.1.1 Intervalo lineal .....	50
3.2.1.1.2 Límites de detección y cuantificación .....	53
3.2.1.1.3 Precisión.....	53
3.2.1.2 Muestras.....	54
3.2.1.2.1 Parámetros cromatográficos .....	57
3.2.1.2.2 Recobro.....	57

3.3 Bioensayos de exposición .....	58
3.3.1 Degradación de benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno con células de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	58
3.3.1.1 Benzo[a]pireno .....	58
3.3.1.2 Benzo[a]antraceno .....	62
3.3.1.3 4,5-cis-dihidrodiol benzo[a]pireno.....	67
3.3.1.4 5,6-cis-dihidrodiol benzo[a]antraceno.....	72
3.3.3 Degradación de BaP con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados .....	76
3.3.3.1 Evaluación de matrices con alginato .....	77
3.3.3.2 Benzo[a]pireno .....	78
3.3.3.3 4,5-cis dihidrodiol benzo[a]pireno.....	89
4. Conclusión .....	98
Referencias .....	101
Anexos .....	112
Anexo 1. Análisis estadístico de exposiciones de células enteras .....	112
Anexo 1.1 Análisis estadístico BaP.....	112
Anexo 1.2 Análisis estadístico de BaA.....	114
Anexo 1.3 Análisis estadístico de BaP y BaA .....	115
Anexo 1.4 Análisis estadístico de 4,5-dBaP.....	118
Anexo 1.5 Análisis estadístico de 5,6-dBaA.....	119

## **Abreviaturas**

ACN Acetonitrilo

BaP Benzo[a]pireno

BaA Benzo[a]antraceno

4,5-dBaP 4,5 cis-dihidrodiol benzo[a]pireno

5,6-dBaA 5,6 cis-dihidrodiol benzo[a]antraceno

CLAR Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

CYP Citocromo P450

DF Detector de Fluorescencia

DMFS Dispersión de Matriz en Fase Sólida

EFS Extracción en Fase Sólida

EPA Environmental Protection Agency

HAP Hidrocarburo Aromático Policíclico

HAP4 Benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, criseno

IL Intervalo Lineal

LC Límite de cuantificación

LD Límite de detección

MeOH Metanol

PM Partículas suspendidas

t<sub>r</sub> Tiempo de retención

UV-Vis Ultravioleta-Visible

## Índice de tablas

Tabla 1.1 Estructura de HAPs y principales propiedades fisicoquímicas.....	5
Tabla 1.2. Límites máximos permitidos de PM <sub>10</sub> y PM <sub>2.5</sub> en aire.....	9
Tabla 1.3. Concentración de HAPs, expresado en µg/kg, en peso húmedo de frutas y vegetales y peso seco de café y aceites .....	9
Tabla 1.4. Concentración residual de HAPs en cocción de carne de res.....	10
Tabla 1.5. Límites máximos permitidos de BaP y HAP4 en alimentos.....	11
Tabla 1.6 Registro de remoción de fluoranteno y pireno mediante microalgas.....	17
Tabla 1.7 Metabolitos dihidrodioles de BaP y BaA.....	19
Tabla 1.8 Criterios de aceptación de parámetros de desempeño .....	33
Tabla 1.9 Recuperación para residuos y contaminantes en alimentos y agua .....	33
Tabla 2.1 Componentes de medio Bristol para cultivo de <i>Selenastrum capricornutum</i> . ....	36
Tabla 3.1 Registro de crecimiento de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	48
Tabla 3.2 Parámetros de curvas de calibración de los analitos. ....	53
Tabla 3.3 Límites de detección y cuantificación instrumentales de los analitos.....	53
Tabla 3.4 Parámetros de precisión de analitos, n = 3. ....	54
Tabla 3.5 Parámetros cromatográficos de analitos. ....	57
Tabla 3.6 Recobro de analitos en células microalgales y extractos enzimáticos inmovilizados, n = 3.....	57
Tabla 3.7 Cantidad (µg) de BaP presente en bioensayos de exposición de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	58
Tabla 3.8 Cantidad de BaA (µg) presente en bioensayos de exposición de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	63
Tabla 3.9 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) presente en bioensayos de exposición de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	68
Tabla 3.10 Cantidad de 5,6-dBaA (ng) presente en bioensayos de exposición de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	72
Tabla 3.11 Cantidad de BaP (µg) presente en bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de <i>Selenastrum capricornutum</i> en incubaciones de 3 horas.....	79

Tabla 3.12 Cantidad de BaP ( $\mu\text{g}$ ) presente en bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de *Selenastrum capricornutum* a 28 °C en incubaciones de 3 y 6 horas.....85

Tabla 3.13 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) presente en bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de *Selenastrum capricornutum* en incubaciones de 3 horas.89

Tabla 3.14 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) presente en bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de *Selenastrum capricornutum* a 28 °C en incubaciones de 3 y 6 horas.....95

## Índice de figuras

Figura 1.1 Estructuras de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	4
Figura 1.2 Células de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	18
Figura 2.1 Esquema general de actividades experimentales. ....	36
Figura 2.2 Cultivos de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	37
Figura 2.3 Preparación de biomasa para lisis celular.....	38
Figura 2.4 Inmovilización de extractos enzimáticos intracelulares. ....	39
Figura 2.5 Liberación de extractos enzimáticos. ....	43
Figura 2.6 Esquema de EFS. ....	44
Figura 2.7 Esquema de DMFS. ....	45
Figura 2.8 Esquema general de exposición y activación de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	46
Figura 2.9 Esquema de ensayos de extractos enzimáticos inmovilizados.....	47
Figura 2.10 Esquema de bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares. ....	47
Figura 3.1 Curva de crecimiento de <i>Selenastrum capricornutum</i> en 100 mL de cultivo Bristol adicionado con proteosa peptona.....	48
Figura 3.2 Perlas de extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados.....	49
Figura 3.3 Cromatogramas de disoluciones estándar de BaP (rojo, 2 µg/mL, 263 nm) y BaA (azul, 1 µg/mL, 282 nm) con detección UV. ....	50
Figura 3.4 Cromatogramas de disoluciones estándar de 5,6-dBaA (azul, 45 ng/mL) y 4,5-dBaP (rojo, 90 ng/mL) mediante DF.....	50
Figura 3.5 Curva de calibración de BaP obtenida mediante CLAR-UV, n = 3.....	51
Figura 3.6 Curva de calibración de BaA obtenida mediante CLAR-UV, n = 3.....	51
Figura 3.7 Curva de calibración de 4,5-dBaP obtenida mediante CLAR-DF, n = 3.....	52
Figura 3.8 Curva de calibración de 5,6-dBaA obtenida mediante CLAR-DF, n = 3.....	52
Figura 3.9 Cromatogramas de exposición a BaP en biomasa de <i>Selenastrum capricornutum</i> (rojo) y disolución estándar (1 µg/mL, azul) con detección UV. ....	54

Figura 3.10 Cromatogramas de exposición a BaA representativos. Biomasa fortificada (rojo), blanco (azul) y disolución estándar (1 µg/mL, verde) con detección UV. Fase móvil metanol. ....	55
Figura 3.11 Cromatogramas de exposición a BaA representativos. Biomasa fortificada (rojo), blanco (azul) y disolución estándar (1 µg/mL, verde) con detección UV. Fase móvil 90:10 v:v metanol-agua. ....	55
Figura 3.12 Cromatograma de un extracto de biomasa representativo de los metabolitos de BaP formados por <i>Selenastrum capricornutum</i> (rojo) con una disolución estándar de 4,5-dBaP (105 ng/mL, azul) mediante DF. ....	56
Figura 3.13 Cromatograma de un extracto de medio líquido representativo de los metabolitos de BaA formados por <i>Selenastrum capricornutum</i> (rojo) con una disolución estándar de 5,6-dBaA (60 ng/mL, azul) mediante DF. ....	56
Figura 3.14 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes del medio líquido de cultivo a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.....	59
Figura 3.15 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes del medio líquido de cultivo a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 6 horas con detección UV.....	59
Figura 3.16 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de la biomasa de microalgas a las temperaturas de trabajo (azul 34 °C, rojo 28 °C, verde 22 °C) en incubación de 3 horas con detección UV.....	60
Figura 3.17 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de la biomasa de microalgas a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 6 horas con detección UV.....	61
Figura 3.18 Cantidad de BaP (µg) en medio líquido y biomasa en bioensayos de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> a 22, 28 y 34 °C. ....	62
Figura 3.19 Cromatogramas de BaA en extractos provenientes del medio líquido de cultivo a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.....	63
Figura 3.20 Cromatogramas de BaA en extractos provenientes del medio líquido de cultivo a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 6 horas con detección UV.....	64
Figura 3.21 Cromatogramas de BaA en extractos provenientes de la biomasa de microalgas a las temperaturas de trabajo (azul 34 °C, rojo 28 °C, verde 22 °C) en incubación de 3 horas con detección UV.....	65
Figura 3.22 Cromatogramas de BaA en extractos provenientes de la biomasa de microalgas a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 6 horas con detección UV.....	65

Figura 3.23 Cantidad de BaA ( $\mu\text{g}$ ) en medio líquido y biomasa en bioensayos de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> a 22, 28 y 34 °C.....	66
Figura 3.24 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes del medio líquido de cultivo (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.....	68
Figura 3.25 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes del medio líquido de cultivo (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 6 horas mediante DF.....	69
Figura 3.26 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de la biomasa de microalgas (rojo 22°C, verde 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.....	69
Figura 3.27 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de la biomasa de microalgas (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 6 horas mediante DF.....	70
Figura 3.28 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) en medio líquido y biomasa en bioensayos con células de <i>Selenastrum capricornutum</i> a 22, 28 y 34 °C.....	72
Figura 3.29 Cromatogramas de metabolitos de BaA en extractos provenientes del medio líquido de cultivo (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.....	73
Figura 3.30 Cromatogramas de metabolitos de BaA en extractos provenientes del medio líquido de cultivo (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 6 horas mediante DF.....	73
Figura 3.31 Cromatogramas de metabolitos de BaA en extractos provenientes de la biomasa de microalgas (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.....	74
Figura 3.32 Cromatogramas de metabolitos de BaA en extractos provenientes de la biomasa de microalgas (verde 22 °C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 6 horas mediante DF.....	74
Figura 3.33 Cantidad de 5,6-dBaA (ng) en medio líquido y biomasa en bioensayos de células de <i>Selenastrum capricornutum</i> a 22, 28 y 34 °C.....	76
Figura 3.34 Cromatogramas de perlas (azul), disolución buffer de incubación (rojo) y disolución estándar de BaP (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , verde) con detección UV.....	78
Figura 3.35 Cromatogramas de perlas (azul), disolución buffer de incubación (rojo) y disolución estándar de 4,5-dBaP (1.2 $\text{ng}/\text{mL}$ , verde) mediante DF.....	78
Figura 3.36 Cromatogramas de BaP de enzima libre (verde), perlas (azul), disolución buffer de incubación (rojo) y control de remanentes de BaP (morado) en bioensayos con alginato 3% a 28 °C por 3 horas con detección UV.....	79

Figura 3.37 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de la disolución buffer de incubación en ensayos con alginato 3% (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.....	80
Figura 3.38 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de la disolución buffer de incubación en ensayos con alginato 9% (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.....	80
Figura 3.39 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de perlas con alginato 3% en ensayos de exposición (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV. ....	81
Figura 3.40 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de perlas con alginato 9% en ensayos de exposición (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV. ....	81
Figura 3.41 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de ensayos de exposición con enzimas libres (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) y disolución estándar (1 µg/mL, negro) en incubación de 3 horas con detección UV.....	82
Figura 3.42 Cantidad de BaP (µg) en disolución buffer de incubación, perlas y enzimas libres de extractos intracelulares de <i>Selenastrum capricornutum</i> en incubaciones de 3 horas a 22, 28 y 34 °C.....	83
Figura 3.43 Remoción de BaP (%) con células de <i>Selenastrum capricornutum</i> y extractos intracelulares inmovilizados con alginato en incubaciones por 3 horas a 22, 28 y 34 °C. .84	84
Figura 3.44 Degradación de BaP (%) con células de <i>Selenastrum capricornutum</i> , extractos intracelulares inmovilizados con alginato y enzimas libres en incubaciones por 3 horas a 22, 28 y 34 °C.....	85
Figura 3.45 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de ensayos con alginato 3% a 28 °C en perlas (azul 3 horas, rojo 6 horas) y disolución buffer de incubación (verde 3 horas, negro 6 horas) con detección UV. ....	86
Figura 3.46 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de ensayos con alginato 9% a 28 °C en perlas (azul 3 horas, rojo 6 horas) y disolución buffer de incubación (verde 3 horas, negro 6 horas) con detección UV. ....	86
Figura 3.47 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de enzimas libres (verde 3 horas, rojo 6 horas) y disolución estándar (1 µg/mL en acetonitrilo, azul) en incubaciones a 28 °C con detección UV.....	87
Figura 3.48 Cantidad de BaP (µg) en disolución buffer de incubación, perlas y enzimas libres de extractos intracelulares de <i>Selenastrum capricornutum</i> a 28 °C en incubaciones de 3 y 6 horas.....	88
Figura 3.49 Remoción de BaP (%) con células de <i>Selenastrum capricornutum</i> y extractos intracelulares inmovilizados con alginato en incubaciones por 6 horas a 28 °C. ....	88

Figura 3.50 Degradación de BaP (%) con células de <i>Selenastrum capricornutum</i> , extractos intracelulares inmovilizados con alginato y enzimas libres en incubaciones por 6 horas a 28 °C.....	89
Figura 3.51 Cromatogramas de bioensayos a 34 °C con enzima libre (azul) y extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados con alginato 9%: perlas (verde), disolución buffer de incubación (rojo) y remanentes de metabolitos (naranja) mediante DF. ....	90
Figura 3.52 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de la disolución buffer de incubación en ensayos con alginato 3% (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.....	90
Figura 3.53 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de la disolución buffer de incubación en ensayos con alginato 9% (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.....	91
Figura 3.54 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de perlas en ensayos con alginato 3% (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF. ....	91
Figura 3.55 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de perlas en ensayos con alginato 9% (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF. ....	92
Figura 3.56 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de ensayos con enzimas libres (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.....	93
Figura 3.57 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) en bioensayos con extractos inmovilizados y con enzimas libres intracelulares de <i>Selenastrum capricornutum</i> en incubaciones de 3 horas a 22, 28 y 34 °C.....	94
Figura 3.58 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) en disolución buffer de incubación, perlas y enzimas libres de extractos intracelulares de <i>Selenastrum capricornutum</i> en incubaciones a 28 °C de 3 horas.....	94
Figura 3.59 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de ensayos con alginato 3% a 28 °C en disolución buffer de incubación (rojo 3 horas, verde 6 horas) y perlas (naranja 3 horas, azul 6 horas) mediante DF. ....	95
Figura 3.60 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de ensayos con alginato 9% a 28 °C en disolución buffer de incubación (rojo 3 horas, verde 6 horas) y perlas (naranja 3 horas, azul 6 horas) mediante DF. ....	96
Figura 3.61 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de enzimas libres (rojo 3 horas, verde 6 horas) en incubaciones a 28 °C mediante DF. ....	96
Figura 3.62 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) en disolución buffer de incubación, perlas y enzimas libres de extractos intracelulares de <i>Selenastrum capricornutum</i> a 28 °C en incubaciones de 3 y 6 horas.....	97

## Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos orgánicos no polares conformados por anillos aromáticos en distintos arreglos. Los HAPs se forman a partir de la combustión incompleta de materia orgánica, proviniendo de fuentes naturales, como incendios o erupciones volcánicas, o por actividad antropogénica, principalmente por la quema de combustible fósil, emisiones industriales y vehiculares (Hayakawa et al, 2018). Debido a sus propiedades, se adhieren con facilidad a diferentes matrices ambientales como el aire, agua y suelo, aumentando la exposición a estos contaminantes, además de que pueden incorporarse a la cadena trófica, sufriendo el fenómeno de bioacumulación (Ma y Harrad, 2015).

La importancia del estudio de dichos compuestos recae en que su formación se ha incrementado en los últimos años, siendo un factor de riesgo debido a su toxicidad y actividad como agentes cancerígenos (Kim et al, 2013). Además, la remoción y degradación de los HAPs no es espontánea, requiriendo métodos físicos, químicos o biológicos para su remediación. Sin embargo, la mayoría de los métodos tradicionales implican el uso de reactivos que pueden afectar al medio ambiente por sí mismos, los residuos que generan o el gasto energético que implica usar temperatura alta para descomponerlos. Los métodos biológicos representan una alternativa ecológica a las metodologías físicas o químicas, en las que predomina el uso de microorganismos capaces de realizar la biorremediación de contaminantes en diversas matrices. Entre estos destaca la actividad de bacterias, hongos y microalgas (Kuppusamy et al, 2017).

La degradación de los HAPs se ha descrito ampliamente en el caso de bacterias y hongos con actividad enzimática que actúa principalmente mediante un sistema de dioxigenasas y citocromo P450 (CYP), respectivamente. En el caso de las bacterias se obtienen como metabolitos primarios cis-dihidrodiolés y para los hongos, epóxidos que dan lugar a trans-dihidrodiolés. El sistema enzimático en el caso de las microalgas no ha sido elucidado, por lo que se requieren estudios que indiquen el mecanismo de acción, los productos de degradación generados, su estabilidad y posible descomposición (Ghosal et al, 2016). Por lo tanto, es importante aislar las enzimas responsables de la degradación de los HAPs, con el fin de identificarlas y caracterizarlas. Igualmente, es necesario evaluar la actividad degradadora de los extractos enzimáticos en diferentes condiciones con fines de biorremediación.

La inmovilización enzimática ha cobrado mayor importancia en los procesos de biorremediación, ya que permite la recuperación del biocatalizador del medio en el que actúa, así como su reutilización y la reducción de los costos de operación.

Adicionalmente, proveen a la enzima de protección y estabilidad a las condiciones externas, lo cual dota de mayor versatilidad y eficiencia al proceso (Spasojević et al, 2019). El alginato se usa comúnmente como matriz de inmovilización debido a su biocompatibilidad, bajo costo, nula toxicidad y por su capacidad de formar geles en condiciones suaves al añadir cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ , cuyas interacciones entre la matriz soporte y la enzima permiten un alto rendimiento catalítico, preservando la conformación de la biomolécula (Spasojević et al, 2019; Won et al, 2005).

La microalga *Selenastrum capricornutum* ha demostrado capacidad de degradar HAPs de alto peso molecular como benzo[a]pireno (BaP) y benzo[a]antraceno (BaA), produciendo metabolitos de tipo dihidrodiol en diferentes posiciones de los anillos aromáticos (García de Llasera et al, 2016). Adicionalmente, se ha estudiado la capacidad de degradación de los HAPs con la célula inmovilizada (Baca Ibañez, 2019) y de extractos enzimáticos crudos obtenidos de los cultivos después de una activación por exposición a los contaminantes (Fuentes Pérez, 2019). Sin embargo, no se ha evaluado la degradación con dichos extractos inmovilizados ni la influencia de la temperatura en la producción de sus metabolitos.

Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó un estudio comparativo acerca del efecto de la temperatura en la degradación de BaP y BaA por células de *Selenastrum capricornutum* y sus correspondientes extractos crudos enzimáticos inmovilizados. Con esto, se evaluó la capacidad de remoción de los HAPs y su degradación, monitoreando la formación de sus metabolitos en cultivos de microalgas libres y sus extractos enzimáticos inmovilizados, a tres temperaturas y dos tiempos de exposición. Esta evaluación del efecto de la temperatura en la biodegradación pudo realizarse gracias a la implementación de metodologías analíticas para la extracción y cuantificación a nivel de trazas de BaP, BaA y sus respectivos metabolitos, 4,5-cis dihidrodiol benzo[a]pireno y 5,6-cis dihidrodiol benzo[a]antraceno. Para ello, se usaron las técnicas de extracción en fase sólida (EFS) y dispersión de matriz en fase sólida (DMFS). La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección UV y de fluorescencia se usó para analizar a los HAPs y sus metabolitos en los extractos. Asimismo, se realizó la validación de los métodos analíticos para reportar resultados confiables.

## Objetivos

### General

Comparar la degradación de benzo[a]pireno (BaP) y benzo[a]antraceno (BaA) en función de la temperatura y tiempo de incubación, empleando cultivos de *Selenastrum capricornutum* y extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados en perlas de alginato.

### Particulares

- Validar la metodología EFS/DMFS-CLAR-UV/DF para la cuantificación de benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno y los metabolitos 4,5-cis-dihidrodiol benzo[a]pireno y 5,6-cis-dihidrodiol benzo[a]antraceno en el medio de cultivo líquido y biomasa de *Selenastrum capricornutum*, al igual que en sus extractos enzimáticos intracelulares encapsulados en alginato.
- Determinar la concentración de benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno y sus metabolitos en el medio de cultivo líquido y la biomasa de *Selenastrum capricornutum*, variando el tiempo y la temperatura de exposición.
- Desarrollar una metodología de concentración e inmovilización de extractos enzimáticos intracelulares de *Selenastrum capricornutum* obtenidos mediante lisis ultrasónica celular.
- Determinar la concentración de benzo[a]pireno y el metabolito 4,5-cis-dihidrodiol benzo[a]pireno en extractos enzimáticos intracelulares encapsulados en alginato y sus medios líquidos de incubación, variando el tiempo y la temperatura de exposición.
- Evaluar la degradación de los HAPs en los extractos enzimáticos inmovilizados.

### Hipótesis.

- A 34 °C se observará una mayor degradación de los HAPs, tanto en células libres como en extractos enzimáticos inmovilizados. La detección de metabolitos provenientes de la degradación, en las incubaciones con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados, demostrará la capacidad degradadora de las enzimas, las cuales deberán estar en un ambiente controlado que preserva su estabilidad. Los extractos enzimáticos tendrán una mayor cantidad del metabolito que sus análogos celulares, debido a que el sustrato puede acceder con mayor facilidad al sitio activo de la enzima, reflejándose en una mayor degradación del HAP.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Generalidades de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos unidos en arreglos lineales, angulares o en cúmulos, conteniendo sólo átomos de carbono e hidrógeno. Son resultado de cualquier combustión incompleta de materia orgánica, principalmente originadas por actividades antropogénicas (Hayakawa et al, 2018). Los HAPs se encuentran en mezclas con otros contaminantes, acumulándose en el agua, aire, alimentos y suelos, por lo que la exposición puede darse a través de su ingesta, inhalación o contacto dérmico. Los ecosistemas con mayor riesgo de exposición son los que se encuentran cerca de áreas industriales y urbanas, como puertos y minas, o de fuentes naturales como incendios forestales (Wallace et al, 2020). El BaP y el BaA son contaminantes altamente tóxicos, cancerígenos y recalcitrantes, debido a su baja solubilidad en agua. Dichas sustancias tienden a bioacumularse en los organismos, afectando la cadena trófica, por lo que es importante su monitoreo e implementar medidas para removerlos del ambiente, incluyendo métodos de biodegradación (Ghosal et al 2016). A continuación, se presentan en la Figura 1.1 algunos de estos compuestos, resaltando los estudiados en el presente trabajo.

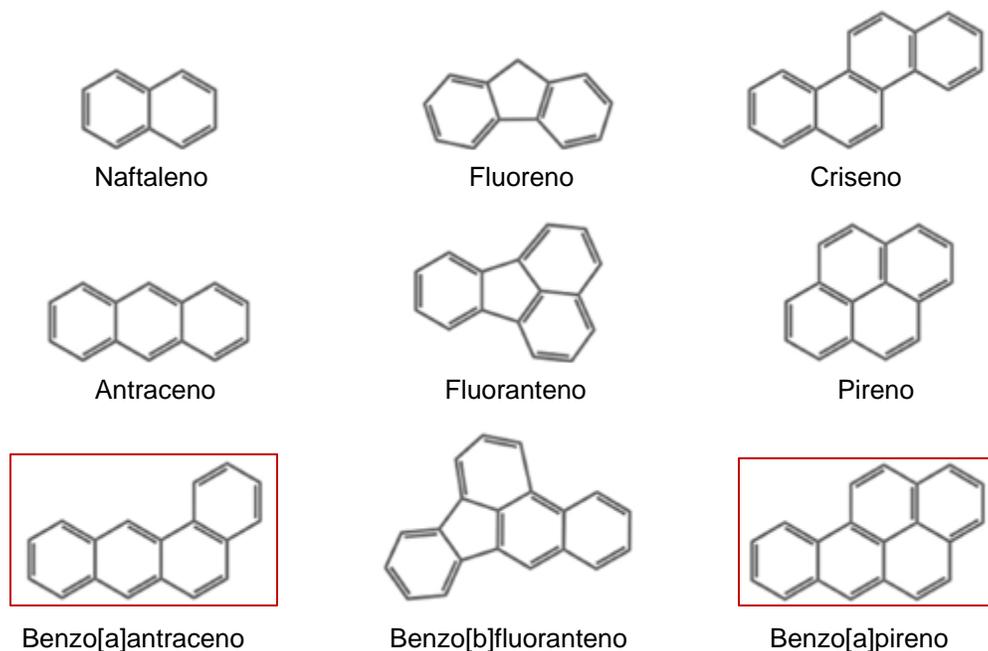


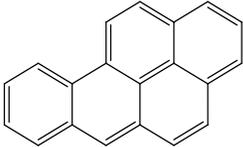
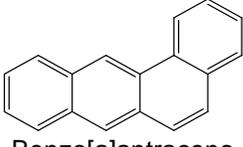
Figura 1.1 Estructuras de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

### 1.1.1 Características fisicoquímicas

Los HAPs son sólidos incoloros o amarillentos a temperatura ambiente que tienen baja presión de vapor y solubilidad en agua, con altos puntos de fusión y ebullición. Cuentan con sistemas  $\pi$  conjugados que permiten la absorción de luz ultravioleta y la mayoría produce un espectro fluorescente característico (Hayakawa 2018).

Los HAPs reaccionan por sustitución electrofílica aromática del hidrógeno o por adición cuando se produce su saturación, conservando su sistema de anillos. La mayoría de estos compuestos se fotooxidan, obteniendo endoperóxidos que pueden convertirse en quinonas (Yu, 2002). Sintéticamente, son sustancias de interés para formar arenos policíclicos y nanografenos mediante extensiones  $\pi$ -anulativas (APEX) de sustratos aromáticos simples, permitiendo la reducción del número de pasos en su síntesis (Ito et al, 2019). Las estructuras y algunas de las características fisicoquímicas del benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno se presentan en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Estructura de HAPs y principales propiedades fisicoquímicas.

Sustancia	Peso molar	Punto fusión	Punto ebullición	Solubilidad (mol/L)	Log $K_{ow}$	Concentración (pg/m <sup>3</sup> )
 Benzo[a]pireno	252.32 g/mol	177 °C [EPA]	495 °C [EPA]	8.40x10 <sup>-9</sup> [EPA]	6.13 [EPA]	286 (PM <sub>2.5</sub> ) <sup>1</sup> [Amador-Muñoz 2020]
 Benzo[a]antraceno	228.29 g/mol	159 °C [EPA]	437 °C [EPA]	5.23x10 <sup>-8</sup> [EPA]	5.60 [EPA]	219 (PM <sub>2.5</sub> ) <sup>1</sup> [Amador-Muñoz 2020]

<sup>1</sup>Concentración en partículas PM<sub>2.5</sub> muestreado en la Ciudad de México (Amador-Muñoz 2020).

### 1.1.2 Toxicidad

Se han identificado 16 HAPs como sustancias peligrosas prioritarias debido a su alto riesgo de producir efectos adversos en la salud al exponerse a los seres humanos, destacando sus efectos carcinogénicos, mutágenos y teratógenos (EPA, 2011). Se ha reportado la relación entre los HAPs y la incidencia de diversas enfermedades, destacando el desarrollo de células cancerígenas en tejido pulmonar, gastrointestinal, dérmico y cardiovascular (Kim et al, 2013, Marris et al, 2020). El monitoreo biológico de la exposición a los HAPs es de gran interés, debido a la difusión de dichos compuestos y su relevancia toxicológica. Sin embargo, los

efectos en la salud de los HAPs individuales no son exactamente iguales. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (WHO: IARC, 2010) ha clasificado dichas sustancias en alguna de las siguientes categorías:

- Grupo 1: El agente es carcinogénico para los humanos, mostrando evidencia suficiente de este efecto. En el año 2012 la IARC catalogó al benzo[a]pireno como parte de este grupo.
- Grupo 2A: El agente probablemente es carcinogénico para los humanos, presentando evidencia limitada de este efecto, y evidencia suficiente en animales, con fuertes pruebas de que la carcinogénesis es mediada por un mecanismo que también opera en seres humanos. El benzo[a]antraceno pertenece a este tipo de contaminantes.
- Grupo 2B: El agente es posiblemente carcinogénico para los humanos, teniendo evidencia limitada de este efecto, y con evidencias menores a las suficientes en animales.
- Grupo 3: El agente no es clasificable como carcinogénico para los humanos. En estos, la evidencia del efecto carcinogénico en humanos es inadecuada, y en animales es inadecuada o limitada.

Las principales rutas de exposición a los HAPs en la población se dan por medio de la respiración, ingesta de alimentos que los contienen y al fumar, teniendo en menor medida al contacto dérmico y el consumo de agua contaminada. También se presenta como riesgo ocupacional para trabajadores que respiran humo de escapes, como mecánicos, vendedores callejeros, conductores de motocicletas e incluyen a trabajadores en minas, fundidoras o refinerías. La biodisponibilidad de los HAPs después de su ingesta e inhalación es significativa, tendiendo a acumularse en tejido adiposo, liberándose gradualmente. El impacto de los HAPs en la salud depende principalmente del tiempo de exposición, la concentración y toxicidad relativa del contaminante, causando náusea, vómito, e irritación en exposiciones cortas e inmunosupresión, cataratas, dificultad para respirar, daño hepático y renal de forma crónica (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

### 1.1.3 Fuentes

Entre las principales fuentes de formación de los HAPs destacan la combustión incompleta de carbón, considerada como la de mayor contribución, y en menor medida a la cocción de alimentos, incendios, erupciones volcánicas, erosión de rocas que los contengan y humo de cigarrillos. Dependiendo de su origen, se pueden clasificar en dos tipos principales:

- Pirogénicos: Provenientes de la pirólisis realizada bajo condiciones de poco o nulo oxígeno, con un intervalo de temperatura entre 350-1200 °C, aunque

se ha reportado que pueden formarse entre 100-150 °C. Cuentan con un mayor número de anillos de seis miembros.

- Petrogénicos: Formados durante la maduración del petróleo crudo, son comunes debido a su transporte, almacenamiento y uso. Poseen un mayor número de anillos de cinco miembros.

Debido a las actividades industriales, la presencia de dichos contaminantes ha aumentado, particularmente en los alrededores de fábricas. Una vez emitidos, los HAPs pueden introducirse al ambiente a través del aire, agua, suelo y diversos organismos que los acumulan (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

#### 1.1.3.1 Agua

Los HAPs se incorporan a los sistemas acuáticos mediante precipitaciones, descargas de drenaje y derrames de petróleo, relacionándose con el desarrollo industrial del área colindante que puede formarlos, como el caso de las industrias que usan carbón como fuente de energía. Los HAPs se adhieren a la superficie de lagos, arroyos, ríos y océanos, dispersándose por corrientes y eventualmente se integran con el sedimento. En este punto, son prácticamente inmóviles debido a que sus estructuras no polares son poco solubles en agua, aunque pequeñas cantidades de HAPs pueden estar biodisponibles (Dong et al, 2012; Abdel-Shafy y Mansour, 2016). Los HAPs de menor peso molecular tienen una mayor solubilidad en agua, siendo potencialmente más tóxicos que los contenidos en fase sólida (Frapiccini y Marini, 2015). Se ha observado que la cantidad de HAPs aumenta en las temporadas de lluvia y a temperaturas cálidas, debido a que en estas condiciones se favorece su movilidad en el agua (Yu et al, 2021).

La contaminación de los recursos acuíferos es una problemática prioritaria para evitar daños a la salud comunitaria y a los ecosistemas. De acuerdo a la Ley Federal de Desechos emitida por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), el límite de HAPs permitidos en fuentes de suministro para uso público es de 0.0001 µg/mL, mientras que en aguas costeras y estuarios se establece como 0.1 µg/mL (CONAGUA 2020). Entre los estudios realizados para evaluar la calidad del agua destaca el realizado en 50 pozos en Mérida, Yucatán, observando que el 50% sobrepasó los límites permitidos de HAPs, en los que hubo una mayor proporción de contaminantes de origen pirogénico (López-Macías et al, 2019). La toxicidad de los HAPs en organismos acuáticos es afectada por los procesos metabólicos y de fotooxidación, incrementándose en presencia de luz ultravioleta. Dichos compuestos muestran una toxicidad de moderada a alta para la vida acuática y las aves, teniendo efectos adversos en su reproducción y desarrollo, mientras que los HAPs contenidos en la tierra no suelen ejercer efectos tóxicos, a menos que se encuentren en concentraciones altas (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

### 1.1.3.2 Aire

La atmósfera es el principal medio de dispersión de los HAPs debido a que recibe la mayoría de las emisiones. Estos pueden encontrarse en dos fases separadas, gas y sólido, distribuyéndose acorde a las características del contaminante. Los HAPs con menor presión de vapor predominan en la fase sólida, constituidos principalmente por moléculas con cinco o más anillos, mientras que los hidrocarburos más pequeños preponderan en la fase gaseosa (Lai et al 2011; Wang et al, 2013).

La concentración de HAPs puede cambiar dependiendo de la estación y las características de la región. De manera general, se ha observado una mayor cantidad en otoño-invierno y menor en primavera-verano, debido al incremento en las emisiones relacionadas a actividades comerciales y residenciales, aunado a su acumulación temporal provocada por el clima que impide la dispersión de los contaminantes de los centros urbanos (Han et al, 2020). La presencia de industrias que usan carbón en sus actividades afecta la exposición de los residentes en zonas aledañas, cuyo aire en exteriores cuenta con el triple de HAPs comparado con las zonas alejadas de estos sitios (Hendryx et al, 2020).

Debido a que los HAPs están en una mezcla compleja de composición variable, que depende del lugar y tiempo del muestreo, no se cuentan con valores estandarizados para su regulación y monitoreo. Con esto en cuenta, se ha propuesto el uso del BaP como indicador carcinogénico para estimar el riesgo de estos contaminantes, determinando un límite de  $8.7 \times 10^{-5} \text{ ng/m}^3$ , basado en estudios epidemiológicos realizados en trabajadores de hornos de coque (WHO, 2000).

Como alternativa a su cuantificación aislada se ha considerado monitorear los HAPs adsorbidos en partículas suspendidas en el aire, constituidas por compuestos orgánicos e inorgánicos como nitratos, sulfatos, metales y carbono orgánico. Estas pueden clasificarse de acuerdo al tamaño de partícula, destacando las  $\text{PM}_{10}$  y  $\text{PM}_{2.5}$ , y son indicadores de la calidad del aire, con regulaciones ambientales establecidas. Las  $\text{PM}_{2.5}$  son prioritarias debido a su relación con morbilidades cardiovasculares, ya que tienen una alta penetración en el sistema respiratorio, provocando respuestas inflamatorias en los pulmones que pueden inducir arritmias cardíacas, infartos, vasoconstricción arterial, arterioesclerosis y problemas de coagulación (Marris et al, 2020). En la Ciudad de México se han realizado cuantificaciones de HAPs en  $\text{PM}_{2.5}$ , siendo más abundantes el benzo[ghi]perileno y pireno, cuyas distribuciones sugieren que tienen un origen pirogénico derivado del uso de combustibles fósiles (Amador-Muñoz et al, 2020). Los límites máximos permitidos de  $\text{PM}_{10}$  y  $\text{PM}_{2.5}$  se muestran en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Límites máximos permitidos de PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub> en aire.

Tamaño de partícula	Promedio diario (µg/m <sup>3</sup> )	Promedio anual (µg/m <sup>3</sup> )
PM <sub>10</sub>	150 [EPA, 2022] 70 [NOM 2021]	36 [NOM 2021]
PM <sub>2.5</sub>	35 [EPA, 2022] 41 [NOM 2021]	15 [EPA, 2022] 10 [NOM 2021]

### 1.1.3.3 Alimentos

Los HAPs se encuentran en los alimentos al recibirlos del aire, tierra y agua, además pueden formarse en los procesos que involucran combustión, ya sea para cocinarlos o para preservarlos. Debido a esto, se encuentran en una gran variedad de productos, incluyendo cereales, moluscos, crustáceos, aceites y carnes. La exposición a estos contaminantes en la dieta depende de los hábitos de consumo del individuo y el origen de los alimentos, teniendo un riesgo mayor si provienen de cultivos u organismos expuestos a fuentes de HAPs (Ma y Harrad, 2015). Se han realizado estudios en los que se observa una mayor cantidad de estos contaminantes debido a que los alimentos se cultivan en tierra contaminada, están expuestos a precipitación de los mismos o son resultado de su refinación para obtener aceites, encontrando principalmente HAPs pequeños que se acumulan en hojas y raíces (Ramesh et al, 2004; Jia et al, 2019). En la Tabla 1.3 se registran algunos HAPs en diferentes alimentos.

Tabla 1.3. Concentración de HAPs, expresado en µg/kg, en peso húmedo de frutas y vegetales y peso seco de café y aceites (Ramesh et al, 2004).

Hidrocarburo	Vegetales	Fruta	Café	Aceite		
				Oliva	Girasol	Maní
Benzo[a]pireno	0.1	0.014	0.9	0.1	1.5	106
Benzo[a]antraceno	No reportado	0.014	0.3	0.2	3.1	79
Fluoranteno	1.3	0.037	8.0	4.2	6.7	17
Pireno	0.3	0.034	8.1	5.0	5.0	7.2
Criseno	No reportado	0.025	1.8	0.5	1.7	63

El someter los alimentos a procesos de cocción afecta sus propiedades nutricionales y puede formar contaminantes (Sobral et al, 2018). En el caso de la carne, su cocción a altas temperaturas produce HAPs y aminas heterocíclicas aromáticas (Viegas et al, 2012), principalmente en métodos como ahumado, asado o a la parrilla (Darwish et al, 2019). Se muestra la comparación de la cantidad de HAPs en la carne de res al usar diferentes métodos de cocción en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Concentración residual de HAPs en cocción de carne de res, expresada en ng/g (Darwish et al, 2019).

Hidrocarburo	Tipo de cocción			
	Crudo	Hervido	Al sartén	Parrilla
Benzo[a]antraceno	0.06 ± 0.02	0.14 ± 0.07	0.72 ± 0.24	1.33 ± 0.61
Benzo[a]pireno	>0.04	0.02 ± 0.01	0.98 ± 0.31	2.66 ± 0.44
Fluoranteno	0.05 ± 0.01	0.22 ± 0.08	0.41 ± 0.11	0.61 ± 0.20
Fluoreno	2.42 ± 0.61	2.31 ± 0.74	4.96 ± 1.17	9.41 ± 2.86
Naftaleno	2.28 ± 0.70	10.11 ± 2.22	18.67 ± 5.88	23.26 ± 10.69

La presencia de HAPs en los alimentos se da principalmente por los mismos factores fisicoquímicos que describen su absorción y distribución en los seres humanos, como su solubilidad en agua y solventes orgánicos; determinando su capacidad de distribución entre diferentes compartimientos, su adquisición y acumulación por organismos vivos, volatilidad; que establece su transporte en la atmósfera, y reactividad; que influye en la adsorción en materia orgánica o degradación en el ambiente. Todos estos factores indican la persistencia y capacidad de los HAPs para bioacumularse en la cadena trófica (Dong et al, 2012).

Debido a que los sedimentos son reservorios de HAPs en ecosistemas acuáticos, diversos invertebrados, peces y anfibios pueden estar expuestos a los contaminantes. Esto se da por contacto directo con HAPs de bajo peso molecular que se encuentran en la fase líquida, e ingestión de HAPs de mayor tamaño que predominan en partículas suspendidas. Una vez absorbidos, los organismos estimulan rutas metabólicas que inducen la biotransformación y excreción de los contaminantes, mitigando la biomagnificación en la cadena trófica. Estos procesos varían entre las especies, destacando que en los invertebrados es significativamente más lento que en los vertebrados, provocando una acumulación específica en órganos y a variabilidad en la toxicidad. (Wallace et al, 2020). Para monitorear y regular éstos contaminantes la Comisión Reguladora de la Unión Europea ha establecido niveles máximos permitidos de BaP y la suma de cuatro HAPs (BaP, BaA, benzo[b]fluoranteno y criseno, identificados como HAP4), usados como marcadores de contaminación alimenticia. En la Tabla 1.5 se exponen algunos de estos lineamientos en alimentos.

Tabla 1.5. Límites máximos permitidos de BaP y HAP4 en alimentos (European Comission, 2011).

Alimento	Niveles máximos ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
	Benzo[a]pireno	HAP4
Aceites	2	10
Granos de cacao y derivados	5	30
Carne ahumada y derivados	2	12
Carne de pescado y mariscos ahumados	2	12
Alimentos para niños (fórmulas lácteas, cereales procesados)	1	1

#### 1.1.3.4 Suelo

Los HAPs presentes en la atmósfera son acumulados continuamente en el suelo por procesos de precipitación húmeda o seca. La mayoría se adhiere sobre partículas que pueden moverse, dependiendo de su tamaño y de los poros de la tierra (Abdel-Shafy y Mansour, 2016). Una vez que los HAPs se encuentran en el suelo, pueden sufrir procesos de volatilización, fotooxidación, sorción irreversible a materia orgánica, permeación a agua subterránea, pérdida abiótica o degradación microbiana. La rapidez de estos procesos depende principalmente de las propiedades del suelo y las características fisicoquímicas del HAP. De manera general, los HAPs de bajo peso molecular son más móviles y degradables, mientras que los más pesados son más recalcitrantes (Kuppusamy et al, 2017).

Debido a su naturaleza hidrofóbica, los HAPs tienden a adsorberse a sedimentos de materia orgánica. Para modelar su distribución se usan parámetros fisicoquímicos como el coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ), proporcional al número de anillos en la estructura y relacionado con la solubilidad de un compuesto orgánico en agua. Por ello, este parámetro es usado para modelar la bioconcentración de compuestos no polares orgánicos, con valores de  $\log K_{ow}$  entre 3 y 10 (Frapiccini y Marini, 2015; Schwarzenbach et al, 2003; Wallace et al, 2020).

#### 1.2 Métodos de tratamiento

Se han desarrollado diversos métodos para disminuir los HAPs en el medio ambiente, cuyo rendimiento depende del contaminante y del medio en el que se encuentra. De forma general, los tratamientos se clasifican de acuerdo al principio por el que se da la remediación, destacando los fisicoquímicos; que abarcan métodos de adsorción, térmicos y extracción, químicos; que involucran reacciones redox o fotooxidaciones y biológicos, en los que se da la biorremediación. Los métodos biológicos han adquirido mayor relevancia, siendo frecuente su acoplamiento para tratar medios altamente contaminados (Kuppusamy et al, 2017).

### 1.2.1 Adsorción

La adsorción es usada para remover HAPs en medios acuosos, empleando sorbentes como el carbón activado y biocarbón (Gupta, 2015; Wang et al, 2015). En estos métodos se dan interacciones de transferencia de masa en la interfase del HAP y el sorbente, provocando una reducción en la energía libre y la entropía de adsorción del sistema (Lamichhane et al, 2016). Entre sus ventajas destacan su diseño y operación simple con baja inversión y costo de mantenimiento, aunado a la ausencia de subproductos indeseados (Tong et al, 2010). La elección del sorbente adecuado y la optimización de los factores ambientales son puntos a tomar en cuenta para remover los HAPs en diferentes medios, como agua, tierra y lodo (Hale et al, 2012, Oleszczuk et al, 2012; Lamichhane et al, 2016). Los sorbentes más usados son los siguientes:

- Carbón activado: Producido a partir de conchas y materiales derivados de plantas al carbonizarlos, seguido de procesos de activación. Cuenta con una alta área superficial específica (entre 300 m<sup>2</sup>/g y 3000 m<sup>2</sup>/g) y sus formas más empleadas son pulverizado y granulado (Amstaetter et al, 2012).
- Biocarbón: Generado en la pirólisis de biomasa en ausencia de oxígeno, cuenta con una gran área superficial y porosidad que puede adsorber varios compuestos, incluyendo nutrientes, gases y algunos contaminantes como metales pesados y HAPs (Yargicoglu et al, 2015). Se han observado porcentajes de remoción en suelos mayores al 50% y 40% de HAPs de alto y bajo peso molecular, respectivamente (Beesley et al, 2010).

### 1.2.2 Químicos

Los procesos convencionales de oxidación consisten en la reacción del HAP con oxidantes como ozono, cloro y permanganato de potasio, o en la formación de especies altamente reactivas que descomponen al HAP. Los métodos más comunes son la ozonólisis y fotólisis directa. En la ozonólisis, la degradación ocurre a través de la oxidación directa del contaminante por O<sub>3</sub>, provocando la ruptura de anillos mediante mecanismos electrofílicos, formando carboxilatos, quinonas y derivados oxigenados de compuestos alifáticos. La fotólisis directa consiste en la absorción de luz por los HAPs, provocando su excitación y potencial transformación en un catión radical y un electrón solvatado, el cual puede reaccionar con el oxígeno disuelto en el agua para formar una especie reactiva que oxida al HAP. La fotólisis depende del espectro de emisión del compuesto a degradar, la intensidad de la radiación emitida, el pH, temperatura y los componentes de la muestra. Estos métodos tienen como desventaja su alto costo de operación, debido a los equipos y reactivos empleados, junto a la formación de subproductos potencialmente

dañinos al reaccionar con otros componentes de la muestra, principalmente con materia orgánica, disminuyendo su efectividad.

Recientemente se han desarrollado procesos de oxidación avanzada formando el radical  $^{\circ}\text{OH}$ , altamente reactivo y capaz de atacar la mayoría de las sustancias orgánicas tóxicas, logrando su mineralización completa para producir  $\text{CO}_2$ , agua y iones inorgánicos como  $\text{SO}_4^{2-}$ , y  $\text{NH}_4^+$ . Se usan diferentes combinaciones de oxidantes, fuentes de energía y catalizadores para formar  $^{\circ}\text{OH}$  en el agua, clasificándose de manera general en procesos fotoquímicos; los cuales usan radiación UV-Visible con semiconductores y oxidantes químicos; y no fotoquímicos que incluyen técnicas que involucran energía eléctrica o ultrasónica para llevar a cabo la oxidación del agua o la ozonación en medio alcalino.

Entre los oxidantes usados para tratar a los HAPs destaca el reactivo de Fenton, conformado por sales ferrosas que actúan como catalizador y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cuando el ion  $\text{Fe}^{2+}$  reacciona con  $\text{H}_2\text{O}_2$  se lleva a cabo la disociación del oxidante, produciendo la especie  $^{\circ}\text{OH}$ . La eficiencia de estos procesos depende de varios parámetros, como la concentración del oxidante, intensidad de la luz, tiempo de reacción, pH, la rapidez de la generación del radical libre, las propiedades fisicoquímicas y concentración inicial del contaminante, al igual que los componentes de la matriz. Estos sistemas son fáciles de implementar, sin embargo, requieren altas cantidades de  $\text{Fe}^{2+}$ , tienen un alto costo de operación y son propensos a tener rendimientos menores a otros métodos debido a que involucran reacciones radicalarias en las que es difícil controlar las condiciones para que sólo se lleve a cabo la reacción de interés. Para mejorar su eficiencia y rentabilidad, suelen acoplarse a tratamientos biológicos, ya sea como pre o postratamiento.

La técnica electroquímica más común en los procesos de biorremediación es la oxidación anódica, que consiste en el paso de agua a través de electrodos en presencia de un electrolito. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la oxidación electroquímica de los HAPs inicia con la transferencia de electrones del hidrocarburo adsorbido al electrodo, formando radicales catiónicos que reaccionan directamente en la superficie del electrodo o con los oxidantes formados *in situ* como  $^{\circ}\text{OH}$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las principales desventajas son las limitantes en la transferencia de masa y la cantidad de energía necesaria para que el proceso se lleve a cabo, aunque destaca su aplicación en sistemas con una fuerza iónica alta, como aguas residuales con un alto contenido de metales (Rubio-Clemente et al, 2014).

### 1.2.3 Térmicos

La remediación térmica es aplicada principalmente para los HAPs contenidos en la tierra o en medios acuosos. Se tienen dos tipos principales de metodologías:

- Incineración: Consiste en la combustión de los HAPs al someterlos a temperaturas entre 900 y 1200 °C en una atmósfera rica en O<sub>2</sub>. Se obtienen principalmente H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Peng et al, 2019).
- Desorción térmica *in situ*: También conocida como calentamiento conductivo, permite separar físicamente los HAPs de la tierra al volatilizarlos o destruirlos. Entre sus ventajas se encuentra que casi no emite HAPs a la atmósfera, debido a que requiere el uso de un gas acarreador, o un sistema de vacío, el cual arrastra los compuestos volatilizados hacia un sistema de tratamiento de gases (Kuppusamy et al, 2017).

#### 1.2.4 Biorremediación

La biorremediación es el uso de microorganismos para degradar o remover contaminantes en el medio ambiente aplicando tratamientos biológicos. La efectividad depende del contaminante, su biodisponibilidad y la capacidad microbiana del medio que ha sido contaminado. Estos métodos son más convenientes que los fisicoquímicos y los térmicos, ya que no se transfiere el contaminante de una fase a otra ni se requiere de altas temperaturas para que se lleve a cabo, además de disminuir el uso de reactivos y se realiza en menor tiempo, implicando un menor consumo de energía. Cabe destacar que el proceso puede realizarse *in situ*, evitando el traslado de la muestra y minimiza las alteraciones al medio. En el caso de la biorremediación de contaminantes orgánicos, estos son convertidos en sustancias inocuas como CO<sub>2</sub>, agua y metano, por lo que es un método ecológico (Shahsavari et al, 2019; Cerniglia, 1993).

El proceso para realizar la biorremediación depende del tipo de contaminante y las características del medio a tratar. De manera general, se tienen las siguientes técnicas, independientemente de que se realicen *in situ* o en un biorreactor:

- Atenuación natural: Los microorganismos endógenos degradan los contaminantes sin añadir macronutrientes o microorganismos exógenos.
- Bioestimulación: Promueve el crecimiento de microorganismos endógenos mediante la adición limitada de macronutrientes exógenos, como nitrógeno, fósforo y carbono orgánico.
- Bioaumentación: Es empleada si no se cuentan con microorganismos adaptados para la degradación de contaminantes. La comunidad endógena es aumentada por la siembra de microorganismos capaces de degradar los contaminantes. La supervivencia de los inóculos exógenos es un limitante porque los microorganismos pueden no adaptarse al ambiente, debido a condiciones incompatibles o competencia con la comunidad endógena. Esto puede mitigarse aislando los cultivos de los microorganismos degradadores y reintroduciéndolos a concentraciones mayores.

Se ha demostrado que diversos microorganismos pueden biorremediar los HAPs, destacando algas, bacterias y hongos, usando diferentes rutas metabólicas y sustratos bajo condiciones aerobias y anaerobias. Históricamente, la mayoría de los estudios se han realizado en ambientes aeróbicos, cuya transformación es más rápida, aunque las condiciones anaeróbicas son promovidas cuando el grado de contaminación es alto y limita el flujo de oxígeno (Shahsavari et al, 2019). Para que el proceso se lleve a cabo, los HAPs deben estar disponibles al microorganismo, siendo facilitado si se encuentran disueltos o en fase gaseosa. Si el contaminante está adsorbido a partículas de tierra, no puede ser degradado debido a su separación de las enzimas que se encargan de su transformación (Abdel-Shafy y Mansour, 2016). De manera general, la rapidez de la degradación de los HAPs es inversamente proporcional al número de anillos en la molécula debido a que el tamaño del contaminante impide que el microorganismo pueda incorporarlo. La degradación es altamente regio y estereoespecífica porque, dependiendo del microorganismo que la lleva a cabo, se obtienen diferentes metabolitos, resaltando los HAPs funcionalizados con grupos ceto, hidroxil, dihidrodiol o grupos carboxilo. Los metabolitos pueden ser más móviles y biodisponibles que los HAPs de los que provienen, siendo descompuestos posteriormente mediante fenómenos bióticos o abióticos (Shahsavari et al, 2019; Pulleyblank et al, 2019).

#### 1.2.4.1 Bacterias

Las bacterias han desarrollado estrategias para obtener energía a partir de casi cualquier compuesto, por lo que algunas especies se han adaptado para degradar a los HAPs, usándolos como fuente de carbono y energía. Este proceso se da por dos vías, la degradación aeróbica, en la que el oxígeno actúa como receptor final de electrones y cosustrato para la ruptura del anillo; y la degradación anaeróbica, cuyas reacciones se dan en condiciones reductoras de sulfatos, metano y nitratos. Entre las especies capaces de degradar HAPs pequeños destacan las Gram-negativas *Sphingomonas*, *Sphingobium* y *Novosphingobium* y las Gram-positivas *Rhodococcus* (Ghosal et al, 2016; Shahsavari et al, 2019).

Generalmente se usan consorcios de microorganismos para que lleve a cabo la biorremediación. Se han realizado estudios con bacterias del género *Stenotrophomonas*, *Williamsia* y *Chitinophagaceae*, capaces de degradar hasta el 90% de una fortificación de 100 mg/L de HAPs como fenantreno, naftaleno y pireno en un periodo de 14 días (Blanco-Enríquez et al, 2018). Además, se ha investigado la oxidación química combinada con remediación microbiana de una biota local de muestras de suelo, enfocado en benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, naftaleno, pireno y fenantreno. El proceso tiene como limitante la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos, los cuales no están caracterizados y aislados, además

que implica el uso de agentes oxidantes fuertes, siendo fuente de nuevos contaminantes (Liao et al, 2018).

#### 1.2.4.2 Hongos

De manera general, los hongos capaces de realizar la degradación de HAPs se dividen en lignolíticos y no lignolíticos. La degradación es realizada principalmente por enzimas monooxigenasas, predominantes en los hongos no lignolíticos y son representativas de especies como *Cunninghamella elegans*, que producen trans-dihidrodiolés al degradar fluoranteno. En el caso de los hongos lignolíticos se encuentran las especies *Pleurotus ostreatus* y *Antrodia vaillantii*, capaces de descomponer fluoreno, fenantreno, pireno y benzo[a]antraceno.

La mayoría de los hongos no puede usar a los HAPs como su única fuente de carbono y energía, por lo que participan en procesos de co-metabolización con otros microorganismos. Estos pueden degradar diversos sustratos, incluso los más recalcitrantes, como la especie *Phanerochaete chrysosporium* que es capaz de oxidar pireno, antraceno, fluoreno y benzo[a]pireno, obteniendo sus respectivas quinonas (Ghosal et al, 2016).

#### 1.2.4.3 Microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que pueden ser eucariontes o procariontes. Se catalogan como microalgas verdes (*Chlorophyceae*), doradas (*Chrysophyceae*), rojas (*Rhodophyceae*), cafés (*Phaeophyceae*), cianobacterias (*Cyanophyceae*) y diatomeas (*Bacillariophyceae*), estimando que se han descubierto 80,000 especies, caracterizando alrededor de 40,000. Las microalgas son marcadores importantes de cambio ambiental, empleándose para evaluar el riesgo y expansión de contaminación por metales. Además, son de interés debido a la diversidad de aplicaciones en las que se han implementado recientemente, destacando su uso como fuente de biomasa para la producción de biocombustibles, captura y fijación de CO<sub>2</sub>, obtención de productos de interés para la agricultura y el tratamiento de contaminantes en agua (Jalilian et al, 2020).

Las microalgas tienen diversas aplicaciones en la biorremediación, principalmente para el tratamiento de metales pesados, pesticidas y contaminantes orgánicos como los HAPs. Estos procesos inician mediante la adsorción extracelular pasiva del contaminante, seguida de la difusión y acumulación intracelular; la cual se lleva a cabo a través de enlaces entre polisacáridos, lípidos y proteínas, con sus respectivos grupos funcionales, a metales pesados como arsénico, cadmio, cromo, plomo y mercurio (Leong y Chang, 2020). La biodegradación de pesticidas depende del metabolismo de varias enzimas, principalmente por las estererasas, transferasas

y citocromo P450, además de hidrolasas, fosfatasas, oxigenasas y oxidorreductasas. Este es un fenómeno de pasos múltiples que involucran la activación de los contaminantes carentes de grupos funcionales por la enzima citocromo P450, mediante reacciones de oxidación, reducción e hidroxilación para obtener compuestos más hidrofílicos, solubles y degradables, que posteriormente se conjugan con glutatión, glucosa y malonato para finalmente expulsarlos en transportadores de glutatión. Un ejemplo de la versatilidad de las microalgas es la especie *Chlorella vulgaris*, empleada en la biorremediación de atrazina, molinato, simazina, isoproturon, propanil, carbofurano, dimetoato y pendimetalina con una eficiencia de remoción mayor al 85% (Nie et al, 2019; Hussein et al, 2017). Entre las ventajas de las microalgas en la biorremediación resalta su gran diversidad filogenética y fisiológica, permitiendo el crecimiento de diversas especies en varias condiciones de pH, salinidad, contaminantes, temperatura, entre otras. Además, los requisitos energéticos de las microalgas son menores, debido a que los nutrientes presentes en aguas residuales; como nitrógeno, fosforo, carbono y azufre, pueden recuperarse en la biomasa en lugar de que se disipen en la atmósfera, reflejándose en un menor costo de operación (Nagarajan et al, 2020).

Se han encontrado diversas especies de microalgas capaces de remover HAPs de bajo peso molecular, como el naftaleno y fenantreno (Cerniglia et al, 1992). Los estudios que involucran a los HAPs de mayor tamaño resaltan especies como *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*. Entre ellas, las dos últimas han podido remover al BaP, produciendo dihidrodioles al degradarlo (Warshawsky et al, 1988) y que, al compararlas, el proceso es más rápido con *Selenastrum capricornutum*, actuando inicialmente mediante fenómenos de sorción del hidrocarburo a la célula (García de Llasera et al, 2016). A continuación, en la Tabla 1.6, se presenta la remoción de fluoranteno y pireno por algunas especies de microalgas.

Tabla 1.6 Registro de remoción de fluoranteno y pireno mediante microalgas (Lei et al, 2007).

Especie	Remoción (%)	
	Fluoranteno	Pireno
<i>Chlorella vulgaris</i>	46.7	41.3
<i>Scenedesmus platydiscus</i>	47.6	48.5
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	55.5	35.2
<i>Selenastrum capricornutum</i>	80.9	73.5

#### 1.2.4.3.1 *Selenastrum capricornutum*

La microalga verde *Selenastrum capricornutum*, también conocida como *Raphidocelus subcapitata*, es un microorganismo cuya clasificación ha sido discutida recientemente. La cepa NIVA-CHL fue aislada en Noruega en 1959 por O. M. Skulberg, quien le asignó su nombre basado en la forma de luna creciente de sus células, las cuales son mononucleares sin pirenoide con un volumen alrededor de 40 a 60  $\mu\text{m}^3$ . Su crecimiento puede afectarse si el medio contiene metales pesados, inhibiéndose en la presencia de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (Machado y Soares, 2014; Krienitz et al, 2011). Las células se ilustran en la Figura 1.2.

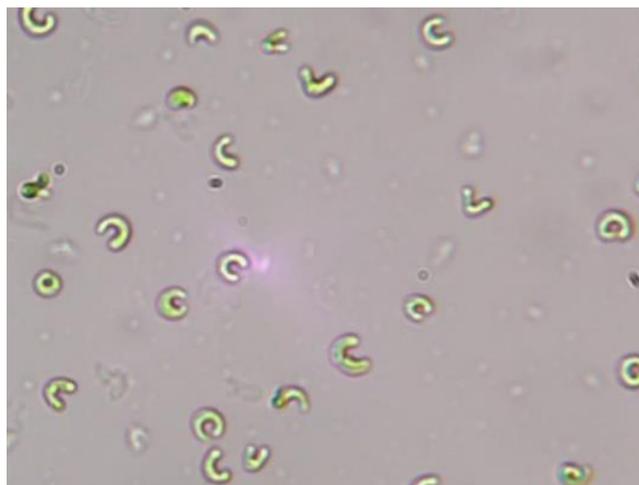
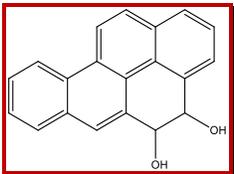
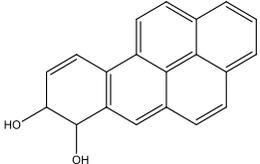
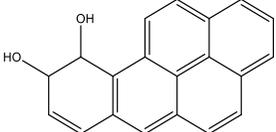
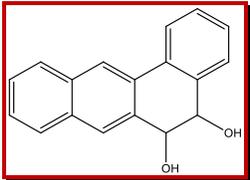
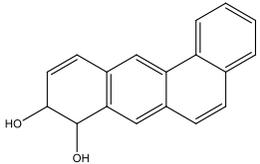
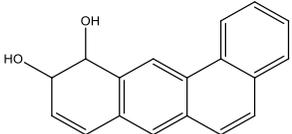


Figura 1.2 Células de *Selenastrum capricornutum*. Técnica de observación en fresco, aumento 40X. Imagen propia.

Se ha descubierto que la microalga degrada HAPs como fenantreno, fluoranteno y pireno, produciendo metabolitos hidroxilados y dihidrodioles que sugieren el uso de sistemas enzimáticos monoxigenasa y dioxigenasa, respectivamente (Chan et al, 2006). En el caso de moléculas de mayor tamaño, como el BaP y BaA, se han encontrado que la mayoría de los metabolitos son cis-dihidrodioles (Warshawsky et al, 1990). Al monitorearse se descubrió que estos no se forman con la misma proporción, cambiando su distribución entre la biomasa y el medio líquido con el tiempo, teniendo un máximo total que posteriormente disminuye debido a su descomposición (Hernández-Blanco y García de Llasera, 2016). En la Tabla 1.7 se muestran las estructuras de metabolitos dihidrodioles observados en la degradación de HAPs por *Selenastrum capricornutum* (Hernández-Blanco y García de Llasera, 2016), siendo los primeros tres originados a partir del BaP y los últimos al BaA. Se resaltan al 4,5-cis-dihidrodiol benzo[a]pireno y al 5,6-cis-dihidrodiol benzo[a]antraceno, los cuales fueron monitoreados en este trabajo.

Tabla 1.7 Metabolitos dihidrodioles de BaP y BaA (Hernández-Blanco y García de Llasera, 2016).

Metabolito	Estructura	Punto fusión (°C)	Punto ebullición (°C)	Log K <sub>ow</sub>
4,5-cisdihidrodiole benzo[a]pireno		218	512	3.83
7,8-cisdihidrodiole benzo[a]pireno		218	512	4.01
9,10-cisdihidrodiole benzo[a]pireno		210	499	4.01
5,6-cisdihidrodiole benzo[a]antraceno		198	460	4.56
8,9-cisdihidrodiole benzo[a]antraceno		178	496	3.25
10,11-cisdihidrodiole benzo[a]antraceno		178	475	3.42

Los metabolitos pueden alterarse estructuralmente o perderse durante su extracción y almacenamiento. Se deben evitar condiciones oxidantes y mantener los extractos en viales ámbar para evitar su fotodegradación (Pulleyblank, 2019).

Entre las condiciones que se han estudiado para la remoción de HAPs en condiciones complejas resaltan el efecto de metales como cadmio, zinc, cobre y níquel en la degradación de HAPs como fluoreno, fenantreno, fluoroanteno, pireno y benzo[a]pireno, y la inmovilización de las microalgas en alginato de calcio para protegerlas del medio. La inmovilización en alginato proporciona una matriz transparente que permite el paso de la luz, necesaria para la supervivencia y desarrollo de la microalga, otorgando un ambiente adecuado para las células (Moreno-Garrido, 2008). Se ha observado que las células inmovilizadas en alginato

pueden ser más eficientes en la remoción de hidrocarburos comparadas con las células libres, debido a la adsorción del contaminante en la matriz de alginato (Wang et al, 2013). Las células inmovilizadas se han empleado en biorreactores, cuantificando la remoción de BaP y BaA en mini reactores Batch con 90 perlas y 15 mL de medio (García de Llasera et al, 2018), los cuales se han escalado a 60 mL y 4000 mL, determinando sus parámetros de operación (Ramírez Madera, 2020).

### 1.3 Enzimas

Se han estudiado diversas enzimas que tienen actividad degradadora de diversos HAPs. La mayoría provienen de bacterias, hongos y microalgas, siendo en los primeros dos tipos de microorganismos en donde se han elucidado de forma más detallada. La biodegradación realizada por bacterias aeróbicas ha descrito el metabolismo de HAPs como naftaleno, fenantreno, pireno y antraceno, obteniendo cis-dihidrodiol por la acción de enzimas dioxigenasas, que posteriormente son descompuestos en ácidos orgánicos y compuestos carbonílicos. La degradación involucra la incorporación de O<sub>2</sub> en el sistema aromático, cuya reacción es catalizada por enzimas dioxigenasas, las cuales son proteínas multicomponentes formadas por ferredoxina, ferredoxina reductasa y una apoenzima hierro-azufre, siendo el paso limitante en la biodegradación. Posteriormente, la enzima cis-dihidrodiol deshidrogenasa recupera la aromaticidad del sistema, formando intermediarios dihidroxilados que son oxidados hasta la formación de catecol, realizando rupturas de los anillos y produciendo ácido succínico, fumárico, pirúvico, acético, aldehídos, CO<sub>2</sub> y agua (Shahsavari et al, 2019; Habe et al, 2003).

Diversos organismos metabolizan a los HAPs mediante enzimas que pertenecen al citocromo P450 (CYP). Estas son una familia de enzimas catalogadas como hemoproteínas que contienen entre 400-500 residuos de aminoácidos y un solo grupo prostético hemo en el sitio activo. Dichas biomoléculas están involucradas en el metabolismo de sustratos endógenos, incluyendo prostaglandinas, hormonas esteroidales y ácidos grasos, al igual que xenobióticos como alcoholes, HAPs y aproximadamente 60% de los medicamentos usados por seres humanos. Las enzimas CYP se han encontrado en animales, plantas, hongos y bacterias, enlazadas a membranas en células eucariontes o en formas solubles en organismos procariontes, ubicándose primordialmente en el retículo endoplasmático. En mamíferos, las enzimas CYP están en todos los tejidos, siendo más comunes en el hígado e intestino delgado, al igual que en las membranas mitocondriales internas de tejidos esteroideogénicos como testículos, ovarios y placenta. Las enzimas CYP son multifuncionales, teniendo acciones autónomas que frecuentemente no están relacionadas (Manikandan y Nagini, 2018).

Las enzimas CYP tienen una amplia especificidad de sustratos y catalizan varias reacciones redox incluyendo hidroxilación, oxigenación y destrucción del grupo hemo. Las reacciones de monooxigenación mediadas por CYP involucran la incorporación de un átomo de oxígeno en el sustrato. En general, las familias CYP 1 a 4 catalizan reacciones involucradas con la detoxificación de medicamentos y xenobióticos, aumentando su hidrofobicidad. Los metabolitos reaccionan frecuentemente con macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, formando aductos que provocan toxicidad celular y el inicio del proceso de cáncer debido al daño al ADN, induciendo rupturas en cromátidas, daño oxidativo o alteraciones estructurales como la ruptura de cadenas, rearrreglos cromosomales, eliminaciones y enlaces entre cadenas. Estos fenómenos se relacionan con la incidencia de cáncer en órganos como hígado, pulmones, riñones y leucemia (Poirier et al, 2004; Kim et al, 1998; Raunio et al, 2015; Santes et al, 2020).

Los hongos lignolíticos producen lacasas, y peroxidasas que son secretadas extracelularmente y pueden difundirse hacia los HAPs, generando radicales hidroxilos libres que oxidan a los hidrocarburos, obteniendo quinonas. Los metabolitos suelen ser menos mutagénicos que los compuestos de los que son originarios y no se degradan completamente, pero se pueden cometabolizar en conjunto con otros microorganismos para obtener residuos inocuos. Los hongos no lignolíticos usan enzimas monooxigenasas CYP para epoxidar al sistema aromático, formando como intermediarios óxidos de areno que pueden metabolizarse mediante epóxido hidrolasas, produciendo trans-dihidrodiol, o rearrreglarse sin la intervención de enzimas obteniendo fenol, capaz de conjugarse con sulfatos, ácido glucurónico, xilosa o glucosa. Se ha observado que los HAPs con cuatro o más anillos en su estructura pueden transformarse en una mayor cantidad de metabolitos diferentes, debido a que la reacción ocurre en diferentes sitios, como es el caso de la enzima PYR-1, proveniente de *M. vanbaalenti* (Erwin et al, 2019). Posteriormente se da la transformación a metabolitos n-hidroxilados, en los que se llevan a cabo reacciones sucesivas hasta obtener dionas, quinonas y ácidos ftálicos. (Guntupalli et al, 2019; Ghosal et al, 2016; Shahsavari et al, 2019). En la Figura 1.3 se describe, de manera general, la ruta de degradación que pueden seguir los HAPs al ser metabolizados por bacterias y hongos.

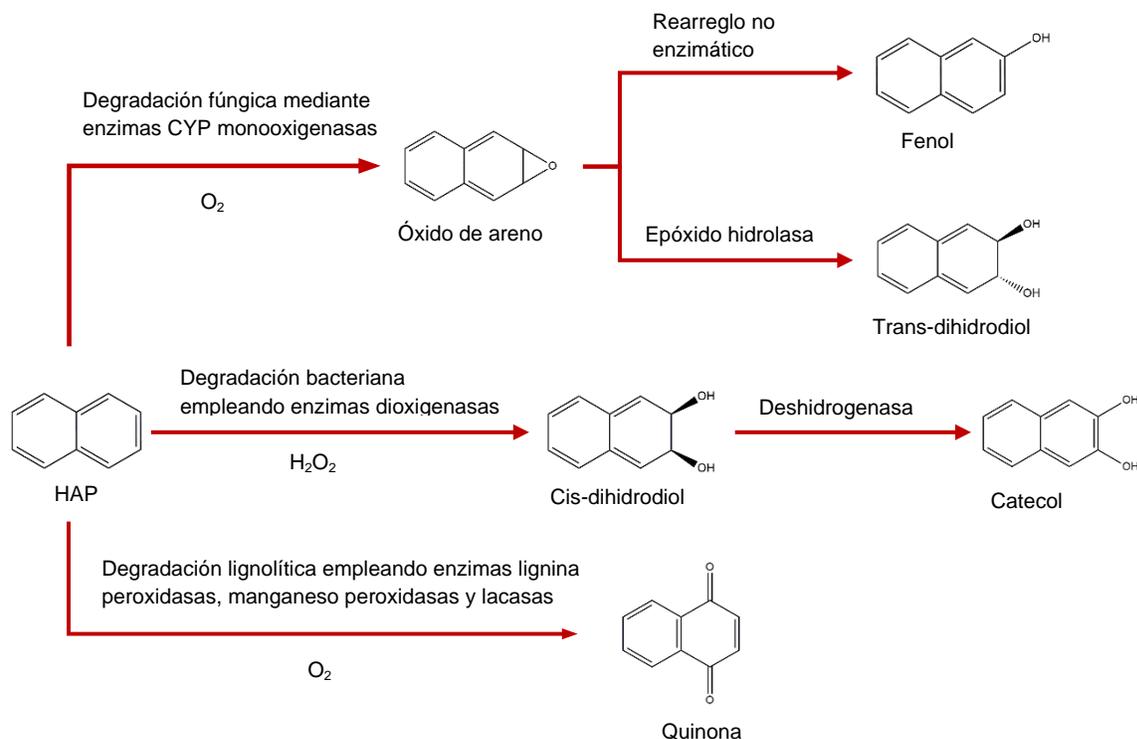


Figura 1.3 Esquema de degradación de HAPs por bacterias y hongos (Adaptado de Shahsavari et al, 2019).

La ruta metabólica realizada por microalgas no se ha descrito totalmente. Se han realizado estudios en cepas de *Chlorella vulgaris* proponiendo la acción de enzimas oxidantes para la apertura del anillo, de acuerdo a los metabolitos obtenidos (Asghari et al, 2019). Se ha observado la formación de metabolitos cis-dihidrodiol por las microalgas *Selenastrum capricornutum* (Warshawsky, 1988) y *Scenedesmus acutus* (García de Llasera et al, 2016) en HAPs de alto peso molecular, indicando que la enzima responsable puede ser una dioxigenasa. Asimismo, se han desarrollado metodologías para obtener extractos enzimáticos extra e intracelulares de *Selenastrum capricornutum*, evaluando su actividad degradadora de BaP. Es importante resaltar que estas enzimas se inducen como respuesta a la exposición de la microalga al hidrocarburo, por lo que las células se deben sensibilizar al contaminante antes de obtener los extractos enzimáticos (Fuentes Pérez, 2019).

Actualmente se han realizado estudios para elucidar el mecanismo molecular de la producción de estos metabolitos, basándose en el análisis estructural de enzimas Rieske no-hemo hierro dioxigenasas (RDO). El sistema RDO está compuesto de tres partes: oxigenasa, proteína reductasa de flavina y ferredoxina. Los electrones del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) son transferidos al núcleo del componente oxigenasa por la flavoproteína reductasa y la ferredoxina de Rieske. El

siguiente paso provoca la activación de la oxidación del sustrato, generando al metabolito. Como miembro importante de los RDO, la enzima naftaleno dioxigenasa (NDO) añade oxígeno a los HAPs para producir cis-dihidrodióles (Chen et al, 2020).

### 1.3.1 Uso en biorremediación

El uso de enzimas en la degradación de compuestos orgánicos presenta ventajas sobre los métodos que emplean microorganismos, destacando su versatilidad, eficiencia y especificidad al sustrato de interés. Pueden actuar en presencia de sustancias xenobióticas en una amplia variedad de condiciones ambientales que pueden ser desfavorables para los microorganismos. Además, las enzimas alcanzan sustratos en poros pequeños, aproximadamente 100 veces menores que las bacterias (Acevedo et al, 2010).

Entre las enzimas empleadas en los procesos de biodegradación destacan las peroxidasas, que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos al precipitarlos para facilitar su biodegradación. La mayoría de las enzimas usadas actualmente en procesos industriales son de acción hidrolítica, incluyendo lipasas y proteasas, predominantes en las industrias de detergentes, alimentos y químicos (Sellami et al, 2022).

Se han realizado estudios con enzimas manganeso peroxidasas provenientes del hongo *Anthracoephyllum discolor* en la degradación de HAPs, inmovilizándolas en microarcillas y evaluando su desempeño al variar el pH, temperatura y tiempo de almacenamiento. Se encontró que la inmovilización mantuvo un 60% de la actividad enzimática al almacenarse por 14 días, además de actuar en un intervalo amplio de pH y altas temperaturas, superando la actividad de la enzima libre a 50 °C y 60 °C. Esto sugiere que la inmovilización evita el cambio conformacional en la estructura terciaria de la enzima (Acevedo et al, 2010).

Las enzimas también han sido empleadas para detectar y cuantificar el estado del medio antes, durante y después de los procesos de remediación, actuando como biosensores a moléculas específicas o a sus derivados. Los biosensores son dispositivos integrados que pueden dar información cuantitativa usando un elemento de reconocimiento biológico, como enzimas, fragmentos de ADN o células, que está retenido en contacto directo con un elemento de transducción. Debido a su alta selectividad y sensibilidad, bajo costo, diseño adaptable y corto tiempo de respuesta, los biosensores son más benéficos y rentables que otras técnicas analíticas, permitiendo su uso *in situ* (Rao et al, 2014; Sellami et al, 2022).

### 1.3.2 Efecto de la temperatura

La actividad de las enzimas depende de diversos factores, como el pH, cantidad de sustrato y fuerza iónica, aunque entre ellos el más crucial es la temperatura. De manera similar a las reacciones químicas, la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente aumenta por un factor de 2-3 por cada 10 °C. No hay un límite superior para el incremento, pero al llegar a cierta temperatura esta se detiene hasta que la rapidez de reacción se aproxima a cero. La disminución se debe a la inestabilidad térmica de la proteína, ya que sufre cambios conformacionales que afectan su actividad (Bisswanger, 2017).

Las enzimas suelen mostrar su mayor actividad catalítica en un intervalo pequeño de temperatura, típicamente de 5 °C, entre 40-50 °C, como el caso de las lacasas, que son óptimas a 45 °C (Kadri et al, 2017). Su estabilidad aumenta al elegir el pH adecuado de la disolución, debido a que son menos solubles en pH cercano a su punto isoeléctrico, condición en la que el desdoblamiento térmico es altamente favorable. La actividad de las biomoléculas se pierde permanentemente a 70-80 °C, con la excepción de algunas enzimas termofílicas. Las enzimas más termosensibles sufren de inactivación a temperaturas bajas, como la alcohol deshidrogenasa, que pierde su estabilidad a 30 °C. La mayoría de las enzimas mantienen su estabilidad durante meses si son refrigeradas. Su congelación debe evitarse porque provoca cambios en la tensión superficial y variación del pH, acompañadas de formación de cristales de hielo (Purich, 2010).

Hasta el momento, no se han reportado estudios que evalúen el efecto de la temperatura en la degradación de HAPs mediante enzimas, sin embargo, se ha observado que la bacteria *Planomicrobium alkanoclasticum* es capaz de degradar en un 91% a los 16 HAPs prioritarios por la EPA de manera óptima a 35 °C y pH 7.5 en incubaciones de 15 días (Al-Dossary et al, 2021).

### 1.3.3 Lisis ultrasónica para la extracción de biomoléculas

La lisis celular es un paso importante en la extracción de biomoléculas celulares, siendo el inicio del proceso de separación, por lo que debe tener un rendimiento alto, sin pérdida o contaminación del producto. Los métodos empleados se dividen, de forma general, en mecánicos y no mecánicos:

- Mecánicos: Suelen considerarse severos, ya que no son específicos y se basan en principios que promueven la destrucción de la pared celular mediante fuerzas de corte líquidas; como la homogenización y microfluidización, fuerzas de corte sólidas; que incluyen al molino de perlas

y la homogenización a alta velocidad, intercambio de energía a través de ondas ultrasónicas, corriente eléctrica o tratamiento térmico.

- No mecánicos: Catalogados como suaves porque son menos agresivos con las células, cuentan con una mayor selectividad y especificidad. Se dividen en físicos; como el congelamiento en seco y químicos; que incluyen la hidrólisis ácida y el tratamiento enzimático (Gomes et al, 2020).

El método a emplear depende del tipo de célula, las biomoléculas de interés dentro de la misma y la escala a la que se realizará el proceso. La ultrasonificación es un método fácil de montar, reproducible, rápido y manejable a bajas temperaturas con un costo energético mínimo. La técnica consiste en una acción de corte intensa generada por ondas sonoras de alta frecuencia que producen el fenómeno de cavitación, el cual involucra la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor. Al colapsar, se promueven ondas de choque elásticas que pueden dañar la pared celular debido a su alta presión, que suele encontrarse alrededor de 200 MPa. Se deben emplear ciclos de refrigeración y baños de hielo para evitar la degradación de compuestos termolábiles, con sonicaciones cortas que impiden la formación de radicales libres que disminuyen la calidad de los componentes extraídos. La disrupción celular depende de la intensidad del ultrasonido, características de la burbuja de aire y la distancia relativa con las células (Aarthy et al, 2018).

El equipo más común a nivel laboratorio es una sonda de titanio en el que la energía mecánica, transducida por el convertidor ultrasónico, promueve la cavitación. Los parámetros críticos en el proceso son la intensidad acústica, temperatura, concentración celular y tiempo de tratamiento (Wu et al, 2015). Estos parámetros pueden ajustarse para hacer una disrupción parcial y liberar selectivamente los componentes intracelulares. La técnica tiene una mayor selectividad en la liberación de enzimas periplasmáticas y proteínas recombinantes incrustadas en la membrana o insolubles (Gomes et al, 2020).

El método de lisis con sonda ultrasónica es adecuado para las microalgas, permitiendo la ruptura efectiva de su pared celular. En general, la pared celular de las algas es estructuralmente similar a las plantas, conformada de matrices fibrilares y polímeros cristalinos formados principalmente de celulosa. Su estructura dificulta el proceso de extracción de macromoléculas, por lo que la elección del método de disrupción celular depende del tipo de alga, la estructura de su pared y su composición. (Aarthy et al, 2018).

#### 1.3.4 Inmovilización

La inmovilización enzimática es el confinamiento de la enzima a una fase, conocida como matriz o soporte, diferente de los sustratos y productos. Un soporte ideal debe

ser económico, inerte, estable, capaz de aumentar la especificidad y actividad de la enzima al reducir la inhibición del producto, adsorción no específica y contaminación microbiana (Datta et al, 2013). La inmovilización permite mejorar la estabilidad de las enzimas, protegiéndolas de su desnaturalización causada por condiciones del medio como la temperatura y el pH. Asimismo, la inmovilización aumenta la eficiencia enzimática y permite recuperarlas fácilmente del medio de reacción, prolongando su vida operacional. Estas ventajas permiten usar las enzimas en aplicaciones prácticas, ya que en su forma libre cuentan con una baja estabilidad operacional y dificultad para almacenar (Rao et al, 2014; Sellami et al, 2022).

Las enzimas inmovilizadas han adquirido mayor importancia en procesos biotecnológicos como reactores y biosensores, contando con propiedades químicas, bioquímicas, mecánicas y cinéticas específicas que son determinadas por la enzima, el soporte y las interacciones que tienen entre sí. Para elegir el método de inmovilización y soporte adecuados se deben considerar los grupos funcionales y la pureza de la enzima, al igual que el peso molecular, debido a que los efectos estéricos pueden dificultar la adhesión de las moléculas al soporte.

Los métodos de inmovilización se agrupan en cuatro tipos generales; adsorción, unión covalente, enlace cruzado y atrapamiento. El atrapamiento consiste en la inmovilización de la enzima en una membrana semipermeable, permitiendo la difusión de moléculas pequeñas. La enzima se añade a una disolución del monómero y, después de mezclarse, se polimeriza, manteniendo su integridad y actividad debido a que no está en contacto directo con el medio. Este método retiene a la enzima sin modificar sus grupos funcionales o conformación para interactuar con el soporte, evitando la disminución de su actividad.

Los soportes empleados en la inmovilización por atrapamiento se clasifican en inorgánicos y orgánicos:

- Inorgánicos. Son estables e inertes a altas temperaturas y presiones, presentan dificultades para crear diversas formas geométricas y son susceptibles a abrasión al mezclarse. Los materiales más usados son sílica, minerales como bentonita, kaolinita, montmorillonita y sepiolita, junto a materiales basados en carbono, como nanotubos y grafeno, estos últimos teniendo un mayor costo al usarse, compensado con una mayor estabilidad mecánica y la posibilidad de funcionalizar su superficie para favorecer las interacciones con la enzima.
- Orgánicos. Obtenidos a partir de recursos renovables, tienen como ventaja su biocompatibilidad, biodegradabilidad y nula toxicidad, al igual que una excelente afinidad a las enzimas que permite conservar su estructura y propiedades. Pueden modificar las características de su superficie debido a

la presencia de grupos hidroxilo, amino y carbonilo, con los cuales se inmoviliza la enzima mediante enlaces covalentes o adsorción. A diferencia de los materiales inorgánicos, los biopolímeros pueden crear diversas formas geométricas y geles, permitiendo la inmovilización por microencapsulación o atrapamiento. Entre los materiales usados destacan el alginato, almidón, celulosa, quitosán, colágeno, y pectina (Spasojević et al, 2019).

El alginato de sodio es un polisacárido derivado de ácidos algínicos, conformados por 1,4-β-D-ácido manurónico y α-L-ácido gulurónico. Es un componente de algas cafés marinas, *Phaeophyceae*, y contienen aproximadamente 30-60% de ácido algínico. La conversión de ácido algínico en alginato de sodio permite su solubilidad en agua, facilitando su extracción. Algunas bacterias de la familia *Pseudomonas* y *Azobacter* pueden sintetizar alginato con una composición definida de sus monómeros para obtener propiedades específicas (Loureiro 2017). Entre sus características resalta su bajo costo, nula toxicidad, alta biocompatibilidad y la capacidad de formar geles en condiciones suaves al mezclarlo con disoluciones que contienen cationes divalentes como Ca<sup>+2</sup> (Won et al 2005). El tamaño de poro en las perlas y la cantidad de enzima atrapada puede controlarse modulando la concentración de alginato de sodio; si esta aumenta se obtiene una red entrecruzada extensa, reduciendo el tamaño del poro y la transferencia de masa o difusión del sustrato al sitio activo de la enzima. Por lo contrario, si la concentración disminuye, los poros del gel son más amplios, teniendo el riesgo de que la enzima se fugue del soporte (Prianka et al, 2019). Un beneficio importante que tiene el uso del alginato es la ausencia de enlaces covalentes entre el soporte y la enzima, reflejado en un alto rendimiento catalítico y la preservación de la conformación de la biomolécula. Entre las desventajas se encuentra la posible disminución de la actividad catalítica, debido a la formación de interacciones relativamente más débiles que provocan la lixiviación de la enzima desde la matriz, al igual que restricciones en la difusión de los sustratos (Bilal et al, 2019).

El desarrollo de un proceso de inmovilización requiere varios ensayos que describan su efecto en la actividad enzimática. Las condiciones de inmovilización son evaluadas al medir la actividad de la enzima libre. Posteriormente, se cuantifica la actividad en el medio con la enzima inmovilizada para conocer el porcentaje de inmovilización. Finalmente se determina la actividad en la suspensión inmovilizada. Si la actividad final no concuerda con las mediciones realizadas puede indicar que hubo pérdidas de enzimas al realizar los lavados subsecuentes a la inmovilización. Es importante elegir las condiciones de inmovilización adecuadas para evitar problemas estéricos en los que el sitio activo no entra en contacto con el sustrato, o difusión limitada en el que las moléculas enzimáticas internas no tienen sustrato disponible para llevar a cabo la reacción (Boudrant et al, 2020).

Las enzimas inmovilizadas muestran una dependencia diferente al pH y fuerza iónica, particularmente si estos parámetros cambian por la misma reacción enzimática. La acumulación de los productos por difusión puede desplazar el pH óptimo por 1 o 2 unidades, en comparación con lo observado en enzimas libres. Al graficar su velocidad de reacción, las enzimas inmovilizadas frecuentemente muestran partes heterogéneas que se observan como transiciones entre regiones de diferentes curvas. Esto sucede en el intervalo de temperaturas bajas, debido a que la reacción enzimática es muy lenta y los fenómenos de difusión no son predominantes. A temperaturas mayores la rapidez de conversión se incrementa y el sustrato disminuye, por lo que la reacción total puede mostrar los límites asociados a la difusión, representados como disminuciones en la pendiente de la gráfica. (Bisswanger, 2017).

#### 1.4 Métodos de preparación de muestra con adsorbentes

La preparación de la muestra es una etapa crucial en el proceso analítico, suele tener varios pasos y requiere de la mayor cantidad de tiempo en el análisis. Su importancia radica en que, al realizarse de manera adecuada, se obtienen resultados precisos y reproducibles. Los HAPs y los metabolitos producidos por la degradación microbiana se encuentran en cantidades a nivel de trazas, por lo que requieren métodos de extracción y preconcentración de la muestra, con el propósito de remover las impurezas provenientes de la matriz y recuperar selectivamente a los analitos en extractos que posteriormente podrán ser cuantificados.

Dependiendo de la muestra, se pueden emplear diversos métodos de extracción basados en técnicas como la Extracción en Fase Sólida (EFS) para líquidos y la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para semisólidos y sólidos. La EFS es una técnica rápida y simple que usa una menor cantidad de disolventes que otros tipos de extracción clásicos, capaz de acoplarse a sistemas en línea (en inglés on-line) y en diferido (en inglés off-line). La DMFS es una versión derivada de la EFS, en donde la muestra se mezcla directamente con el adsorbente y en cuyo proceso se puede combinar la disrupción, extracción y purificación en un solo paso. Una de las principales ventajas de ambas técnicas es la variedad de adsorbentes que pueden emplearse, siendo específicos a cierto tipo de analitos, dependiendo de su estructura y las interacciones que se llevan a cabo entre ellos (Faraji et al, 2019; Wianowska y Gil, 2019).

La EFS y la DMFS son las técnicas de extracción utilizadas en este trabajo, por lo que se describen con detalle a continuación.

### 1.4.1 Extracción en Fase Sólida

La EFS se basa en la transferencia de los analitos contenidos en una matriz líquida hacia un adsorbente sólido. De manera tradicional, la muestra fluye a través del adsorbente, el cual retiene los compuestos debido a las interacciones favorables que tienen con la fase sólida.

La técnica suele llevarse a cabo usando cartuchos hechos de polipropileno o vidrio que actúan como columnas cortas y contienen al adsorbente empacado entre dos filtros de polietileno o politetrafluoroetileno. Sus principales ventajas destacan su bajo precio, la reducción en el tiempo de procesamiento de la muestra y el uso de una menor cantidad de disolventes. De manera general, la EFS consiste en cuatro pasos: acondicionamiento de la columna, carga de la muestra, lavado y desorción de la muestra. En el acondicionamiento se da un lavado de la fase estacionaria para eliminar posibles impurezas y solvatar el adsorbente. La carga de la muestra se realiza permitiendo que se alcance un equilibrio entre la fase líquida y el adsorbente, dejando pasar la muestra a través el cartucho por gravedad. Los lavados del cartucho se llevan a cabo con disolventes que tienen la fuerza de elución adecuada para remover los interferentes de la muestra. Finalmente, los analitos se recuperan al desplazarse con un disolvente adecuado, obteniendo la mayor preconcentración de la muestra al eluir con el menor volumen posible, el cual puede reducirse si se emplea una desorción térmica. La efectividad de los métodos depende de varios factores, como el adsorbente, pH, tratamiento de la muestra, disolventes orgánicos empleados y el flujo de la fase móvil durante el proceso.

Los adsorbentes usados para EFS se pueden clasificar en óxidos inorgánicos de baja especificidad, abarcando las fases basadas en sílice, polímeros porosos y carbón; y de alta especificidad, incluyendo a los adsorbentes de intercambio iónico, macrocíclicos y polímeros impresos molecularmente. La sílice puede usarse como adsorbente sin necesidad de modificar su estructura, incorporando diferentes grupos funcionales a su superficie para aumentar su selectividad. Los adsorbentes unidos químicamente, como C1, C2, C8, C18, Ph, CN y NH<sub>2</sub>, pueden usarse en muestras similares, principalmente para compuestos neutros de diferente polaridad en muestras acuosas. Para la determinación de HAPs y otros contaminantes orgánicos persistentes se emplean adsorbentes basados en sílice como C18. En estos, la retención es determinada por interacciones dispersivas acompañadas de fuerzas intermoleculares, destacando las fuerzas de Van der Waals, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , puentes de hidrógeno y dipolo-dipolo, dependiendo de la estructura y grupo funcional del adsorbente y de los analitos. Los adsorbentes se caracterizan por tener fuerza mecánica, gran área superficial y la capacidad de retener cantidades grandes de muestra dejando pasar la mayor parte del líquido (Faraji et al, 2019; Poole, 2020).

#### 1.4.2 Dispersión de Matriz en Fase Sólida

La DMFS es una técnica de extracción y limpieza simultánea desarrollada por Steven A. Barker en 1989 para muestras sólidas o semisólidas. En ella, la muestra se desintegra en presencia de un soporte sólido que produce su disrupción completa, creando una nueva fase que se transfiere a una columna para la elución de los analitos. Esta técnica requiere de pocas cantidades de disolvente y muestra para llevar a cabo la extracción y, en algunos casos, no requiere una purificación adicional. La DMFS es ampliamente usada para tratar material biológico debido a que al homogenizar se destruye la estructura celular, aumentando la rapidez y eficiencia de la extracción.

El procedimiento consiste en la homogenización de la muestra con el adsorbente, la cual suele realizarse en morteros de ágata. En este paso el adsorbente actúa como un abrasivo que promueve la disrupción de la estructura física de la muestra, dispersándola en partes pequeñas. Después, la mezcla se transfiere a un cartucho de EFS que contiene un filtro en el fondo, colocando otro después de la muestra para empacarla, evitando la formación de burbujas. Posteriormente, se realizan lavados para eliminar los interferentes presentes en la matriz, con la posibilidad de añadir un cosorbente en el fondo de la columna para realizar una limpieza *in situ* adicional. Finalmente, se recuperan los analitos al eluir con un solvente adecuado, usando un sistema de vacío.

Se cuentan con varias diferencias entre EFS y DMFS. En DMFS, se consigue una disrupción y dispersión completa de la muestra en toda la columna, proporcionando una mejor superficie para la extracción. En el caso de la EFS, si la muestra es sólida, su disrupción debe realizarse antes de su aplicación en el cartucho de extracción en forma líquida porque muchos componentes de la misma se descartan antes de la extracción. Además, en EFS la muestra líquida inicialmente se retiene como una banda en los primeros milímetros del adsorbente empacado y progresivamente migra con la fase móvil. Finalmente, las interacciones físicas y químicas son mayores en DMFS que en EFS.

Los adsorbentes usados en DMFS son similares a los de EFS, siendo mayoritariamente C18 y Florisil para fase reversa y normal, respectivamente. Estos requieren tener una gran área superficial, buena dispersión y contacto con el disolvente si se usan adsorbentes con un tamaño de partícula entre 40 y 100  $\mu\text{m}$ , aunque pueden usarse fases estacionarias con un tamaño de partícula menor, con el inconveniente del aumento en su tiempo de elución y un posible bloqueo de las columnas (Poole, 2020; Wianowska y Gil, 2019).

## 1.5 Análisis cromatográfico

Debido a su carácter carcinogénico, los HAPs son analitos de interés en muestras ambientales y alimentos, por lo que se ha buscado monitorear y cuantificarlos mediante técnicas sensibles a ellos para determinar si la muestra analizada está por encima de los límites permitidos. De igual forma, el monitoreo de los metabolitos es fundamental para estudiar el mecanismo de degradación de los HAPs, considerándolos como biomarcador de contaminación por estos compuestos.

La cromatografía de gases y de líquidos de alta eficiencia se han empleado para el análisis de HAPs y sus metabolitos en muestras ambientales, destacando su poder de separación que permite diferenciar isómeros estructurales producidos en la biodegradación de los HAPs, siendo indistinguibles en su determinación por otros medios. En ambas técnicas es frecuente el uso de espectrómetros de masas como detectores, particularmente al analizar los metabolitos de degradación, ya que sus espectros permiten la identificación completa o parcial de compuestos desconocidos, mejorando la detección o cuantificación de compuestos coeluyentes.

La cromatografía de gases es considerada mejor para la separación, identificación y cuantificación de HAPs volátiles y térmicamente estables, ofreciendo alta selectividad y mejor resolución. Sin embargo, puede no ser adecuada para el análisis de HAPs de alto peso molecular con masas atómicas superiores a 300 debido a su baja volatilidad, descomposición a altas temperaturas y adsorción al sistema cromatográfico. Adicionalmente, la técnica presenta dificultades en la determinación de sus metabolitos de degradación termolábiles, ya que requieren de una derivatización previa a su cuantificación.

La cromatografía de líquidos cuenta con ventajas específicas sobre su contraparte de gases, destacando el potencial de analizar directamente las muestras acuosas y la capacidad de cuantificar una mayor cantidad de compuestos con grupos hidroxilo y carboxilo sin necesidad de derivatizarlos. En general, la técnica es aplicada en HAPs conjugados o con grupos de ácido carboxílico, debido a que se encuentran ionizados o pueden ionizarse con facilidad. Típicamente, las muestras son separadas mediante cromatografía en fase reversa, usando como fase estacionaria empaques de C18, capaces de separar exitosamente diversos metabolitos oxigenados de diferente funcionalidad en la misma corrida cromatográfica. La complejidad de la muestra y las interferencias de la matriz son retos significativos para alcanzar la separación e identificación adecuada de los analitos, por lo que la mayoría de los trabajos se enfocan en una categoría de estos compuestos, obtenidos mediante métodos de separación como EFS o DMFS en los que se remueven interferentes de la muestra para posteriormente recuperar los analitos en fracciones adecuadas para su análisis.

Los detectores más usados en el análisis de HAPs mediante cromatografía de líquidos son ultravioleta, fluorescencia y arreglo de diodos, cuantificando a los analitos debido a la presencia de sistemas  $\pi$  conjugados capaces de absorber esta radiación. Los detectores con arreglos de diodos son empleados con mayor frecuencia en la investigación de compuestos desconocidos, debido a que no todos los metabolitos fluorescen y su espectro puede usarse para la identificación de compuestos. Al ser más selectivos y sensibles, los detectores de fluorescencia son empleados para monitorear metabolitos, cuantificando su producción incluso a niveles de nanogramos por mililitro.

La dificultad en establecer técnicas estandarizadas para el análisis de los metabolitos originarios de los HAPs es por la amplia diversidad de estos compuestos, con diferentes características químicas y la complejidad de las matrices, dificultando la validación de las técnicas. Además, la incertidumbre en la selección de estándares internos y limitada disponibilidad comercial plantea un gran problema para establecer métodos robustos (Pulleyblank et al, 2019; Famiyeh et al, 2021).

#### 1.5.1 Validación del método

Para validar el método de cuantificación, se evalúan los siguientes parámetros correspondientes a los analitos a determinar:

- Intervalo de comportamiento lineal. Intervalo de concentración del analito dentro del cual la respuesta del detector es directamente proporcional a la concentración.
- Límite de detección. Concentración del analito que da una relación señal/ruido definida, típicamente 3 veces mayor al ruido.
- Límite de cuantificación. Concentración del analito con una señal más intensa y permite medirse con exactitud. Generalmente se considera un valor de 10 veces respecto a la relación señal/ruido.
- Precisión. Medida de la repetibilidad de un resultado, teniendo como parámetro la dispersión entre los resultados obtenidos.
- Recobro. También conocido como recuperación, indica la relación entre el valor obtenido al aplicar un método a la muestra, contra el valor obtenido al no aplicarlo. Para que éste sea satisfactorio, debe ser entre 70 a 100 %.

La Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC) es una de las instituciones encargadas de la regulación de métodos analíticos para el análisis de agua, alimentos, fármacos, materias primas y productos biológicos. De acuerdo a ella, se han descrito los criterios de aceptación que deben cumplir los métodos de

análisis para considerar a los resultados obtenidos mediante ellos como confiables (CCAyAC, 2011). En las Tablas 1.8 y 1.9 se presentan los criterios de aceptación para los parámetros evaluados en este trabajo, al igual que la recuperación de residuos y contaminantes en agua y alimentos.

Tabla 1.8 Criterios de aceptación de parámetros de desempeño (CCAyAC, 2011).

Parámetro	Criterio de aceptación
Intervalo lineal	a) Comportamiento lineal en la gráfica respuesta analítica en función de la concentración del analito b) Datos aleatorios en 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 o ingrediente activo
Límite de detección	Los establecidos en la referencia original del método
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. En caso de no estar disponibles, referirse a la Tabla 1.9

Tabla 1.9 Recuperación para residuos y contaminantes en alimentos y agua (CCAyAC, 2011).

Concentración del analito	Criterio de aceptación
< 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$	50-120%
1 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$	60-120%
10 a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ó $\mu\text{g}/\text{L}$	70-120%
0.1 a 100 $\text{mg}/\text{kg}$ ó $\text{mg}/\text{L}$	70-110%
100 a 1000 $\text{mg}/\text{kg}$ ó $\text{mg}/\text{L}$	85-110%

## 2. Desarrollo experimental

### 2.1 Equipo, material de uso y reactivos

#### Equipo

- Agitador orbital Thermo Scientific Compact Digital Mini Rotator.
- Autoclave Tuttnauer 2540EL.
- Balanza analítica Mettler-Toledo AG245.
- Balanza analítica Ohaus Adventurer Pro AV114C.
- Centrífuga Fisher Scientific 225.
- Cromatógrafos de líquidos de alta resolución.
  - Varian, Bomba ProStar 210. Precolumna de acero inoxidable (20 mm x 2.0 mm diámetro interno) empacada con sílice Nucleosil C18 (diámetro de partícula 5  $\mu\text{m}$ ). Columna Thermo-Scientific Hypersil ODS (150 mm x 4.6 mm diámetro interno, diámetro de partícula 5  $\mu\text{m}$ ) 10025855. Detector UV-Visible Polychrom 9065 Software LC Workstation 6.41.
  - Lab Alliance Serie II. Precolumna de acero inoxidable (20 mm x 2.0 mm diámetro interno) empacada con sílice Nucleosil C18 (diámetro de partícula 5  $\mu\text{m}$ ). Horno Phenomenex TS-130. Columna Perkin-Elmer Spheri-5-ODS (250 mm x 4.6 mm diámetro interno, diámetro de partícula 5  $\mu\text{m}$ ) 217342. Software Clarity Chromatography Station 2.8.1.584. Detector de fluorescencia Linear Instruments LC 305.
- Espectrofotómetro UV-Visible Genesys 10 S.
- Foco de luz fluorescente 40 W.
- Agitador orbital con incubadora Jeio Tech SI-600R.
- Micropipeta Eppendorf 20-250  $\mu\text{L}$ .
- Micropipeta Eppendorf 100-1000  $\mu\text{L}$ .
- Microscopio óptico National B2-220.
- Potenciómetro Corning 220.
- Rotavapor Büchi R-205.
- Sonicador Branson 1510, punta 1/8.

#### Material de uso

- Cartuchos de polipropileno de 1 mL y 6 mL.
- Celdas de metacrilato (1 cm paso óptico).
- Filtros circulares de polietileno de 20  $\mu\text{m}$ , diámetro 6.4 mm y 12.7 mm.
- Jeringa de plástico 20 mL con adaptador.
- Matraces Erlenmeyer de 50 mL y 150 mL.
- Matraz Kitasato con tapón horadado.

- Mortero de ágata y pistilo.
- Pipeta graduada de 10 mL.
- Pipetas volumétricas de 4 mL y 15 mL.
- Portaobjetos.
- Tubos para centrífuga 6 mL y 15 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL y 150 mL.
- Viales ámbar de 2 mL y 4 mL.
- Viales transparentes de 2 mL y 4 mL.

#### Reactivos

- Agua grado cromatográfico, desionizador Millipore Simplicity UV (resistividad de 18.2 M $\Omega$ /cm).
- Alginato de sodio, Sigma-Aldrich.
- Citrato de sodio, Sigma-Aldrich.
- Cloruro de calcio dihidratado, Sigma-Aldrich.
- Disolventes (Acetonitrilo, isopropanol, metanol) grado HPLC, J. T. Baker EUA.
- Estándares de metabolitos (4,5-dBaA, 5,6-dBaP) Pureza > 99%, MRI Global Research Institute Missouri EUA.
- Estándares de BaP y BaA Pureza > 99 %, Chemservice EUA.
- Medio Bristol.
- Proteosa peptona, MCD Lab.
- Sílice Supelclean LC-18 diámetro de partícula 45  $\mu$ m, Supelco.
- Tris(hidroximetil)aminometano, Bio-Rad.

## 2.2 Planteamiento general

En la Figura 2.1 se presentan las actividades realizadas en el desarrollo experimental, clasificándolas en tres partes principales.

### Preparación de muestra e inmovilización

- Crecimiento y mantenimiento de *Selenastrum capricornutum*.
- Separación de la biomasa del medio líquido.
- Obtención de extractos enzimáticos intracelulares.
- Optimización de inmovilización de extractos intracelulares.

### Métodología analítica

- Validación de sistemas cromatográficos para BaP, BaA, 4,5-dBaP y 5,6-dBaA.
- Validación de metodologías EFS-CLAR-UV y DMFS-CLAR-UV para BaP y BaA, y EFS-CLAR-DF y DMFS-CLAR-DF para 4,5-dBaP y 5,6-dBaA en medio líquido y biomasa.
- Validación de metodologías EFS-CLAR-UV para BaP y BaA, y EFS-CLAR-DF para 4,5-dBaP y 5,6-dBaA en extractos intracelulares inmovilizados.

### Bioensayos de exposición

- Degradación de HAPs con células de *Selenastrum capricornutum*.
- Degradación de BaP con extractos enzimáticos intracelulares de *Selenastrum capricornutum* inmovilizados.

Figura 2.1 Esquema general de actividades experimentales.

## 2.3 Preparación de muestra e inmovilización

### 2.3.1 Crecimiento y mantenimiento de *Selenastrum capricornutum*

La microalga *Selenastrum capricornutum* se obtuvo a partir de una cepa pura adquirida de “The culture collection of algae (UTEX)”, de la Universidad de Texas. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 100 mL de medio Bristol con 100 mg de proteosa peptona, los cuales se homogenizaron y se taparon con un tapón de tela y algodón. Posteriormente se esterilizaron en una autoclave por 20 minutos a 120 °C. La Tabla 2.1 presenta la composición del medio Bristol.

Tabla 2.1 Componentes de medio Bristol para cultivo de *Selenastrum capricornutum*.

Reactivos	Concentración (mmol/L)
NaCl	0.43
NaNO <sub>3</sub>	2.94
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.29
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.43
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.17
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.30

En condiciones de asepsia se tomó una asada de la microalga *Selenastrum capricornutum*, previamente cultivada en tubos con medio sólido de agar y proteosa peptona, depositándola en un matraz con medio Bristol estéril. El matraz se mantuvo bajo agitación orbital y con lámparas de luz blanca, sometido a periodos de luz y oscuridad de 16 y 8 horas. Los cultivos líquidos y sólidos en crecimiento se muestran en la Figura 2.2.



Figura 2.2 Cultivos de *Selenastrum capricornutum*.

El monitoreo del crecimiento de las microalgas se basa en la detección de clorofila en el cultivo. Así, bajo condiciones de asepsia, se tomó una alícuota con una pipeta Beral estéril, transfiriéndola a una celda de acrílico para espectrofotometría. Se midió la absorbancia de la muestra a 685 nm, usando como blanco el medio Bristol con proteosa peptona en una celda de acrílico. El cultivo de microalgas estuvo listo para usarse en bioensayos cuando la absorbancia fue igual o mayor a 1, ya que esto asegura que al tomar una alícuota de 15 mL se obtiene una biomasa seca de 5 mg, punto en el que las microalgas se encuentran en su fase de crecimiento exponencial (Olmos Espejel, 2013).

### 2.3.2 Separación de la biomasa del medio líquido

Se depositaron los 15 mL de medio líquido en un tubo Falcon, posteriormente se centrifugó a 3,900 rpm por 15 minutos, obteniendo un sobrenadante y un botón de biomasa. El sobrenadante se traspasó a un matraz Erlenmeyer para posteriormente seguir la secuencia de extracción por EFS de analitos descrita en la sección 2.4.2.1, mientras que la biomasa se colocó en un portaobjetos y se dejó secar durante una noche para su posterior tratamiento por DMFS, de acuerdo a la sección 2.4.2.3.

### 2.3.3 Obtención de extractos intracelulares

En condiciones de asepsia se tomaron 15 mL del medio líquido de *Selenastrum capricornutum* para colocarlos en un matraz Erlenmeyer. A continuación, se centrifugó el medio líquido, de acuerdo a lo descrito en la sección 2.3.2, y se recuperó el botón celular, resuspendiéndolo en 3 mL de buffer Tris 50 mM a pH 7.5 e inmediatamente se centrifugó a 3,900 rpm por 15 minutos para lavar la biomasa, retirando residuos que pudieran contener las células. Después, se desechó el sobrenadante y la biomasa se resuspendió en 5 mL de buffer Tris 50 mM a pH 7.5, transfiriendo el contenido a un vial de vidrio de 10 mL que se colocó dentro de un vaso con hielo para realizar la lisis celular con un sonicador. La biomasa se sometió a un ciclo con una amplitud de 40% durante 5 minutos, aplicando pulsos de 10 segundos y pausas de 5 segundos. Seguido a esto, la muestra se centrifugó a 3,900 rpm por 15 minutos, se recuperó el sobrenadante, o extracto enzimático intracelular, y se desecharon los residuos sólidos. El proceso se ilustra en la Figura 2.3.

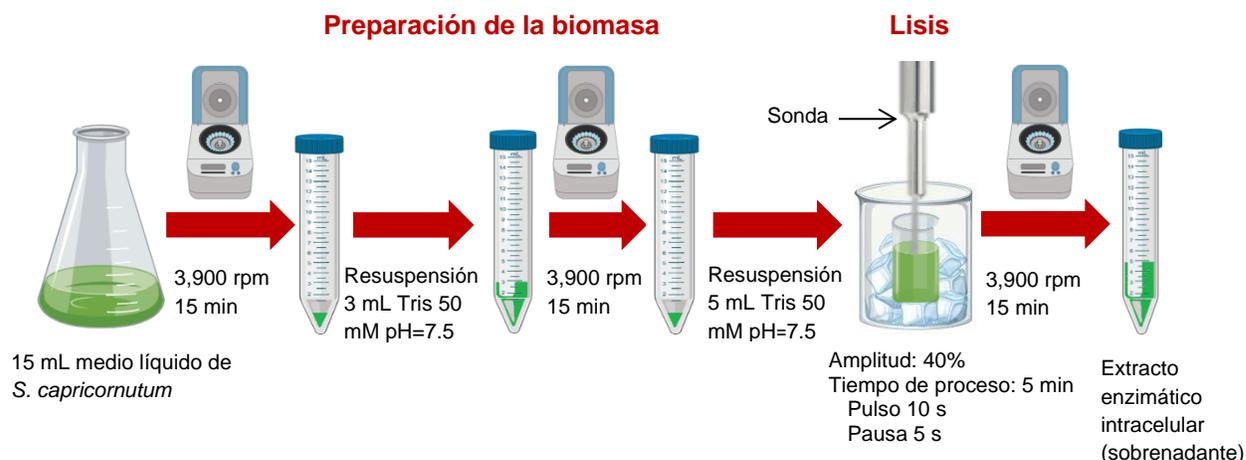


Figura 2.3 Preparación de biomasa para lisis celular.

Es importante mencionar que la célula debe sensibilizarse al contaminante para inducir la producción de las enzimas degradadoras, por lo que los bioensayos con extractos enzimáticos requieren de una activación previa del medio líquido que se empleará. Esto se describirá en la sección 2.5.2.

### 2.3.4 Inmovilización de extractos intracelulares

Para el procedimiento de inmovilización se evaporaron los 5 mL del extracto intracelular usando un rotavapor a 37 °C y 10 mbar, condiciones que permitieron reducir su volumen a 3 mL, manteniendo la estabilidad de las enzimas. A continuación, los 3 mL del extracto se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL al que se adicionaron 3 mL de alginato de sodio 3% m/v y se homogenizó mediante agitación asistida por un vórtex. Después, la mezcla se goteó en un vaso de

precipitados conteniendo 30 mL de una disolución de  $\text{CaCl}_2$  1% m/v para formar las perlas. Al transcurrir 3 minutos de reposo, las perlas se recolectaron y lavaron con agua destilada, depositándolas en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 15 mL de buffer Tris 50 mM a pH 7.5. El proceso se ilustra en la Figura 2.4.

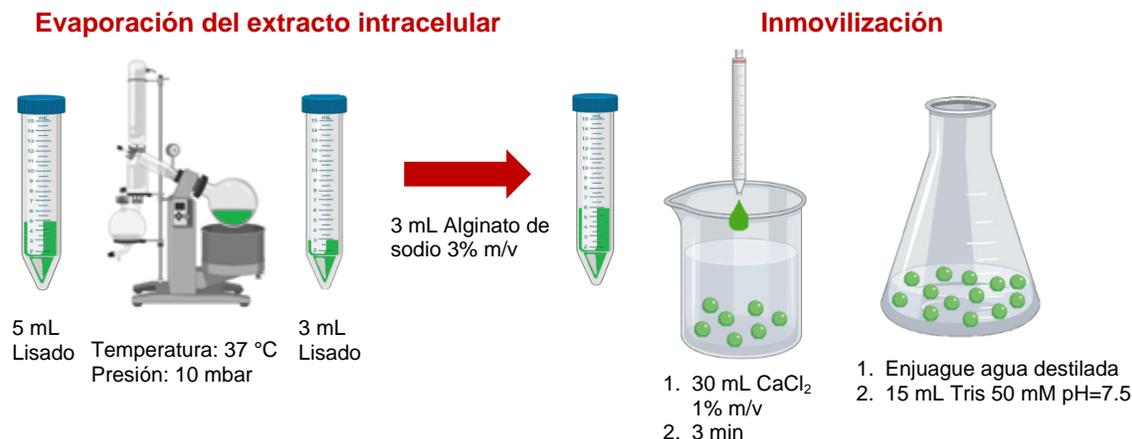


Figura 2.4 Inmovilización de extractos enzimáticos intracelulares.

La disminución del volumen de lisado se realizó con el propósito de seguir la metodología de inmovilización establecida en trabajos anteriores enfocados en células de *Selenastrum capricornutum* (Ramírez Madera, 2020); obteniendo una cantidad de perlas similar al trabajo mencionado. En estas condiciones se ha mostrado que las células inmovilizadas cuentan con un intercambio adecuado de HAPs y metabolitos empleando las perlas de alginato (Castro Gudiño, 2017).

Se evaluó el aumento de la concentración de alginato de sodio para omitir la evaporación del lisado de 5 mL. El cambio mantiene la cantidad de alginato en la solución a inmovilizar, 0.09 g totales, usando un volumen menor. Para ello, se empleó una concentración 9% m/v en lugar de 3% m/v de alginato de sodio, de la cual se añadió 1 mL al extracto enzimático de 5 mL. De esta forma, se obtuvo una mezcla extracto enzimático-disolución de alginato de 6 mL para el goteo, siendo de igual volumen que en el caso anterior en donde sí se evaporó el lisado. Al usar estas metodologías se obtuvieron aproximadamente 90 perlas.

La inmovilización de los extractos es reversible, en la sección 2.4.2.2 se explica en detalle el procedimiento de liberación de los extractos enzimáticos y su posterior extracción de los analitos.

## 2.4 Metodología analítica

### 2.4.1 Validación de sistemas cromatográficos

Se empleó la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar los analitos de interés. Los HAPs se analizaron en el cromatógrafo Varian con bomba ProStar 210, cuya fase móvil fue metanol puro a excepción de la cuantificación de BaA en la biomasa, que usó 90:10 v:v metanol-agua. Se trabajó con un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L. El sistema consistió en una precolumna de acero inoxidable (20 mm x 2.0 mm D.I.) empacada con sílice Nucleosil C18 y una columna Thermo-Scientific Hypersil ODS (150 mm x 4.6 mm diámetro interno, diámetro de partícula 5  $\mu$ m) S. N. 10025855. Se usó el detector de UV-Visible Polychrom 9065, trabajando a una longitud de onda de 263 nm para cuantificar al BaP y 282 nm para el BaA. Las disoluciones estándar de los HAPs se disolvieron en acetonitrilo en las inyecciones efectuadas. Los cromatogramas fueron adquiridos con el software LC Workstation, versión 6.41.

Los metabolitos 4,5-dBaP y 5,6-dBaA fueron analizados en el cromatógrafo Lab Alliance Serie II, empleando una fase móvil de 65:35 v:v metanol-agua, con un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L. El sistema consistió en una precolumna de acero inoxidable (20 mm x 2.0 mm D.I.) empacada con sílice Nucleosil C18 y una columna Perkin-Elmer Spheri-5-ODS (250 mm x 4.6 mm diámetro interno, diámetro de partícula 5  $\mu$ m) S. N. 217342, las cuales se mantuvieron a 30 °C en un horno Phenomenex TS-130. Se usó el detector de fluorescencia Linear Instruments LC 305, trabajando a una  $\lambda$  excitación de 264 nm y una  $\lambda$  emisión de 390 nm. Las disoluciones estándar del 4,5-dBaP y 5,6-dBaA fueron disueltas en una disolución 50:50 v:v de acetonitrilo-agua en las inyecciones realizadas. Los cromatogramas se obtuvieron mediante el software Clarity Chromatography Station, versión 2.8.1.584.

- Intervalo de comportamiento lineal

Se realizaron disoluciones a partir de los estándares de BaP y BaA, usando como disolvente acetonitrilo. En el caso del 4,5-dBaP y 5,6-dBaA, sus estándares se disolvieron en una mezcla 50:50 v:v acetonitrilo-agua, almacenándolas en viales ámbar. A partir de estas disoluciones se prepararon curvas de calibración independientes por triplicado, para los hidrocarburos sus concentraciones fueron de 1  $\mu$ g/mL, 2  $\mu$ g/mL, 3  $\mu$ g/mL, 4  $\mu$ g/mL y 5  $\mu$ g/mL, mientras que en los metabolitos fueron 15 ng/mL, 30 ng/mL, 45 ng/mL, 60 ng/mL, 75 ng/mL, 90 ng/mL, 105 ng/mL y 120 ng/mL. Se usó la señal del instrumento y la concentración de los estándares para el análisis estadístico de mínimos cuadrados que evaluó su linealidad.

- Límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD)

Los parámetros se estimaron mediante un análisis estadístico de los datos empleados para determinar el intervalo lineal, usando las siguientes Ecuaciones.

$$1) LC = 10 \frac{sb_0}{m} \qquad 2) LD = 3.3 \frac{sb_0}{m}$$

Ecuaciones 1 y 2. Límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD)

En estas expresiones el término  $sb_0$  se refiere a la desviación estándar de la ordenada al origen, y  $m$  a la pendiente de la ecuación de la recta obtenida en la regresión lineal de la respuesta analítica en función de la concentración.

De igual forma, los parámetros se evaluaron en función de la relación señal/ruido del detector. Se realizaron disoluciones de 0.005 µg/mL, 0.01 µg/mL, 0.05 µg/mL y 0.08 µg/mL de cada HAP y, en el caso del 4,5-dBaP y 5,6-dBaA, se usaron concentraciones de 0.6 ng/mL, 1.2 ng/mL y 2.4 ng/mL, siendo inyectadas en los equipos correspondientes. El límite de detección se reportó como la concentración cuya respuesta en el equipo fue aproximadamente tres veces mayor al ruido de fondo, mientras que el límite de cuantificación corresponde a la concentración con una respuesta diez veces mayor al ruido.

- Repetibilidad

Se analizaron disoluciones estándar de BaP, BaA, 4,5-dBaP y 5,6-dBaA a las concentraciones indicadas en el intervalo lineal por triplicado el mismo día para posteriormente calcular el porcentaje de variación en cada concentración, como se indica en la siguiente Ecuación.

$$3) CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Ecuación 3. Coeficiente de variación (CV) de concentraciones.

Los términos  $s$  y  $\bar{x}$  se refieren a la desviación estándar de las áreas y su promedio, respectivamente.

- Reproducibilidad

Se analizaron disoluciones de BaP, BaA, 4,5-dBaP y 5,6-dBaA en tres días diferentes, calculando el porcentaje de variación como se indica en la Ecuación 3. Se usaron concentraciones de 1 µg/mL para los HAPs, y 30 ng/mL para los metabolitos.

- Recobro

Se evaluó la recuperación de BaP, BaA, 4,5-dBaP y 5,6-dBaA en el sobrenadante y la biomasa provenientes de la centrifugación de medios líquidos de *Selenastrum capricornutum*. Para esto, se tomó una alícuota de 15 mL de cultivo de la microalga, la cual se centrifugó a 3,900 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se fortificó con 4 µg de HAPs y 180 ng de los metabolitos, y se sometió a la secuencia de extracción por EFS. En el caso de la biomasa, se fortificó con 4 µg de HAPs y 90 ng de los metabolitos, para posteriormente aplicar la secuencia de extracción por DMFS.

La recuperación de los analitos en los extractos enzimáticos inmovilizados se realizó fortificando con 4 µg de HAPs y 180 ng de los metabolitos, añadiéndolos a matraces con perlas y buffer, que posteriormente siguieron su secuencia de EFS. El porcentaje de recobro se calculó como se indica en la siguiente Ecuación.

$$4) \text{ Recobro (R\%)} = \frac{\text{Área de muestra}}{\text{Área de disolución estándar}} \times 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de recobro de analitos en muestras.

## 2.4.2 Validación de metodologías de extracción

### 2.4.2.1 Extracción en Fase Sólida de medio líquido

El método de extracción de los analitos en el medio líquido del cultivo de las microalgas fue desarrollado previamente (Olmos Espejel, 2013), el cual fue adaptado para las muestras tratadas en este trabajo. Para su acondicionamiento se prepararon cartuchos de EFS empacando 300 mg de sílice C18 entre dos filtros, siendo activada al dejar pasar por gravedad 2 mL de metanol, 1 mL de acetonitrilo y 10 mL de agua desionizada, con el fin de solvatar las moléculas del adsorbente y limpiar posibles impurezas que pueda contener. Cada muestra se cargó en un cartucho, dejando eluir por gravedad, para posteriormente realizar una secuencia de adición de disolventes; primero para eliminar impurezas y después para extraer a los analitos.

La secuencia de lavados y extracción dependió del tipo de muestra que se cargó en el cartucho. En el caso del medio líquido, previo a la carga, se añadieron 4 mL de isopropanol a la muestra para favorecer la solubilidad de los analitos en el líquido. Después de la carga de 15 mL de muestra se realizó la limpieza, adicionando 10 mL de agua desionizada, 10 mL de acetonitrilo al 10%, 3 mL de acetonitrilo al 20% y 1 mL de acetonitrilo al 30%. Posteriormente se recuperaron los analitos, eluyendo los metabolitos con 3 mL de acetonitrilo al 55% (fracción A), recolectándolos en un vial ámbar, y los hidrocarburos con 4 mL de acetonitrilo (fracción B), almacenándolos en un vial transparente.

### 2.4.2.2 Extracción en Fase Sólida de extractos enzimáticos desinmovilizados

El acondicionamiento de los cartuchos para la EFS en los bioensayos con extractos enzimáticos, que incluyen a las perlas desinmovilizadas y la disolución buffer de incubación, siguieron lo descrito en la sección 2.4.2.1. Las perlas con los extractos enzimáticos inmovilizados se separaron de la disolución buffer, liberando su contenido al centrifugarlas con 10 mL de citrato de sodio 10% m/v a 3,900 rpm por 15 min. El proceso se ilustra en la Figura 2.5.

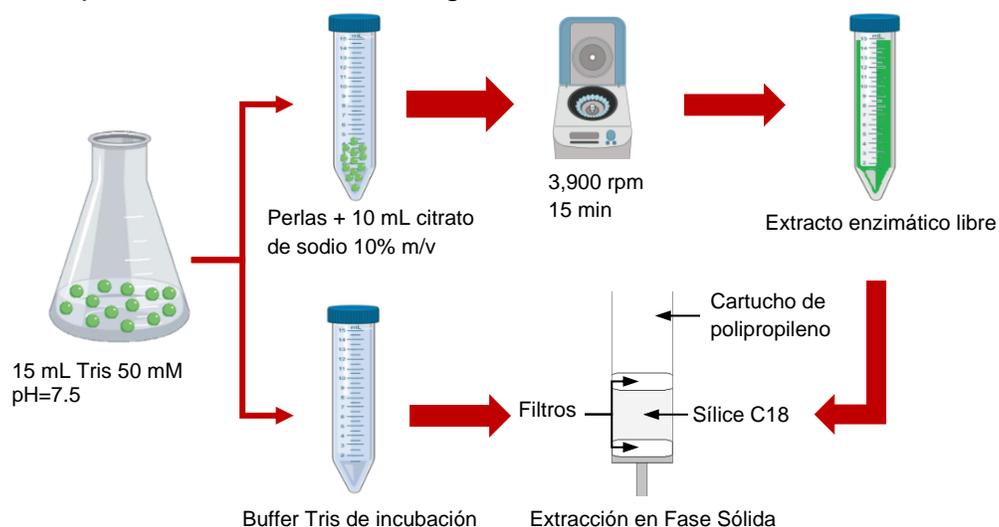


Figura 2.5 Liberación de extractos enzimáticos.

El extracto enzimático liberado, o desinmovilizado, se cargó en el cartucho previamente activado, dejando eluir por gravedad. A continuación, se adicionaron 30 mL de agua desionizada y 4 mL de acetonitrilo al 10% para limpiar la muestra. Posteriormente se recuperaron los analitos, eluyendo los metabolitos con 3 mL de acetonitrilo al 55% (fracción A), recolectándolos en un vial ámbar, y los hidrocarburos con 4 mL de acetonitrilo (fracción B), almacenándolos en un vial transparente.

La extracción de los analitos contenidos en la disolución buffer, que estuvo en contacto con las perlas durante la incubación con los HAPs, se realizó cargando la disolución buffer en el cartucho activado y posteriormente enjuagando el matraz con 10 mL de isopropanol al 20%, volumen que también fue cargado al cartucho con el fin de recuperar a los analitos que pudieron quedar adheridos en el recipiente. Subsecuentemente, se añadieron al cartucho 5 mL de agua desionizada y 4 mL de acetonitrilo al 10% para limpiar interferentes de la muestra. Finalmente, se recuperaron los analitos, eluyendo los metabolitos con 3 mL de acetonitrilo al 55%, recolectándolos en un vial ámbar, y los hidrocarburos con 4 mL de acetonitrilo, almacenándolos en un vial transparente. Los procesos se ilustran en la Figura 2.6,

representando a la extracción del medio líquido de las células (a), los extractos enzimáticos desinmovilizados (b) y el buffer en el que se mantuvieron las perlas (c).

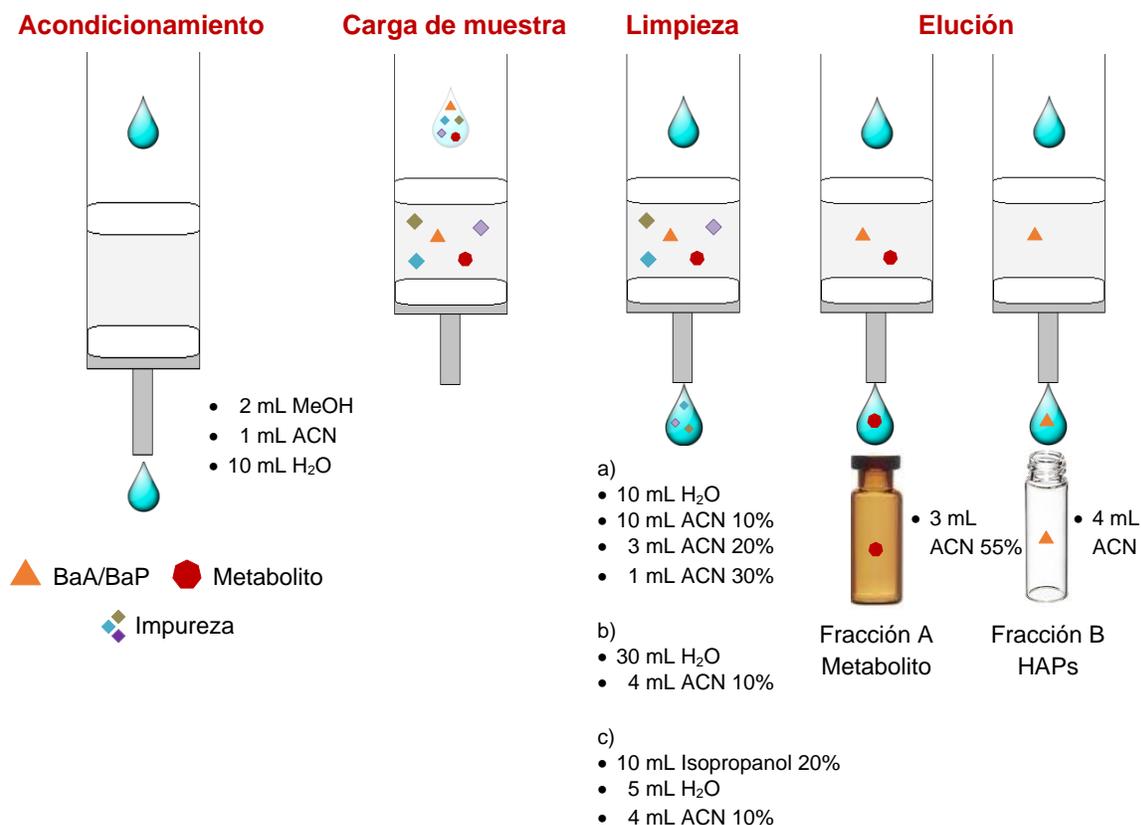


Figura 2.6 Esquema de EFS. Adaptado de Fuentes Pérez, 2019.

a) Limpieza para medio líquido b) Limpieza para extractos enzimáticos desinmovilizados c) Limpieza para buffer.

### 2.4.2.3 Dispersión de Matriz en Fase Sólida de biomasa

La metodología de extracción de analitos a partir de la biomasa que se empleó en este trabajo (Olmos Espejel, 2013) se describe a continuación. Se activó la sílice C18, de manera análoga a la EFS, pero sin empacar, y secando al vacío. Se recuperó el botón celular, colocándolo en un portaobjetos para dejarlo secar al aire libre durante un día. Después se raspó el sólido obtenido, se pesó y homogenizó por maceración con 100 mg de la sílice C18 seca y activada, empleando un mortero de ágata. Posteriormente, la mezcla se empacó en un cartucho de 1 mL entre dos filtros y se llevó a cabo una secuencia de adición de disolventes para extraer los analitos.

La limpieza consistió en la adición de 10 mL de agua desionizada, seguidos de 10 mL de acetonitrilo al 10% y 5 mL de acetonitrilo al 20%, eliminando las impurezas de la muestra. Finalmente, se recuperaron los analitos, eluyendo los metabolitos

con 1.5 mL de acetonitrilo al 40% (fracción A), recolectándolos en un vial ámbar, y los hidrocarburos con 1 mL de acetonitrilo al 90% (fracción B), almacenándolos en un vial transparente. El proceso se representa en la Figura 2.7.

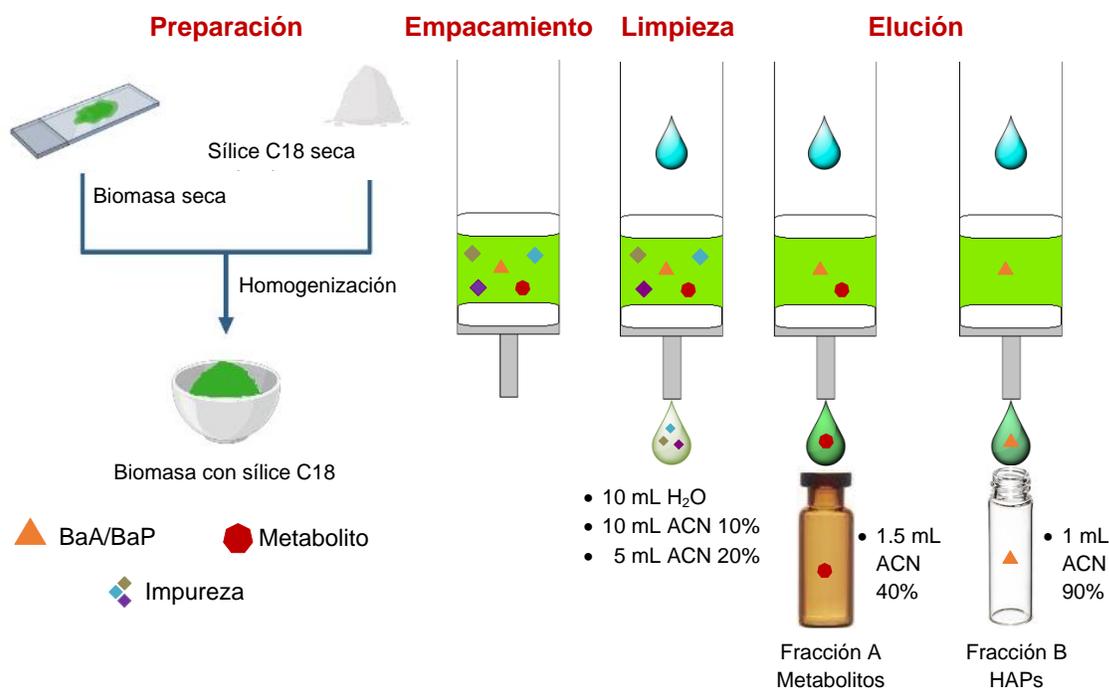


Figura 2.7 Esquema de DMFS. Adaptado de Fuentes Pérez, 2019.

## 2.5 Bioensayos de exposición

### 2.5.1 Degradación de benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno con células de *Selenastrum capricornutum*

Los bioensayos de exposición a BaP y BaA se realizaron con células de *Selenastrum capricornutum*. Se evaluó su capacidad para remover y degradar el hidrocarburo, determinando la desaparición de HAPs del medio y la formación de sus metabolitos, 4,5-dBaP y 5,6-dBaA, durante el tiempo de incubación.

Se esterilizaron matraces Erlenmeyer de 50 mL y, bajo condiciones de asepsia, se tomó una alícuota de 15 mL del medio líquido de cultivo en el que se encontraban las microalgas. Se añadió una alícuota del HAP, BaP o BaA por separado, para tener 4 µg en el medio, obteniendo una concentración de 266 µg/L. Después, los matraces se colocaron en una incubadora con agitación orbital a 90 rpm. Se evaluaron dos tiempos de exposición: 3 y 6 horas; cada uno a tres temperaturas: 22 °C, 28 °C y 34 °C. Al término de la incubación se analizaron el medio líquido y la biomasa, separándolos como se describió en la sección 2.3.2, y posteriormente

tratados mediante DMFS y EFS. La cuantificación de los extractos obtenidos se realizó mediante CLAR. En la Figura 2.8 se muestra un esquema general de las incubaciones realizadas con células en las condiciones de temperatura y tiempo evaluadas (a) y su activación previa para realizar los bioensayos con extractos enzimáticos inmovilizados, que se describirán en la sección 2.5.2 (b).



Figura 2.8 Esquema general de exposición y activación de células de *Selenastrum capricornutum*.

### 2.5.2 Degradación de benzo[a]pireno con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de *Selenastrum capricornutum*

Los bioensayos con los extractos enzimáticos intracelulares requirieron una primera exposición del BaP a la microalga, llamada activación, que induce la producción de las enzimas degradadoras. Se realizó una incubación similar a las descritas en la sección 2.5.1, tomando una alícuota de BaP para tener 4 µg en el medio, equivalentes a 266 µg/L, por 72 horas a 34 °C, condiciones en las que se ha demostrado la producción de la enzima con un remanente bajo de hidrocarburos y metabolitos (Fuentes Pérez, 2019). Después, se obtuvo el extracto enzimático, descrito en la sección 2.3.3, el cual fue inmovilizado en perlas de alginato de calcio, de acuerdo a la sección 2.3.4. Los extractos inmovilizados fueron expuestos nuevamente al BaP, denominado como segunda exposición, para evaluar su degradación en condiciones similares a los ensayos con células. Se contó con un control de extractos enzimáticos libres, sin inmovilizar, para determinar la eficiencia del encapsulado. Adicionalmente, se tuvo un control de remanentes de BaP y metabolitos provenientes de la activación de células que prevalece después del proceso de inmovilización. A continuación, en la Figura 2.9, se presenta un esquema que incluye a los bioensayos con los extractos enzimáticos inmovilizados, sus

controles y los componentes analizados, conformados por las perlas y la disolución buffer de incubación.

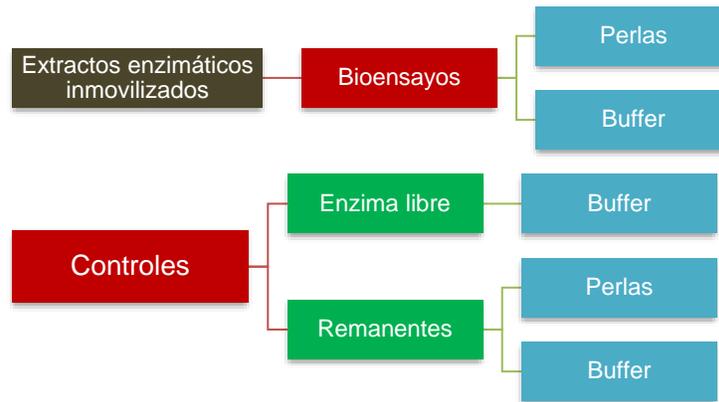


Figura 2.9 Esquema de ensayos de extractos enzimáticos inmovilizados.

Los bioensayos con los extractos enzimáticos se realizaron de la siguiente manera: Las perlas con los extractos inmovilizados se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50 mL, al que se agregaron 15 mL de una disolución buffer Tris 50 mM a pH 7.5 y una alícuota de BaP para tener 4 µg en el medio, equivalentes a una concentración de 266 µg/L. Los matraces se colocaron en una incubadora con agitación orbital, realizando los bioensayos a 22, 28 y 34 °C por 3 horas. A su término, se separaron las perlas del buffer, liberando su contenido al centrifugarlas con 10 mL de citrato de sodio 10% m/v a 3,900 rpm por 15 min. El buffer de incubación y el extracto enzimático desinmovilizado se trataron mediante EFS, analizando los extractos obtenidos mediante CLAR. El proceso se ilustra en la Figura 2.10.

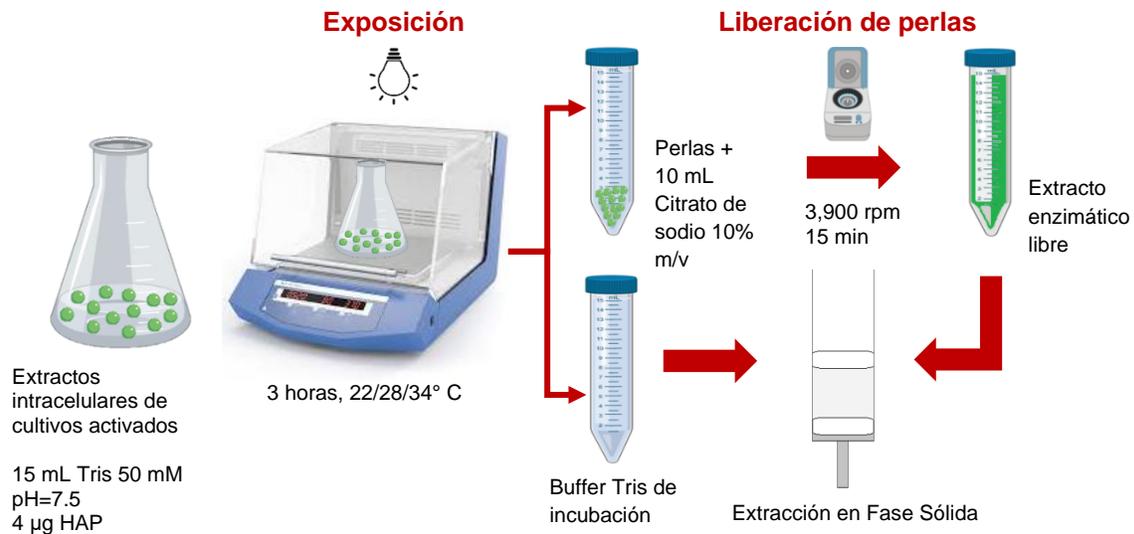


Figura 2.10 Esquema de bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Preparación de muestra e inmovilización

##### 3.1.1 Crecimiento y mantenimiento de *Selenastrum capricornutum*

Se monitoreó el crecimiento de la microalga en medios líquidos de *Selenastrum capricornutum* de 100 mL, realizando mediciones de absorbancia en diferentes días, reportados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Registro de crecimiento de *Selenastrum capricornutum*.

Día	Absorbancia
0	0.000
3	0.116
6	0.258
9	0.347
12	0.482
19	0.795
23	0.934
30	1.113

Para que los medios de cultivo puedan emplearse en los bioensayos se requieren alrededor de cuatro semanas, tiempo en el que su absorbancia es cercana a 1. Con los datos obtenidos se construyó una curva de crecimiento, la cual corresponde a la Figura 3.1. Se observa que al recolectar las células cuya absorbancia es cercana a 1, éstas se encuentran en su etapa de pleno crecimiento.

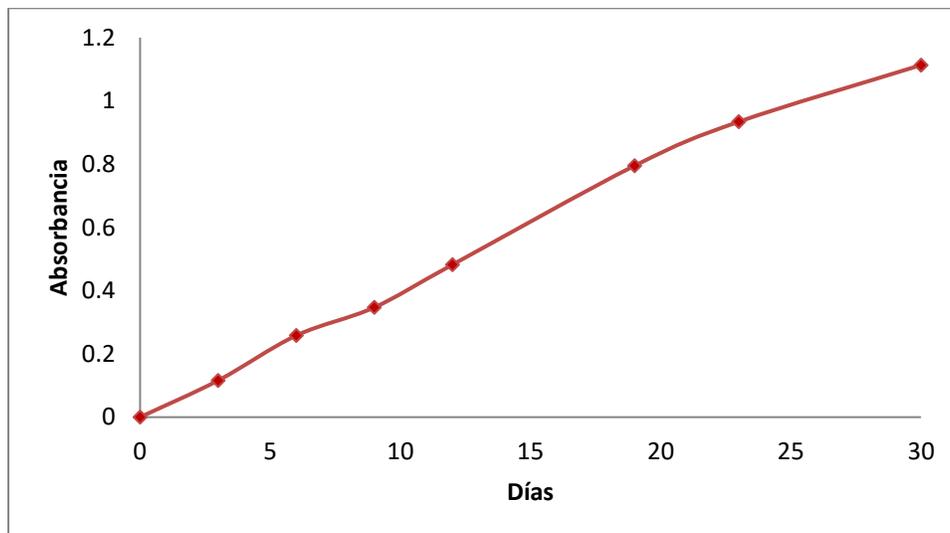


Figura 3.1 Curva de crecimiento de *Selenastrum capricornutum* en 100 mL de cultivo Bristol adicionado con proteosa peptona.

### 3.1.2 Inmovilización de extractos enzimáticos intracelulares

Una vez que se obtuvieron los extractos enzimáticos intracelulares por medio del proceso de lisis ultrasónica se realizó su inmovilización, empleando las condiciones descritas en la sección 2.3.4. Las perlas formadas mediante ambas metodologías tuvieron una forma regular y estable en las condiciones de exposición, además de ser translúcidas e indistinguibles entre sí. En la Figura 3.2 se muestran las perlas obtenidas con estos procesos.

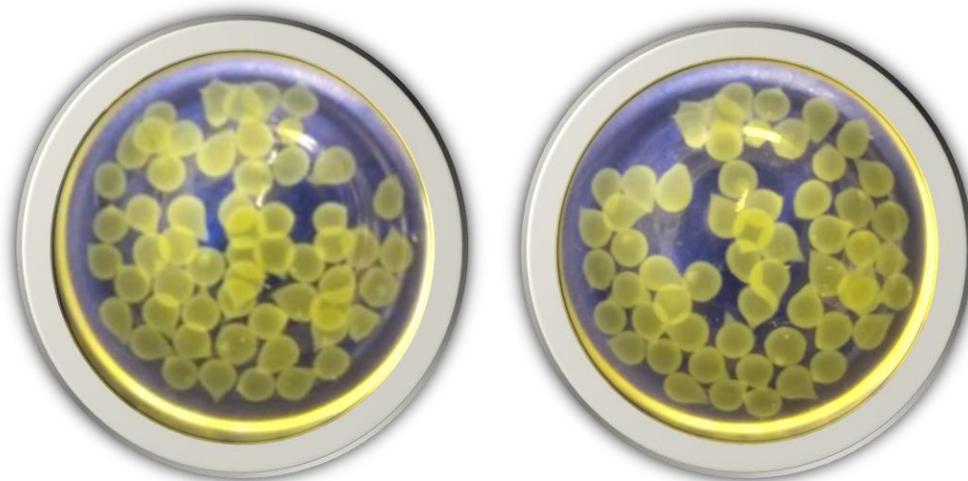


Figura 3.2 Perlas de extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados.  
Izquierda: Alginato 3%                      Derecha: Alginato 9%.

## 3.2 Metodología analítica

### 3.2.1 Validación de sistemas cromatográficos

#### 3.2.1.1 Disoluciones estándar

Los equipos y condiciones descritas en la sección 2.4.1 permitieron obtener cromatogramas como los de la Figura 3.3 para las disoluciones estándar de BaP y BaA mediante detección UV, representados en color rojo y azul respectivamente.

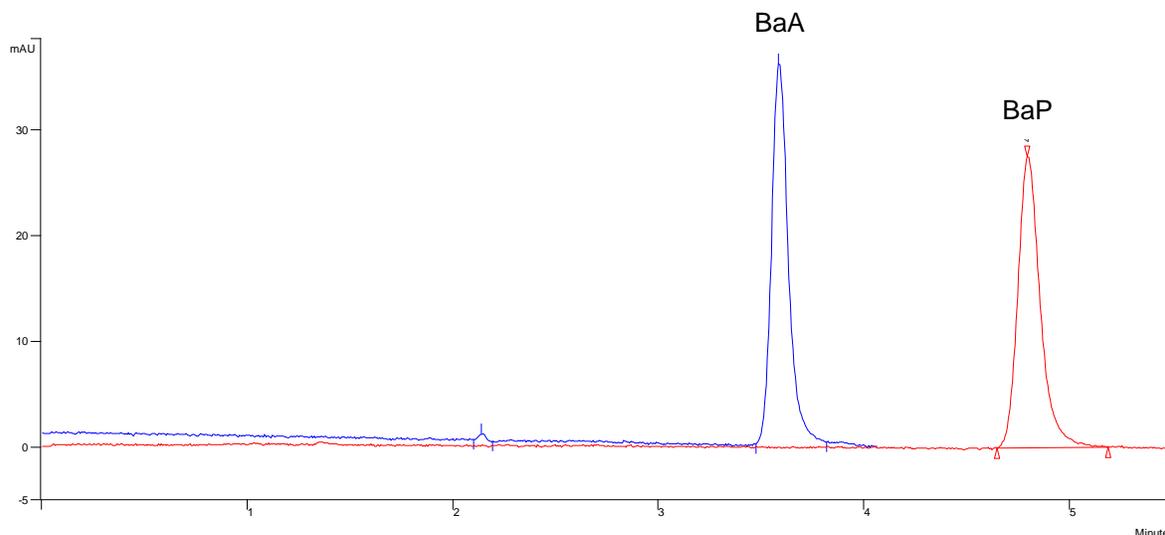


Figura 3.3 Cromatogramas de disoluciones estándar de BaP (rojo, 2  $\mu\text{g/mL}$ , 263 nm) y BaA (azul, 1  $\mu\text{g/mL}$ , 282 nm) con detección UV.

Análogamente, se obtuvieron cromatogramas de las disoluciones estándar de los metabolitos 4,5-dBaP y 5,6-dBaA por detección de fluorescencia, similares a los mostrados en la Figura 3.4, mostrados en color rojo y azul, respectivamente.

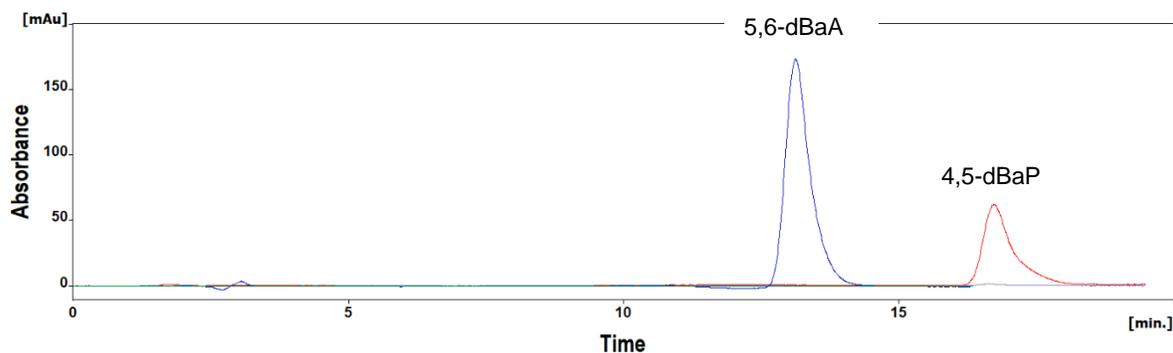


Figura 3.4 Cromatogramas de disoluciones estándar de 5,6-dBaA (azul, 45 ng/mL) y 4,5-dBaP (rojo, 90 ng/mL) mediante DF.

#### 3.2.1.1.1 Intervalo lineal

Se realizaron las curvas de calibración como fueron descritas en la sección 2.4.1, aplicando para su ajuste lineal el método de mínimos cuadrados. Las curvas y ecuaciones correspondientes al BaP y BaA se ilustran en las Figuras 3.5 y 3.6, cuyo intervalo de trabajo fue establecido de 1 a 5  $\mu\text{g/mL}$ .

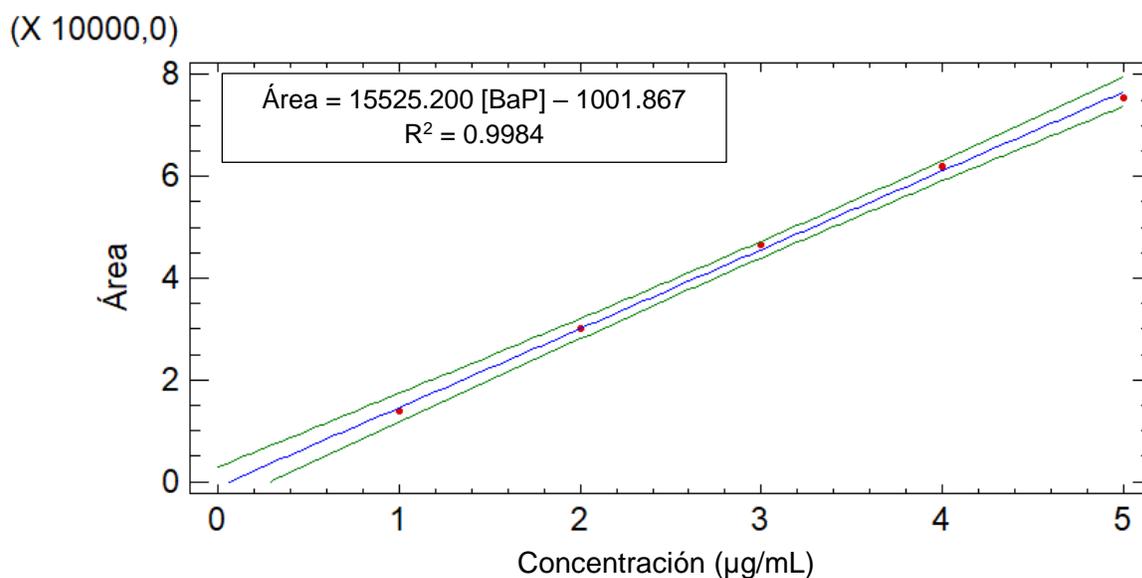


Figura 3.5 Curva de calibración de BaP obtenida mediante CLAR-UV, n = 3.

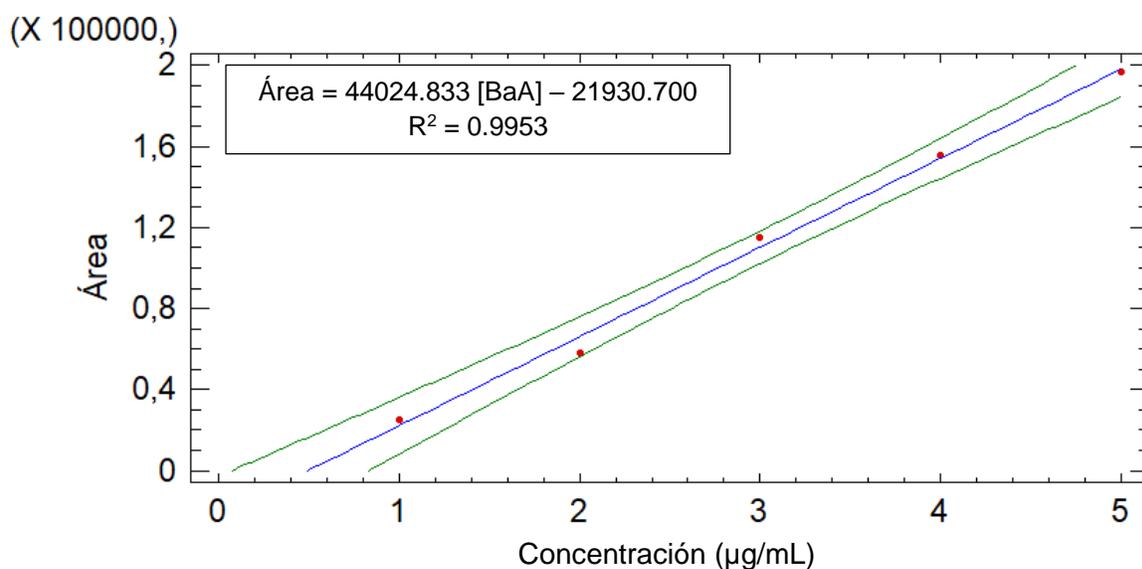


Figura 3.6 Curva de calibración de BaA obtenida mediante CLAR-UV, n = 3.

Las curvas de calibración de los metabolitos 4,5-dBaP y 5,6-dBaA tuvieron un intervalo de trabajo de 15 a 120 ng/mL, mostrándolas en las Figuras 3.7 y 3.8, respectivamente.

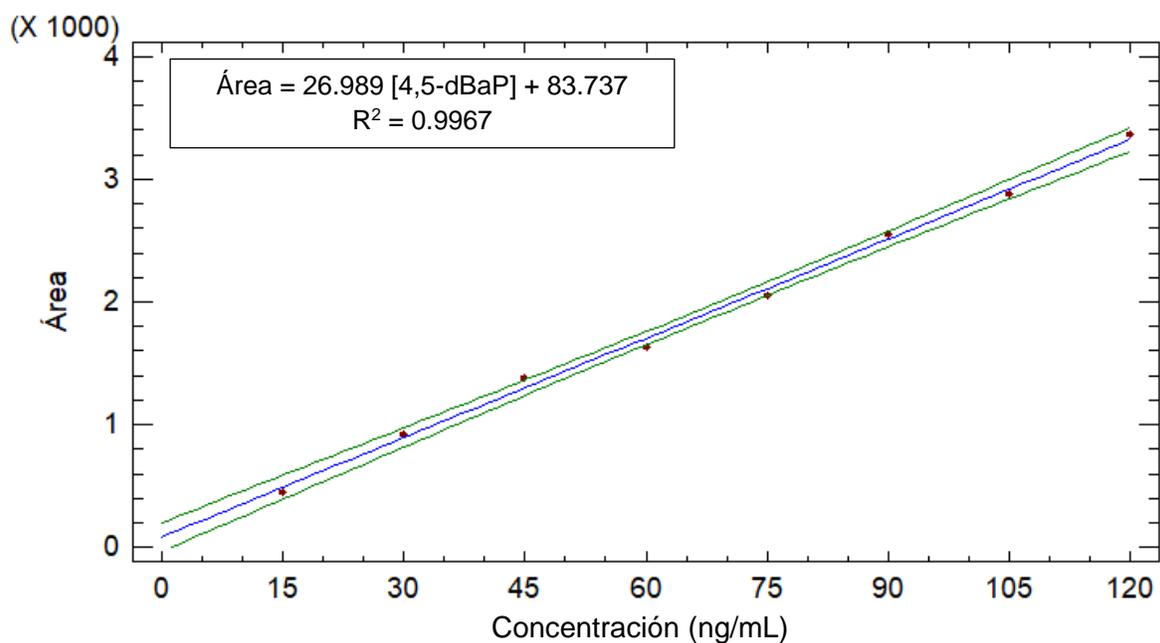


Figura 3.7 Curva de calibración de 4,5-dBaP obtenida mediante CLAR-DF, n = 3.

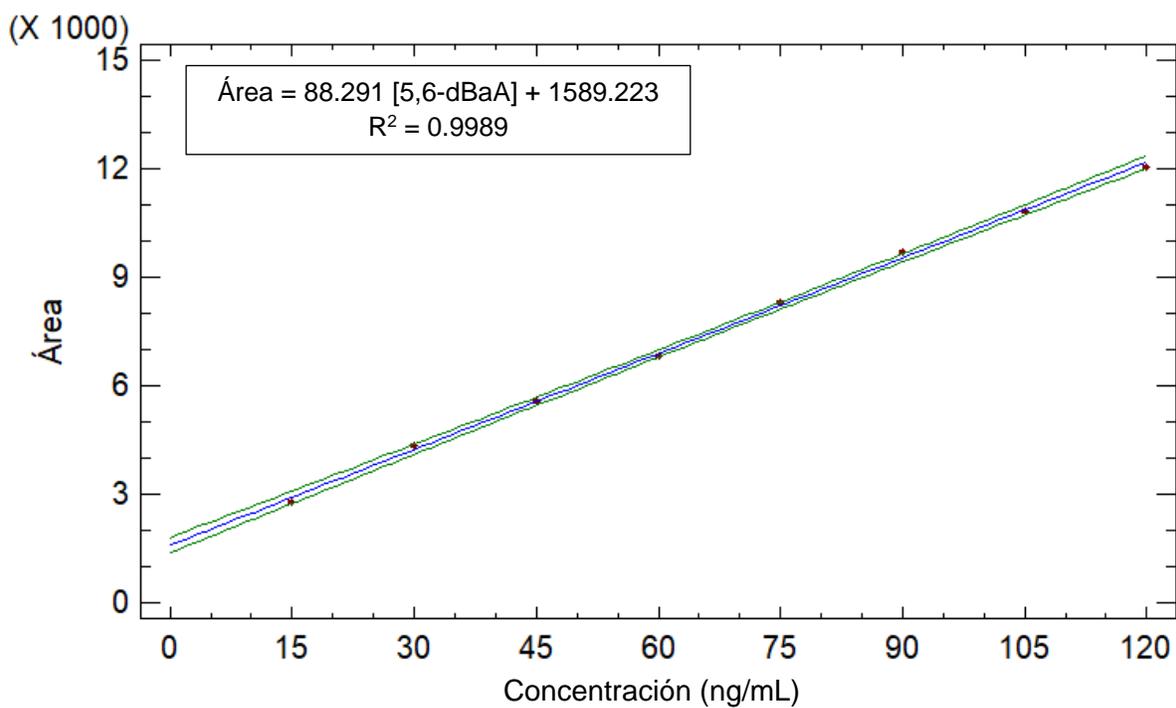


Figura 3.8 Curva de calibración de 5,6-dBaA obtenida mediante CLAR-DF, n = 3.

En la Tabla 3.2 se exponen los parámetros de pendiente ( $m$ ) y ordenada al origen ( $b_0$ ), con sus incertidumbres y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de las curvas de calibración correspondientes a cada analito.

Tabla 3.2 Parámetros de curvas de calibración de los analitos.

Analito	M		$b_0$		$r^2$
	Valor	Incertidumbre	Valor	Incertidumbre	
BaP	15525.200	± 361.402	-1001.867	± 1198.635	0.9984
BaA	44024.833	± 1789.389	-21930.700	± 5934.731	0.9953
4,5-dBaP	26.989	± 0.636	83.737	± 48.179	0.9967
5,6-dBaA	88.291	± 1.143	1589.223	± 86.567	0.9989

En todos los casos se tuvieron coeficientes de correlación ( $r^2$ ) mayores a 0.98 para la cuantificación de residuos e impurezas, por lo que se consideran lineales y adecuados (CCAyAC, 2011).

#### 3.2.1.1.2 Límites de detección y cuantificación

Se determinaron los límites de cuantificación y detección instrumentales de los analitos como se describió en la sección 2.4.1, acorde a las curvas de calibración y la relación señal/ruido del detector. Los resultados se encuentran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Límites de detección y cuantificación instrumentales de los analitos.

Analito	Límite de detección		Límite de cuantificación	
	Señal/ruido	Curva	Señal/ruido	Curva
BaP	0.010 µg/mL	0.255 µg/mL	0.080 µg/mL	0.772 µg/mL
BaA	0.005 µg/mL	0.445 µg/mL	0.010 µg/mL	1.348 µg/mL
4,5-dBaP	1 ng/mL	6 ng/mL	2 ng/mL	18 ng/mL
5,6-dBaA	1 ng/mL	3 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL

#### 3.2.1.1.3 Precisión

En la Tabla 3.4 se reportan los resultados de repetibilidad y reproducibilidad de los analitos estudiados, expresados como porcentajes de coeficientes de variación y calculados como se indica en la sección 2.4.1. Se observa que los coeficientes de variación son adecuados para análisis cuantitativos (CCAyAC, 2011).

Tabla 3.4 Parámetros de precisión de analitos, n = 3.

Analito	Repetibilidad (CV %)	Reproducibilidad (CV %)
BaP	3.31	4.02
BaA	3.30	2.94
4,5-dBaP	0.35	1.21
5,6-dBaA	1.45	0.93

### 3.2.1.2 Muestras

Las metodologías de extracción permitieron el análisis adecuado del BaP en las muestras. Cabe resaltar que en el análisis de la biomasa se presentó un pico desconocido con  $t_r$  alrededor de 4.2 min en el cromatograma que no interfirió con su cuantificación. En la Figura 3.9 se muestran los cromatogramas del extracto obtenido mediante DMFS en los bioensayos de exposición, comparado con una disolución estándar de BaP. Las condiciones cromatográficas se indican en la sección 2.4.1.

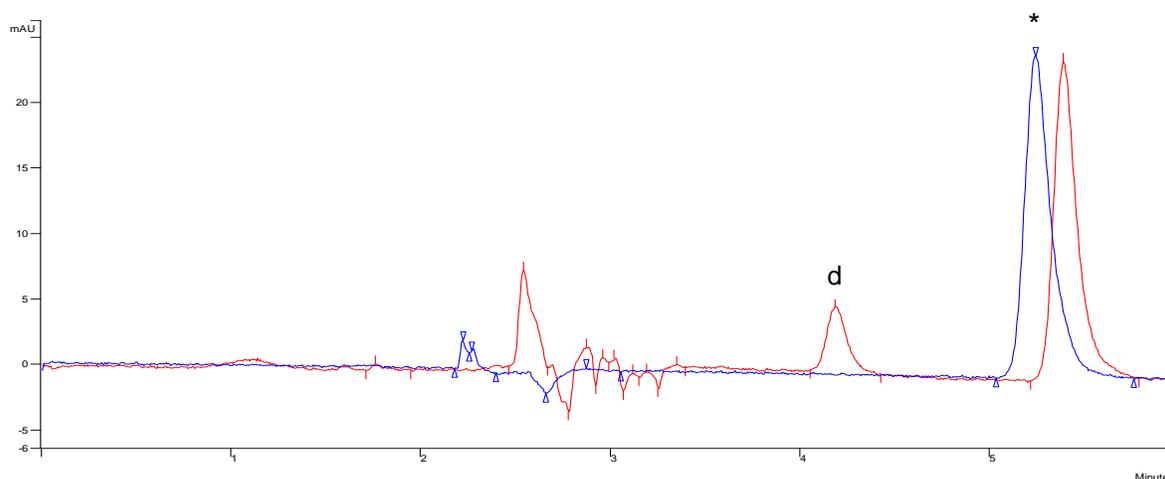


Figura 3.9 Cromatogramas de exposición a BaP en biomasa de *Selenastrum capricornutum* (rojo) y disolución estándar (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , azul) con detección UV.

d : Desconocido      \* : BaP.

Para la cuantificación del BaA, los cromatogramas provenientes de la biomasa tuvieron dificultades debido a la presencia de un interferente de la matriz cercano al pico del BaA, por lo que se cambió la composición de la fase móvil para determinar adecuadamente al analito. En la Figura 3.10 se muestran los cromatogramas usando metanol como fase móvil, mientras que en la Figura 3.11 se utilizó 90:10 v:v de metanol-agua, comparando el extracto, el blanco de biomasa sin exposición al BaA y una disolución estándar. Se observó que al aumentar la polaridad de la fase móvil los componentes de la muestra se retuvieron más tiempo, permitiendo una mejor separación del BaA y el interferente.

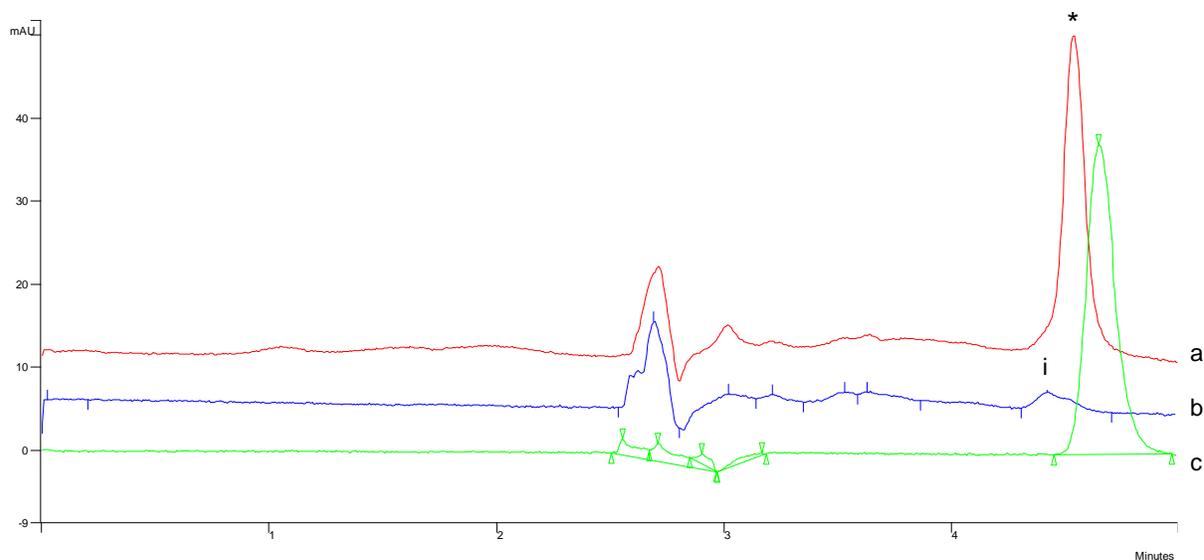


Figura 3.10 Cromatogramas de exposición a BaA representativos. Biomasa fortificada (rojo), blanco (azul) y disolución estándar (1 µg/mL, verde) con detección UV. Fase móvil metanol.

a : Biomasa fortificada b : Biomasa no fortificada c : Estándar i : Interferente \* : BaA.

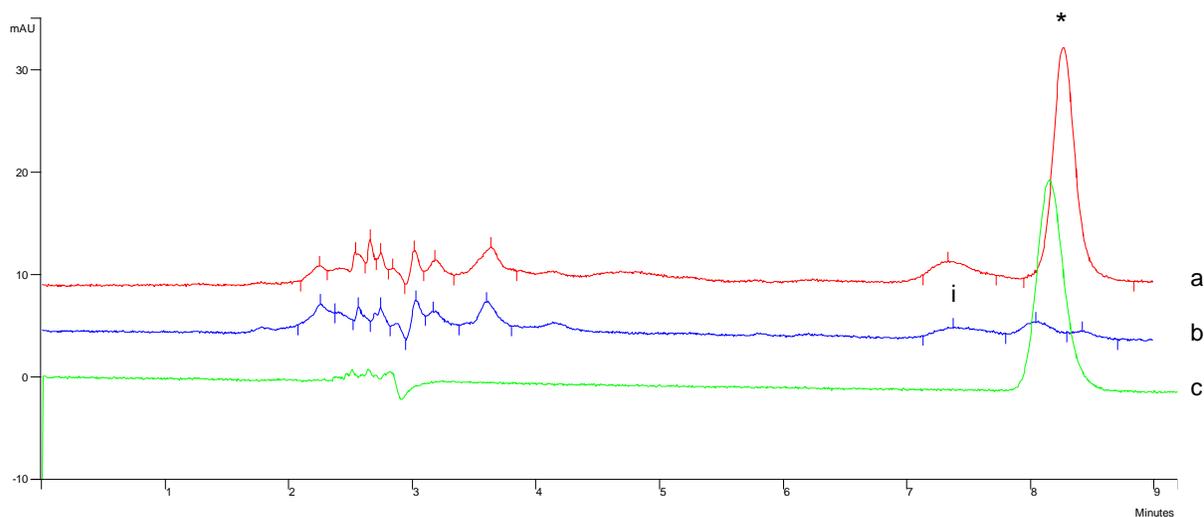


Figura 3.11 Cromatogramas de exposición a BaA representativos. Biomasa fortificada (rojo), blanco (azul) y disolución estándar (1 µg/mL, verde) con detección UV. Fase móvil 90:10 v:v metanol-agua.

a : Biomasa fortificada b : Biomasa no fortificada c : Estándar i : Interferente \* : BaA.

En el caso de los metabolitos producidos por la microalga se obtuvieron perfiles cromatográficos distintos, dependiendo del hidrocarburo al que fueron expuestos. En la Figura 3.12 se presenta el cromatograma obtenido en el extracto de la biomasa al exponerse al BaP, en el que se monitoreó el metabolito 4,5-dBaP para evaluar la degradación. Es de notarse que se observan tres metabolitos del tipo

dihidrodiol, correspondiendo a lo reportado en estudios anteriores (Hernández Blanco y García de Llasera, 2016), aunque no se da una resolución óptima, debido a que los metabolitos producidos son isómeros estructurales. No obstante, las condiciones de trabajo permiten la cuantificación del 4,5-dBaP sin sobreestimarlos por medio de una integración de base a valle (Fuentes Pérez, 2019).

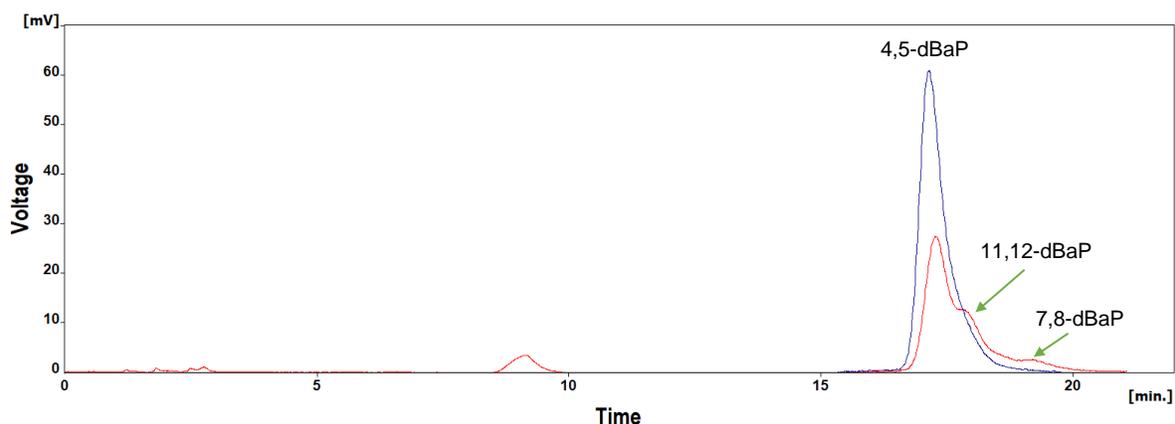


Figura 3.12 Cromatograma de un extracto de biomasa representativo de los metabolitos de BaP formados por *Selenastrum capricornutum* (rojo) con una disolución estándar de 4,5-dBaP (105 ng/mL, azul) mediante DF.

Por otra parte, el metabolito de seguimiento en la degradación del BaA, el 5,6-dBaA, se separó mejor del pico subsecuente, conformado por los metabolitos 8,9-dBaA y 10,11-dBaA que coeluyen, de acuerdo a lo observado en trabajos realizados anteriormente (Hernández Blanco y García de Llasera, 2016). La Figura 3.13 muestra el cromatograma de un extracto del medio líquido con el perfil de metabolitos, en los que se monitoreó al 5,6-dBaA.

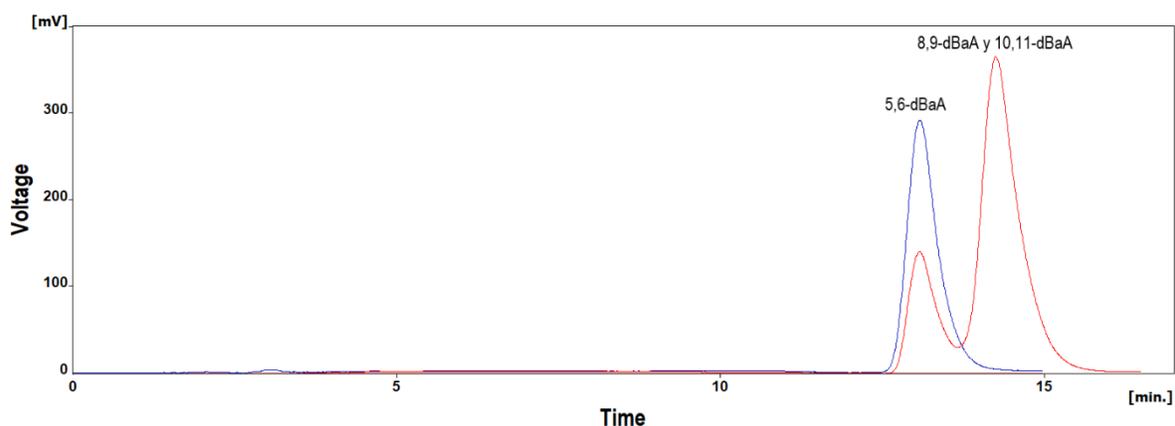


Figura 3.13 Cromatograma de un extracto de medio líquido representativo de los metabolitos de BaA formados por *Selenastrum capricornutum* (rojo) con una disolución estándar de 5,6-dBaA (60 ng/mL, azul) mediante DF.

### 3.2.1.2.1 Parámetros cromatográficos

En la Tabla 3.5 se describen los parámetros cromatográficos de los analitos, en el caso del 4,5-dBaP no se reporta la resolución con el pico adyacente del 11,12-dBaP, debido a que no se cuenta con una medida confiable del ancho del pico a la base. Para el BaA se reporta el tiempo de retención y  $k'$  en las dos composiciones de fase móvil, mientras que el  $\alpha$  y resolución corresponden a las cuantificaciones en la biomasa, respecto al pico del interferente mostrado en la Figura 3.11.

Tabla 3.5 Parámetros cromatográficos de analitos.

Parámetro	BaP	BaA		4,5-dBaP	5,6-dBaA
$t_m$ (min)	1.662	1.658		1.505	1.459
$t_r$ (min)	5.442	4.440 <sup>a</sup>	8.864 <sup>b</sup>	17.371	13.194
$k'$	2.274	1.678 <sup>a</sup>	4.346 <sup>b</sup>	10.542	7.617
$\alpha$	-	1.230 <sup>b</sup>		1.029	1.119
$R_s$	-	1.362 <sup>b</sup>		-	1.477

a = Fase móvil 100% metanol. b = Fase móvil 90:10 metanol:agua.

### 3.2.1.2.2 Recobro

Los resultados de recuperación de los analitos (R%) en las diferentes muestras se encuentran en la Tabla 3.6, siendo determinados como se indica en la sección 2.4.1. En el caso de los extractos enzimáticos, se consideró como la recuperación total la suma de las cantidades de los analitos obtenidas en las perlas y el buffer, ya que la fortificación se realizó en matraces que contenían ambas matrices. Se observa que los recobros fueron mayores a los establecidos para la cuantificación de contaminantes en agua (CCAyAC, 2011), por lo que la metodología es adecuada para su uso.

Tabla 3.6 Recobro de analitos en células microalgales y extractos enzimáticos inmovilizados, n = 3.

Analito	Células		Extracto enzimático (R%)
	Biomasa (R%)	Sobrenadante (R%)	
BaP	82	83	84
BaA	82	85	87
4,5-dBaP	82	86	89
5,6-dBaA	82	84	82

### 3.3 Bioensayos de exposición

#### 3.3.1 Degradación de benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno con células de *Selenastrum capricornutum*

Los bioensayos de exposición permitieron conocer la capacidad de biorremediación del HAP en un medio del cultivo líquido de *Selenastrum capricornutum*, evaluando su remoción, que consideró su remanente en el medio líquido, y degradación, contemplando el total del BaP en la biomasa y el medio líquido, ambas en relación con la fortificación inicial del contaminante. Asimismo, se monitoreó la producción de sus metabolitos, cuantificándolos en el medio líquido y la biomasa. Los bioensayos se realizaron por triplicado en dos tiempos de incubación, 3 y 6 horas, y tres temperaturas distintas, 22 °C, 28 °C y 34 °C, bajo agitación orbital y luz blanca.

##### 3.3.1.1 Benzo[a]pireno

Las cantidades del BaP monitoreadas en el medio líquido y la biomasa, así como los porcentajes de remoción y degradación a los diferentes tiempos y temperaturas se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Cantidad ( $\mu\text{g}$ ) de BaP presente en bioensayos de exposición de células de *Selenastrum capricornutum*.

Tiempo de incubación	22 °C			28 °C			34 °C		
	Medio líquido ( $\mu\text{g}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )	Medio líquido ( $\mu\text{g}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )	Medio líquido ( $\mu\text{g}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )
3 Horas	1.289 $\pm$ 0.017	1.935 $\pm$ 0.094	3.224 $\pm$ 0.104	0.332 $\pm$ 0.035	1.832 $\pm$ 0.090	2.164 $\pm$ 0.089	0.271 $\pm$ 0.023	1.427 $\pm$ 0.088	1.698 $\pm$ 0.107
Remoción	68%			92%			93%		
Degradación	19%			46%			58%		
6 Horas	1.064 $\pm$ 0.016	1.735 $\pm$ 0.077	2.799 $\pm$ 0.075	0.220 $\pm$ 0.013	1.499 $\pm$ 0.087	1.719 $\pm$ 0.082	0.139 $\pm$ 0.011	0.967 $\pm$ 0.055	1.106 $\pm$ 0.060
Remoción	73%			95%			97%		
Degradación	30%			57%			72%		

En las condiciones experimentales se observó una relación inversamente proporcional entre la temperatura y la cantidad de BaP en las muestras. Por esta razón, las incubaciones por 3 horas en el medio líquido mostraron diferencias significativas al variar la temperatura, destacando la remoción del 92% del BaP

presente a 28 °C, en comparación al 68% obtenido a 22 °C. La microalga mostró la mayor capacidad de remoción a 34 °C, siendo del 93%. Los cromatogramas correspondientes se muestran en la Figura 3.14.

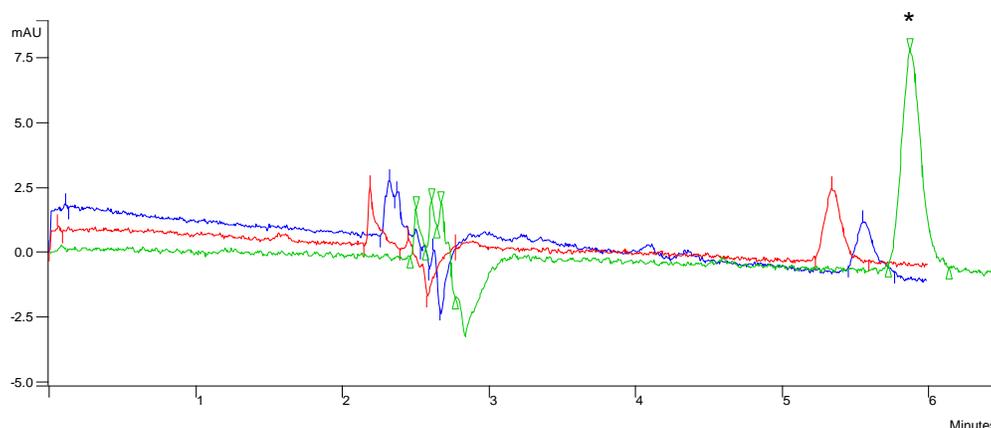


Figura 3.14 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes del medio líquido de cultivo a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.

\* : BaP.

Al aumentar el tiempo de incubación se observaron remociones mayores en las temperaturas de trabajo respecto a sus análogos de 3 horas. La temperatura de incubación fue un factor crucial para el proceso, siendo significativamente mayor a 34 °C, comparado con lo obtenido a 28 °C en ambos tiempos de incubación. Es importante resaltar que cada temperatura tuvo una respuesta diferente al prolongar el tiempo de exposición al hidrocarburo, resaltando el caso de 22 °C, cuya remoción se incrementó del 68% a 73%. Los cromatogramas del BaP correspondientes al conjunto de bioensayos a 6 horas en el medio líquido se ilustran en la Figura 3.15.

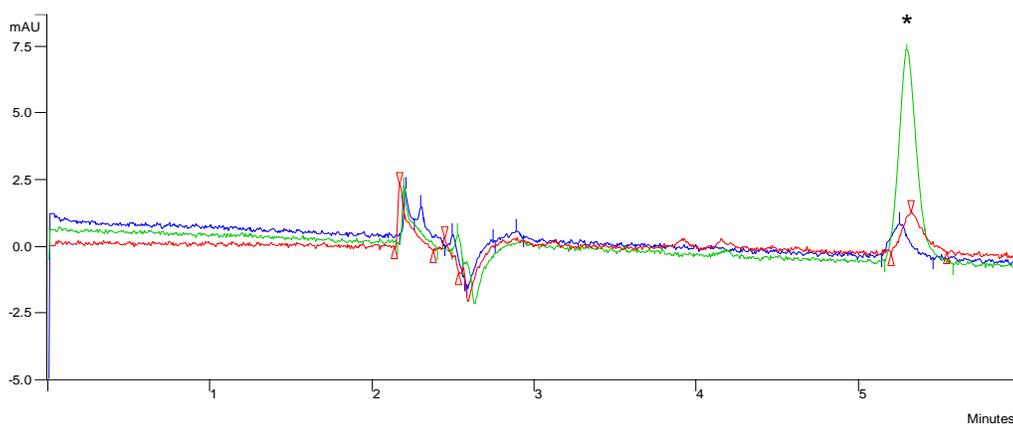


Figura 3.15 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes del medio líquido de cultivo a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 6 horas con detección UV.

\* : BaP.

De manera general, se encontró una mayor cantidad de BaP en la biomasa comparado con el medio líquido, siendo consistente con estudios en los que diferentes contaminantes se adhieren a la microalga, favoreciendo su remoción del medio (Jalilian et al, 2020). En las incubaciones por 3 horas se observaron diferencias significativas entre las temperaturas, siendo más notoria entre 28 °C y 34 °C, resaltando que en la incubación a 34 °C se obtuvo la menor cantidad de BaP remanente. Los cromatogramas del BaP en la biomasa proveniente de los bioensayos a 3 horas se muestran en la Figura 3.16.

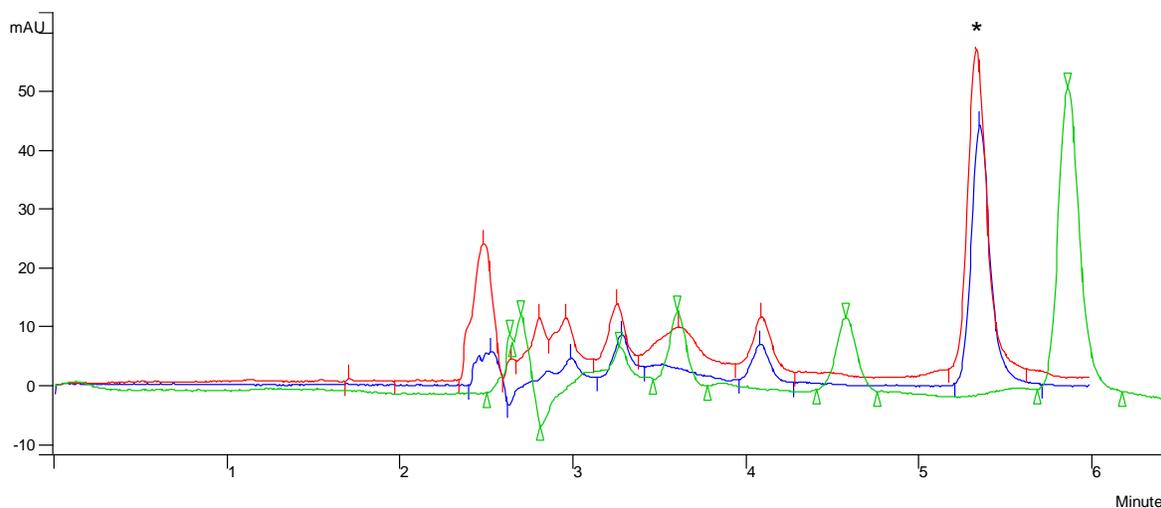


Figura 3.16 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de la biomasa de microalgas a las temperaturas de trabajo (azul 34 °C, rojo 28 °C, verde 22 °C) en incubación de 3 horas con detección UV.

\* : BaP.

El efecto de la temperatura mostró un perfil similar al incrementar el tiempo de incubación de 3 a 6 horas, diferenciándose al tener menores cantidades de BaP que sus análogos de 3 horas. Los bioensayos a cada temperatura tuvieron una respuesta diferente al comparar el tiempo de incubación, resaltando el caso a 34 °C en los que el BaP disminuyó 0.460 µg en las incubaciones a 6 horas respecto a las de 3 horas, siendo la temperatura en la que se observó la mayor diferencia entre los tiempos de incubación. En la Figura 3.17 se presentan los cromatogramas correspondientes a los extractos obtenidos de la biomasa con 6 horas de incubación.

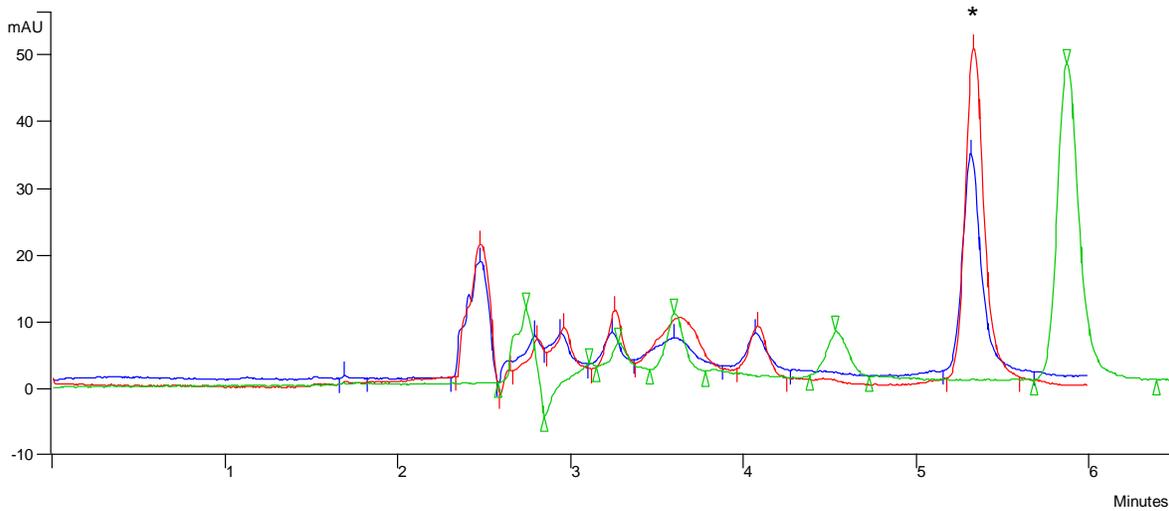


Figura 3.17 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de la biomasa de microalgas a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 6 horas con detección UV.

\* : BaP.

La Figura 3.18 muestra las cantidades de BaP en el medio líquido y la biomasa de los bioensayos en un gráfico de barras. La tendencia global que se observa es la disminución del total de BaP al aumentar el tiempo y la temperatura de incubación.

La predominancia del hidrocarburo en la biomasa a temperaturas más altas muestra que su relación biomasa/medio líquido es cinco veces mayor en las incubaciones por 3 horas. Al aumentar el tiempo de incubación a 6 horas se encontró una mayor cantidad de BaP en la biomasa, comparado con el medio líquido, observando su principal diferencia a 28 °C y 34 °C, en las que su relación biomasa/medio líquido fue casi siete veces mayor. En las incubaciones a 6 horas se mejoró la degradación del BaP, obteniendo un 30% a 22 °C, 57% a 28 °C y 72% a 34 °C.

Con esta información se infiere que la microalga requiere de la temperatura más alta para optimizar la remoción y degradación de BaP en el medio, atribuido principalmente a dos razones; el incremento en la disponibilidad del BaP al ser más soluble y la mejora en la capacidad de degradación del BaP por las enzimas degradadoras, reflejado en la disminución del contaminante en la biomasa. El proceso se favorece al tener incubaciones más largas, que permiten la difusión del contaminante hacia la microalga para su degradación, por lo que las condiciones óptimas son las incubaciones a 34 °C por 6 horas.

Se observó un caso particular al comparar los bioensayos de 28 °C incubados por 6 horas con los de 34 °C por 3 horas, cuya degradación y cantidad de BaP en su

biomasa es estadísticamente similar. Esto sugiere que, al aumentar la temperatura, se pueden obtener degradaciones equiparables o mayores a las observadas en las incubaciones más largas que se llevan a cabo a temperaturas menores, siempre y cuando las condiciones no sean contraproducentes para las células. El desarrollo estadístico de los resultados de BaP se encuentra en el Anexo 1.1.

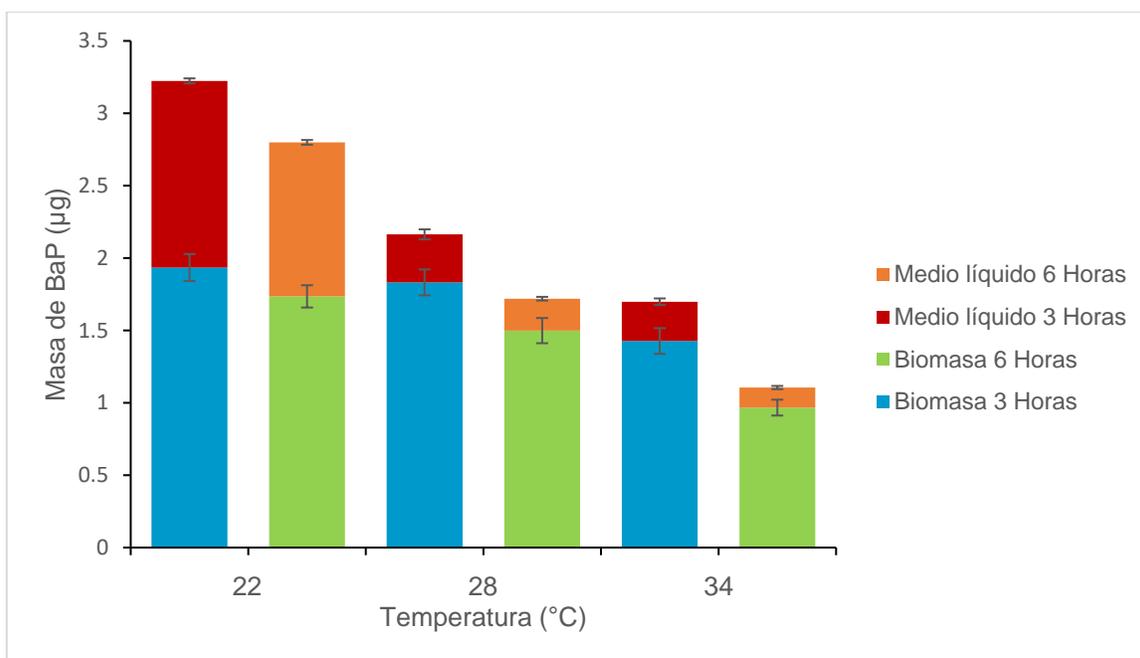


Figura 3.18 Cantidad de BaP ( $\mu\text{g}$ ) en medio líquido y biomasa en bioensayos de células de *Selenastrum capricornutum* a 22, 28 y 34 °C.

### 3.3.1.2 Benzo[a]antraceno

De manera similar al BaP, se observó una disminución del BaA en los bioensayos al aumentar la temperatura de incubación. Las cantidades del BaA monitoreadas en el medio líquido y la biomasa, así como los porcentajes de remoción y degradación a los diferentes tiempos y temperaturas se encuentran en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8 Cantidad de BaA ( $\mu\text{g}$ ) presente en bioensayos de exposición de células de *Selenastrum capricornutum*.

Tiempo de incubación	22 °C			28 °C			34 °C		
	Medio líquido ( $\mu\text{g}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )	Medio líquido ( $\mu\text{g}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )	Medio líquido ( $\mu\text{g}$ )	Biomasa ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )
3 Horas	0.448 $\pm$ 0.017	1.610 $\pm$ 0.079	2.059 $\pm$ 0.085	0.239 $\pm$ 0.021	1.038 $\pm$ 0.038	1.277 $\pm$ 0.035	0.154 $\pm$ 0.008	0.631 $\pm$ 0.032	0.785 $\pm$ 0.028
Remoción	89%			94%			96%		
Degradación	49%			68%			80%		
6 Horas	0.235 $\pm$ 0.019	1.172 $\pm$ 0.067	1.406 $\pm$ 0.065	0.187 $\pm$ 0.009	0.837 $\pm$ 0.066	1.024 $\pm$ 0.068	0.095 $\pm$ 0.005	0.487 $\pm$ 0.043	0.582 $\pm$ 0.040
Remoción	94%			95%			98%		
Degradación	65%			74%			85%		

En las incubaciones por 3 horas se observaron diferencias significativas entre las temperaturas de incubación, cuyas remociones del BaA fueron superiores al 89%. En la Figura 3.19 se muestran los cromatogramas del BaA en los extractos de medio líquido provenientes de estos bioensayos.

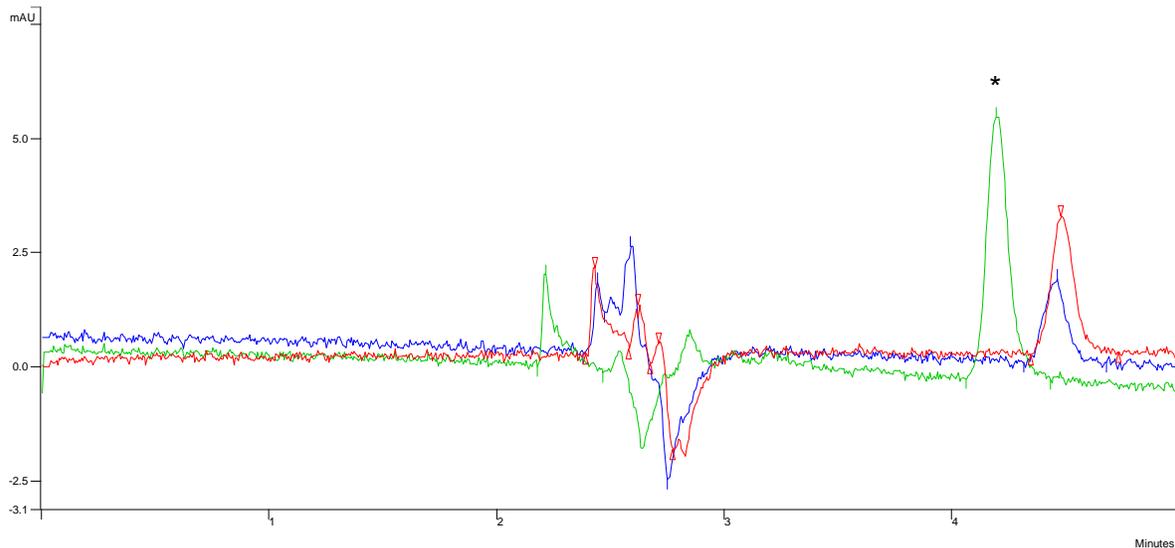


Figura 3.19 Cromatogramas de BaA en extractos provenientes del medio líquido de cultivo a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.

\* : BaA.

Las incubaciones por 6 horas mostraron una menor cantidad del BaA al aumentar la temperatura, destacando que la remoción fue superior al 94% en todos los bioensayos, con un máximo de 98% a 34 °C. En la Figura 3.20 se muestran los cromatogramas del BaA de los extractos de medio líquido correspondientes al conjunto de bioensayos de 6 horas.

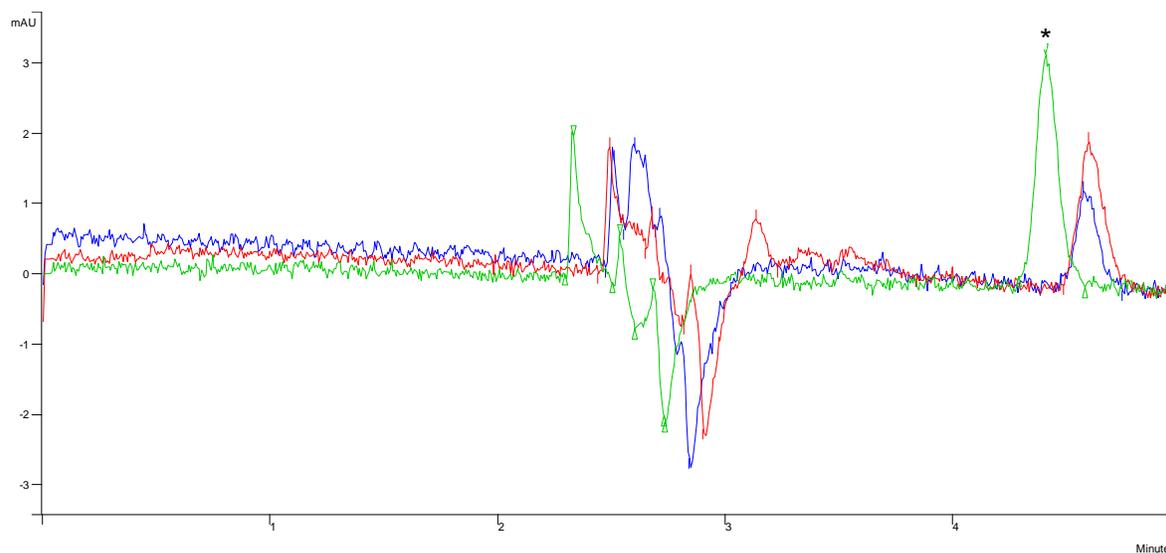


Figura 3.20 Cromatogramas de BaA en extractos provenientes del medio líquido de cultivo a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 6 horas con detección UV.

\* : BaA.

La biomasa mostró una mayor cantidad de BaA que el medio líquido, observando una relación inversamente proporcional con la temperatura. Esto da indicio de que el contaminante es acumulado en la biomasa para posteriormente degradarse, fenómeno que se acelera conforme la temperatura aumenta. Los cromatogramas del BaA en los extractos de la biomasa incubados por 3 horas tuvieron diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas. En la Figura 3.21 se exponen los cromatogramas representativos del BaA en los bioensayos a 3 horas de los extractos obtenidos de la biomasa.

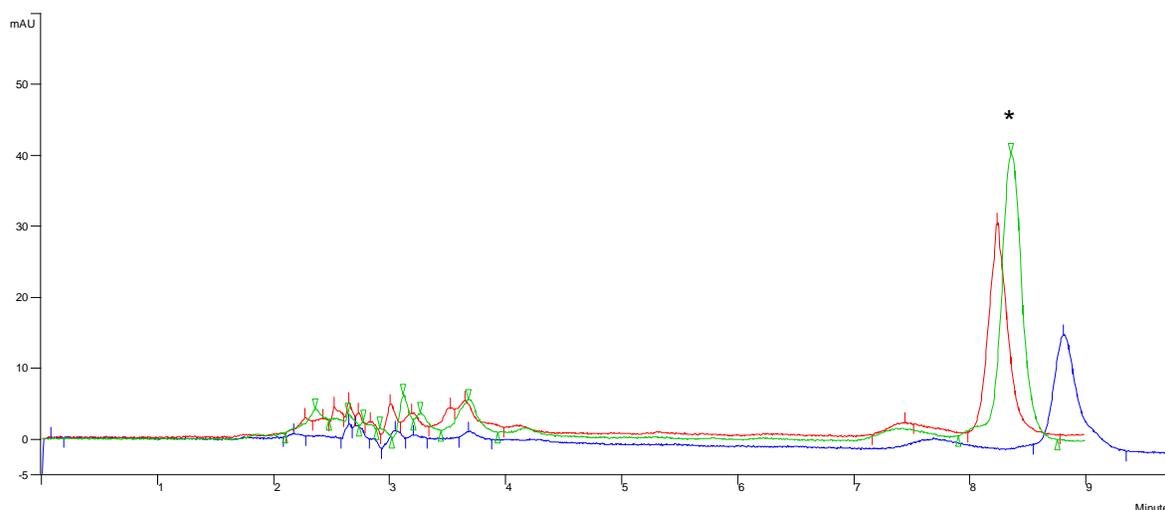


Figura 3.21 Cromatogramas de BaA en extractos provenientes de la biomasa de microalgas a las temperaturas de trabajo (azul 34 °C, rojo 28 °C, verde 22 °C) en incubación de 3 horas con detección UV.

\* : BaA.

Las incubaciones por 6 horas tuvieron un perfil de cambio con la temperatura similar, con diferencias significativas entre las condiciones evaluadas. El aumento en el tiempo de incubación favoreció la degradación del hidrocarburo, siendo más notorio al comparar los bioensayos de 22 °C, en los que el BaA disminuyó 0.438  $\mu\text{g}$  en la incubación a 6 horas respecto a lo obtenido a 3 horas. Los cromatogramas del BaA obtenidos a partir de los extractos de biomasa en las incubaciones por 6 horas se encuentran en la Figura 3.22.

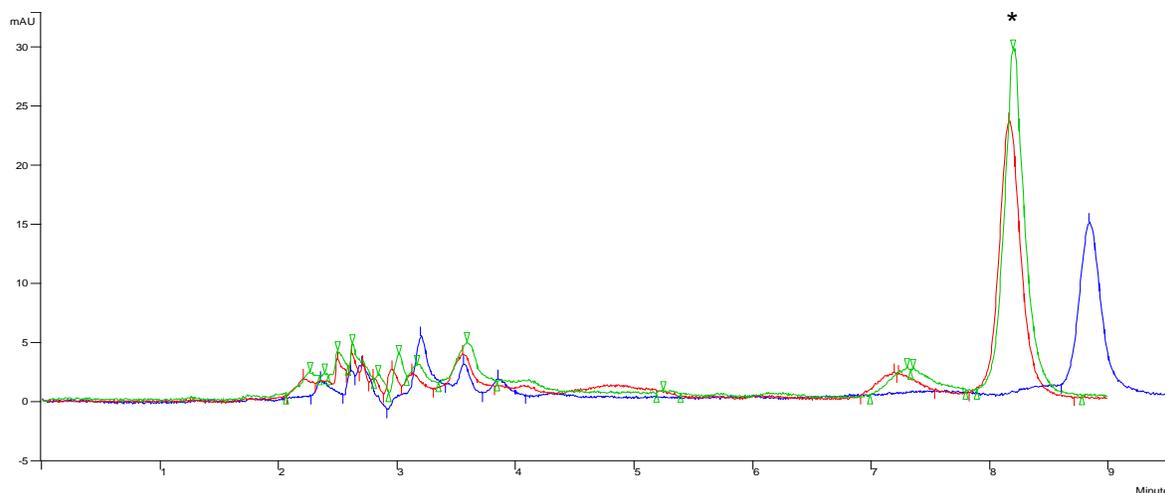


Figura 3.22 Cromatogramas de BaA en extractos provenientes de la biomasa de microalgas a las temperaturas de trabajo (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 6 horas con detección UV.

\* : BaA.

Las cantidades totales del BaA en la biomasa y medio líquido son representados por una gráfica de barras en la Figura 3.23. En las incubaciones por 3 horas destaca que la cantidad de BaA en la biomasa es, en promedio, cuatro veces mayor que en el medio líquido. La degradación mostró una relación proporcional con la temperatura, con un máximo de 80% a 34 °C.

Al aumentar el tiempo de incubación se observó una menor cantidad del BaA en el medio líquido en relación con su distribución total en los componentes del cultivo, por lo que éste fue, en promedio, casi cinco veces mayor en la biomasa. La degradación del contaminante aumentó significativamente a las 6 horas con respecto a las 3 horas, superando el 65% a 22 °C hasta obtener un 85% a 34 °C.

La información obtenida muestra que la temperatura y el tiempo de incubación afectaron significativamente a los procesos de remoción y degradación, con los que tienen una relación directamente proporcional en las condiciones evaluadas. Con esto en cuenta, las condiciones óptimas para la degradación del BaA son las incubaciones a 34 °C por 6 horas.

Se presentó un caso particular entre el ensayo de 28 °C por 3 horas y 22 °C por 6 horas, en los que su remoción fue estadísticamente similar. Sus diferencias radican en la cantidad en la biomasa y la degradación que realizaron, la cual fue significativamente mayor a 28 °C, por lo que la temperatura tuvo mayor impacto en estos procesos. El desarrollo estadístico se encuentra en el Anexo 1.2.

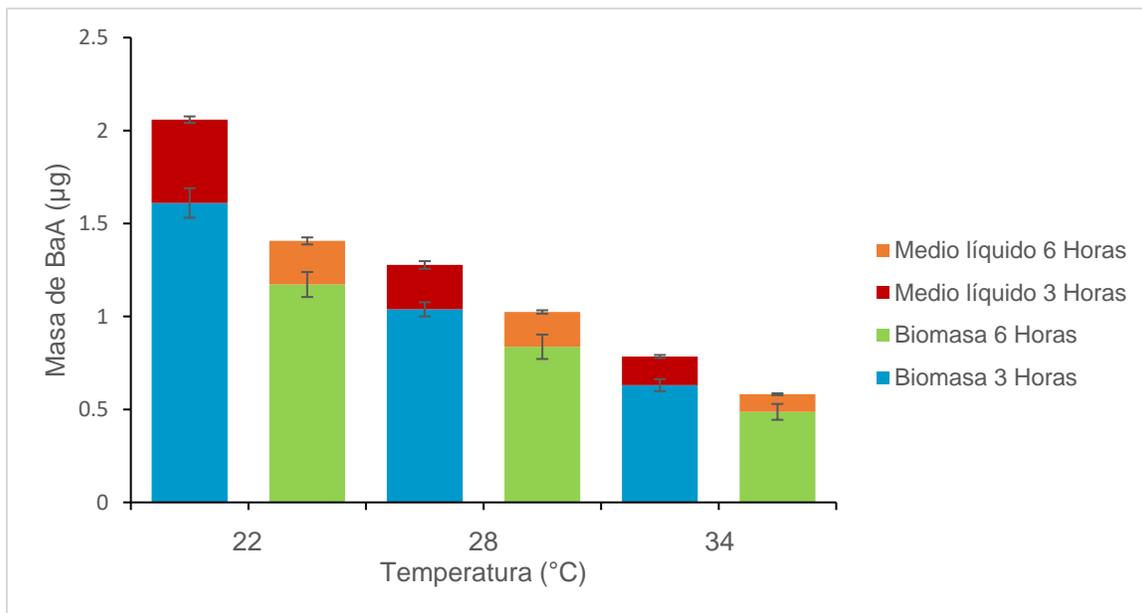


Figura 3.23 Cantidad de BaA ( $\mu\text{g}$ ) en medio líquido y biomasa en bioensayos de células de *Selenastrum capricornutum* a 22, 28 y 34 °C.

Comparando estos resultados con lo observado en los bioensayos de BaP, los procesos de degradación y remoción del BaA en las mismas condiciones de incubación son significativamente mayores. Esto puede deberse a que el BaP cuenta con un anillo aromático adicional que le proporciona una mayor estabilidad y dificultad para introducirse a la célula, por lo que su degradación requiere de tiempos de incubación más largos y temperaturas más altas. Dicha inferencia se corrobora al contrastar los bioensayos de 28 °C y 34 °C expuestos por 6 horas al BaP con sus análogos de 3 horas incubados con BaA. En estos el BaP se removió con mayor eficiencia, mientras que el BaA tuvo la mayor degradación. Esto resalta la importancia del tiempo de incubación, el cual puede compensar las dificultades de difusión del contaminante a la célula. Asimismo, se deduce que, si en las incubaciones de 3 horas el BaP es removido con mayor eficiencia, es debido a que la membrana celular adsorbe con facilidad al hidrocarburo del medio, dado su mayor hidrofobicidad.

La temperatura puede compensar otros factores en la remoción de los contaminantes. Al comparar los bioensayos de BaA a 22 °C y BaP a 28 °C por 3 horas se observa que el BaP se remueve con mayor facilidad. Las incubaciones por 6 horas muestran un comportamiento diferente, los bioensayos de BaA a 22 °C y BaP a 28 °C son estadísticamente similares, mientras que, al aumentar la temperatura a 28 °C y 34 °C, respectivamente, el BaP tiene una mayor remoción. Un factor que puede explicar el resultado es el aumento en la solubilidad del contaminante, facilitando su sorción a la microalga. Los análisis estadísticos se encuentran en el Anexo 1.3.

Finalmente, de estos bioensayos se puede verificar que la remoción se lleva a cabo más rápido que la degradación. En efecto, la remoción implica la desaparición de los HAPs exclusivamente del medio líquido, mientras que la degradación involucra su eliminación tanto del medio como de la biomasa. La remoción del contaminante en el medio es rápida debido a la facilidad con la que el hidrocarburo se adsorbe a la célula, mientras que la degradación requiere un proceso de activación de los mecanismos de inducción enzimática de la célula, para que en pasos subsecuentes la enzima degradadora pueda realizar su función.

#### 3.3.1.3 4,5-cis-dihidrodiol benzo[a]pireno

Los bioensayos realizados con BaP mostraron una relación proporcional entre la temperatura de incubación y la cantidad de metabolito encontrado, siendo drásticamente mayor a 34 °C, comparado con las demás condiciones evaluadas. Las cantidades de 4,5-dBaP determinadas en los bioensayos realizados se encuentran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) presente en bioensayos de exposición de células de *Selenastrum capricornutum*.

Tiempo de incubación	22 °C			28 °C			34 °C		
	Medio líquido (ng)	Biomasa (ng)	Total (ng)	Medio líquido (ng)	Biomasa (ng)	Total (ng)	Medio líquido (ng)	Biomasa (ng)	Total (ng)
3 Horas	12.315 ± 1.035	47.672 ± 4.576	59.987 ± 4.273	43.268 ± 3.382	46.116 ± 2.338	89.384 ± 1.865	65.233 ± 3.252	96.428 ± 13.788	161.662 ± 16.947
6 Horas	33.313 ± 0.619	89.214 ± 5.112	122.527 ± 5.626	109.643 ± 13.866	95.839 ± 6.279	205.482 ± 18.725	193.576 ± 6.045	272.219 ± 2.530	465.795 ± 5.378

Al analizar el medio líquido en las incubaciones por 3 horas se observó que, a 28 °C, el metabolito fue alrededor de 3.5 veces mayor que lo obtenido a 22 °C. La máxima cantidad del 4,5-dBaP se encontró a 34 °C, produciendo un 51% más comparado con el resultado a 28 °C. En la Figura 3.24 se muestran los cromatogramas de los metabolitos del BaP correspondientes en extractos obtenidos del medio líquido con 3 horas de incubación, señalando al 4,5-dBaP.

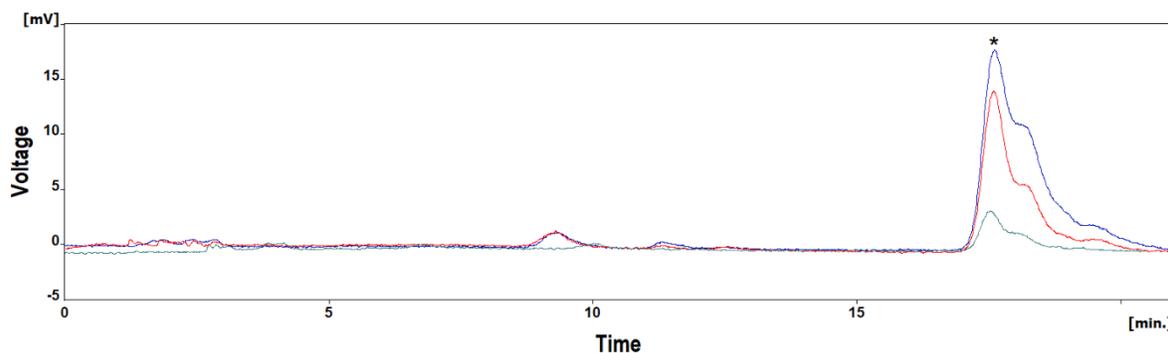


Figura 3.24 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes del medio líquido de cultivo (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

El efecto de la temperatura se mantuvo en las incubaciones por 6 horas, destacando que a 28 °C se obtuvo alrededor de 3.3 veces más metabolito que a 22 °C. Asimismo, a 34 °C se encontró un 77% más del analito, comparado con la incubación a 28 °C. Al contrastar estos ensayos con sus análogos de 3 horas se encontró que, en promedio, los ensayos de 6 horas contienen 2.7 veces mayor cantidad del metabolito. En la Figura 3.25 se exponen los cromatogramas correspondientes a los metabolitos del BaP en extractos de cultivos con 6 horas de incubación, señalando al 4,5-dBaP.

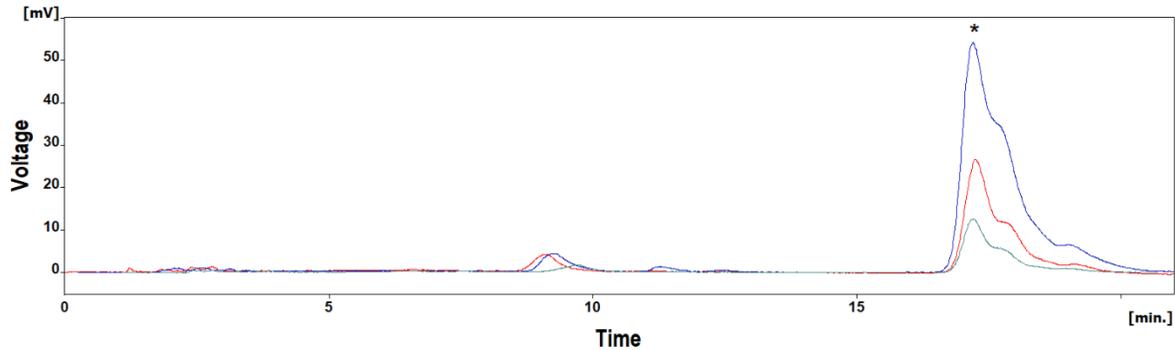


Figura 3.25 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes del medio líquido de cultivo (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 6 horas mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

La producción del 4,5-dBaP en la biomasa mostró un comportamiento diferente, resaltando que, en las incubaciones por 3 horas, los ensayos de 22 °C y 28 °C fueron estadísticamente similares, mientras que a 34 °C se observó el doble del analito en relación con el ensayo de 28 °C. Esto puede indicar que la rapidez del metabolismo en la microalga es similar a 22 °C y 28 °C, encontrándose en condiciones óptimas para la degradación a 34 °C. En la Figura 3.26 se muestran los cromatogramas correspondientes de los metabolitos del BaP en extractos de incubaciones de 3 horas, señalando al 4,5-dBaP que fue el metabolito que se monitoreó en la biomasa.

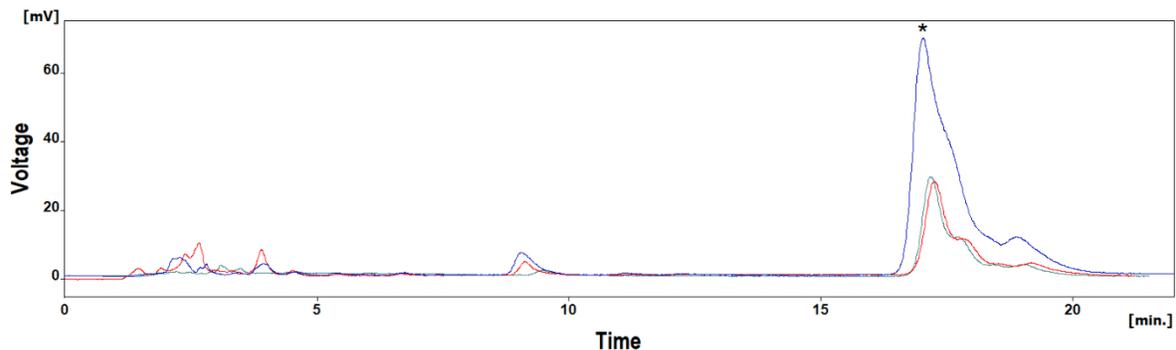


Figura 3.26 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de la biomasa de microalgas (rojo 22°C, verde 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

En las incubaciones por 6 horas se observó un aumento del 7% en la cantidad del 4,5-dBaP encontrada entre el ensayo de 28 °C y el de 22 °C en la biomasa, representando una diferencia significativa en su producción. Al aumentar la temperatura a 34 °C se observó un incremento drástico en el metabolito producido,

siendo alrededor de 2.8 veces mayor comparado con el de 28 °C. De manera general, las incubaciones de 6 horas tuvieron una mayor cantidad del metabolito y cada temperatura tuvo su propia relación de incremento entre los tiempos de incubación, siendo 1.9 veces mayor a 22 °C, 2.1 veces mayor a 28 °C y 2.8 veces mayor a 34 °C. Esta información indica que al realizar incubaciones más largas el efecto de la temperatura se acentúa, permitiendo distinguir mejor las variaciones de las cantidades de metabolito formado. Los cromatogramas correspondientes a los metabolitos del BaP en extractos de incubaciones de 6 horas, señalando al 4,5-dBaP que fue el metabolito que se monitoreó en la biomasa, se exponen en la Figura 3.27.

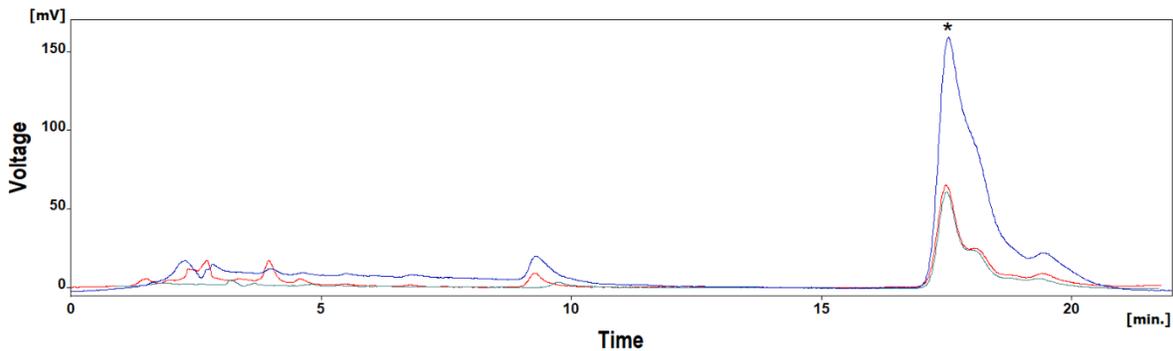


Figura 3.27 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de la biomasa de microalgas (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 6 horas mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

En la Figura 3.28 se ilustran en una gráfica de barras las cantidades totales determinadas en el medio líquido y la biomasa del 4,5-dBaP en los cultivos de las microalgas. Resalta que en las incubaciones por 3 horas a 22 °C el metabolito predomina en la biomasa, siendo casi cuatro veces mayor que en el medio líquido y es consistente con lo observado en estudios realizados a 25 °C en tiempos de incubación cortos (Hernández Blanco y García de Llasera, 2016). Esto contrasta con los ensayos a 28 °C en los que hay un aumento del 49% en la cantidad total del metabolito, respecto a lo obtenido a 22 °C, y cuenta con una distribución estadísticamente similar entre el medio líquido y la biomasa, indicando que a esta temperatura la microalga puede expulsar con mayor facilidad el metabolito al medio. La distribución del metabolito en la muestra cambia a 34 °C, predominando en la biomasa y siendo 1.8 veces mayor en su cantidad total, comparado con lo obtenido a 28 °C. Una posible explicación para ello es que en esta temperatura la célula no puede expulsar al metabolito a la misma rapidez con la que lo produce.

Las incubaciones por 6 horas tuvieron una cantidad de metabolito de dos a tres veces mayor que sus símiles de 3 horas en las temperaturas evaluadas,

considerando la suma contenida en la biomasa y el medio líquido. La distribución del 4,5-dBaP en los componentes del bioensayo mostró que a 22 °C la cantidad del metabolito fue 2.7 veces mayor en la biomasa que en el medio líquido, mientras que a 28 °C se encuentra principalmente en el medio líquido, siendo 1.7 veces mayor en la cantidad total obtenida respecto a la temperatura anterior. En la incubación a 34 °C su distribución fue similar a lo observado a 3 horas, encontrando alrededor de 2.3 veces más metabolito que en su análogo de 28 °C. Las diferencias en la distribución del metabolito pueden deberse a que al aumentar el tiempo de incubación este se produce en mayor cantidad, y cuenta con más tiempo para difundirse en el medio.

La información obtenida indica que la temperatura óptima para la degradación es 34 °C, siendo idónea para sensibilizar la microalga al contaminante e inducir la producción de la enzima degradadora (Fuentes Pérez, 2019). Es importante mencionar que Hernández y García de Llasera (2016) encontraron que, en el monitoreo de los metabolitos a 25 °C en incubaciones de 0.75 a 48 horas, el metabolito predominante es el 4,5-dBaP, cuya mayor producción se obtiene en exposiciones de 24 horas. Con esto se reafirma la importancia de la temperatura en la actividad metabólica y se sugiere en un futuro monitorear los metabolitos del BaP en incubaciones por 24 horas para evaluar el efecto de la temperatura, en las que se espera que su influencia sea más notoria.

Se presentó un caso particular al comparar los bioensayos de 34 °C por 3 horas y 28 °C por 6 horas, en los que se infiere que su producción intracelular es estadísticamente similar al observar el metabolito en la biomasa. Esto corrobora lo observado con el BaP, cuya degradación en ambas condiciones es prácticamente igual, mientras que su diferencia en la cantidad del metabolito en el medio líquido puede atribuirse a que, en la incubación por 6 horas, se ha difundido mejor. Los resultados del análisis estadístico se encuentran en el Anexo 1.4.

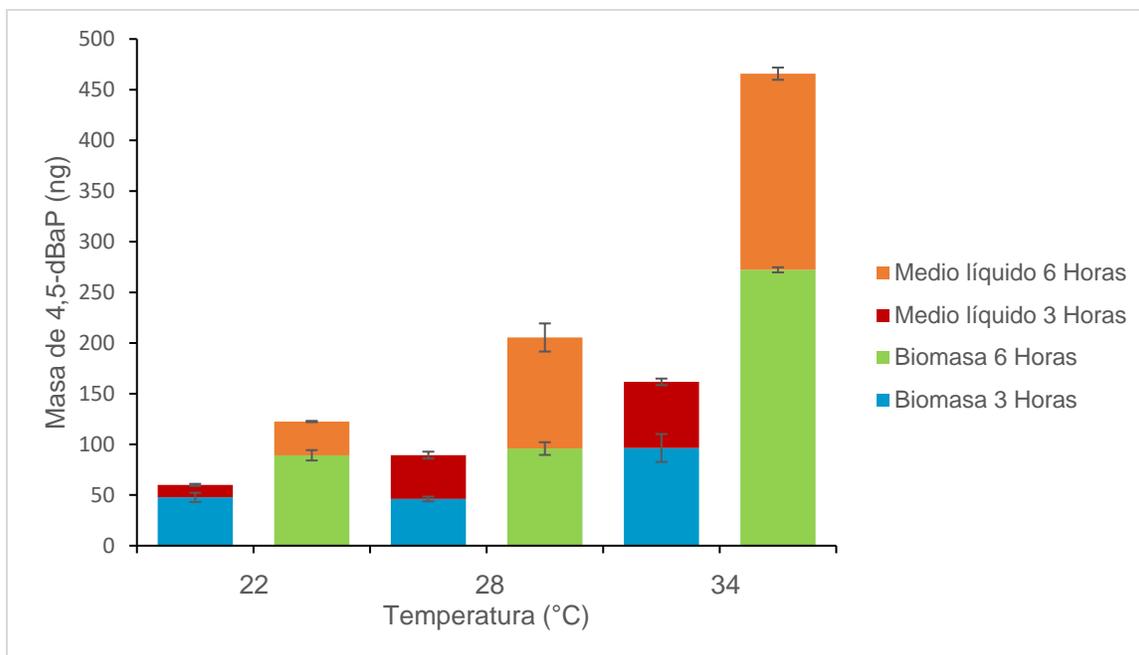


Figura 3.28 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) en medio líquido y biomasa en bioensayos con células de *Selenastrum capricornutum* a 22, 28 y 34 °C.

#### 3.3.1.4 5,6-cis-dihidrodiol benzo[a]antraceno

Los resultados obtenidos de los bioensayos con BaA mostraron que al aumentar la temperatura de incubación se favoreció la producción del metabolito. En la Tabla 3.10 se muestran las cantidades obtenidas del 5,6-dBaA en los bioensayos realizados, a las condiciones de tiempo y temperatura descritas previamente.

Tabla 3.10 Cantidad de 5,6-dBaA (ng) presente en bioensayos de exposición de células de *Selenastrum capricornutum*.

Tiempo de incubación	22 °C			28 °C			34 °C		
	Medio líquido (ng)	Biomasa (ng)	Total (ng)	Medio líquido (ng)	Biomasa (ng)	Total (ng)	Medio líquido (ng)	Biomasa (ng)	Total (ng)
3 Horas	12.021 ± 1.094	20.338 ± 0.943	32.359 ± 1.519	33.389 ± 1.571	26.363 ± 0.703	59.752 ± 2.158	37.842 ± 2.364	26.593 ± 0.677	64.435 ± 1.909
6 Horas	35.548 ± 2.857	32.926 ± 3.178	68.473 ± 5.790	89.967 ± 4.683	38.917 ± 1.251	128.884 ± 4.311	96.655 ± 5.156	45.522 ± 1.107	142.177 ± 6.120

En los bioensayos por 3 horas en el medio líquido se observó un aumento considerable del metabolito a 28 °C, siendo casi tres veces mayor que el ensayo a 22 °C. A 34 °C se dio un incremento significativo del 13% respecto a la temperatura inferior. Los cromatogramas correspondientes a los metabolitos del BaA en

extractos de cultivos con 3 horas de incubación se encuentran en la Figura 3.29, señalando al 5,6-dBaA que fue el metabolito que se monitoreó en el medio líquido.

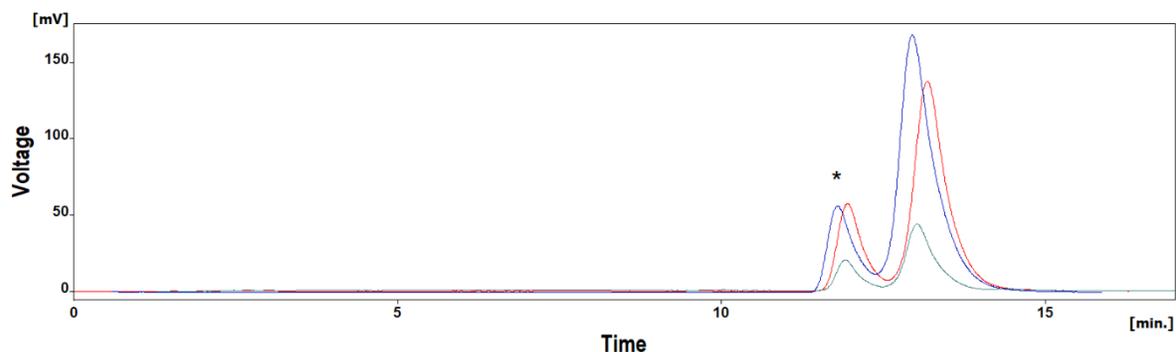


Figura 3.29 Cromatogramas de metabolitos de BaA en extractos provenientes del medio líquido de cultivo (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.

\* : 5,6-dBaA.

Las incubaciones por 6 horas en el medio líquido mostraron una tendencia similar al variar la temperatura, resaltando el ensayo a 28 °C que es 2.5 veces mayor que lo obtenido a 22 °C, y el incremento del 7%, entre 34 °C y 28 °C. Se observó que las cantidades del metabolito en estos ensayos fueron, en promedio, 2.7 veces mayores que sus análogos de 3 horas. Cabe destacar que en ambos tiempos de incubación los resultados a 28 °C y 34 °C tienen diferencias significativas entre sí, por lo que la temperatura es un factor importante en la formación del metabolito. En la Figura 3.30 se muestran los cromatogramas de los metabolitos del BaA, señalando al 5,6-dBaA, correspondientes a este conjunto de bioensayos.

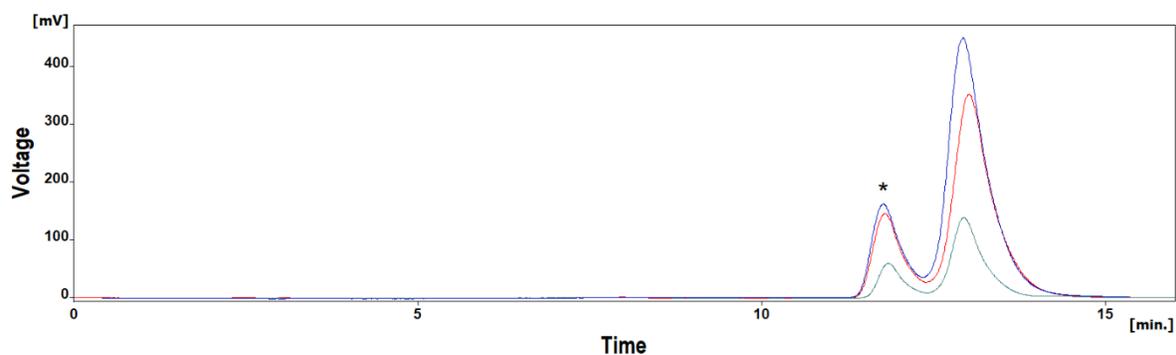


Figura 3.30 Cromatogramas de metabolitos de BaA en extractos provenientes del medio líquido de cultivo (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 6 horas mediante DF.

\* : 5,6-dBaA.

El 5,6-dBaA en la biomasa mostró su mínimo de producción a 22 °C, mientras que, al incrementar la temperatura a 28 °C, aumentó un 30%. Los bioensayos a 28 °C y 34 °C fueron estadísticamente similares, lo que permite inferir que estas incubaciones tienen una rapidez similar, o que el metabolito se produce lentamente. En la Figura 3.31 se muestran los cromatogramas correspondientes a los metabolitos del BaA en los bioensayos de 3 horas de incubación, señalando al 5,6-dBaA, en la biomasa.

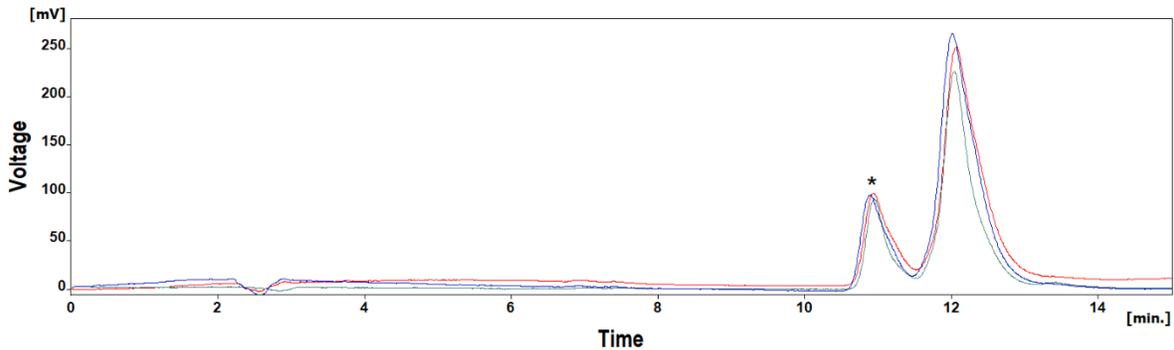


Figura 3.31 Cromatogramas de metabolitos de BaA en extractos provenientes de la biomasa de microalgas (verde 22 °C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.

\* : 5,6-dBaA.

El incremento en el tiempo de incubación a 6 horas permitió que la cantidad del metabolito en la biomasa de la microalga sí pudiera distinguirse significativamente entre las temperaturas de incubación. Se observó un aumento del 18% entre 22 °C y 28 °C, mientras que a 34 °C este fue del 17% con respecto a la temperatura inferior. La cantidad del metabolito determinado en estas incubaciones fue, en promedio, 1.6 veces mayor que sus análogos de 3 horas. Los cromatogramas correspondientes a los metabolitos del BaA en este conjunto de bioensayos se encuentran en la Figura 3.32, señalando al 5,6-dBaA.

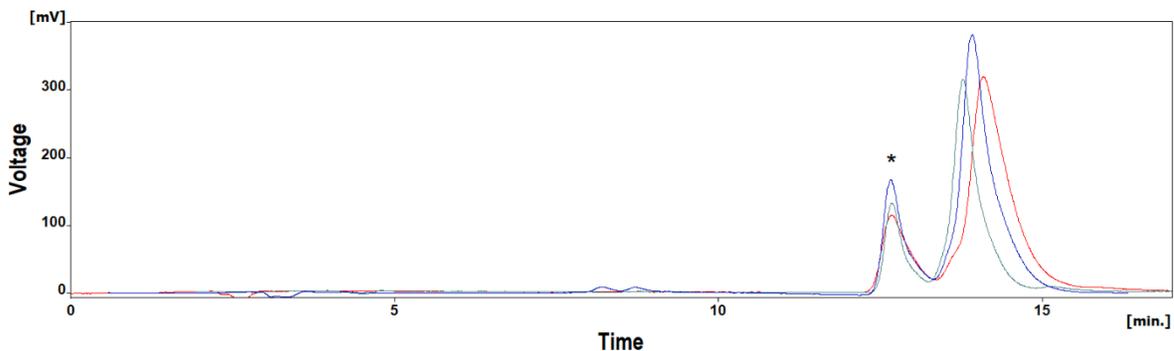


Figura 3.32 Cromatogramas de metabolitos de BaA en extractos provenientes de la biomasa de microalgas (verde 22 °C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 6 horas mediante DF.

\* : 5,6-dBaA.

En la Figura 3.33 se ilustra en un gráfico de barras las cantidades totales del metabolito, compuesto por la suma del 5,6-dBaA en el medio líquido y la biomasa. Las incubaciones por 3 horas tienen un incremento del 85% a 28 °C, comparado con su similar de 22 °C en los resultados totales. La mayor cantidad del metabolito se observó a 34 °C, con un aumento significativo del 8% en relación al bioensayo de 28 °C. La distribución del analito en la muestra varió con la temperatura, a 22 °C predominó en la biomasa, siendo 69% mayor que en su medio líquido. Al aumentar la temperatura, el 5,6-dBaA se encontró principalmente en el medio líquido, indicando que la expulsión de los metabolitos al medio es más rápida que su formación en la célula y contrasta con el caso del 4,5-dBaP. La diferencia entre ellos radica en el tamaño de la molécula, el 5,6-dBaA es más pequeño por lo que su difusión se facilita, además de ser más polar que sus análogos de BaP.

Las incubaciones por 6 horas tuvieron una tendencia similar, destacando el incremento en la cantidad total de metabolito de 88% entre 22 °C y 28 °C. A 34 °C se da la mayor producción, siendo 10% mayor que a 28 °C. El 5,6-dBaA se distribuye equitativamente entre el medio líquido y biomasa a 22 °C, mientras que a 28 °C y 34 °C predomina en el medio líquido. El tiempo de incubación influyó de manera similar en la producción del analito siendo, en promedio, 2.2 veces mayor que sus análogos de 3 horas.

La información obtenida indica que la producción del metabolito por parte de la microalga se favorece significativamente a partir de 28 °C y es mayor a 34 °C. Las incubaciones por 6 horas son más sensibles al cambio de temperatura, por lo que las condiciones ideales para la degradación del BaA es en ensayos a 34 °C.

La temperatura permite compensar el efecto del tiempo de incubación en casos como la incubación a 34 °C por 3 horas, cuya cantidad total es estadísticamente similar a lo obtenido en el ensayo a 22 °C por 6 horas. El desarrollo estadístico se encuentra en el Anexo 1.5.

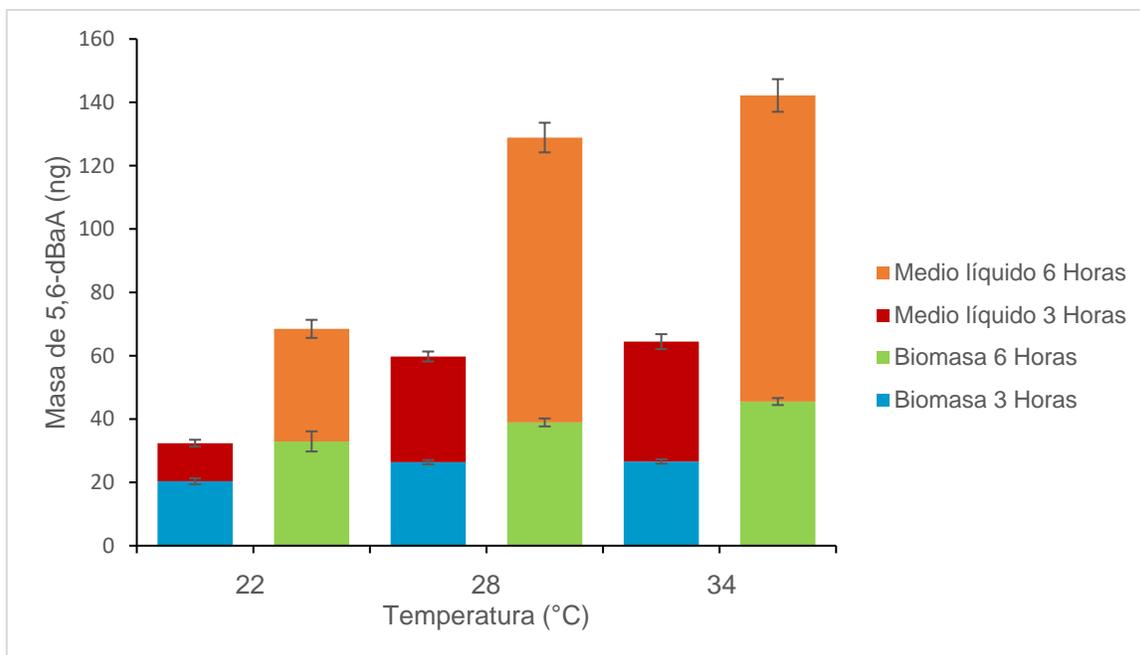


Figura 3.33 Cantidad de 5,6-dBaA (ng) en medio líquido y biomasa en bioensayos de células de *Selenastrum capricornutum* a 22, 28 y 34 °C.

Es importante resaltar que los metabolitos 8,9-dBaA y 10,11-dBaA mostraron una mayor respuesta al variar la temperatura en las condiciones de estudio, en comparación con lo observado con el 5,6-dBaA. De acuerdo a los resultados obtenidos por Hernández Blanco y García de Llasera (2016), el máximo de producción de los metabolitos se da en incubaciones por 24 horas, siendo mayoritaria la mezcla del 8,9-dBaA y 10,11-dBaA. Debido a que se ha podido realizar una separación adecuada del 5,6-dBaA de los otros dos metabolitos, se sugiere evaluar el efecto de la temperatura en su producción, realizando incubaciones por 24 horas, en las que se espera que su respuesta permita distinguir con mayor claridad las temperaturas más altas.

### 3.3.3 Degradación de BaP con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados

Con el fin de conocer si los extractos enzimáticos intracelulares conservaban su capacidad de degradación en presencia de la enzima responsable activa, se realizaron ensayos de carácter cualitativo para observar el efecto de la temperatura y explorar las condiciones de inmovilización que favorecen su actividad. Se eligió el BaP como el contaminante modelo debido a que es el hidrocarburo más complejo y recalcitrante, debido a su tamaño y estabilidad. Asimismo, el metabolito 4,5-dBaP predomina sobre los demás que se forman en el tiempo de incubación.

Los bioensayos de exposición con los extractos intracelulares inmovilizados se realizaron tomando células de *Selenastrum capricornutum* previamente activadas o sensibilizadas al BaP en una primera exposición. Posteriormente, se realizó una segunda exposición al BaP empleando los extractos intracelulares previamente lisados e inmovilizados en incubaciones por 3 horas a 22 °C, 28 °C y 34 °C, evaluando la capacidad de remoción del contaminante y la producción del 4,5-dBaP. Adicionalmente, se realizó una incubación por 6 horas a 28 °C para evaluar el efecto de la difusión de los analitos a través de los poros del alginato en la degradación efectuada por los extractos enzimáticos.

### 3.3.3.1 Evaluación de matrices con alginato

Retomando lo expuesto en la sección 2.3.4, se usaron dos metodologías de inmovilización para evaluar la degradación del BaP con los extractos intracelulares encapsulados en alginato: la primera usando 3 mL de alginato de sodio 3% requirió el uso de rotavapor para reducir el extracto enzimático de 5 a 3 mL; la segunda empleó 1 mL de alginato de sodio 9%, mezclándolo directamente con los 5 mL del extracto obtenido de la lisis para omitir su evaporación. Los ensayos consistieron en la determinación de los analitos BaP y 4,5-dBaP en la disolución buffer donde se incubaron las perlas inmovilizadas y en las mismas perlas que se disolvieron con citrato después de la incubación. Estos resultados fueron comparados con los siguientes controles: 1. Extractos intracelulares inmovilizados provenientes de células activadas, los cuales se manejaron sin segunda exposición y en los que se cuantificó el remanente de la primera exposición, y 2. Extractos enzimáticos intracelulares libres, sin inmovilización, provenientes de células activadas, que fueron sometidos a una segunda exposición. En estos controles se buscó evaluar el efecto de la inmovilización en la producción del metabolito.

Para asegurar que no se presentaran interferentes con los mismos tiempos de retención de los analitos en los cromatogramas, se analizaron las matrices de las perlas y la disolución buffer de incubación, siguiendo la metodología de obtención y extracción descrita en las secciones 2.3.3 y 2.4.2.2, respectivamente, omitiendo su incubación con el BaP. Estos extractos fueron analizados en las condiciones de trabajo de los analitos comparando sus cromatogramas, mostrados en las Figuras 3.34 para el BaP y 3.35 para los metabolitos. Se observa que las matrices no muestran señales en el tiempo de retención de los analitos, permitiendo su cuantificación en las condiciones de análisis.

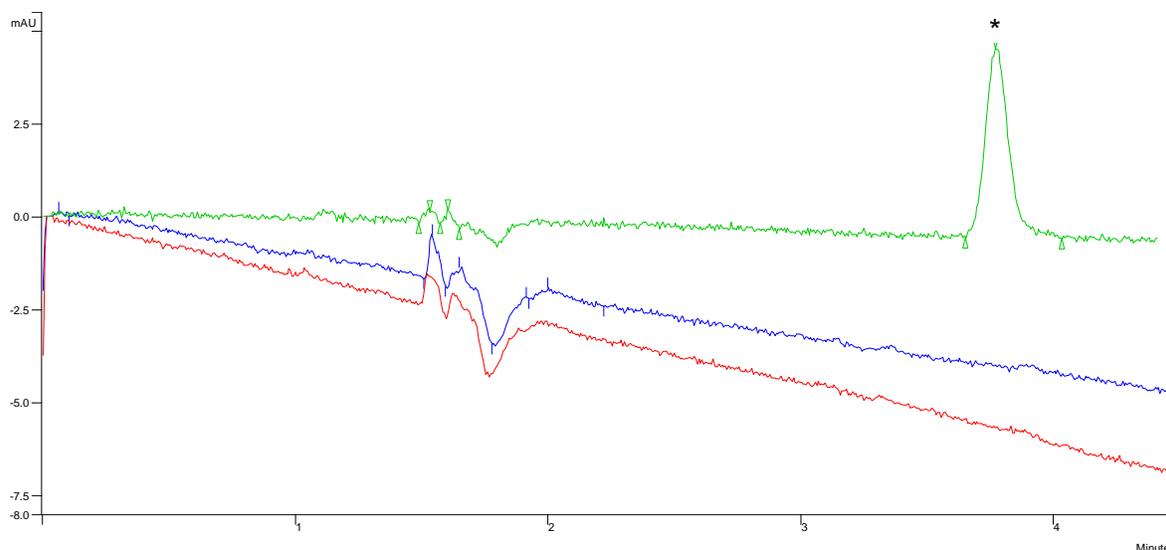


Figura 3.34 Cromatogramas de perlas (azul), disolución buffer de incubación (rojo) y disolución estándar de BaP (0.3  $\mu\text{g/mL}$ , verde) con detección UV.

\* : BaP.

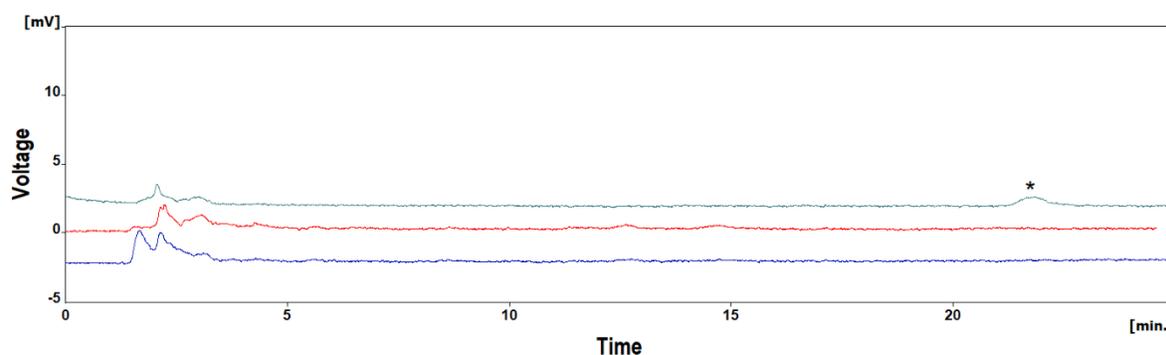


Figura 3.35 Cromatogramas de perlas (azul), disolución buffer de incubación (rojo) y disolución estándar de 4,5-dBaP (1.2 ng/mL, verde) mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

### 3.3.3.2 Benzo[a]pireno

Los bioensayos enzimáticos consistieron en la exposición de los extractos intracelulares inmovilizados en perlas de alginato sumergidos en 15 mL de disolución buffer adicionada con 4  $\mu\text{g}$  de BaP, equivalentes a 266  $\mu\text{g/L}$ . Los resultados mostraron que el control de remanente de la primera exposición fue menor al límite de cuantificación y que, de manera general, la degradación de los extractos enzimáticos inmovilizados con los dos métodos evaluados fue mayor que en el control con enzimas libres. En la Figura 3.36 se muestran, de manera ilustrativa, los cromatogramas obtenidos en los bioensayos con alginato 3% a 28  $^{\circ}\text{C}$  por 3 horas, consistiendo en el ensayo del extracto enzimático inmovilizado y la

disolución buffer en el que se incubó, junto a los controles de enzimas libres y de remanentes de la primera exposición.

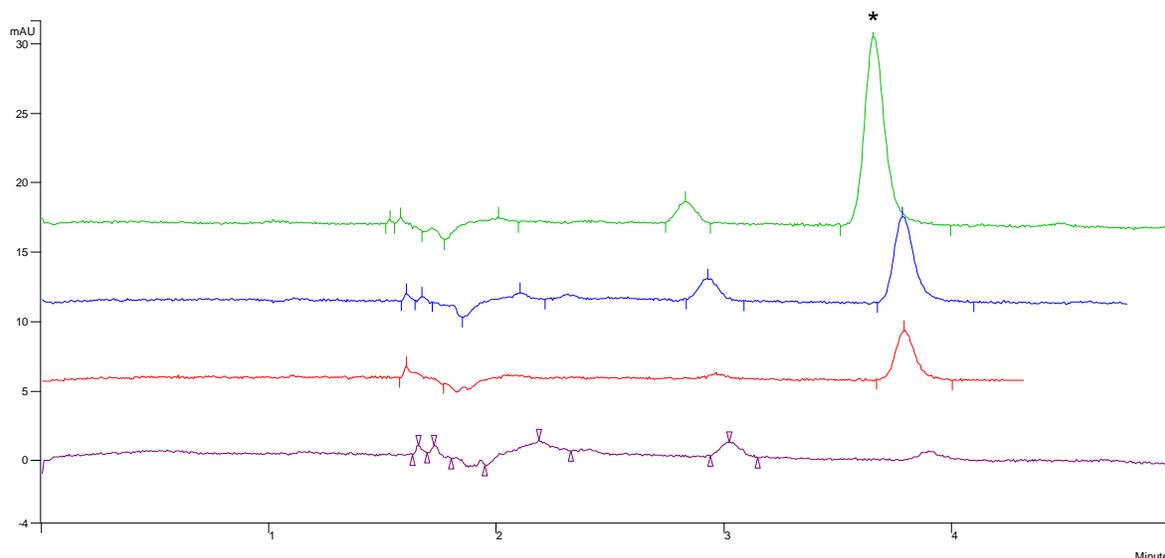


Figura 3.36 Cromatogramas de BaP de enzima libre (verde), perlas (azul), disolución buffer de incubación (rojo) y control de remanentes de BaP (morado) en bioensayos con alginato 3% a 28 °C por 3 horas con detección UV.

\* : BaP.

En la Tabla 3.11 se integran las cantidades de BaP y sus porcentajes de remoción y degradación obtenidos en los bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados, a diferentes temperaturas y dos condiciones de inmovilización.

Tabla 3.11 Cantidad de BaP ( $\mu\text{g}$ ) presente en bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de *Selenastrum capricornutum* en incubaciones de 3 horas.

Ensayo	22 °C			28 °C			34 °C		
	Buffer ( $\mu\text{g}$ )	Perlas ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )	Buffer ( $\mu\text{g}$ )	Perlas ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )	Buffer ( $\mu\text{g}$ )	Perlas ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )
BaP									
Alginato 3%	1.177	0.944	2.121	0.617	1.159	1.777	0.593	0.840	1.433
Remoción	71%			85%			85%		
Degradación	47%			56%			64%		
Alginato 9%	1.250	0.833	2.083	0.771	1.107	1.878	0.679	0.943	1.622
Remoción	69%			81%			83%		
Degradación	48%			53%			59%		
Enzima libre	2.559			2.448			2.407		
Degradación	36%			39%			40%		

Al analizar la disolución buffer de incubación en los bioensayos se observó que, en las dos condiciones de inmovilización, se tiene una mayor cantidad de BaP a 22 °C, la cual disminuye al aumentar la temperatura. Este cambio es más sutil entre 28 °C y 34 °C, condiciones en las que la remoción del hidrocarburo es mayor al 81%. En

las Figuras 3.37 y 3.38 se muestran los cromatogramas correspondientes al BaP en la disolución buffer de incubación por 3 horas a diferentes temperaturas para los ensayos con alginato al 3% y 9%, respectivamente.

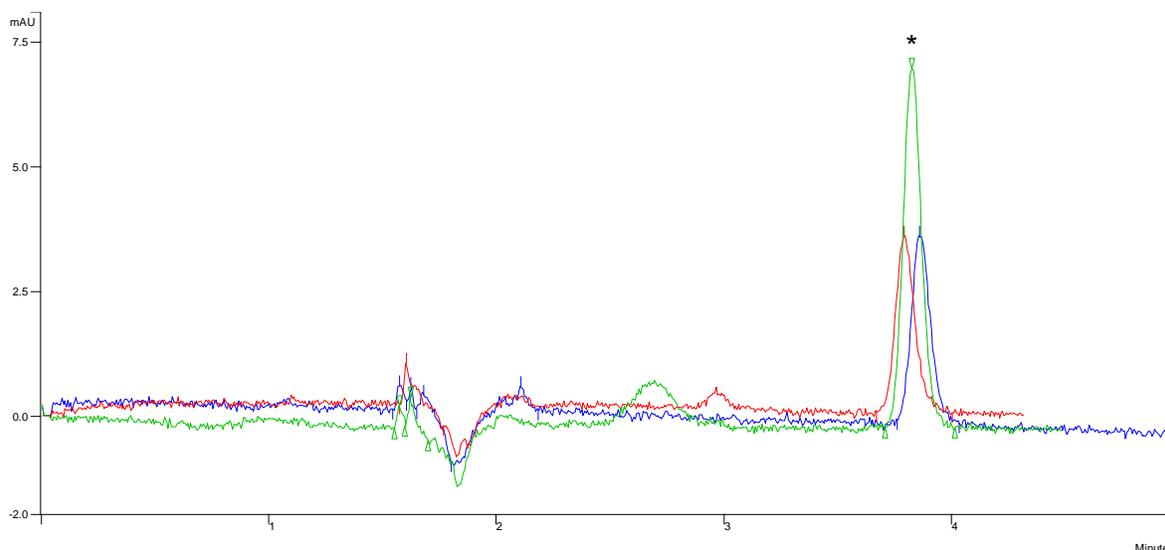


Figura 3.37 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de la disolución buffer de incubación en ensayos con alginato 3% (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.

\* : BaP.

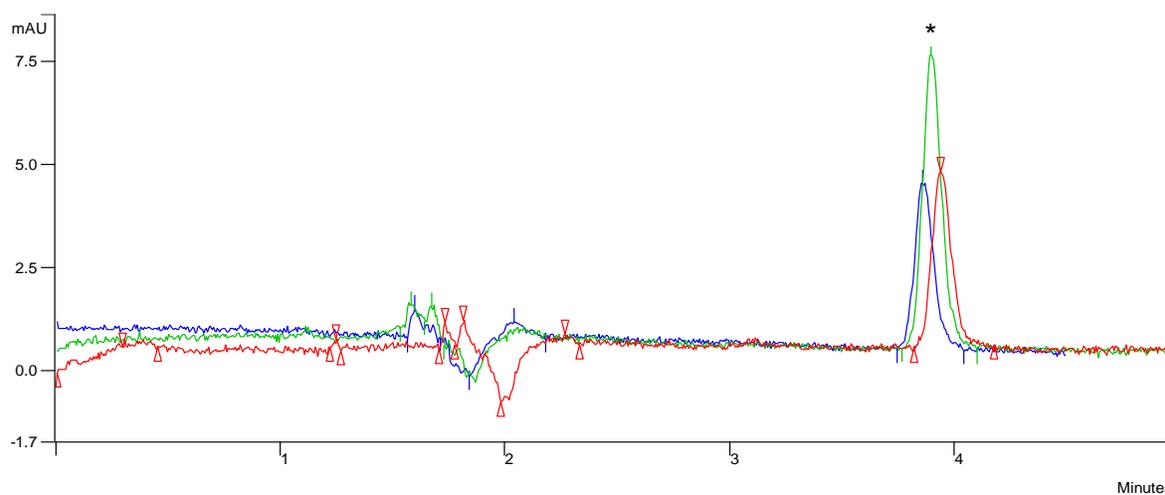


Figura 3.38 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de la disolución buffer de incubación en ensayos con alginato 9% (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.

\* : BaP.

Se observó una tendencia diferente en el hidrocarburo contenido en las perlas, destacando su aumento a 28 °C en los ensayos realizados. Esto puede deberse a

que a 22 °C la solubilidad del BaP es menor, disminuyendo su disponibilidad para adsorberse, mientras que a 28 °C se tienen condiciones más favorables para su interacción. A 34 °C se promueve mejor la degradación del contaminante, reflejado en la disminución del BaP en la muestra. Los cromatogramas de las Figuras 3.39 y 3.40 muestran la señal del BaP en las perlas provenientes de los ensayos de incubación a 3 horas a diferentes temperaturas con perlas constituidas con alginato 3% y 9%, respectivamente.

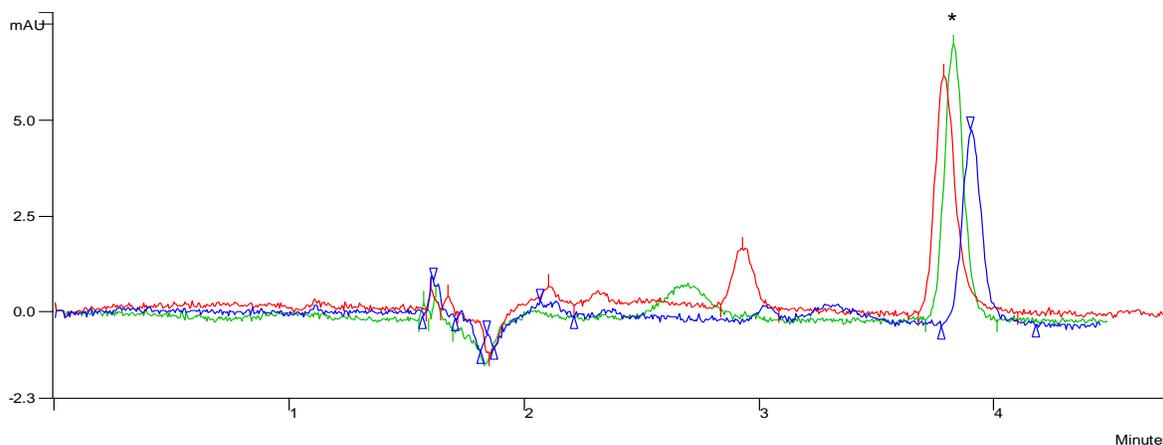


Figura 3.39 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de perlas con alginato 3% en ensayos de exposición (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.

\* : BaP.

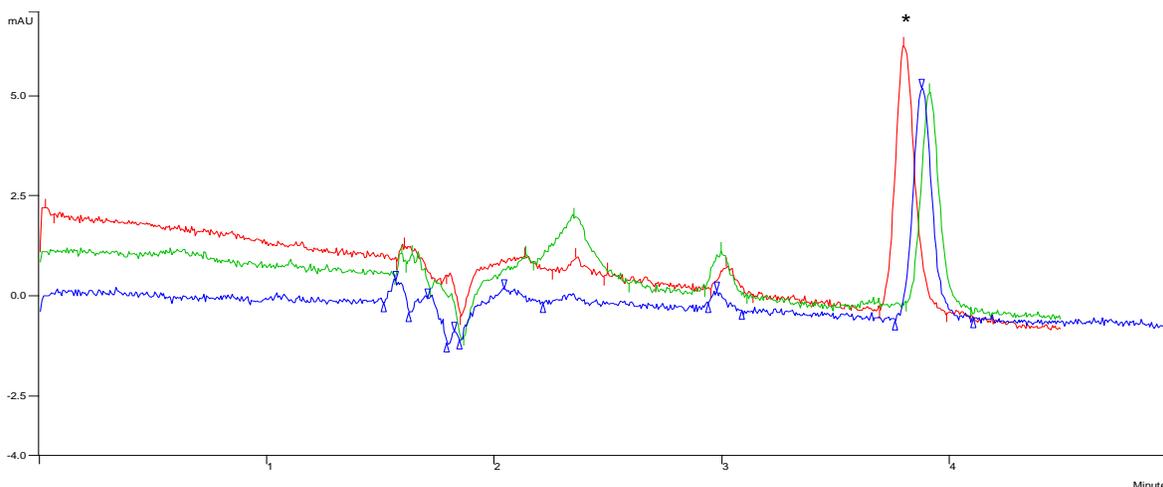


Figura 3.40 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de perlas con alginato 9% en ensayos de exposición (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) en incubación de 3 horas con detección UV.

\* : BaP.

Los resultados de los controles de enzima libre, que también se presentan en la Tabla 3.11, no reflejan un cambio notable con respecto a la temperatura en la degradación, que fue menor a lo observado en los ensayos con extractos enzimáticos inmovilizados. En efecto, con la enzima libre la cantidad de BaP parece disminuir muy levemente al aumentar la temperatura de incubación, sin embargo, la enzima mantuvo su capacidad degradadora en la disolución buffer a las temperaturas evaluadas. Es importante considerar que las enzimas libres están en un extracto crudo que puede interferir con su capacidad de degradación y no cuentan con mecanismos de autorregulación, a diferencia de las células, o con barreras físicas que le otorguen protección y estabilidad respecto al medio en el que se encuentren, como sucede en los extractos inmovilizados. En la Figura 3.41 se ilustran los cromatogramas correspondientes a los controles con enzimas libres comparados con un estándar que representa la cantidad de BaP con el que se fortificaron los medios.

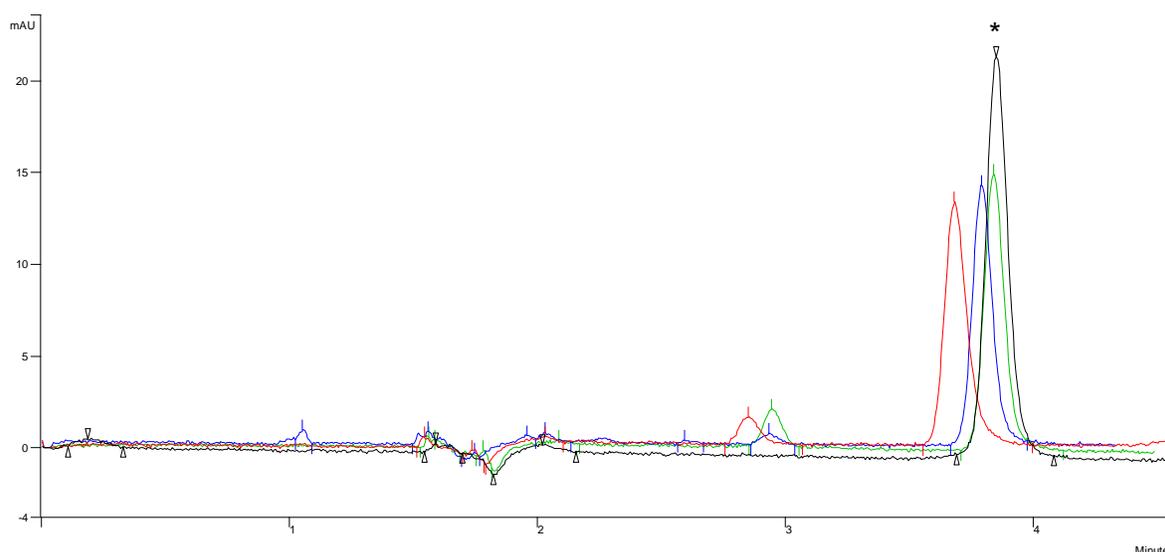


Figura 3.41 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de ensayos de exposición con enzimas libres (azul 34°C, rojo 28°C, verde 22°C) y disolución estándar (1 µg/mL, negro) en incubación de 3 horas con detección UV.

\* : BaP.

Comparando los porcentajes de remoción y degradación obtenidos con las perlas inmovilizadas en los dos procedimientos se observa que son similares; esto indica que ambos fueron igualmente exitosos para favorecer el intercambio de BaP del exterior al interior de la perla, al igual que la conservación de la capacidad degradadora de la enzima. Sin embargo, el procedimiento con 9% de alginato resultó ser más favorable a nivel práctico, ya que se evita la evaporación. Al variar la temperatura las dos metodologías tuvieron la misma tendencia, destacando que la distribución del BaP cambió al variar la temperatura, predominando en el buffer a

22 °C y en las perlas en las demás condiciones de incubación, debido a la disponibilidad del contaminante en medios acuosos. En la Figura 3.42 se muestra un diagrama de barras con los resultados globales de los ensayos con extractos enzimáticos que fueron detallados en la Tabla 3.11.

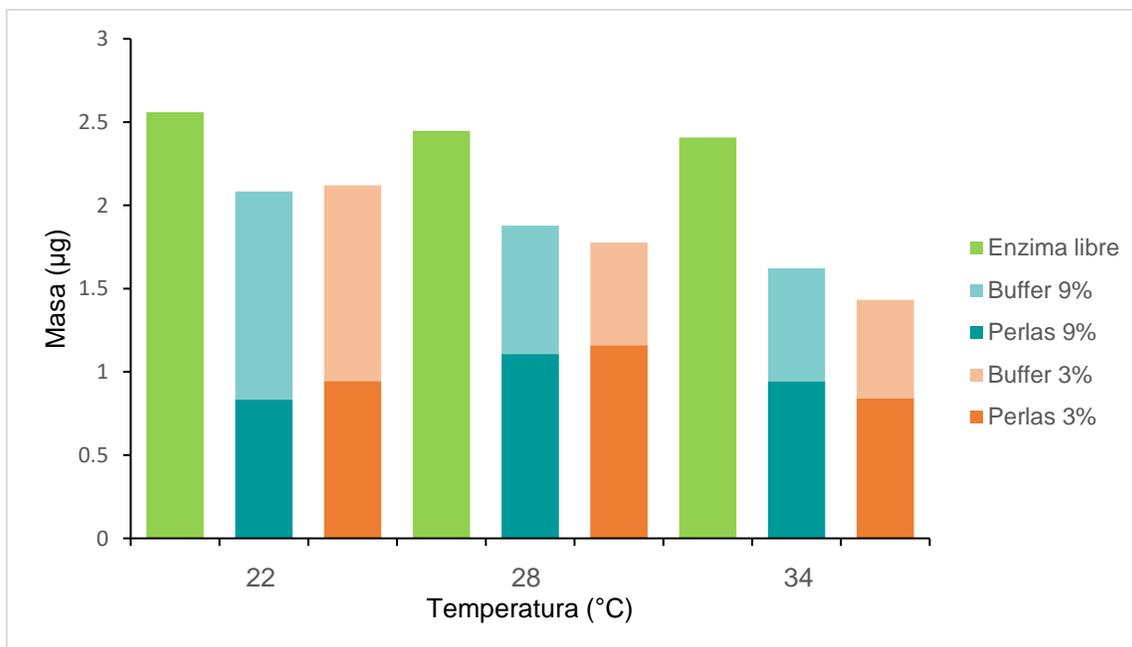


Figura 3.42 Cantidad de BaP ( $\mu\text{g}$ ) en disolución buffer de incubación, perlas y enzimas libres de extractos intracelulares de *Selenastrum capricornutum* en incubaciones de 3 horas a 22, 28 y 34 °C.

Es importante resaltar que en los bioensayos con las células la biomasa tuvo una mayor cantidad de BaP en comparación con lo observado en las perlas de los ensayos con extractos enzimáticos. Lo anterior indicaría que la microalga remueve mejor al BaP a 28 °C y 34 °C con valores superiores al 94%, en comparación con los resultados de los extractos inmovilizados que fueron del 81-85%, acorde a los datos de las incubaciones por 3 horas. En la Figura 3.43 se muestra gráficamente la remoción del BaP con las células y los extractos enzimáticos.

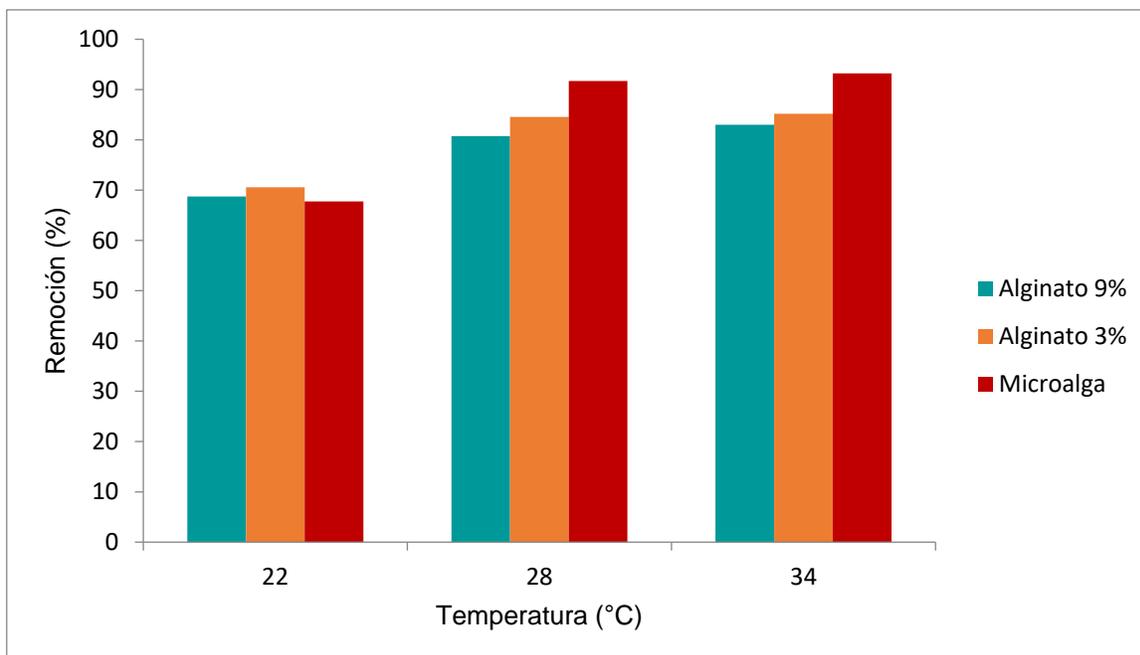


Figura 3.43 Remoción de BaP (%) con células de *Selenastrum capricornutum* y extractos intracelulares inmovilizados con alginato en incubaciones por 3 horas a 22, 28 y 34 °C.

Por el contrario, la degradación en los extractos enzimáticos inmovilizados fue alrededor del 53-64% a 28 °C y 34 °C, ligeramente mayor al 46-58% obtenido con las células en las incubaciones por 3 horas a las mismas temperaturas. Lo anterior puede indicar que la célula remueve con mayor facilidad al contaminante del medio, debido a su capacidad de adsorber al BaP en la pared celular. Por su parte, los extractos enzimáticos inmovilizados aparentemente degradan el contaminante con una eficiencia similar a las células. Estos resultados son prometedores porque se demuestra que esta enzima tiene un alto potencial para efectos de biorremediación ambiental y requieren de un mayor estudio para demostrar estadísticamente sus ventajas sobre el uso de cultivos celulares. En la Figura 3.44 se expone la degradación del BaP en sus incubaciones por 3 horas, empleando las microalgas y los extractos enzimáticos

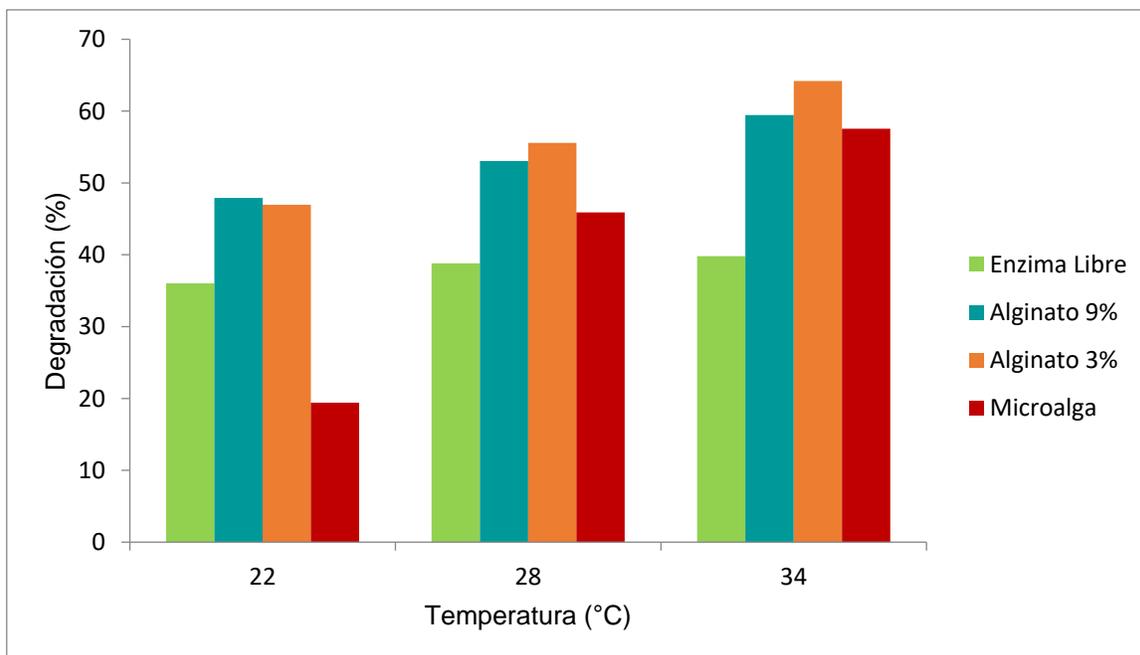


Figura 3.44 Degradación de BaP (%) con células de *Selenastrum capricornutum*, extractos intracelulares inmovilizados con alginato y enzimas libres en incubaciones por 3 horas a 22, 28 y 34 °C.

Para evaluar el efecto de la difusión del contaminante entre la disolución buffer de incubación y la perla se realizó un bioensayo a 28 °C por 6 horas, usando las dos metodologías de inmovilización previamente descritas, determinando el BaP en el buffer de incubación y en las perlas. En la Tabla 3.12 se registran las cantidades de BaP obtenidos en estos bioensayos, comparando los resultados de 3 y 6 horas.

Tabla 3.12 Cantidad de BaP ( $\mu\text{g}$ ) presente en bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de *Selenastrum capricornutum* a 28 °C en incubaciones de 3 y 6 horas.

Ensayo BaP	3 Horas			6 Horas		
	Buffer ( $\mu\text{g}$ )	Perlas ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )	Buffer ( $\mu\text{g}$ )	Perlas ( $\mu\text{g}$ )	Total ( $\mu\text{g}$ )
Alginato 3%	0.617	1.159	1.777	0.699	0.995	1.694
Remoción	85%			83%		
Degradación	56%			58%		
Alginato 9%	0.771	1.107	1.878	0.538	0.886	1.424
Remoción	81%			87%		
Degradación	53%			64%		
Enzima libre	2.448			2.105		
Degradación	39%			47%		

De manera general, se observó una disminución del BaP al aumentar el tiempo de incubación. En las Figuras 3.45 y 3.46 se muestran los cromatogramas obtenidos en los ensayos con alginato 3% y 9%, respectivamente.

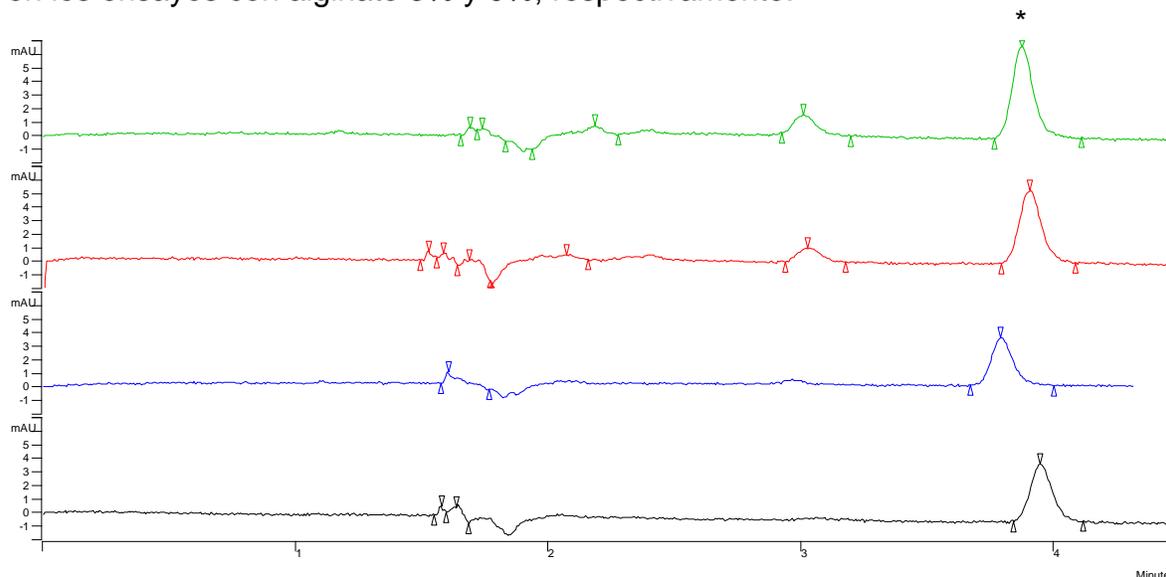


Figura 3.45 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de ensayos con alginato 3% a 28 °C en perlas (azul 3 horas, rojo 6 horas) y disolución buffer de incubación (verde 3 horas, negro 6 horas) con detección UV.

\* : BaP.

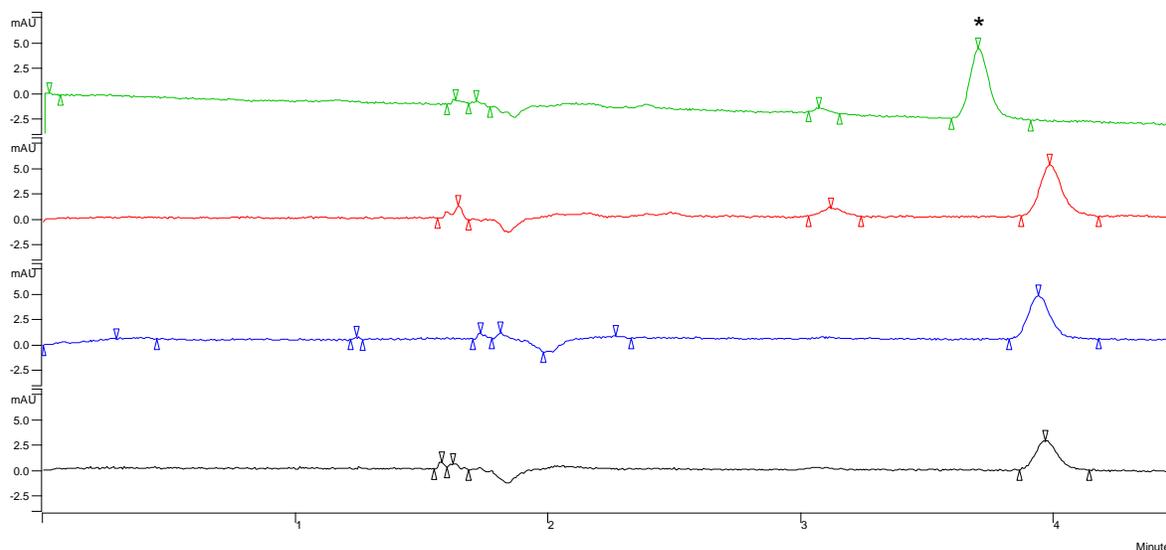


Figura 3.46 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de ensayos con alginato 9% a 28 °C en perlas (azul 3 horas, rojo 6 horas) y disolución buffer de incubación (verde 3 horas, negro 6 horas) con detección UV.

\* : BaP.

El comportamiento se mantuvo en los controles enzimáticos libres, en los que se observó una disminución de 0.343  $\mu\text{g}$  de BaP en la incubación por 6 horas respecto a su homólogo de 3 horas. De igual forma, los controles con enzimas libres tuvieron una mayor cantidad de BaP que la encontrada en los ensayos con extractos enzimáticos inmovilizados, por lo que su porcentaje de degradación fue menor. Lo anterior corrobora que la enzima actúa mejor al protegerla del ambiente externo mediante su inmovilización. Los cromatogramas del BaP provenientes de los controles con enzimas libres se encuentran en la Figura 3.47.

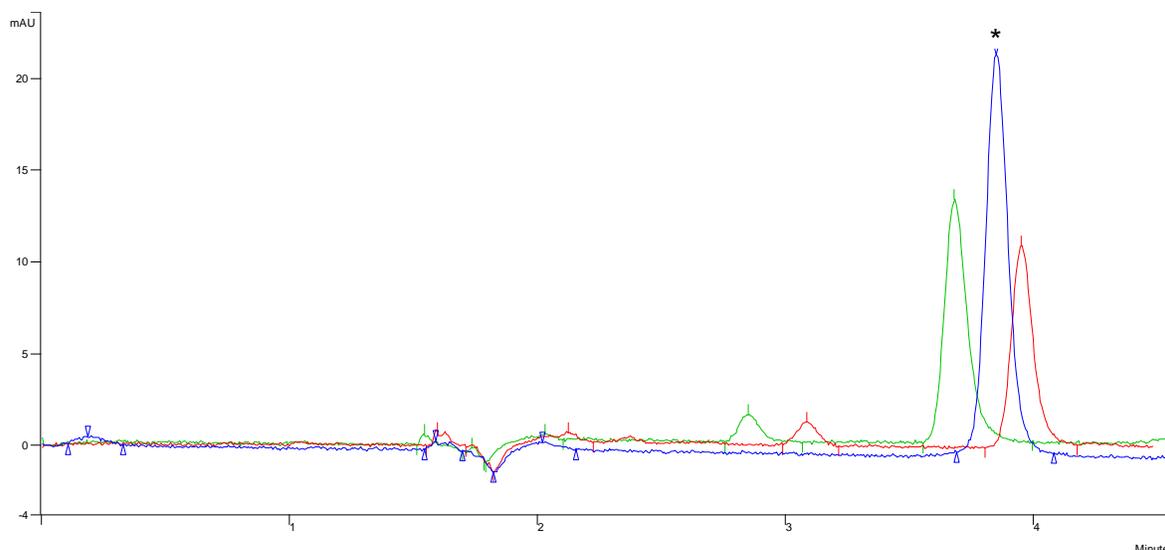


Figura 3.47 Cromatogramas de BaP en extractos provenientes de enzimas libres (verde 3 horas, rojo 6 horas) y disolución estándar (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en acetonitrilo, azul) en incubaciones a 28 °C con detección UV.

\* : BaP.

Al comparar los resultados resalta la disminución de la cantidad de BaP total al aumentar el tiempo de incubación y en ambas condiciones de inmovilización se mantiene la tendencia de que el hidrocarburo se encuentra principalmente en la perla. Los ensayos realizados con alginato 9% presentaron la mayor diferencia en la concentración de BaP al aumentar el tiempo de incubación a 6 horas, cuya remoción fue la mayor de todas las condiciones evaluadas. Esto puede deberse a que las enzimas inmovilizadas con esta metodología no se evaporaron, evitando su merma y favoreciendo el proceso de degradación. Los resultados generales se muestran en la Figura 3.48, representados en una gráfica de barras.

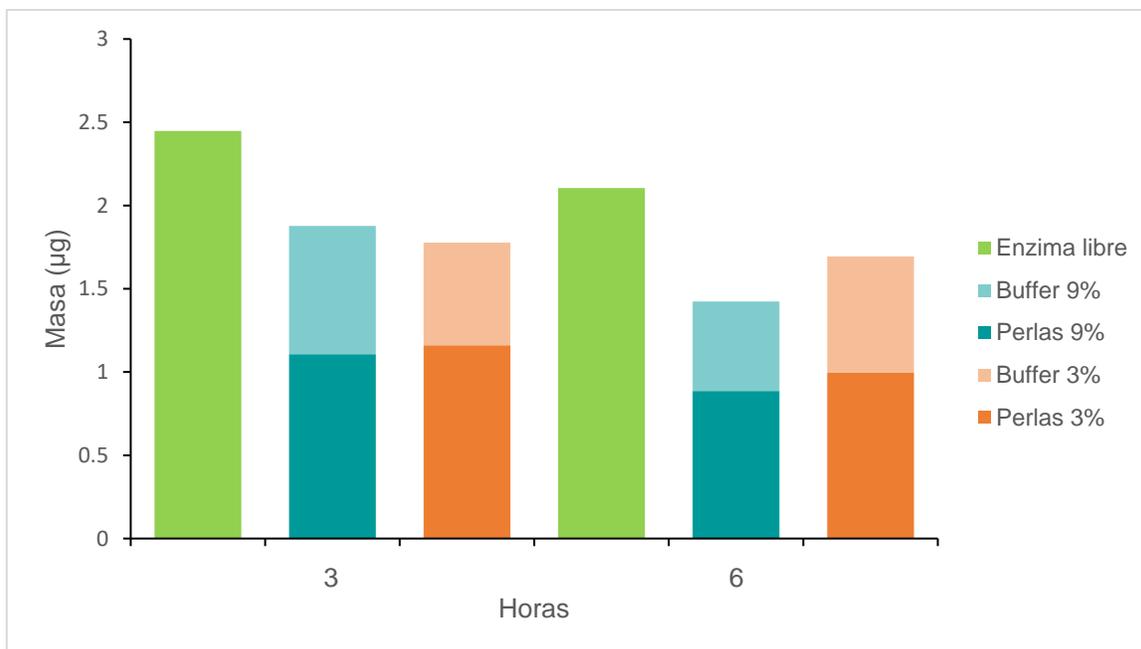


Figura 3.48 Cantidad de BaP ( $\mu\text{g}$ ) en disolución buffer de incubación, perlas y enzimas libres de extractos intracelulares de *Selenastrum capricornutum* a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  en incubaciones de 3 y 6 horas.

En las incubaciones por 6 horas las células removieron el 95% del hidrocarburo, siendo mejor que los extractos inmovilizados con alginato 3% (83%) o 9% (87%). En la Figura 3.49 se observa la remoción del hidrocarburo en las incubaciones por 6 horas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

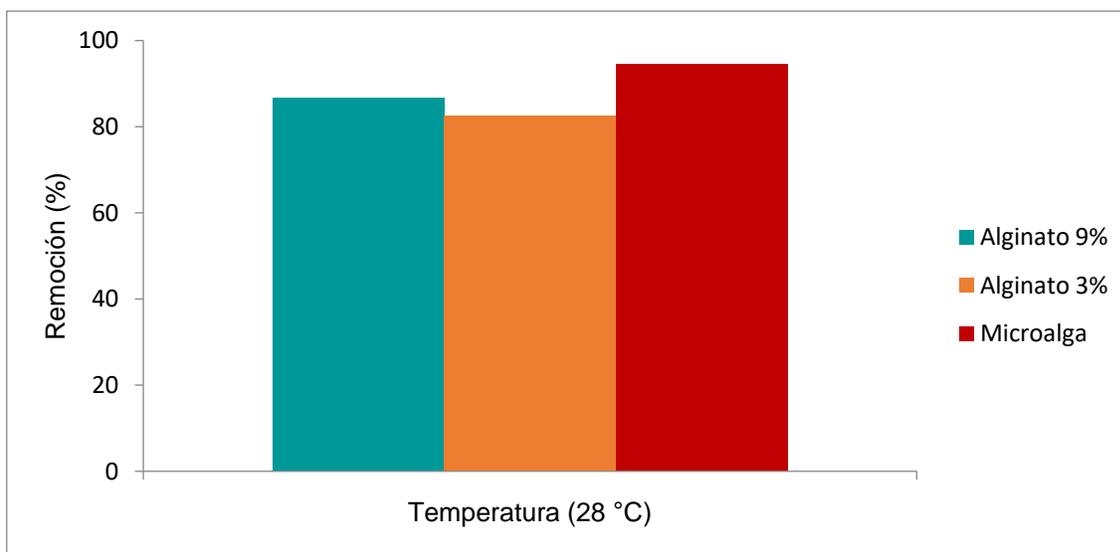


Figura 3.49 Remoción de BaP (%) con células de *Selenastrum capricornutum* y extractos intracelulares inmovilizados con alginato en incubaciones por 6 horas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Por otra parte, la degradación en estas condiciones realizada por las células fue similar a lo obtenido con las enzimas en alginato 3%, alrededor del 58%, mientras que con alginato 9% llegó al 64%. Esto puede deberse a que no se sometió al proceso de evaporación, reduciendo los pasos en los que puede perderse la biomolécula. Estos resultados se muestran en la Figura 3.50.

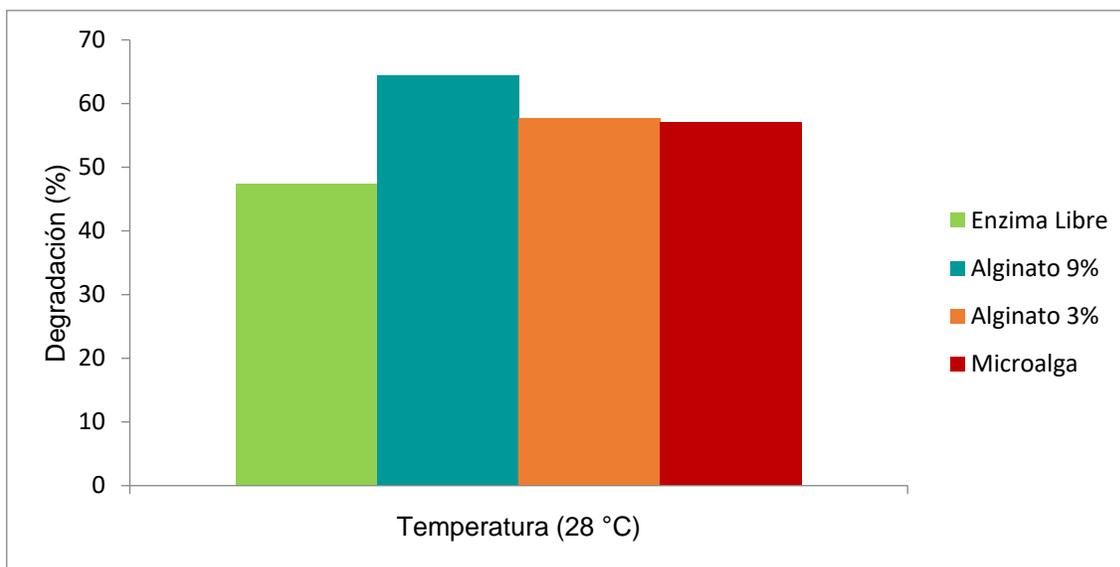


Figura 3.50 Degradación de BaP (%) con células de *Selenastrum capricornutum*, extractos intracelulares inmovilizados con alginato y enzimas libres en incubaciones por 6 horas a 28 °C.

### 3.3.3.3 4,5-cis dihidrodiol benzo[a]pireno

Se realizaron las cuantificaciones del 4,5-dBaP en la disolución buffer de incubación y las perlas provenientes de los ensayos enzimáticos inmovilizados. La Tabla 3.13 recopila las cantidades obtenidas de 4,5-dBaP con las dos metodologías de inmovilización en los bioensayos por 3 horas a diferentes temperaturas.

Tabla 3.13 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) presente en bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de *Selenastrum capricornutum* en incubaciones de 3 horas.

Ensayo	22 °C		28 °C			34 °C		
	Buffer (ng)	Perlas (ng)	Buffer (ng)	Perlas (ng)	Total (ng)	Buffer (ng)	Perlas (ng)	Total (ng)
Alginato 3%	LC	LC	22.940	21.273	44.213	LC	LC	LC
Alginato 9%	LC	LC	53.083	60.344	113.428	8.799	LC	8.799
Enzima libre	20.213		167.263			18.183		

De manera general, se observó una mayor cantidad de metabolito con las enzimas libres en comparación con los extractos inmovilizados. La cantidad del 4,5-dBaP presentó diferencias en las condiciones de inmovilización; en el caso de los ensayos

con alginato al 3% las perlas y la disolución buffer de incubación tuvieron resultados similares, mientras que al usar alginato al 9% hubo una mayor cantidad del analito en las perlas y la suma total en la muestra fue mayor que en sus análogos de 3%. El perfil cromatográfico de los metabolitos en los bioensayos a 34 °C con enzimas libres y enzimas inmovilizadas, compuestas por las perlas y la disolución buffer, junto al control de remanentes se observan en la Figura 3.51.

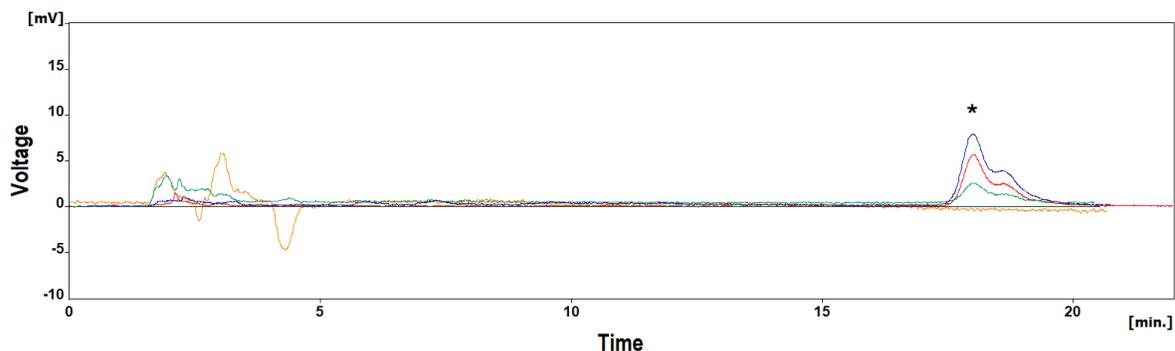


Figura 3.51 Cromatogramas de bioensayos a 34 °C con enzima libre (azul) y extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados con alginato 9%: perlas (verde), disolución buffer de incubación (rojo) y remanentes de metabolitos (naranja) mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

Al analizar el 4,5-dBaP en la disolución buffer se observó que la producción de metabolito a 22 °C fue ligeramente menor que a 34 °C, obteniendo la mayor cantidad a 28 °C. Esta tendencia se replicó en ambas metodologías, sin embargo, tuvieron diferencias en la cantidad del metabolito, siendo mayor en los bioensayos que no evaporaron sus extractos enzimáticos. Los cromatogramas obtenidos se muestran en las Figuras 3.52, para los ensayos con alginato 3%, y 3.53 para alginato 9%.

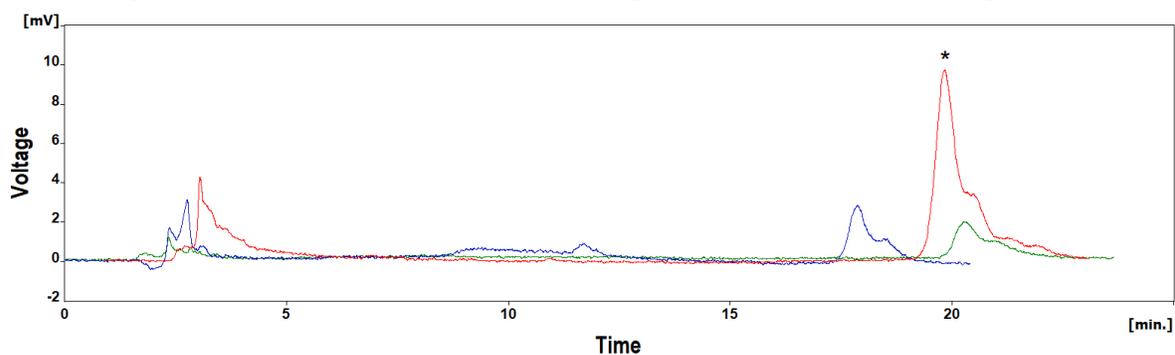


Figura 3.52 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de la disolución buffer de incubación en ensayos con alginato 3% (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.

\* : 4,5-dBaP

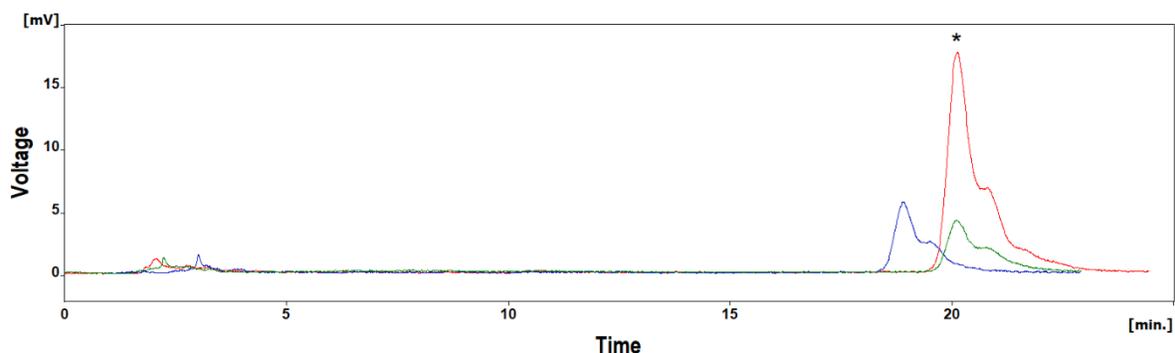


Figura 3.53 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de la disolución buffer de incubación en ensayos con alginato 9% (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.

\* : 4,5-dBaP

Las cantidades de 4,5-dBaP en las perlas mostraron un perfil de variación con la temperatura similar a lo observado en la disolución buffer de incubación, replicando la tendencia en la que el máximo del metabolito se encontró a 28 °C. Cabe destacar que los ensayos a 28 °C con alginato al 9% tuvieron el doble del metabolito en comparación con su análogo que empleó alginato al 3%. La Figura 3.54 muestra los cromatogramas del 4,5-dBaP determinadas de los ensayos con alginato 3%, con su símil de 9% en la Figura 3.55.

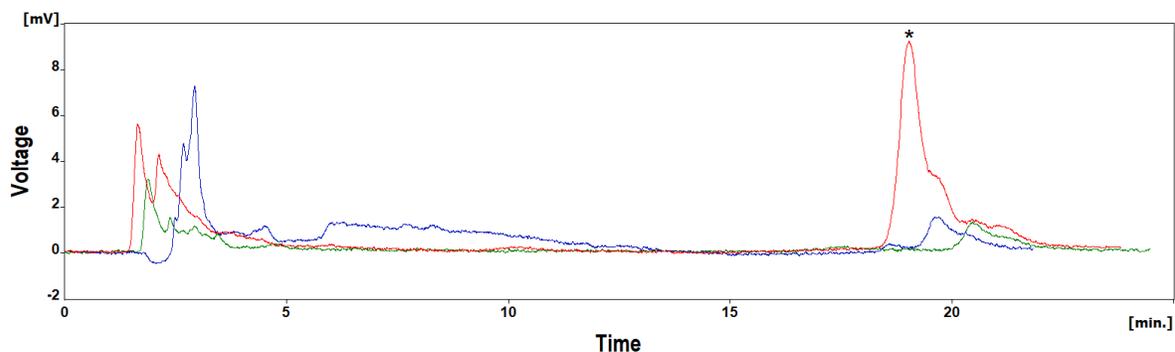


Figura 3.54 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de perlas en ensayos con alginato 3% (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

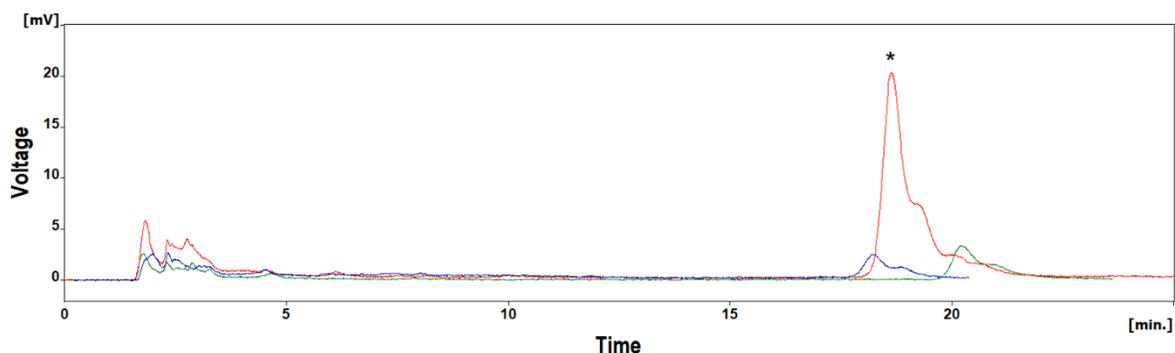


Figura 3.55 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de perlas en ensayos con alginato 9% (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

Los controles con enzimas libres confirmaron que la cantidad del metabolito que se determinó a 28 °C, 167 ng, es considerablemente mayor que a 34 °C, 18 ng. Esto es distinto a lo observado en los bioensayos con la biomasa de las células, las cuales presentaron su mayor cantidad del metabolito a 34 °C, 96 ng, en comparación con sus resultados a 28 °C, 46 ng, como se observa en la Tabla 3.8. Este resultado puede deberse a que la célula viva cuenta con mecanismos de autorregulación y protección que permiten mantener la capacidad de degradación en condiciones diferentes a las óptimas para sus enzimas, aunado a que la inducción enzimática en la célula se incrementa al aumentar la temperatura. Sin embargo, se necesita investigar a mayor profundidad para confirmar estas hipótesis.

Por otra parte, se puede inferir que, si existe una degradación más rápida con la enzima libre o inmovilizada en perlas de alginato en comparación con la enzima en células, entonces a 34 °C la degradación con la enzima extraída, ya sea libre o inmovilizada, se encuentra muy avanzada, de tal forma que el metabolito ya pasó por su máxima producción y en el momento del término de la incubación éste se ha descompuesto, por lo que los metabolitos identificados disminuyen en el medio. El comportamiento de aparición con producción de un máximo y posterior desaparición de este metabolito en el medio de cultivo con microalgas ha sido reportado en trabajos anteriores (Hernández Blanco y García de Llasera, 2016; García de Llasera et al., 2016). En la Figura 3.56 se muestran los cromatogramas del 4,5-dBaP correspondientes a los controles con enzimas libres.

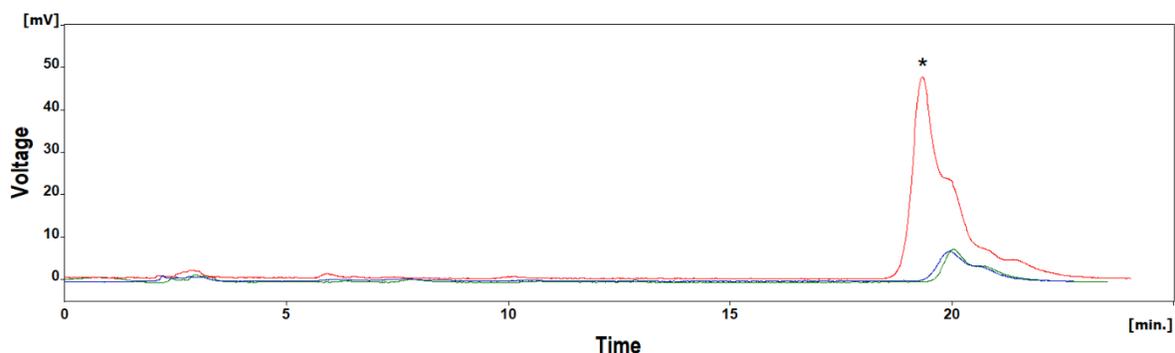


Figura 3.56 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de ensayos con enzimas libres (verde 22°C, rojo 28 °C, azul 34 °C) en incubación de 3 horas mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

De manera global es importante resaltar que las señales cromatográficas de los metabolitos obtenidas en los ensayos enzimáticos fueron mayores a los controles de remanentes de la primera exposición, aunque en varios casos no pudieron determinarse con exactitud debido a que se encontraron por debajo del límite de cuantificación del instrumento. La tendencia muestra una mayor cantidad del metabolito con las enzimas libres que con los extractos enzimáticos inmovilizados, aunque se observó que al omitir la evaporación se favoreció la producción de los metabolitos, siendo 2.5 veces mayor que al evaporar los extractos enzimáticos en las incubaciones a 28 °C. Los resultados generales se representan en gráficos de barras, de manera global en la Figura 3.57, y la distribución del metabolito a 28 °C en la Figura 3.58.

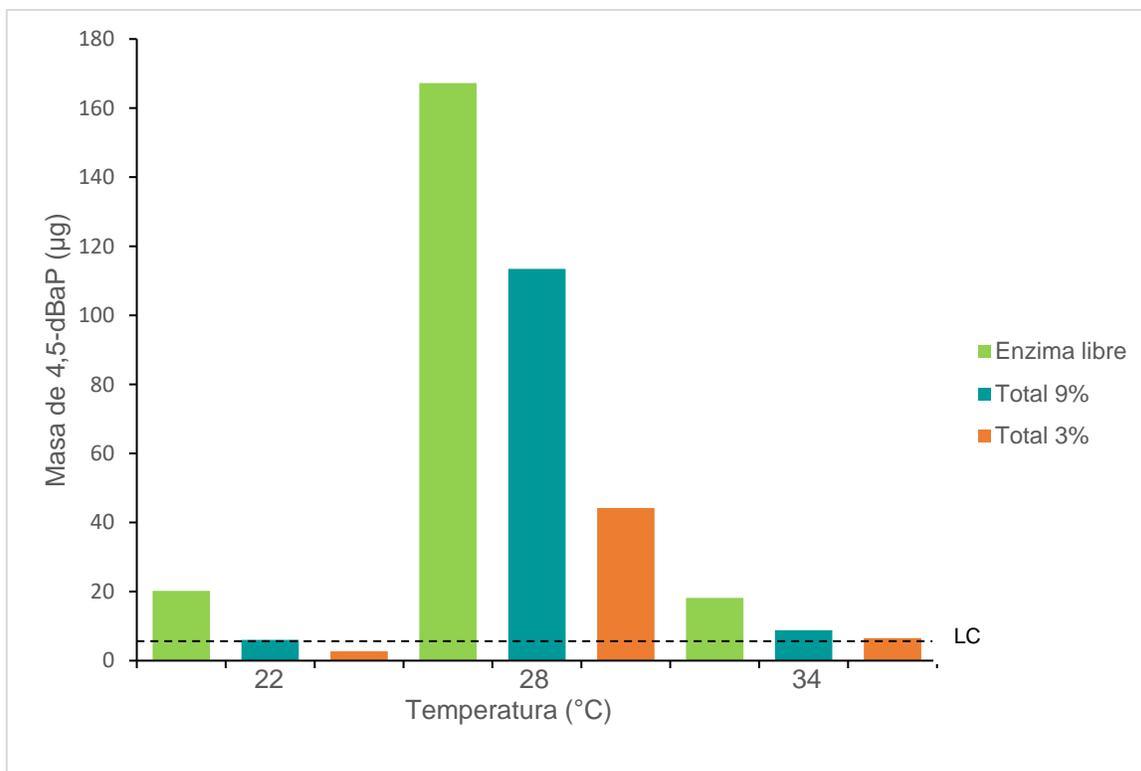


Figura 3.57 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) en bioensayos con extractos inmobilizados y con enzimas libres intracelulares de *Selenastrum capricornutum* en incubaciones de 3 horas a 22, 28 y 34 °C.

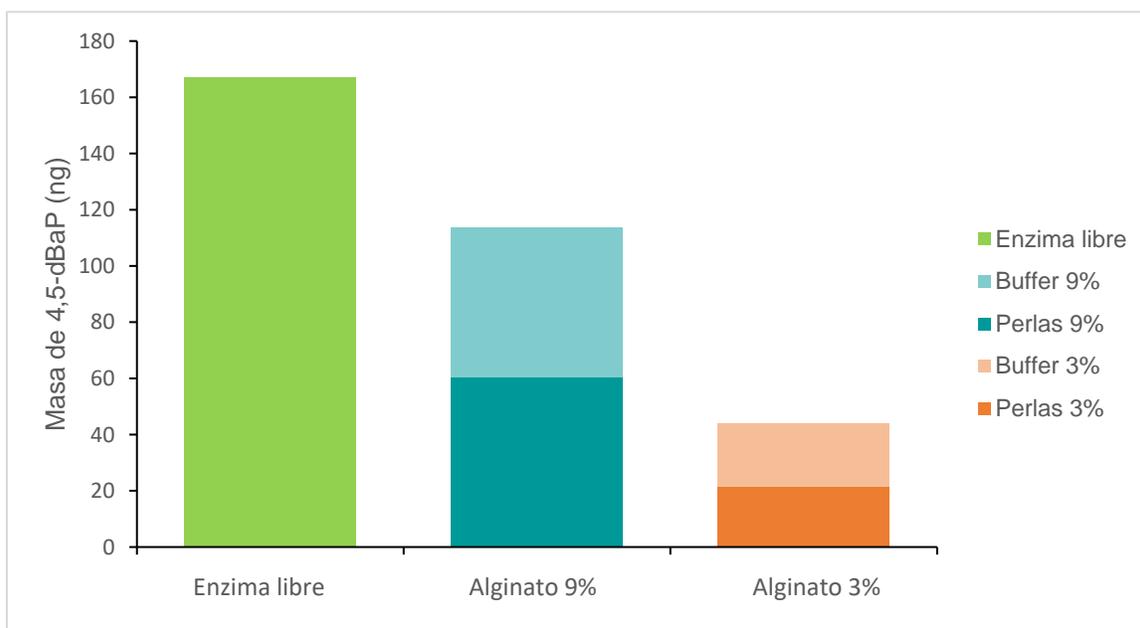


Figura 3.58 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) en disolución buffer de incubación, perlas y enzimas libres de extractos intracelulares de *Selenastrum capricornutum* en incubaciones a 28 °C de 3 horas.

Al comparar los ensayos de extractos enzimáticos inmovilizados con las microalgas resalta que a 28 °C tienen una distribución similar de los metabolitos en la muestra. A esta temperatura el 4,5-dBaP en los bioensayos con microalgas fue el doble que lo observado en el ensayo con extracto intracelular inmovilizado en alginato 3%, mientras que el ensayo con alginato 9% incrementó su producción en un 27% respecto a la que se obtiene con la microalga. Esto indica que la evaporación de los extractos enzimáticos puede disminuir su capacidad de metabolizar al BaP, por lo que si se omite este paso se tienen condiciones favorables de degradación con enzimas extraídas inmovilizadas que incluso pueden superar a su símil de microalgas.

Por otra parte, se eligió hacer una incubación a 28 °C por 6 horas para evaluar el efecto de la difusión del BaP a través de las perlas en las condiciones que tuvieron la mayor cantidad del metabolito. En la Tabla 3.13 se encuentran las cantidades de 4,5-dBaP correspondientes a las incubaciones a 28 °C de los extractos enzimáticos inmovilizados a 3 y 6 horas.

Tabla 3.14 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) presente en bioensayos con extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados de *Selenastrum capricornutum* a 28 °C en incubaciones de 3 y 6 horas.

Ensayo	3 Horas			6 Horas		
	Buffer (ng)	Perlas (ng)	Total (ng)	Buffer (ng)	Perlas (ng)	Total (ng)
Alginato 3%	22.940	21.273	44.213	24.968	20.211	45.179
Alginato 9%	53.083	60.344	113.428	55.019	46.504	101.523
Enzima libre	167.263			150.217		

Los resultados obtenidos fueron similares entre ambos tiempos, contrario a los ensayos con microalgas en los que la producción del metabolito aumentó en las incubaciones por 6 horas. En las Figuras 3.59 y 3.60 se muestran los cromatogramas de los ensayos con extractos enzimáticos inmovilizados en alginato 3% y 9%, respectivamente.

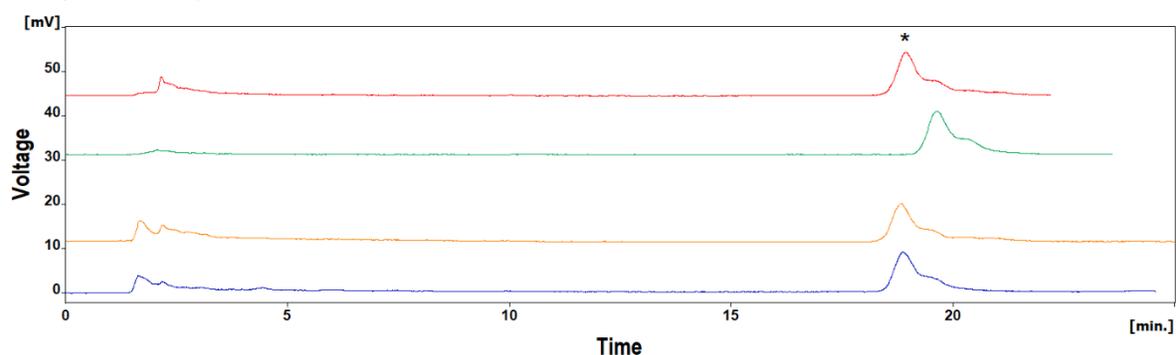


Figura 3.59 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de ensayos con alginato 3% a 28 °C en disolución buffer de incubación (rojo 3 horas, verde 6 horas) y perlas (naranja 3 horas, azul 6 horas) mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

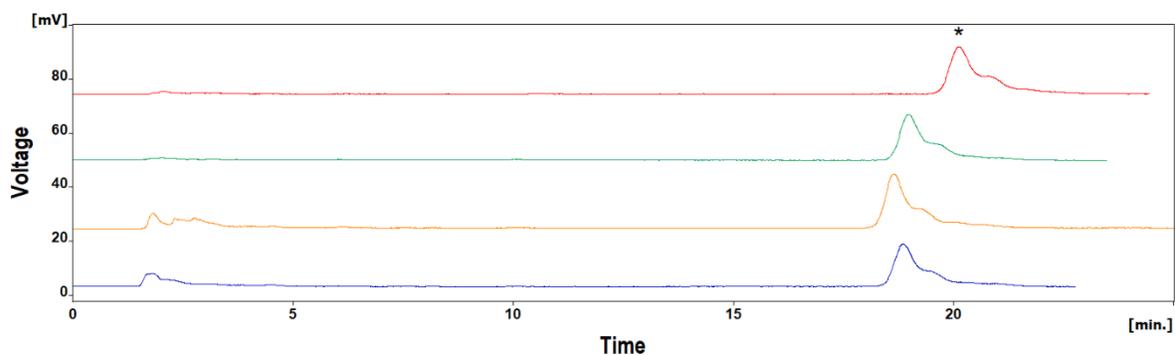


Figura 3.60 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de ensayos con alginato 9% a 28 °C en disolución buffer de incubación (rojo 3 horas, verde 6 horas) y perlas (naranja 3 horas, azul 6 horas) mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

El control de enzimas libres mostró que la producción del metabolito fue similar al incrementar el tiempo de incubación. Esto podría indicar que la enzima está saturada, por lo que para describir el comportamiento de la biomolécula es necesario realizar ensayos de exposición a diferente tiempo de incubación para determinar el momento en el que se da este fenómeno. Por el contrario, se podría dar el caso de que los metabolitos identificados estén siendo descompuestos por otros componentes intracelulares a una rapidez similar a su producción. En la Figura 3.61 se muestran los cromatogramas de los controles de enzimas libres a los dos tiempos de incubación.

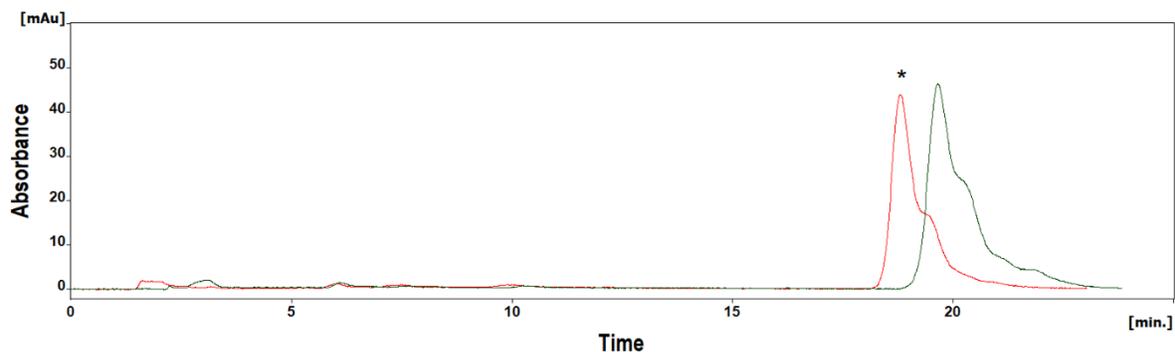


Figura 3.61 Cromatogramas de metabolitos de BaP en extractos provenientes de enzimas libres (rojo 3 horas, verde 6 horas) en incubaciones a 28 °C mediante DF.

\* : 4,5-dBaP.

De manera general, los ensayos con mayor tiempo de incubación tuvieron el mismo comportamiento que los de menor tiempo, destacando la mayor producción de metabolito en los ensayos con las enzimas libres y con las enzimas inmovilizadas en perlas al 9% de alginato, las cuales se prepararon con la metodología sin

evaporación de los extractos. Los resultados se encuentran representados mediante una gráfica de barras en la Figura 3.62.

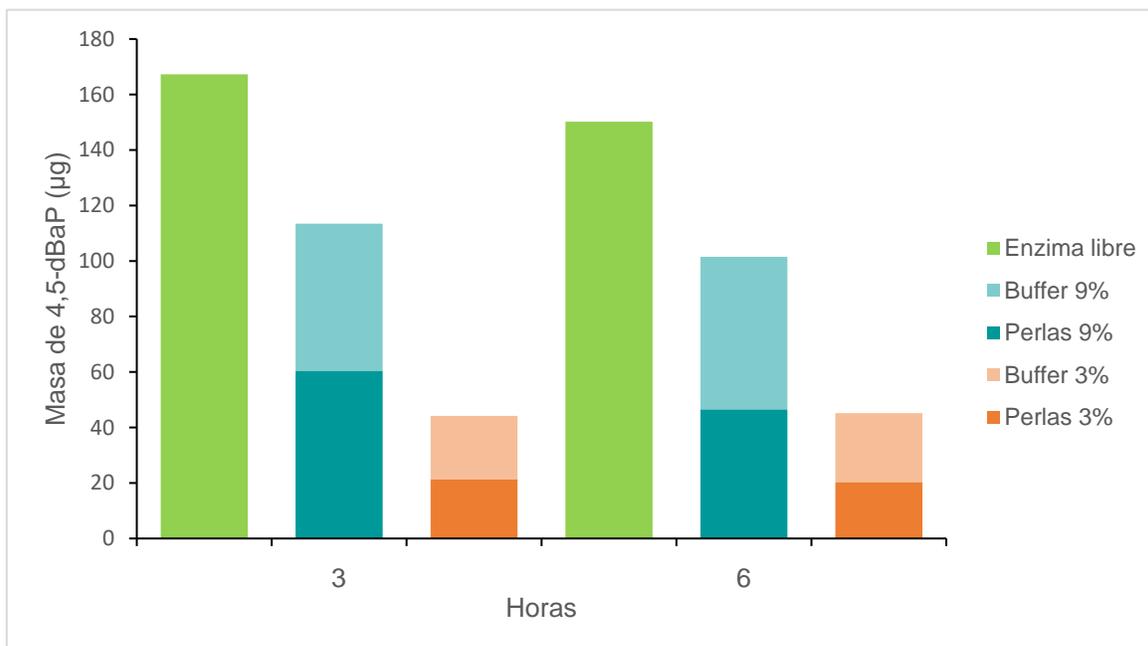


Figura 3.62 Cantidad de 4,5-dBaP (ng) en disolución buffer de incubación, perlas y enzimas libres de extractos intracelulares de *Selenastrum capricornutum* a 28 °C en incubaciones de 3 y 6 horas.

Es importante destacar que, a pesar de obtener una mayor degradación del hidrocarburo al aumentar el tiempo de incubación, esta diferencia es pequeña: 53% a 3 horas contra 64% a 6 horas, como se observa en la Tabla 3.11 y no se reflejó en una mayor cantidad de los metabolitos monitoreados. Esto puede deberse a la degradación abiótica, principalmente por los procesos de fotooxidación que favorecen la descomposición de los metabolitos.

Por otra parte, para elucidar el comportamiento del metabolito es conveniente realizar bioensayos en las temperaturas evaluadas a diferentes tiempos de incubación, con periodos menores de 3 horas para identificar el máximo de producción del metabolito a 34 °C. Asimismo, al realizar incubaciones mayores a 6 horas se evaluarían principalmente el efecto de la difusión del contaminante hacia el sitio activo y la expulsión del metabolito hacia el medio, compensando los posibles efectos de saturación de la enzima y de consumo del sustrato en los alrededores de las perlas.

## 4. Conclusión

Se realizó la validación de las metodologías de extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida con cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la cuantificación adecuada del benzo[a]pireno (BaP), benzo[a]antraceno (BaA), 4,5-cis-dihidrodiol benzo[a]pireno (4,5-dBaP) y 5,6-cis-dihidrodiol benzo[a]antraceno (5,6-dBaA), las cuales cumplieron los parámetros de desempeño establecidos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura.

Las metodologías analíticas validadas permitieron hacer interpretaciones fiables de los resultados obtenidos en los diferentes bioensayos efectuados. Los bioensayos con células de *Selenastrum capricornutum* mostraron que los procesos de remoción y degradación del BaP y BaA, junto a la producción de los metabolitos 4,5-dBaP y 5,6-dBaA, tienen una relación proporcional con la temperatura y el tiempo de incubación evaluados. Estos procesos muestran diferencias significativas al variar las condiciones del bioensayo, por lo que el tiempo y la temperatura son fundamentales para realizar acciones de biorremediación efectivas. Las incubaciones por 6 horas a 34 °C fueron elegidas como las condiciones óptimas para degradar al BaP y BaA, los cuales fueron prácticamente removidos del medio líquido y su degradación superó el 72%, corroborado en el monitoreo de los metabolitos, que presentaron su máxima producción. La microalga realizó la degradación del BaA con mayor eficiencia en comparación con el BaP, mostrando la importancia del tamaño del contaminante, el cual puede dificultar su difusión hacia la célula, y su disponibilidad en el medio, ya que el BaP es más hidrófobo y dificulta su degradación.

Se desarrollaron dos metodologías de inmovilización empleando alginato de calcio para los extractos enzimáticos intracelulares provenientes de lisados de la microalga, junto a metodologías de extracción de los analitos contenidos en la disolución buffer de incubación y en las perlas. La capacidad degradadora se mantuvo en las enzimas inmovilizadas, siendo mayor al emplear una disolución de alginato de sodio al 9%, que permitió omitir el uso del rotavapor aunado a las pérdidas de la biomolécula asociadas a una mayor cantidad de pasos en el tratamiento de muestra.

Las incubaciones por 3 horas de los extractos enzimáticos intracelulares inmovilizados en perlas mostraron que la temperatura tuvo una relación proporcional con la remoción y degradación del BaP, siendo óptima a 34 °C. Estas condiciones no coincidieron con el máximo de producción del metabolito 4,5-dBaP, que se presentó a 28 °C y puede deberse a que el proceso de degradación del hidrocarburo se encuentra en una etapa posterior a su símil de células, en la que el

4,5-dBaP es descompuesto en otros subproductos. Al aumentar el tiempo de incubación a 6 horas se observó una menor cantidad de BaP en la disolución buffer de incubación y en las perlas, con cantidades similares del metabolito a las obtenidas en las incubaciones por 3 horas, indicando que el incremento en el tiempo de incubación no aumenta la cantidad de metabolito, por lo que su descomposición podría darse a una rapidez similar a su producción.

Por lo tanto, en este trabajo se ha demostrado que la degradación de los HAPs puede realizarse efectivamente por medio de las enzimas que produce la especie *Selenastrum capricornutum* después de un proceso de activación por exposición al contaminante. La producción de la enzima degradadora se puede inducir en esta especie y extraerla para fines de biorremediación ambiental. La inmovilización en alginato favorece la capacidad degradadora de la enzima al mantenerla protegida de factores adversos que pudieran encontrarse en su medio externo, y simultáneamente permitiendo la difusión de los sustratos e intercambio de sustancias.

#### Perspectivas.

La inmovilización de los extractos enzimáticos intracelulares en alginato de calcio logró porcentajes de degradación del benzo[a]pireno equiparables a los obtenidos con la microalga, incluso superando lo obtenido con enzimas libres debido al aumento en la estabilidad de la biomolécula. Para optimizar su capacidad degradadora se pueden modular las condiciones de inmovilización, particularmente la concentración de alginato de sodio, con el fin de que los poros de la perla permitan la difusión adecuada de los contaminantes hacia la enzima para ser degradados, sin que la biomolécula se fugue hacia el medio.

Las perlas con la enzima inmovilizada pueden recuperarse del medio con facilidad, evitando modificaciones a la cadena trófica, como ocurre con el uso de la microalga y permite reutilizarla en ciclos de remoción posteriores. Para esto, debe evaluarse la capacidad de degradación al reusarla, al igual que la persistencia de su potencial degradativo después de almacenarse por periodos de tiempo extendidos. Con estos parámetros se puede determinar la viabilidad del uso de la enzima inmovilizada *in situ*, incluso en regiones remotas, para completar los procesos de biorremediación exitosamente.

En este trabajo se demostró que la temperatura tiene un efecto importante en la producción de los metabolitos, cuyos resultados dan pautas de cómo esclarecer la degradación del benzo[a]pireno. La producción enzimática puede tener temperaturas óptimas diferentes que dependen del tiempo, por lo que se puede evaluar el efecto de la temperatura en tiempos de incubación cortos (0.5 a 4 horas)

para corroborar la hipótesis de que se llega a la máxima cantidad de metabolitos más pronto que en los bioensayos con células, particularmente con los controles de enzimas libres. Debido a la inmovilización, es importante considerar los fenómenos de difusión del contaminante hacia el sitio activo de la enzima, por lo que las incubaciones largas (12 a 48 horas) son útiles en la descripción del proceso.

El aislamiento de la enzima responsable de la degradación es crucial para mejorar el rendimiento de los procesos de biodegradación y su inmovilización suele mejorar los rendimientos obtenidos. Los estudios realizados emplearon extractos enzimáticos crudos, por lo que, si se consiguen extractos purificados de la enzima extra e intracelular, se pueden obtener mejores rendimientos de remoción y degradación al inmovilizarla.

## Referencias

1. 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.
2. Abdel-Shafy H. I., Mansour M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25, 107-123.
3. Acevedo F., Pizzul L., Castillo M. dP., González M. E., Cea M., Gianfreda L., Diez M. C. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from *Anthracophyllum discolor*. *Chemosphere*, 80, 271-278.
4. Al-Dossary M. A., Abood S. A., Al-Saad H. T. (2021). Effects of physicochemical factors on PAH degradation by *Planomicrobium alkanoclasticum*. *Remediation*, 31, 29-37.
5. Amador-Muñoz O., Martínez-Domínguez Y., Gómez-Arroyo S., Peralta O. (2020). Current situation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in PM<sub>2.5</sub> in a receptor site in Mexico City and estimation of carcinogenic PAH by combining non-real-time and real-time measurement techniques. *Science of the Total Environment*, 703, 134526.
6. Amstaetter K., Eek E., Cornelissen G. (2012). Sorption of PAHs and PCBs to activated carbon: Coal versus biomass-based quality. *Chemosphere*, 87, 573-578.
7. Asghari S., Rajabi F., Tarrahi R., Salehi-Lisar S., Asnaashari S., Omid Y., Movafeghi A. (2019). Potential of the green microalga *Chlorella vulgaris* to fight against fluorine contamination: evaluation of the antioxidant systems and identification of the intermediate biodegradation compounds. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 411-419.
8. Baca Ibañez A. (2019). Remoción de benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno del agua potable por *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* contenidas en discos de alginato. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.

9. Beesley L., Moreno-Jimenez E., Gomez-Eyles J.L. (2010). Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environmental Pollution*, 158, 2282-2287.
10. Bilal M., Iqbal H.M.N. (2019) Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 462-482.
11. Bisswanger H. (2017). *Enzyme kinetics Principles and methods*. (3ª edición). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
12. Blanco-Enríquez E.G., Zavala-Díaz de la Serna F.J., Peralta-Pérez M. del R., Ballinas-Casarrubias L., Salmerón I., Rubio-Arias H., Rocha-Gutiérrez B. A., (2018). Characterization of a Microbial Consortium for the Bioremoval of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 975.
13. Boudrant J., Woodley J.M., Fernandez-Lafuente R. (2020). Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, 90, 66-80.
14. Castro Gudiño J. I. (2017). Biodegradación de benzo[a]antraceno por microalgas inmovilizadas. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
15. Cerniglia C. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368.
16. Cerniglia C. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(3), 331-338.
17. Chan S.M.N., Luan T., Wong M.H., Tam N.F.Y. (2006). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7), 1772-1779.
18. Chen D., Wu S., Xue H., Jiang J. (2020). Stereoselective catabolism of compounds by microorganisms: Catabolic pathway, molecular mechanism and potential application. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 146, 104822.

19. Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC). (2011). Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. México. Secretaría de Salud.
20. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2020). Ley Federal de Desechos. Disposiciones aplicables en materia de aguas nacionales. México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
21. Datta S., Christena L., Sriramulu Y. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9.
22. Darwish W., Chiba H., El-Ghareeb W., Elhelaly A., Hui S. (2019). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon content in heat-treated meat retailed in Egypt: Health risk assessment, benzo[a]pyrene induced mutagenicity and oxidative stress in human colon (CaClo-2) cells and protection using rosmarinic and ascorbic acids. *Food Chemistry*, 290, 114-124.
23. Dong C., Chen C., Chen C. (2012). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial harbor sediments by GC-MS. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9, 2175-2188.
24. Environmental Protection Agency (EPA). (2021) *Benz(a)anthracene 56-55-3 | DTXSID5023902*. Recuperado el 10 de febrero de 2021. <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID5023902#properties>
25. Environmental Protection Agency (EPA). (2021) *Benzo(a)pyrene 50-32-8 | DTXSID2020139*. Recuperado el 10 de febrero de 2021. <https://comptox.epa.gov/dashboard/dsstoxdb/results?search=DTXSID2020139#properties>
26. Environmental Protection Agency (EPA). (2022) *NAAQS Table*. Recuperado el 4 de enero de 2022. <https://www.epa.gov/criteria-air-pollutants/naaqs-table>
27. Erwin, K., Johnson Jr. W., Melchan A., Whitman C., (2019). Preparation of dihydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons and activities of the two dioxygenases in the phenanthrene degradative pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 673, 108081.

28. European Union (EU). (2011). Commission Regulation (EU) No 835/2011. *Official Journal of European Union*.
29. Famiyeh L., Chen K., Xu J., Sun Y., Guo Q., Wang C., Lv J., Tang Y. T., Yu H., Snape C., He J. (2021). A review on analysis methods, source identification, and cancer risk evaluation of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, 789, 147741.
30. Faraji M., Yamini Y., Gholami M. (2019). Recent advances and trends in applications of Solid-Phase Extraction techniques in food and environmental analysis. *Chromatographia*, 82, 1207-1249.
31. Frapiccini E., Marini M. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and sorption parameters in coastal and open-sea sediment. *Water, Air & Soil Pollution*, 226, 246.
32. Fuentes Pérez A. C. (2019) Metodología analítica para la determinación de metabolitos del benzo(a)pireno formados por enzimas intra y extra celulares de *Selenastrum capricornutum*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
33. 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.
34. Ghosal D., Ghosh S., Dutta T., Ahn Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1369.
35. Gomes T. A., Zanette C. M., Spier M. R. (2020) An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 50(7), 635-654.
36. Guntupalli S., Thunuguntla V. B. S. C., Chalasani L. M., Rao C. V., Bondili J. S. (2019). Degradation and metabolite profiling of benz(a)anthracene, dibenz(a,h)anthracene and indeno[1,2,3-cd]pyrene by *Aspergillus terricola*. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 39(1), 84-92.

37. Gupta H. (2015) Removal of phenanthrene from water using activated carbon developed from orange rind. *International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences*, 3(7), 248-255.
38. Habe H., Omori T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 67(2), 225-243.
39. Hale, S. E., Elmquist M., Brändli R., Hartnik T., Jakob L., Henriksen T., Werner D., Cornelissen G. (2012). Activated carbon amendment to sequester PAHs in contaminated soil: A lysimeter field trial. *Chemosphere*, 87, 177-184.
40. Han F., Guo H., Hu J., Zhang J., Ying Q., Zhang H. (2020). Sources and health risks of ambient polycyclic aromatic hydrocarbons in China. *Science of the Total Environment*, 698, 134229.
41. Hayakawa K. (2018) *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Behavior and Toxicity in East Asia*. Singapore: Springer Singapore.
42. Hendryx M., Wang S., Romanak K., Salamova A., Venier M. (2020). Personal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Appalachian mining communities. *Environmental Pollution*, 257, 113501.
43. 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.
44. Hussein M. H., Abdullah A. M., El Din N. I. B., Mishaqa E. S. I. (2017). Biosorption potential of the microchlorophyte *Chlorella vulgaris* for some pesticides. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 8(1), 1000177.
45. Ito H., Segawa Y., Murakami K., Itami K., (2019). Polycyclic Arene Synthesis by Annulative  $\pi$ -Extension. *Journal of the American Chemistry Society*, 141, 3-10.
46. Jalilian N., Najafpour G. D., Khajouei M. (2020). Macro and micro algae in pollution control and biofuel production-A review. *ChemBioEng Rev*, 7(1), 18-33.

47. Jia J., Bi C., Zhang J., Chen Z. (2019). Atmospheric deposition and vegetable uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) based on experimental and computational simulations. *Atmospheric Environment*, 204, 135-141.
48. Kadri T., Rouissi T., Brar S. K., Cledon M., Sarma S., Verma M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of environmental sciences*, 51, 52-74.
49. Kim J. H., Stansbury K. H., Walker N. J., Trush M. A., Strickland P. T., Sutter T. R. (1998). Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis*, 19(10), 1847-1853.
50. Kim K. H., Jahan S. A., Kabir E., Brown R. J. C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60, 71-80.
51. 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 chlorophyte. *Journal of Phycology*, 47, 880-893.
52. Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y. B., Naidu R., Megharaj M. (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 168, 944-968.
53. Lai I. C., Lee C. L., Zeng K. Y., Huang H. C. (2011). Seasonal variation of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons along the Kaohsiung coast. *Journal of Environmental Management*, 92(8), 2029-2037.
54. Lamichhane S., Bal Krishna K. C., Sarukkalige R. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: A review. *Chemosphere*, 148, 336-353.
55. Lei A. P., Hu Z. L., Wong Y. S., Tam N. F. (2007). Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource Technology*, 98(2), 273-280.
56. Leong Y. K., Chang J. S. (2020). Bioremediation of heavy metals using microalgae: Recent advances and mechanisms. *Bioresource Technology*, 303, 122886.

57. Liao X., Wu Z., Li Y., Luo J., Su C. (2018). Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by indigenous microbes combined with chemical oxidation. *Chemosphere*, 213, 551-558.
58. López-Macías R., Cobos-Gasca V., Cabañas-Vargas D., Rendón von Osten J. (2019). Presence and spatial distribution of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in groundwater of Merida City, Yucatán, México. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102, 538-543.
59. Loureiro dos Santos L. A. (2017). Natural polymeric materials: Processing and properties. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*.
60. Ma Y., Harrad S. (2015). Spatiotemporal analysis and human exposure assessment on polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor air, settled house dust and diet: A review. *Environment International*, 84, 7-16.
61. 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.
62. Manikandan P., Nagini S. (2018). Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: A review. *Current Drug Targets*, 19, 38-54.
63. Marris C., Kompella S., Miller M, Incardona J., Brette F., Hancox J., Sørrhus E., Shiels H. (2020). Polyaromatic hydrocarbons in pollution: a heart-breaking matter. *Journal of Physiology*, 598.2, 227-247.
64. Moreno Garrido I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99, 3949-3964.
65. Nagarajan D., Lee D., Chen C., Chang J. (2020). Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. *Bioresource Technology*, 302, 122817.
66. Nie J., Sun Y., Hou Y., Kumar M., Usman M., Li J., Shao J., Wang L., Tsang D. (2019). Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: Mechanisms, methods and prospects for future research. *Science of the Total Environment*, 707, 136080.

67. Norma Oficial Mexicana. (2021). *NOM-025-SSA1-2021, Salud Ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto a las partículas suspendidas PM10 y PM2.5. Valores normados para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población.* México, Secretaría de Salud.
68. Oleszczuk P., Hale S. E., Lehmann J., Cornelissen G. (2012). Activated carbon and biochar amendments decrease pore-water concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge. *Bioresource. Technology.*, 111, 84-91.
69. Olmos Espejel, J. (2013). Metodologías cromatográficas en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microorganismos. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
70. Peng N., Huang C., Su J. (2019). An experimental and kinetic study of thermal decomposition of phenanthrene. *Journal of Hazardous Materials*, 365 565-571.
71. Poirier M. C. (2004). Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nature Reviews Cancer*, 4, 630-637.
72. Poole C. F. (2020) *Solid-Phase Extraction*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
73. 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.
74. Purich, D. (2010). *Enzyme kinetics: Catalysis & control. A reference of theory and best-practice methods.* (1° edición). Elsevier.
75. Ramesh A., Walker S. A., Hood D. B., Guillén M. D., Schneider K., Weyland E. (2004). Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Toxicology*, 23, 301-333.
76. Ramírez Madera A. (2020) Establecimiento de parámetros operacionales de biorreactor para remediación de agua contaminada con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.

77. Rao M. A., Scelza R., Acevedo F., Diez M. C., Gianfreda L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, 107, 145-162.
78. Raunio H., Kuusisto M., Juvonen R. O., Pentikäinen O. T. (2015). Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 123.
79. 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.
80. Santes-Palacios R., Marroquín-Pérez A. L., Hernández-Ojeda S. L., Camacho-Carranza R., Govezensky T., Espinosa-Aguirre J. J. (2020). Human CYP1A1 inhibition by flavonoids. *Toxicology in Vitro*, 62, 104681.
81. Schwarzenbach R. P., Gschwend P. M., Imboden D. M. (2003). *Environmental organic chemistry*. (2a ed). New Jersey: John Wiley and Sons.
82. Sellami K., Couvert A., Nasrallah N., Maachi R., Abouseoud M., Amrane A. (2022). Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review. *Science of the Total Environment*, 806, 150500.
83. Shahsavari E., Schwarz A., Aburto-Medina A., Ball A. S. (2019). Biological degradation of Polycyclic Aromatic Compounds (PAHs) in soil: A current perspective. *Current Pollution Reports*, 5, 84-92.
84. Sobral M. M. C., Cunha S. C., Faria M. A., Ferreira I. M. P. L. V. O. (2018). Domestic cooking of muscle foods: Impact on composition of nutrients and contaminants. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 309-333.
85. Spasojević M., Prodanović O., Pantić N., Popović N., Balaž A. M., Prodanović R. (2019). The enzyme immobilization: Carriers and immobilization methods. *Journal of Engineering & Processing Management*, 11(2), 89-105.
86. Tong D. S., Zhou C. H., Lu Y., Yu H. Y., Zhang G. F., Yu W. H. (2010). Adsorption of Acid Red G dye on octadecyl trimethylammonium montmorillonite. *Applied Clay Science*, 50, 427-431.

87. Viegas O., Novo P., Pinto E., Pinho O., Ferreira I. M. P. L. V. O. (2012). Effect of charcoal types and grilling conditions on formation of heterocyclic aromatic amines (HAs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled muscle foods. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2128-2134.
88. Wallace S. J., De Solla S. R., Head J., Hodson P. V., Parrott J. L., Thomas P. J., Berthiaume A., Langlois V. S. (2020). Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the Canadian environment: Exposure and effects on wildlife. *Environmental Pollution*, 265(B), 114863.
89. Wang P., Luo L., Ke L., Luan T., Tam N. F. Y. (2013). Combined toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals to biochemical and antioxidant responses of free and immobilized *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(3), 673-683.
90. Wang Z., Ren P., Sun Y., Ma X., Liu X., Na G., Yao Z. (2013). Gas/particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal atmosphere of the north Yellow Sea, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 5753-5763.
91. Wang J., Wang C., Huang Q., Ding F., He X. (2015). Adsorption of PAHs on the sediments from the yellow river delta as a function of particle size and salinity. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 24(2), 103-115.
92. 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.
93. Warshawsky D., Kenan T. H., Reilman R., Cody T. E., Radike M. J. (1990). Conjugation of benzo[a]pyrene metabolites by the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. *Chemico-Biological Interactions*, 74(1-2), 93-105.
94. Wianowska D., Gil M. (2019). New insights into the applications of MSPD in various fields of analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 112, 29-51.
95. Won K., Kim S., Kim K. J., Park H. W., Moon S. J. (2005). Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process biochemistry*, 40, 2149-2154.

96. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). (2010). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 92 Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. France, WHO.
97. Wu T., Yu X., Hu A., Zhang L., Jin Y., Abid M. (2015). Ultrasonic disruption of yeast cells: Underlying mechanism and effects of processing parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28, 59-65.
98. Yargicoglu E. N., Sadasivam B. Y., Reddy K. R., Spokas K. (2015). Physical and chemical characterization of waste wood derived biochars. *Waste Management*, 36, 256-268.
99. Yu H. (2002). Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: Photochemistry and phototoxicity. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 202), 149-183.
100. Yu H., Liu Y., Han C., Fang H., Weng J., Shu X., Pan Y., Ma L. (2021). Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters from the seven main river basins of China: Spatial distribution, source apportionment, and potential risk assessment. *Science of the Total Environment*, 752, 141764.

## Anexos

### Anexo 1. Análisis estadístico de exposiciones de células enteras

Se realizaron los análisis estadísticos entre las condiciones descritas en cada apartado. Para ello se empleó el software Microsoft Office Excel 2019, en los que se comparó la varianza entre las muestras con la prueba F de Fischer, y las medias con la t de Student correspondiente. Se asume que los datos analizados cuentan con una distribución normal y varianzas sin diferencias significativas, a menos que se indique lo contrario. Se consideró un nivel de significancia de 0.05 con comparaciones a dos colas. Los cálculos se realizaron comparando los resultados que presentaron mayor similitud a una temperatura o tiempo de exposición, con el objetivo de determinar si presentan diferencias significativas entre ellos. A continuación, se muestran las comparaciones de cada analito.

#### Anexo 1.1 Análisis estadístico BaP

Medio líquido 3 horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 3 Horas	34 °C 3 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.3318	0.2711	t calculada	4.3917
Varianza	0.0012	0.0005	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaP en el medio líquido, siendo menor al aumentar la temperatura.

Medio líquido 6 horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 6 Horas	34 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.2203	0.1385	t calculada	14.1430
Varianza	0.0002	0.0001	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaP en el medio líquido, siendo menor al aumentar la temperatura.

Biomasa 3 horas (22 °C y 28 °C)				
	22 °C 3 Horas	28 °C 3 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.9347	1.8319	t calculada	2.3806
Varianza	0.0088	0.0080	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaP en la biomasa, siendo menor al aumentar la temperatura.

Biomasa 6 horas (22 °C y 28 °C)				
	22 °C 6 Horas	28 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.7352	1.4990	t calculada	6.0940
Varianza	0.0059	0.0076	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaP en la biomasa, siendo menor al aumentar la temperatura.

Medio líquido 28 °C (3 y 6 Horas)				
	28 °C 3 Horas	28 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas diferentes	
Promedio	0.3318	0.2203	t calculada	9.0866
Varianza	0.0012	0.0002	t crítica	2.2281
			Grados libertad	10

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaP en el medio líquido, siendo menor al aumentar el tiempo de incubación.

Biomasa 22 °C (3 y 6 Horas)				
	22 °C 3 Horas	22 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.9347	1.7352	t calculada	4.9398
Varianza	0.0088	0.0059	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaP en la biomasa, siendo menor al aumentar el tiempo de incubación.

Medio líquido 34 °C 3 Horas y 28 °C 6 Horas				
	34 °C 3 Horas	28 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.2711	0.2203	t calculada	5.8257
Varianza	0.0005	0.0002	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaP en el medio líquido, siendo mayor en la incubación por 3 horas.

Biomasa 34 °C 3 Horas y 28 °C 6 Horas				
	34 °C 3 Horas	28 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.4271	1.4990	t calculada	1.7374
Varianza	0.0078	0.0076	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de BaP en la biomasa es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

Total 34 °C 3 Horas y 28 °C 6 Horas				
	34 °C 3 Horas	28 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.6982	1.7193	t calculada	0.4674
Varianza	0.0115	0.0068	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de BaP total es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

### Anexo 1.2 Análisis estadístico de BaA

Medio líquido 3 Horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 3 Horas	34 °C 3 Horas	Prueba t con varianzas diferentes	
Promedio	0.2388	0.1541	t calculada	11.4856
Varianza	0.0004	0.0001	t crítica	2.2281
			Grados libertad	10

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaA en el medio líquido, siendo menor al aumentar la temperatura.

Medio líquido 6 Horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 6 Horas	34 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.1873	0.0947	t calculada	26.5579
Varianza	0.0001	0.0001	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaA en el medio líquido, siendo menor al aumentar la temperatura.

Biomasa 6 Horas (22 °C y 28 °C)				
	22 °C 6 Horas	28 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.1719	0.8369	t calculada	10.6961
Varianza	0.0045	0.0043	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaA en la biomasa, siendo menor al aumentar la temperatura.

Medio líquido 28°C 3 Horas y 22°C 6 Horas				
	28 °C 3 Horas	22 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.2388	0.2345	t calculada	0.4629
Varianza	0.0004	0.0004	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de BaA en el medio líquido es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

Biomasa 28°C 3 Horas y 22°C 6 Horas				
	28 °C 3 Horas	22 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.0383	1.1719	t calculada	5.1877
Varianza	0.0014	0.0045	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de BaA en la biomasa, siendo menor en la incubación a 28 °C.

Total 28°C 3 Horas y 22°C 6 Horas				
	28 °C 3 Horas	22 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.2771	1.4064	t calculada	5.2272
Varianza	0.0012	0.0043	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad total de BaA en las condiciones evaluadas, siendo menor en la incubación a 28 °C.

### Anexo 1.3 Análisis estadístico de BaP y BaA

Medio líquido 3 Horas (28 °C)				
	28 °C BaP	28 °C BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.3318	0.2388	t calculada	6.9430
Varianza	0.0012	0.0004	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de HAP en el medio líquido, siendo mayor el BaP remanente.

Medio líquido 6 Horas (28 °C)				
	28 °C BaP	28 °C BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.2203	0.1873	t calculada	6.3312
Varianza	0.0001	0.0001	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de HAP en el medio líquido, siendo mayor el BaP remanente.

Biomasa 3 Horas (22 °C)				
	22 °C BaP	22 °C BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.9348	1.6101	t calculada	7.922
Varianza	0.0088	0.0063	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de HAP en la biomasa, siendo mayor el BaP remanente.

Biomasa 6 Horas (22 °C)				
	22 °C BaP	22 °C BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.7352	1.1719	t calculada	16.5278
Varianza	0.0059	0.0045	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de HAP en la biomasa, siendo mayor el BaP remanente.

Total 3 Horas (28 °C)				
	28 °C BaP	28 °C BaA	Prueba t con varianzas diferentes	
Promedio	2.1637	1.2771	t calculada	27.8202
Varianza	0.0079	0.0012	t crítica	2.2281
			Grados libertad	10

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad total de HAP, siendo mayor el BaP remanente.

Total 6 Horas (34 °C)				
	34 °C BaP	34 °C BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.1056	0.5816	t calculada	21.5942
Varianza	0.0035	0.0018	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad total de HAP, siendo mayor el BaP remanente.

Medio líquido 6 Horas BaP y 3 Horas BaA (34 °C)				
	3 Horas BaA	6 Horas BaP	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.1541	0.1385	t calculada	3.2582
Varianza	0.0001	0.0001	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de HAP en el medio líquido, siendo mayor el BaP remanente.

Total 6 Horas BaP y 3 Horas BaA (34 °C)				
	6 Horas BaP	3 Horas BaA	Prueba t con varianzas diferentes	
Promedio	1.1056	0.7846	t calculada	14.6390
Varianza	0.0035	0.0007	t crítica	2.2010
			Grados libertad	11

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad total de HAP, siendo mayor el BaP remanente.

Medio líquido 6 Horas BaP y 3 Horas BaA (28 °C)				
	6 Horas BaP	3 Horas BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.2203	0.2388	t calculada	2.2936
Varianza	0.0002	0.0004	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de HAP en el medio líquido, siendo mayor el BaA remanente.

Total 6 Horas BaP y 3 Horas BaA (28 °C)				
	6 Horas BaP	3 Horas BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	1.7193	1.2771	t calculada	14.8266
Varianza	0.0068	0.0012	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad total de HAP, siendo mayor el BaP remanente.

Medio líquido 28 °C BaP y 22 °C BaA (3 Horas)				
	28 °C BaP	22 °C BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.3318	0.4481	t calculada	9.0315
Varianza	0.0012	0.0003	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de HAP en el medio líquido, siendo mayor el BaA remanente.

Total 28 °C BaP y 22 °C BaA (3 Horas)				
	28 °C BaP	22 °C BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	2.1637	2.0588	t calculada	2.5633
Varianza	0.0079	0.0072	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad total de HAP, siendo mayor el BaP remanente.

Medio líquido 28 °C BaP y 22 °C BaA (6 Horas)				
	28 °C BaP	22 °C BaA	Prueba t con varianzas diferentes	
Promedio	0.2203	0.2345	t calculada	1.8645
Varianza	0.0002	0.0004	t crítica	2.2281
			Grados libertad	10

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de HAP en el medio líquido en las condiciones evaluadas es estadísticamente similar.

Medio líquido 34 °C BaP y 28 °C BaA (6 Horas)				
	34 °C BaP	28 °C BaA	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	0.1385	0.1873	t calculada	9.8328
Varianza	0.0001	0.0001	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de HAP en el medio líquido, siendo mayor el BaA remanente.

#### Anexo 1.4 Análisis estadístico de 4,5-dBaP

Medio líquido 3 Horas (34 °C y 28 °C)				
	34 °C 3 Horas	28 °C 3 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	65.2340	43.2678	t calculada	14.0454
Varianza	10.5761	11.4371	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de 4,5-dBaP en el medio líquido, siendo mayor al aumentar la temperatura.

Biomasa 3 Horas (22 °C y 28 °C)				
	22 °C 3 Horas	28 °C 3 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	47.6718	46.1158	t calculada	0.9085
Varianza	20.9369	5.4673	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de 4,5-dBaP en la biomasa es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

Biomasa 6 Horas (22 °C y 28 °C)				
	22 °C 6 Horas	28 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	89.2137	95.8390	t calculada	2.3143
Varianza	29.3992	44.3609	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de 4,5-dBaP en la biomasa, siendo mayor al aumentar la temperatura.

Biomasa 34 °C 3 Horas y 28 °C 6 Horas				
	34 °C 3 Horas	28 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	96.4277	95.8390	t calculada	0.1153
Varianza	190.1165	44.3609	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de 4,5-dBaP en la biomasa es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

Medio líquido 28 °C 3 Horas y Biomasa 28 °C 3 Horas				
	ML 28 °C 3 H	B 28 °C 3 H	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	43.2678	46.1158	t calculada	2.0780
Varianza	11.4371	5.4673	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de 4,5-dBaP es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

Medio líquido 28 °C 6 Horas y Biomasa 28 °C 6 Horas				
	ML 28 °C 6 H	B 28 °C 6 H	Prueba t con varianzas diferentes	
Promedio	109.6434	95.8390	t calculada	2.6922
Varianza	192.2595	44.3609	t crítica	2.1788
			Grados libertad	12

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de 4,5-dBaP en la muestra, siendo mayor en el medio líquido.

### Anexo 1.5 Análisis estadístico de 5,6-dBaA

Medio líquido 3 Horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 3 Horas	34 °C 3 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	33.3890	37.8419	t calculada	4.7062
Varianza	2.4690	5.5881	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de 5,6-dBaA en el medio líquido, siendo mayor al aumentar la temperatura.

Medio líquido 6 Horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 6 Horas	34 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	89.9670	96.6551	t calculada	2.7868
Varianza	21.9258	29.9122	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de 5,6-dBaA en el medio líquido, siendo mayor al aumentar la temperatura.

Biomasa 3 Horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 3 Horas	34 °C 3 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	26.3634	26.5931	t calculada	0.7062
Varianza	0.4942	0.4581	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de 5,6-dBaA en la biomasa es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

Biomasa 3 Horas (28 °C y 22 °C)				
	28 °C 3 Horas	22 °C 3 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	26.3634	20.3382	t calculada	15.3640
Varianza	0.4942	0.8899	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de 5,6-dBaA en el medio líquido, siendo mayor al aumentar la temperatura.

Biomasa 6 Horas (28 °C y 22 °C)				
	28 °C 6 Horas	22 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas diferentes	
Promedio	38.9172	32.9256	t calculada	5.2638
Varianza	1.5638	10.0969	t crítica	2.2281
			Grados libertad	10

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de 5,6-dBaA en la biomasa, siendo mayor al aumentar la temperatura.

Biomasa 6 Horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 6 Horas	34 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	38.9172	45.5217	t calculada	11.5496
Varianza	1.5638	1.3792	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad de 5,6-dBaA en la biomasa, siendo mayor al aumentar la temperatura.

Total 3 Horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 3 Horas	34 °C 3 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	59.7524	64.4350	t calculada	4.8769
Varianza	4.6548	3.6424	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16
Hay diferencia significativa entre muestras				

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad total de 5,6-dBaA en las condiciones evaluadas, siendo mayor al aumentar la temperatura.

Total 6 Horas (28 °C y 34 °C)				
	28 °C 6 Horas	34 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	128.8842	142.1768	t calculada	5.1176
Varianza	18.5834	42.1366	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

Se acepta la hipótesis nula, hay diferencia significativa en la cantidad total de 5,6-dBaA en las condiciones evaluadas, siendo mayor al aumentar la temperatura.

Medio líquido 34 °C 3 Horas y 22 °C 6 Horas				
	34 °C 3 Horas	22 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	37.8419	35.5478	t calculada	1.8560
Varianza	5.5881	8.1628	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de 5,6-dBaA en el medio líquido es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

Medio líquido 28 °C 3 Horas y 22 °C 6 Horas				
	28 °C 3 Horas	22 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	33.3890	35.5478	t calculada	1.9862
Varianza	2.4690	8.1628	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de 5,6-dBaA en el medio líquido es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

Total 34 °C 3 Horas y 22 °C 6 Horas				
	34 °C 3 Horas	22 °C 6 Horas	Prueba t con varianzas diferentes	
Promedio	64.4350	68.4734	t calculada	1.9872
Varianza	3.6424	33.5247	t crítica	2.2281
			Grados libertad	10

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad total de 5,6-dBaA es estadísticamente similar a las condiciones evaluadas.

Medio líquido y biomasa 22 °C 6 Horas				
	Medio líquido	Biomasa	Prueba t con varianzas iguales	
Promedio	35.5478	32.9256	t calculada	1.8409
Varianza	8.1628	10.0969	t crítica	2.1199
			Grados libertad	16

No hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula, la cantidad de 5,6-dBaA es estadísticamente similar en la muestra.