



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

**“CARACTERIZACIÓN CROMATOGRÁFICA Y ESPECTRAL DE  
COMPUESTOS DE DEGRADACIÓN PROVENIENTES DE LOS  
HAPs CON APLICACIÓN A SU MONITOREO EN CULTIVOS DE  
MICROALGAS”**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**QA ALAN RODRIGO GARCÍA CICOUREL**

TUTOR PRINCIPAL

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

MÉXICO, D.F. JUNIO 2015



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.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN CROMATOGRÁFICA Y ESPECTRAL DE COMPUESTOS DE DEGRADACIÓN  
PROVENIENTES DE LOS HAPs CON APLICACIÓN A SU MONITOREO EN CULTIVOS DE  
MICROALGAS

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

### MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QA ALAN RODRIGO GARCÍA CICOUREL



TUTOR: DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

MÉXICO, D.F., 2015.

Jurado Asignado:

Presidente	Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
Vocal	Dr. José Ramón Verde Calvo
Vocal	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
Vocal	Dra. María T. Leticia Rosales Hoz
Secretario	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 208 “Análisis de trazas” del Edificio F y en el anexo del laboratorio L-3D del Edificio A de la Facultad de Química, UNAM.

---

Dra. Martha Patricia García Camacho

Tutor

Parte de este trabajo se presentó en el VI Congreso Internacional de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental en Ensenada, Baja California, México. Octubre 2014.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de continuar con mi formación profesional y, sobretodo humana, proporcionándome las herramientas necesarias para que esto se llevara a cabo.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por su asesoría, consejos y apoyo ofrecido durante esta estancia, para lograr la realización de este proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el proyecto de Ciencia Básica 166389 *Análisis de trazas cromatográfico para la caracterización de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por microalgas y por la beca otorgada para la realización de los estudios de Maestría (No. de becario 288997).*

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el proyecto PAPIIT IT203214 *Bioremovición de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos acuosos con microalgas libres e inmovilizadas.*

A la M en C María del Rosario Covarrubias Herrera por todo el apoyo y los conocimientos aportados para la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado: Dra. Araceli Peña Álvarez, Dr. José Verde Calvo, Dra. Alma Revilla Vázquez, Dra. Leticia Rosales Hoz y Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus valiosas aportaciones para la corrección y mejora de esta tesis.

A Ale por todo el cariño y apoyo en los momentos difíciles y por todo el tiempo juntos.

A mis amigos y compañeros de trabajo, Maribel, Fernando, Jessica, Nayeli, Miriam e Irán, por su amistad, enseñanza y consejos, y por hacer tan amena la estancia en el laboratorio.

*A mi mamá*

*A Ale*

*A mi abuelita*

*A mis tíos, primos y sobrinos*

*A mis amigos*

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Antecedentes.....	4
3.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs).....	4
3.1.1. Definición, clasificación y propiedades fisicoquímicas.....	4
3.1.2. Fuentes de emisión y presencia de los HAPs en el medio ambiente.....	6
3.1.3. Efectos adversos de los HAPs.....	8
3.1.4. Toxicidad y metabolismo de los HAPs.....	9
3.1.4.1. Carcinogenicidad.....	10
3.1.4.2. Teratogenicidad.....	10
3.1.4.3. Genotoxicidad.....	11
3.1.4.4. Inmunotoxicidad.....	11
3.1.4.5. Metabolismo y degradación de los HAPs. Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos estudiados.....	11
3.1.5. Regulación de los HAPs.....	18
3.1.6. Métodos de análisis de los HAPs y sus metabolitos.....	19
3.2. Métodos de preparación de muestras biológicas.....	19
3.2.1. Extracción en fase sólida (EFS).....	23
3.2.2. Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS).....	25
3.3. Preconcentración de los extractos del medio líquido y de la biomasa por EFS en línea a la CLAR.....	26
4. Metodología.....	29
4.1. Preparación de disoluciones “stock” de los metabolitos estudiados.....	29
4.2. Caracterización espectral de los metabolitos estudiados. Obtención de sus espectros de absorbancia y sus longitudes de máxima absorbancia.....	29
4.3. Desarrollo de los métodos de análisis cromatográfico.....	30
4.3.1. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los metabolitos del BaP.....	30
4.3.2. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los metabolitos del BaA.....	31



4.4.	Validación del sistema cromatográfico con inyección directa de disoluciones estándar de los analitos.....	32
4.4.1.	Límite de detección y cuantificación de los analitos.....	32
4.4.2.	Linealidad del sistema.....	33
4.4.3.	Precisión del sistema.....	33
4.5.	Optimización de la preconcentración en línea acoplada al sistema cromatográfico.....	33
4.6.	Validación del sistema cromatográfico con preconcentración en línea de disoluciones estándar de los analitos.....	35
4.7.	Crecimiento y mantenimiento de la microalga verde <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	36
4.8.	Condiciones de la preparación de muestra.....	37
4.8.1.	Pretratamiento de la muestra biológica.....	37
4.8.2.	Preparación del medio líquido por EFS .....	38
4.8.3.	Preparación de la biomasa por DMFS.....	39
4.9.	Validación de los métodos de determinación de los analitos.....	40
4.9.1.	Validación del método con EFS y preconcentración en línea acoplado a CLAR-DAD para la determinación de los metabolitos del BaP.....	41
4.9.1.1.	Selectividad del método.....	41
4.9.1.2.	Límite de detección y límite de cuantificación del método.....	41
4.9.1.3.	Linealidad del método.....	41
4.9.1.4.	Precisión del método.....	42
4.9.1.5.	Recuperación del método.....	42
4.9.2.	Validación del método con EFS y preconcentración en línea acoplada a CLAR-DAD para la determinación de los metabolitos del BaA.....	42
4.9.3.	Validación del método con DMFS y preconcentración en línea acoplado a CLAR-DAD para la determinación de los metabolitos del BaP.....	43
4.9.3.1.	Selectividad del método.....	43
4.9.3.2.	Límite de detección y cuantificación.....	43
4.9.3.3.	Linealidad del método.....	43
4.9.3.4.	Precisión del método.....	44
4.9.3.5.	Recuperación del método.....	44
4.9.4.	Validación del método con DMFS y preconcentración en línea acoplado a CLAR-DAD para la determinación de los metabolitos del BaA.....	43

4.10. Ensayos de exposición del alga <i>Selenastrum capricornutum</i> con los HAPs.....	45
5. Resultados y discusión .....	46
5.1. Caracterización espectral de los metabolitos estudiados .....	46
5.2. Desarrollo de los métodos de análisis cromatográfico .....	47
5.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los metabolitos del BaP .....	48
5.2.2. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los metabolitos del BaA .....	50
5.3. Validación del sistema cromatográfico con inyección directa de estándares de los analitos.....	54
5.3.1. Metabolitos del BaP.....	55
5.3.1.1. Límite de detección y cuantificación.....	55
5.3.1.2. Linealidad del sistema.....	55
5.3.1.3. Precisión del sistema.....	56
5.3.2. Metabolitos del BaA.....	57
5.3.2.1. Límite de detección y cuantificación.....	57
5.3.2.2. Linealidad del sistema.....	57
5.3.2.3. Precisión del sistema.....	58
5.4. Optimización de la preconcentración en línea acoplada al sistema cromatográfico.....	58
5.5. Validación del sistema cromatográfico con preconcentración en línea de estándares de los analitos.....	61
5.5.1. Metabolitos del BaP.....	61
5.5.1.1. Límite de detección y cuantificación.....	61
5.5.1.2. Linealidad del sistema.....	61
5.5.1.3. Precisión del sistema.....	62
5.5.2. Metabolitos del BaA.....	62
5.5.2.1. Límite de detección y cuantificación.....	62
5.5.2.2. Linealidad del sistema.....	63
5.5.2.3. Precisión del sistema .....	63
5.6. Validación de los métodos de determinación de los analitos.....	64
5.6.1. Validación del método de análisis con EFS y preconcentración línea acoplado a CLAR-DAD para el análisis del medio líquido.....	64

5.6.1.1.	Metabolitos del BaP.....	64
5.6.1.1.1.	Selectividad del método.....	64
5.6.1.1.2.	Límite de detección y cuantificación.....	67
5.6.1.1.3.	Linealidad del método.....	68
5.6.1.1.4.	Precisión del método.....	68
5.6.1.1.5.	Recuperación del método.....	69
5.6.1.2.	Metabolitos del BaA.....	70
5.6.1.2.1.	Selectividad del método.....	70
5.6.1.2.2.	Límite de detección y cuantificación.....	71
5.6.1.2.3.	Linealidad del método.....	71
5.6.1.2.4.	Precisión del método.....	72
5.6.1.2.5.	Recuperación del método.....	73
5.6.2.	Validación del método con DMFS y preconcentración en línea acoplado a CLAR-DAD para el análisis de la biomasa.....	73
5.6.2.1.	Metabolitos del BaP.....	73
5.6.2.1.1.	Selectividad del método.....	73
5.6.2.1.2.	Límite de detección y cuantificación.....	75
5.6.2.1.3.	Linealidad del método.....	75
5.6.2.1.4.	Precisión del método.....	76
5.6.2.1.5.	Recuperación del método .....	76
5.6.2.2.	Metabolitos del BaA.....	77
5.6.2.2.1.	Selectividad del método.....	77
5.6.2.2.2.	Límite de detección y cuantificación.....	79
5.6.2.2.3.	Linealidad del método.....	79
5.6.2.2.4.	Precisión del método .....	80
5.6.2.2.5.	Recuperación del método .....	80
5.7.	Ensayos de exposición del alga <i>Selenastrum capricornutum</i> con los HAPs	81
5.7.1.	Exposición al BaP .....	81
5.7.2.	Exposición al BaA .....	91
6.	Conclusiones .....	100
7.	Referencias .....	102

## ABREVIATURAS

MeCN	Acetonitrilo
BaA	Benzo[a]antraceno
BaP	Benzo[a]pireno
r	Coefficiente de Correlación
CV	Coefficiente de Variación
$K_{o/w}$	Constante de reparto octanol/agua
CG	Cromatografía de Gases
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DMFS	Dispersión de Matriz en Fase Sólida
N	Eficiencia
EM	Espectrometría de Masas
EFS	Extracción en Fase Sólida
$K'$	Factor de capacidad
$K_w$	Factor de retención cuando la fase móvil es agua pura
FL	Fluorescencia
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
$\lambda_{max}$	Longitud de onda de máxima absorción
MeOH	Metanol
R	Resolución
$\alpha$	Selectividad
$t_r$	Tiempo de Retención
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1.	Propiedades fisicoquímicas de los HAPs estudiados	6
Tabla 3.2.	Ejemplos de bacterias capaces de degradar HAPs	14
Tabla 3.3.	Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos del benzo[a]pireno	17
Tabla 3.4.	Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos del benzo[a]antraceno	17
Tabla 3.5.	Límite máximo permitido para los HAPs	18
Tabla 3.6.	Resumen de algunos métodos de extracción y análisis para la identificación o determinación de los HAPs y sus metabolitos en matrices biológicas	21
Tabla 3.7.	Ejemplos de métodos de análisis con preconcentración en línea	28
Tabla 4.1.	Condiciones cromatográficas utilizadas en la caracterización espectral de los metabolitos	29
Tabla 4.2.	Condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los metabolitos del BaP	31
Tabla 4.3.	Condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los metabolitos del BaA	32
Tabla 4.4.	Composición de 1 L de medio Bristol líquido	36
Tabla 5.1.	Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaP y del BaA	47
Tabla 5.2.	Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaP	49
Tabla 5.3.	Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaA	50
Tabla 5.4.	Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaP	53
Tabla 5.5.	Límites de detección y cuantificación teóricos y experimentales para los metabolitos del BaP, inyección directa	55
Tabla 5.6.	Parámetros obtenidos en la linealidad del sistema por inyección directa de los metabolitos del BaP	56
Tabla 5.7.	Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaP.	56
Tabla 5.8.	Límites de detección y cuantificación teóricos y experimentales para los metabolitos del BaA en inyección directa.	57
Tabla 5.9.	Parámetros obtenidos en la linealidad del sistema por inyección directa de los metabolitos del BaA	58
Tabla 5.10.	Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaA	58
Tabla 5.11.	Límites de detección y cuantificación teóricos y experimentales para los metabolitos del BaP con preconcentración en línea	61
Tabla 5.12.	Parámetros obtenidos en la linealidad del sistema con preconcentración en línea de los metabolitos del BaP	62
Tabla 5.13.	Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaP. Evaluación del sistema con preconcentración en línea	62
Tabla 5.14.	Límites de detección y cuantificación teóricos y experimentales para los metabolitos del BaA con preconcentración en línea.	63
Tabla 5.15.	Parámetros obtenidos en la linealidad del sistema con preconcentración en línea de los metabolitos del BaA	63
Tabla 5.16.	Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaA. Evaluación del sistema con preconcentración en línea	64

Tabla 5.17.	Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) experimentales para los metabolitos del BaP con EFS y preconcentración en línea	67
Tabla 5.18.	Parámetros obtenidos en la linealidad del método (respuesta vs concentración) para los metabolitos del BaP con EFS y preconcentración en línea	68
Tabla 5.19.	Parámetros obtenidos en la linealidad del método (concentración recuperada vs concentración adicionada) para los metabolitos del BaP con EFS y preconcentración en línea	68
Tabla 5.20.	Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaP. Evaluación del método con EFS y preconcentración en línea (n=6)	69
Tabla 5.21.	Porcentajes de recuperación para los metabolitos del BaP comparando la respuesta de una disolución estándar preconcentrada contra la respuesta obtenida por la preconcentración de un extracto de EFS proveniente del medio líquido	69
Tabla 5.22.	Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) experimentales para los metabolitos del BaA con EFS y preconcentración en línea	71
Tabla 5.23.	Parámetros obtenidos en la linealidad del método (respuesta vs concentración) para los metabolitos del BaA con EFS y preconcentración en línea	72
Tabla 5.24.	Parámetros obtenidos en la linealidad del método (concentración recuperada vs concentración adicionada) para los metabolitos del BaA con EFS y preconcentración en línea	72
Tabla 5.25.	Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaA. Evaluación del método con EFS y preconcentración en línea (n=6).	72
Tabla 5.26.	Porcentajes de recuperación para los metabolitos del BaA comparando la respuesta de una disolución estándar preconcentrada contra la respuesta obtenida por la preconcentración de un extracto de EFS proveniente del medio líquido	73
Tabla 5.27.	Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) experimentales para los metabolitos del BaP con DMFS y preconcentración en línea	75
Tabla 5.28.	Parámetros obtenidos en la linealidad del método (respuesta vs concentración) para los metabolitos del BaP con DMFS y preconcentración en línea	75
Tabla 5.29.	Parámetros obtenidos en la linealidad del método (concentración recuperada vs concentración adicionada) para los metabolitos del BaP con DMFS y preconcentración en línea	76
Tabla 5.30.	Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaP. Evaluación del método con DMFS y preconcentración en línea (n=6)	76
Tabla 5.31.	Porcentajes de recuperación para los metabolitos del BaP comparando la respuesta de una disolución estándar preconcentrada contra la respuesta obtenida por la preconcentración de un extracto de DMFS proveniente de la biomasa	77
Tabla 5.32.	Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) experimentales para los metabolitos del BaA con DMFS y preconcentración en línea	79
Tabla 5.33.	Parámetros obtenidos en la linealidad del método (respuesta vs concentración) para los metabolitos del BaA con DMFS y preconcentración	79

	en línea	
Tabla 5.34.	Parámetros obtenidos en la linealidad del método (concentración recuperada vs concentración adicionada) para los metabolitos del BaA con DMFS y preconcentración en línea	80
Tabla 5.35.	Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaA. Evaluación del método con DMFS y preconcentración en línea (n=6)	80
Tabla 5.36.	Porcentajes de recuperación para los metabolitos del BaA comparando la respuesta de una disolución estándar preconcentrada contra la respuesta obtenida por la preconcentración de un extracto de DMFS proveniente de la biomasa	81

## ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura 3.1.	Estructura de algunos HAPs	4
Figura 3.2.	Estructura química de los 16 HAPs considerados como contaminantes prioritarios por la EPA	8
Figura 3.3.	Ruta metabólica del benzo[a]pireno en el ser humano	12
Figura 3.4.	Ruta general para el metabolismo de los HAPs en mamíferos	13
Figura 3.5.	Degradación bacteriana del pireno por <i>Mycobacterium sp</i>	15
Figura 3.6.	Degradación fúngica del fenantreno con <i>Irpex lacteus</i>	16
Figura 3.7.	Pasos generales en la Extracción en Fase Sólida	24
Figura 3.8.	Pasos generales en la Dispersión de Matriz en Fase Sólida	26
Figura 3.9.	Esquema general de un sistema de preconcentración en línea acoplado a la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	28
Figura 4.1.	Esquema general del sistema de preconcentración en línea utilizado	35
Figura 4.2.	Pretratamiento de la muestra. Separación del medio líquido y de la biomasa del medio de cultivo para la extracción posterior de los metabolitos	37
Figura 4.3.	Procedimiento del método basado en la EFS para la extracción de los metabolitos del medio de cultivo líquido	39
Figura 4.4.	Procedimiento del método basado en la DMFS para la extracción de los metabolitos de la biomasa del cultivo	40
Figura 5.1.	Espectros de absorción en la región ultravioleta-visible de los metabolitos estudiados	46
Figura 5.2.	Cromatograma obtenido para una mezcla de metabolitos del BaP a una concentración de 1 µg/mL. Fase móvil isocrática	48
Figura 5.3.	Cromatograma obtenido para una mezcla de metabolitos del BaP a una concentración de 1 µg/mL. Fase móvil por gradiente	49
Figura 5.4.	Cromatogramas obtenidos para una mezcla de metabolitos del BaA a una concentración de 1 µg/mL. Diferentes proporciones de fase móvil. Corridas isocráticas	51
Figura 5.5.	Cromatogramas obtenidos para una mezcla de metabolitos del BaA a una concentración de 1 µg/mL. Diferentes proporciones de fase móvil. Corridas por gradiente	53
Figura 5.6.	Cromatograma obtenido para una mezcla de metabolitos del BaA a una concentración de 1 µg/mL y detección con 4 diferentes longitudes de onda	54
Figura 5.7.	Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido al preconcentrar un	65

Figura 5.8.	blanco del medio de cultivo preparado por EFS. Fase móvil isocrática Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido al preconcentrar un	66
Figura 5.9.	blanco del medio de cultivo preparado por EFS. Fase móvil por gradiente Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido de la	67
Figura 5.10.	preconcentración del extracto resultante de una EFS del medio de cultivo adicionado con los metabolitos del BaP (2.67 ng/mL de medio).	70
Figura 5.11.	Cromatograma obtenido a diferentes longitudes de onda al preconcentrar un blanco del medio de cultivo preparado por EFS	70
Figura 5.12.	Cromatograma obtenido a diferentes longitudes de onda de la preconcentración del extracto resultante de una EFS del medio de cultivo adicionado con los metabolitos del BaA (10.67 ng/mL de medio)	74
Figura 5.13.	Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido al preconcentrar un blanco de biomasa preparado por DMFS	74
Figura 5.14.	Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido de la preconcentración del extracto resultante de una DMFS de la biomasa adicionada con los metabolitos del BaP (2.67 ng/mg de biomasa)	78
Figura 5.15.	Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido al preconcentrar un blanco de biomasa preparado por DMFS	78
Figura 5.16.	Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido de la preconcentración del extracto resultante de una DMFS de la biomasa adicionada con los metabolitos del BaA (16 ng/mg de biomasa)	83
Figura 5.17.	Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 4,5-dihidrodiol del BaP (2). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del metabolito mencionado (271.2 nm)	83
Figura 5.18.	Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 7,8-dihidrodiol del BaP (3). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del metabolito mencionado (364.2 nm)	84
Figura 5.19.	Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 9,10-dihidrodiol del BaP (1). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del metabolito mencionado (277.2 nm)	84
Figura 5.20.	Comparación de los espectros de absorción extraídos de las señales obtenidas en el medio líquido para los ensayos de exposición del BaP, con los correspondientes a los estándares en medio de cultivo fortificado	85
Figura 5.21.	Evolución de las señales desconocidas en el medio de cultivo y en biomasa respecto al tiempo de exposición. (4) Posible 11,12-dihidrodiol, (d1) y (d2) Compuestos desconocidos. Cromatograma obtenido a una longitud de onda de 278.4 nm	85
Figura 5.22.	Espectros de absorción extraídos del pico, tanto en el medio de cultivo como en la biomasa, que posiblemente corresponde al 11,12-dihidrodiol del BaP	86
Figura 5.23.	Comparación de los espectros de absorción extraídos de las señales obtenidas en la biomasa para los ensayos de exposición del BaP, con los correspondientes a los estándares en biomasa fortificada	92
Figura 5.23.	Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 5,6- dihidrodiol del BaA (1). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del metabolito mencionado (265.3 nm)	



Figura 5.24.	Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en la biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 8,9 (2) y del 10,11-dihidrodiol del BaA (3). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del 8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	93
Figura 5.25.	Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en la biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 10,11-dihidrodiol del BaA (3). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del metabolito mencionado (272.4 nm)	93
Figura 5.26.	Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en la biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 8,9-dihidrodiol del BaA (2). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del metabolito mencionado (317.7 nm)	94
Figura 5.27.	Comparación de los espectros de absorción extraídos de las señales obtenidas en el medio líquido para los ensayos de exposición del BaA, con los correspondientes a los estándares en medio de cultivo fortificado	94
Figura 5.28.	Comparación de los espectros de absorción extraídos de las señales obtenidas en la biomasa para los ensayos de exposición del BaA, con los correspondientes a los estándares en medio de cultivo fortificado	95
Gráfico 5.1.	Influencia de la proporción de disolvente orgánico en el porcentaje de recuperación obtenido para la preconcentración de los metabolitos del BaP	60
Gráfico 5.2.	Influencia de la proporción de disolvente orgánico en el porcentaje de recuperación obtenido para la preconcentración de los metabolitos del BaA	60
Gráfico 5.3.	Formación de los metabolitos del BaP en el medio de cultivo como función del tiempo de exposición	87
Gráfico 5.4.	Formación de los metabolitos del BaP en la biomasa como función del tiempo de exposición	88
Gráfico 5.5.	Comportamiento del posible 11,12-dihidrodiol en medio de cultivo y biomasa	89
Gráfico 5.6.	Cantidad total de los metabolitos formados por la biodegradación del BaP como función del tiempo de exposición.	90
Gráfico 5.7.	Cantidad neta formada de los productos producidos por la biodegradación del BaP como función del tiempo de exposición	91
Gráfico 5.8.	Formación de los metabolitos del BaA en el medio de cultivo como función del tiempo de exposición	96
Gráfico 5.9.	Formación de los metabolitos del BaP en la biomasa como función del tiempo de exposición	97
Gráfico 5.10.	Cantidad total de los metabolitos formados por la biodegradación del BaP como función del tiempo de exposición	98
Gráfico 5.11.	Cantidad neta formada de los productos producidos por la biodegradación del BaP como función del tiempo de exposición	99

## 1. Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), también conocidos como hidrocarburos aromáticos polinucleares, poliarenos o moléculas poliaromáticas, son un grupo conformado por alrededor de cien compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en el ambiente, muy conocidos por su toxicidad y persistencia (Gan et al., 2009; Wick y Haus, 2011).

Estos compuestos están constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno unidos en dos o más anillos aromáticos fusionados (Gan et al., 2009). Se clasifican como de bajo peso molecular si tienen dos o tres anillos aromáticos condensados, o de alto peso molecular si presentan cuatro o más anillos aromáticos. Los HAPs de bajo peso molecular son más fácilmente degradados y volatilizados que los de alto peso molecular, los cuales son más estables y tóxicos (Plaza-Bolaños et al., 2010; Ali y Tarek, 2009). Los HAPs de alto peso molecular persisten más en el ambiente debido a su baja volatilidad, resistencia a la lixiviación y naturaleza recalcitrante (Wick y Haus, 2011).

Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Se forman por procesos naturales como incendios, reacciones producidas en los seres vivos, erupciones volcánicas y filtraciones naturales de petróleo. Sin embargo, la causa más común de formación de HAPs es de manera antropogénica, principalmente por procesos de combustión, especialmente en la ignición incompleta de materiales orgánicos durante actividades humanas e industriales (medios de transporte, cocción de alimentos, humo de cigarro, combustión de carbón, gas, gasolina, petróleo y madera, e incineración de desechos) (Manariotis et al., 2011; Manoli y Samara, 2008; Haritash y Kaushik, 2009; Ramsauer et al., 2011; Eom et al., 2007).

La acumulación y persistencia de los HAPs en el medio ambiente puede producir efectos perjudiciales tanto en los ecosistemas acuáticos como en los terrestres. La lista de HAPs relevantes varía en cada país. En Estados Unidos la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) ha incluido 16 HAPs en la lista de contaminantes prioritarios como consecuencia de sus efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos en los seres vivos, en donde se encuentran el benzo[a]pireno y el benzo[a]antraceno (Roy et al., 1990; Warshawsky et al., 1995; Song et al., 2012).

A pesar de que el daño causado por los hidrocarburos aromáticos policíclicos puede ser evitado con el uso de métodos de descontaminación convencionales, como la remoción, alteración o aislamiento del contaminante para su posterior incineración, se tiene la desventaja de que son procesos económicamente caros y en ocasiones solo transfieren el contaminante de una fase a otra. Es por esto que se prefiere a la biorremediación como método de descontaminación, ya que es posible transformar con el uso de microorganismos compuestos contaminantes, usando una baja cantidad de compuestos químicos, energía y tiempo (Providenti et al., 1993; Ward et al., 2003).

Entre los microorganismos capaces de degradar a los HAPs se encuentran las bacterias, los hongos y las algas; sin embargo, las rutas metabólicas empleadas por éstos no están completamente definidas, sobre todo en el caso de las algas, y por consiguiente no se conocen con certeza los productos que resultan de la biodegradación de los HAPs, los cuales pueden ser más dañinos. Por ello resulta importante la identificación y cuantificación de estos compuestos provenientes de la degradación de los contaminantes mediante el uso de métodos analíticos validados, con la finalidad de evaluar, en estudios posteriores, sus características fisicoquímicas, su interacción con el medio ambiente y su toxicidad.

## 2. Objetivos

### Objetivo general

Identificar y monitorear, a distintos tiempos de exposición, productos de degradación provenientes de la biotransformación de dos hidrocarburos aromáticos policíclicos: el benzo[a]pireno (BaP) y el benzo[a]antraceno (BaA), por la microalga verde *Selenastrum capricornutum*.

### Objetivos particulares

- Caracterizar espectral y cromatográficamente posibles metabolitos de la biodegradación del BaP: el 9,10-dihidrodiol, el 4,5-dihidrodiol y el 7,8-dihidrodiol y, de la biodegradación del BaA: el 5,6-dihidrodiol, el 8,9-dihidrodiol y el 10,11-dihidrodiol, debido a la acción de la microalga *Selenastrum capricornutum*.
- Evaluar dos técnicas de extracción, una basada en la Extracción en Fase Sólida para el aislamiento de los metabolitos propuestos del BaP y del BaA de un medio de cultivo líquido y otra basada en la Dispersión de Matriz en Fase Sólida para aislar a estos analitos de biomasa proveniente de la microalga *Selenastrum capricornutum*.
- Desarrollar y validar dos métodos analíticos basados en CLAR-UV/DAD con preconcentración en línea por Extracción en Fase Sólida para la identificación y cuantificación de los metabolitos propuestos del BaP y del BaA provenientes de la biodegradación de la microalga *Selenastrum capricornutum*.
- Identificar los compuestos provenientes de la biodegradación por la microalga *Selenastrum capricornutum* del BaP y del BaA mediante la comparación de sus espectros de absorbancia y parámetros cromatográficos con los obtenidos para los estándares de los metabolitos propuestos.
- Monitorear a distintos tiempos de exposición la formación de los metabolitos identificados de la biodegradación del BaP y del BaA.

### 3. Antecedentes

#### 3.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

##### 3.1.1. Definición, clasificación y propiedades fisicoquímicas

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, también conocidos como hidrocarburos aromáticos polinucleares, poliarenos o moléculas poliaromáticas, son un grupo conformado por alrededor de cien compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en el ambiente, muy conocidos por su toxicidad y persistencia (Gan et al., 2009; Wick y Haus, 2011).

Estos compuestos están constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno unidos en dos o más anillos aromáticos fusionados en arreglos lineales o racimos, que pueden presentar o no anillos no aromáticos de menos de seis átomos de carbono (Gan et al., 2009). Sus propiedades físicas y químicas están determinadas por sus sistemas de electrones  $\pi$ -conjugados, los cuales dependen del número de anillos aromáticos que presente la molécula y de su peso molecular (figura 3.1) (González et al., 2012; Vela et al., 2012; Haritash y Kaushik, 2009).

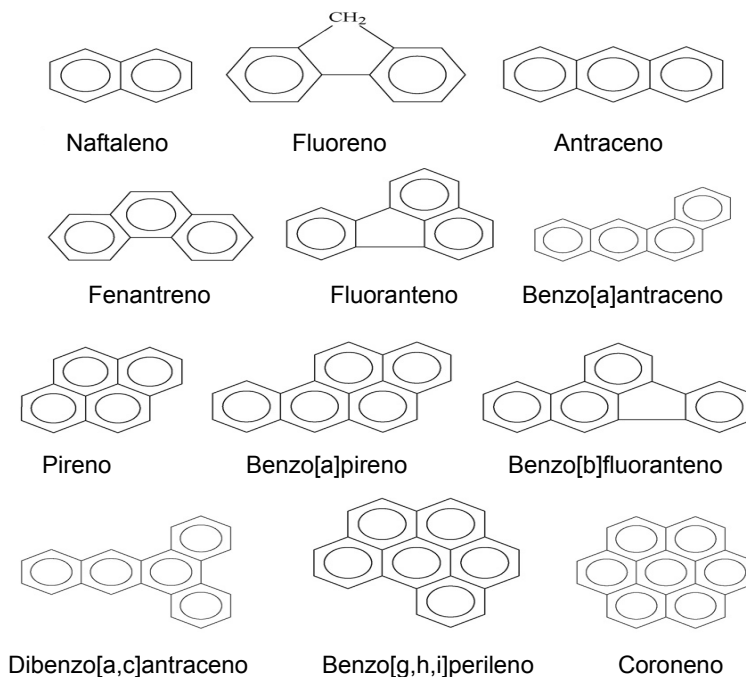


Figura 3.1. Estructura de algunos HAPs.

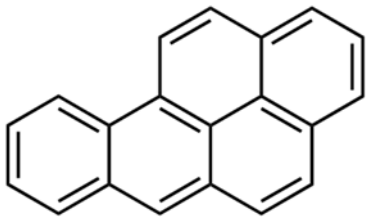
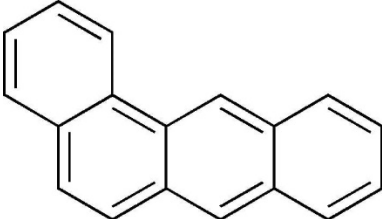
Los HAPs se presentan como sustancias sólidas, incoloras, blancas o amarillentas, neutrales y no polares que poseen una alta estabilidad, haciendo que sea difícil su degradación (Vela et al., 2012; Haritash y Kaushik, 2009). Se clasifican en función de la cantidad de anillos condensados que presentan como de bajo peso molecular (dos o tres anillos) o de alto peso molecular (cuatro o más anillos) (Plaza-Bolaños et al., 2010; Ali y Tarek, 2009).

Otra clasificación de estas moléculas orgánicas se basa en la presencia de anillos no aromáticos en su estructura. Si los HAPs solo contienen anillos de benceno fusionados (máximo 8 anillos) se consideran como alternantes, mientras que si contienen anillos no aromáticos de cuatro, cinco o seis miembros son no alternantes. Ejemplos de alternantes son el antraceno, fenantreno y criseno, ejemplos de no alternantes fluoranteno y fluoreno (Wick y Haus, 2011).

Los HAPs poseen altos puntos de fusión y ebullición, y bajas presiones de vapor y solubilidad en agua (Tabla 3.1) (Vela et al., 2012). La solubilidad de los HAPs en agua depende de la temperatura, pH, fuerza iónica y de los componentes que contiene la matriz acuosa (Dabestani e Ivanov, 1999). De manera general los HAPs presentan una relativa baja solubilidad en agua, son altamente hidrofóbicos (en un rango de 31 g/m<sup>3</sup> hasta 0.26 mg/m<sup>3</sup>), pero se logran disolver fácilmente en disolventes de carácter orgánico, grasas y aceites, por lo que presentan una tendencia a almacenarse y acumularse en los tejidos grasos de los organismos vivos (Dabestani e Ivanov, 1999; Vela et al., 2012). Por consiguiente, estos compuestos presentan un coeficiente de distribución octanol/agua ( $K_{ow}$ ) alto (tabla 3.1) (González et al., 2012). La adición o sustitución de otros grupos funcionales en estos compuestos orgánicos pueden ayudar a aumentar su solubilidad en agua. Muchos productos obtenidos por la degradación biológica o química de los HAPs tienden a ser más polares (Wick y Haus, 2011).

Los HAPs presentan presiones de vapor variadas (punto en el cual un sólido se evapora para encontrarse en su forma gaseosa, o un gas se condensa en su forma sólida), que se encuentran en un rango de 0.37 nPa hasta 10.4 Pa (Dabestani e Ivanov, 1999; Wick y Haus, 2011). Los HAPs con bajas presiones de vapor se asocian con partículas sólidas, mientras que los que presentan altas presiones de vapor se encuentran como gases a temperatura ambiente en el aire (Rubio-Clemente et al., 2014).

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs estudiados.

Compuesto	Benzo[a]pireno	Benzo[a]antraceno
Estructura		
Fórmula condensada	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>
Peso molecular (g/mol)	252.3	228.29
Color	Amarillo pálido	Azul verdoso
Estado físico	Sólido (placas o agujas)	Sólido (placas)
Punto de fusión (°C)	179 – 179.3	158 – 159
Punto de ebullición (°C)	495	400
Densidad a 20 °C (g/ml)	1.351	1.274
Solubilidad: en agua (mg/l) en disolventes orgánicos	0.0023 Ligeramente soluble en metanol y etanol. Soluble en benceno, tolueno, xileno y éter	0.01 Ligeramente soluble en ácido acético y etanol caliente. Soluble en acetona y dietil éter. Muy soluble en benceno
log Kw	6.06	5.61
Presión de vapor (mmHg)	5.6x10 <sup>-9</sup>	2.2x10 <sup>-8</sup>

Generalmente la solubilidad y la volatilidad (presión de vapor) de los HAPs disminuye cuando se incrementa el número de anillos condensados de benceno en la estructura de la molécula (Wick y Haus, 2011; Vela et al., 2012; Haritash y Kaushik, 2009).

### 3.1.2. Fuentes de emisión y presencia de los HAPs en el medio ambiente

Los HAPs se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Se pueden encontrar acumulados en diversos sistemas ambientales como el suelo, sedimentos, agua, aire, plantas y animales, como resultado de procesos naturales y antropogénicos, por lo que forman parte de los contaminantes domésticos comunes (Guo et al., 2007; Manariotis et al., 2011; Campo et al., 2008). Entre los procesos naturales los HAPs son generados en incendios, erupciones volcánicas y filtraciones naturales de petróleo. Sin embargo, la manera más común de formación de HAPs es de manera antropogénica, principalmente por procesos de combustión, especialmente en la ignición incompleta de materiales orgánicos durante actividades humanas e industriales (medios de transporte, cocción de alimentos, humo de cigarro, combustión de carbón, gas, gasolina, petróleo y madera, e incineración de desechos) (Manariotis et al., 2011; Manoli y Samara, 2008; Haritash y Kaushik, 2009; Ramsauer et al., 2011; Eom et al., 2007).

Al formarse a causa de la combustión incompleta de material orgánico, la estructura de los HAPs dependerá de la temperatura y el tiempo de calentamiento. Altas temperaturas y cortos tiempos, como en la cocción de alimentos, crean HAPs simples, de bajo peso molecular. Bajas temperaturas y tiempos largos, como en el consumo de cigarrillos, dan origen a HAPs más complejos, de mayor peso molecular (Wick y Haus, 2011).

Los HAPs se encuentran en la atmósfera principalmente vía emisiones de gases, pero también pueden provenir del suelo y agua mediante evaporación o resuspensión de partículas. El contenido de HAPs en el aire es mayor en el invierno que en el verano, debido al uso de sistemas de calentamiento. En la atmósfera, los HAPs pueden estar en forma gaseosa o particulada. Son capaces de reaccionar con óxidos nitrosos formando nitro-HAPs, los cuales se encuentran en bajas concentraciones pero son más tóxicos (Haritash y Kaushik, 2009; Wick y Haus, 2011).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos se presentan en el ambiente generalmente como mezclas y no como compuestos aislados (Manariotis et al., 2011). A pesar de que su concentración en sistemas ambientales, como suelos, aguas superficiales y subterráneas, y ambientes marinos, es baja por su poca solubilidad en agua, estos compuestos son de gran importancia y están listados como contaminantes prioritarios, debido a su alta toxicidad y fácil acumulación (Manariotis et al., 2011). Los HAPs en agua de desecho proveniente de uso doméstico se encuentran en rango de 0.005 a 14.5 µg/L, mientras que en aguas residuales de uso urbano de 2.7 a 26.4 µg/L. En estas últimas predominan los HAPs de bajo peso molecular como el fenantreno, naftaleno, fluoranteno y pireno (González et al., 2012).

Sin embargo, una de las fuentes principales de exposición de los HAPs con el ser humano es mediante los alimentos. Éstos pueden contaminarse con los HAPs presentes en el medio ambiente, lo que ocurre comúnmente en los alimentos no cocinados o procesados como las frutas y vegetales o la acumulación de estos compuestos en animales acuáticos que viven en fuentes contaminadas de agua. Por otra parte, los HAPs pueden estar presentes en los alimentos procesados como consecuencia de ciertos procesos industriales como el ahumado, el rostizado y el secado, en donde se da un contacto directo entre los alimentos y el material de combustión (Plaza-Bolaños et al., 2010; Purcaro et al., 2013).



### 3.1.3. Efectos adversos de los HAPs

La acumulación y persistencia de los HAPs en el medio ambiente puede producir efectos perjudiciales tanto en los ecosistemas acuáticos como en los terrestres. La lista de HAPs preeminentes varía en cada país. En Estados Unidos la Agencia de Protección Ambiental (EPA), por sus siglas en inglés, ha incluido a 16 HAPs (figura 3.2), donde se encuentran el benzo[a]pireno y el benzo[a]antraceno, en una lista de contaminantes prioritarios como consecuencia de sus efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos en los organismos incluyendo a los seres humanos (Roy et al., 1990; Warshawsky et al., 1995; Song et al., 2012).

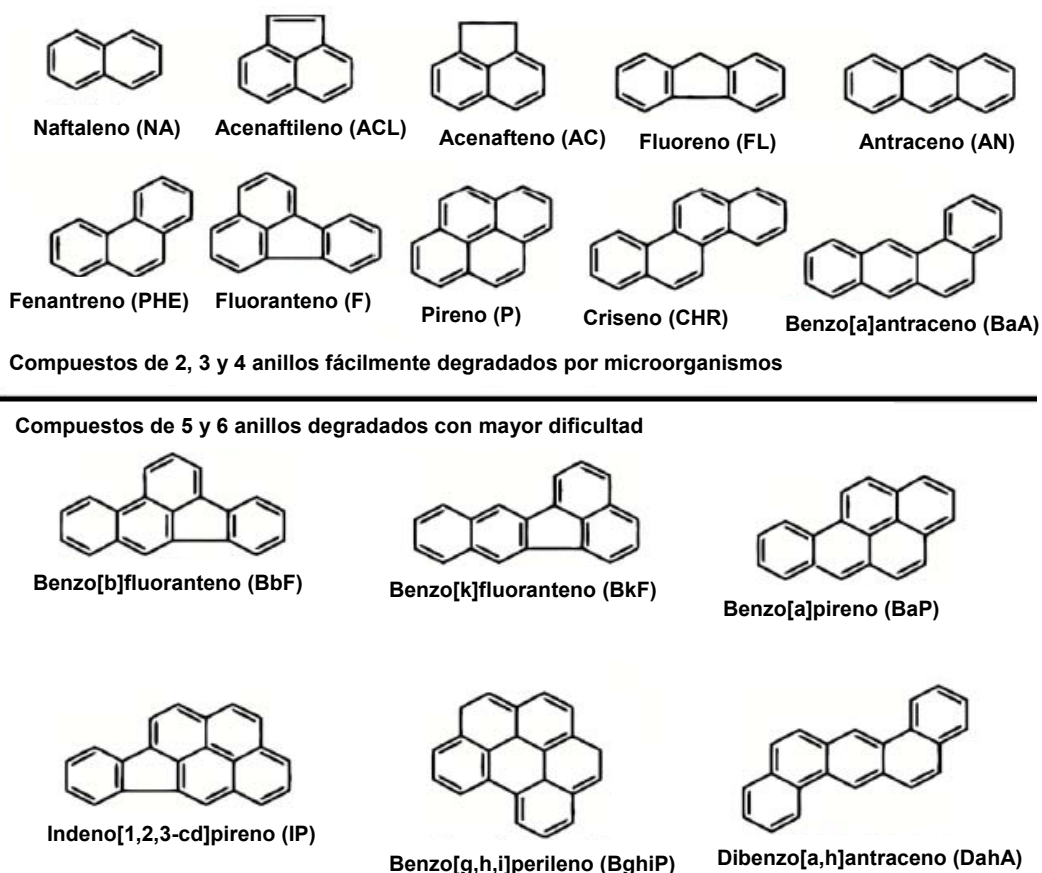


Figura 3.2. Estructura química de los 16 HAPs considerados como contaminantes prioritarios por la EPA.

Los HAPs son clasificados por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) en cuatro clases diferentes. Clase I: carcinogénicos

(benzo[a]pireno), Clase II A: probablemente carcinogénicos (dibenzo[a,b]antraceno, dibenzo[a,l]pireno, ciclopenta[c,d]pireno), Clase II B: posiblemente carcinogénicos para el ser humano (14 HAPs incluido el naftaleno), o Clase III: no clasificados como carcinogénicos para el ser humano (10 HAPs) (Ramsauer et al., 2011).

Los HAPs han sido relacionados con varios tipos de cáncer como de pulmón, vejiga, laringe, escroto, mama, esofágico, próstata, riñón, piel y páncreas. También son capaces de suprimir el sistema inmune y se sospecha de que son disruptores endocrino (US-EPA, 1993; US-EPA, 2008; Canadian Council of Ministers of the Environment, 2008).

#### **3.1.4. Toxicidad y metabolismo de los HAPs**

Los efectos de los HAPs en la salud del ser humano dependen del tiempo de exposición, la cantidad o concentración a la que el individuo es expuesto, y a la toxicidad innata de los compuestos, aunque otros factores como la salud de la persona y la edad pueden estar también relacionadas con dichos efectos. La habilidad de los HAPs de inducir efectos adversos a corto plazo no es del todo clara. Exposición a mezclas contaminantes con altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden resultar en síntomas como irritación en ojos, náuseas, vómito, diarrea y confusión. Sin embargo, no es completamente conocido cuales componentes de las mezclas son los responsables de estos síntomas, por lo que es posible que otras sustancias que se encuentran comúnmente mezcladas con los HAPs sean las causantes de los síntomas descritos. Por otro lado, se sabe que mezclas de HAPs, en donde no se encuentra ningún otro contaminante, causan irritación de piel e inflamación, además de que el antraceno, benzo[a]pireno y naftaleno causan una extremada sensibilidad de piel (Gilbert, 2004).

Una exposición crónica o a largo plazo hacia los HAPs puede causar diversos efectos en la salud humana como decremento en la función inmune, cataratas, daño del riñón e hígado, problemas respiratorios, asma, función anormal del pulmón, irritación e inflamación de piel. Estudios realizados han encontrado que el naftaleno es capaz de producir muerte en los glóbulos rojos si éste es inhalado o ingerido en altas cantidades. De manera general, los efectos generados por los HAPs dependerán de la forma en la que el individuo es expuesto a éstos (Gilbert, 2004).

#### 3.1.4.1. Carcinogenicidad

A pesar de que los HAPs pueden presentar efectos tóxicos, se conoce que sus metabolitos, como epóxidos y dihidrodioles, son más reactivos, ya que se unen con facilidad a proteínas celulares y al ADN. El resultado de estas rupturas y desorganizaciones celulares conducen a mutaciones, malformaciones, tumores y cáncer. Diversos trabajos indican que las mezclas de HAPs son carcinogénicas para los humanos. La evidencia primaria de esta actividad proviene de estudios hechos a trabajadores que estuvieron expuestos a grandes cantidades de HAPs por un largo tiempo, los cuales presentaron predominantemente cáncer de piel y pulmón, así como cáncer gastrointestinal y de vejiga (Buha, 2011; Toriba et al., 2003; Song et al., 2012).

Exposiciones largas de animales a ciertas cantidades de HAPs en estudios de laboratorio, resultaron en el desarrollo de cáncer de pulmón debido a inhalación, cáncer de estómago por ingesta de alimentos contaminados y cáncer de piel por contacto directo con los HAPs. El benzo[a]pireno es el hidrocarburo aromático policíclico más común para inducir cáncer en estudios con animales, incluso fue el primer compuesto químico carcinogénico descubierto. Con base en sus propiedades tóxicas, la EPA ha clasificado a siete HAPs como compuestos posiblemente carcinógenos para el ser humano: el benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno y el indeno[1, 2, 3-c,d]pireno. De manera general, se conoce que entre mayor es el número de anillos de benceno que contiene la molécula, mayor será su toxicidad (Hwang et al., 2007; Klaassen, 2008; Lorenzi et al., 2012).

#### 3.1.4.2. Teratogenicidad

Efectos embriotóxicos se han descrito por exposición de animales hacia los HAPs en estudios de laboratorio. Una investigación llevada a cabo con ratones demostró que la ingesta de altos niveles de benzo[a]pireno durante la gestación da como resultado defectos de nacimiento y decremento en el peso corporal de las crías. Además, el Centro para la Salud Ambiental de los Niños de la Universidad de Columbia (CCCEH) ha reportado estudios que demuestran que la exposición de mujeres embarazadas hacia los hidrocarburos aromáticos policíclicos está relacionada con problemas en el nacimiento como bajo peso corporal, nacimientos prematuros y malformaciones cardíacas. Asimismo,

una gran exposición prenatal también es asociada con un bajo coeficiente intelectual (IQ) a los tres años, problemas de conducta a los 6 y 8 años (Buha, 2011; Klaassen, 2008).

#### **3.1.4.3. Genotoxicidad**

Efectos genotóxicos provocados por ciertos HAPs han sido demostrados tanto en roedores como en ensayos in vitro utilizando líneas celulares de mamífero, incluyendo células humanas. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos policíclicos no son genotóxicos por sí mismos y necesitan ser metabolizados como epoxidioles, los cuales reaccionan con el ADN, induciendo así el daño genotóxico. La genotoxicidad juega un papel muy importante en el proceso de carcinogenicidad y probablemente en varias formas de toxicidad (Buha, 2011; Penning et al., 1999; Bekki et al., 2013).

#### **3.1.4.4. Inmunotoxicidad**

También se ha reportado que los HAPs son capaces de suprimir el sistema inmune en roedores. Los mecanismos exactos de como los HAPs inducen la inmunotoxicidad aún no son claros; sin embargo, parece que la inmunosupresión puede estar relacionada con los mecanismos por los cuales los hidrocarburos aromáticos policíclicos inducen cáncer (Buha, 2011).

#### **3.1.4.5. Metabolismo y degradación de los HAPs. Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos estudiados**

Debido a que la exposición a los HAPs nunca se da individualmente, es decir, con un solo compuesto, es necesario entender, por medio de experimentos, como se lleva a cabo el metabolismo de los HAPs en distintas mezclas; sin embargo, una gran aproximación es entender el metabolismo individual de los HAPs así como sus posibles efectos tóxicos, lo cual ayuda a poder plantear diversas estrategias de remediación.

Por su alta lipofilidad, se sabe que la biodisponibilidad de los HAPs después de su ingesta o inhalación no es significativa. Algunos estudios han encontrado niveles detectables de HAPs en casi todos los órganos internos, particularmente en órganos ricos en tejido adiposo. Estos órganos pueden servir como depósitos desde donde los

hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden ser liberados (Penning et al., 1999; Buha, 2011).

Cuando estos contaminantes son absorbidos por el ser humano son metabolizados por el organismo siendo primeramente oxidados por las enzimas del sistema del citocromo P450 y después reducidos a compuestos hidroxilados, fenoles o dihidrodioles (fase I). En la fase II los compuestos hidroxilados son convertidos en glucoronatos y sulfatos conjugados para facilitar su excreción por medio de la orina (figuras 3.3 y 3.4). Se ha visto que algunos de los intermediarios de estas reacciones se unen covalentemente al ADN y a las proteínas formando aductos, lo cual es causante de la toxicidad de los HAPs; sin embargo, una gran cantidad de estos son excretados rápidamente en la orina (Campo et al., 2008; Toriba et al., 2003; Bekki et al., 2013; Romanoff et al., 2006). Estas rutas metabólicas presentadas son similares en la mayoría de los organismos vivos estudiados, por lo cual se ha podido plantear procesos de biorremediación con distintos microorganismos, con la finalidad de biodegradar a los HAPs y hacerlos menos tóxicos.

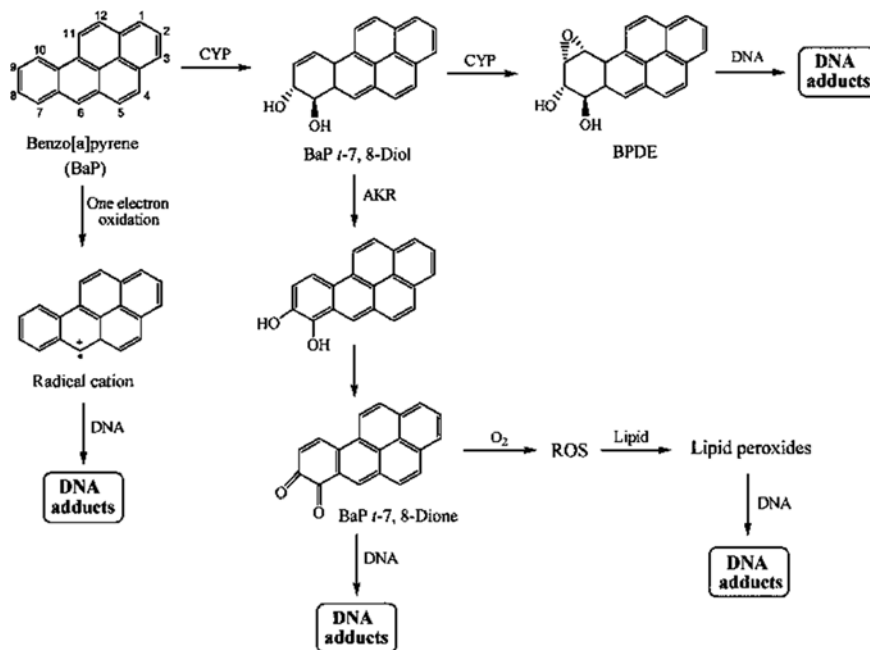


Figura 3.3. Ruta metabólica del benzo[a]pireno en el ser humano. Se observa que sólo el catión radical, la diona los peróxidos lipídicos y los epóxidoles (BPDE) son tóxicos (Fu et al., 2012).

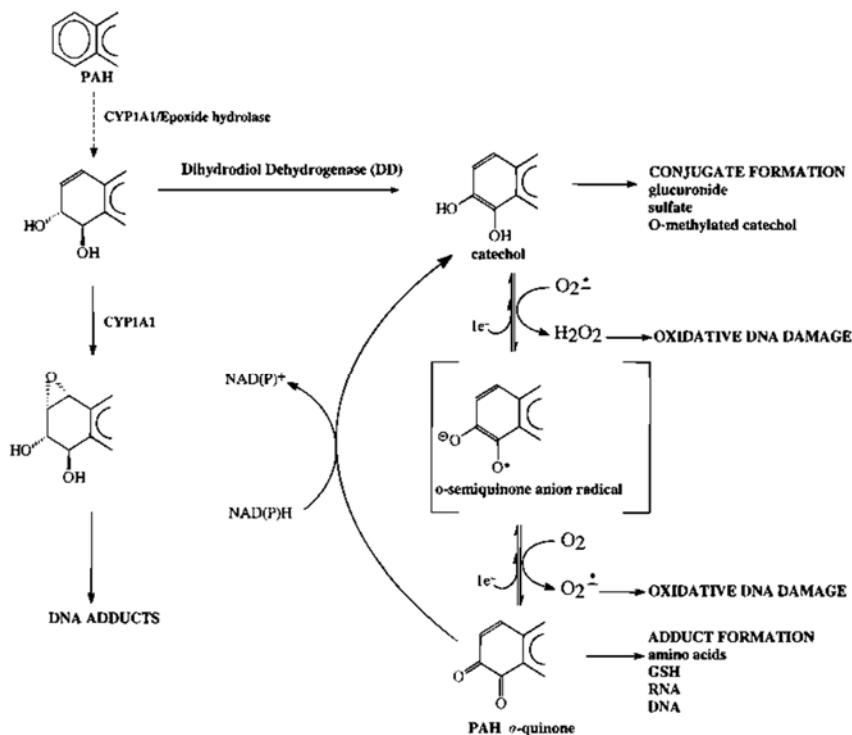


Figura 3.4. Ruta general para el metabolismo de los HAPs en mamíferos (Penning et al., 1999).

A pesar de que el daño causado por los hidrocarburos aromáticos policíclicos puede ser evitado con el uso de métodos convencionales de descontaminación como la remoción, alteración o aislamiento del contaminante para su posterior incineración, se tiene la desventaja de que son procesos económicamente caros y en ocasiones solo transfieren el contaminante de una fase a otra. Es por esto que se prefiere a la biorremediación como método de descontaminación, ya que es posible transformar con el uso de microorganismos compuestos contaminantes, usando una baja cantidad de compuestos químicos, energía y tiempo (Providenti et al., 1993; Ward et al., 2003).

Entre los microorganismos capaces de degradar a los HAPs se encuentran las bacterias, los hongos y las algas. La degradación involucra el rompimiento de los compuestos orgánicos por medio de una biotransformación en compuestos menos complejos llamados metabolitos y su posterior mineralización en compuestos inorgánicos, agua y  $CO_2$  (proceso aerobio) o  $CH_4$  (proceso anaerobio). La biorremediación depende de las condiciones ambientales como la composición del suelo, de la cantidad y tipo de microorganismos, y de la naturaleza y estructura química del compuesto a degradar. Además otros factores que influyen en este proceso son el pH, la temperatura, la cantidad

de oxígeno, grado de aclimatación, accesibilidad de nutrientes y propiedades del transporte celular (Bumpus, 1989; Yuan et al., 2002).

Las bacterias son los microorganismos más estudiados en la degradación de los HAPs. Son microorganismos activos envueltos en la biodegradación de contaminantes orgánicos. Muchas son aisladas de suelos o sedimentos contaminados. Se ha demostrado que algunas pueden degradar a los HAPs cuando crecen en medios con otra fuente alternativa de carbono. El inconveniente de estos microorganismos es el largo tiempo que se necesita para que la degradación se lleve a cabo (Hofrichter y Scheibner, 1998; Silva et al., 2009; Haritash y Kaushik, 2009). Algunos ejemplos de bacterias capaces de degradar a estos compuestos se enlistan en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Ejemplos de bacterias capaces de degradar HAPs.**

Bacteria	HAPs	Degradación	Tiempo de degradación
<i>Sphingomonas parcimobilis</i> (Ye y Siddiqi, 1995)	Benzo[a]pireno	5 %	168 h
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (Romero y Cazau, 1998)	Fenantreno	10%	30 días
<i>Micobacteria spp.</i> (Rehmann et al., 1998)	Pireno (0.5 mg/mL)	60 %	8 días
<i>Pseudomona fluorescens</i> , <i>Haemophilus spp.</i> (Yuan et al., 2002)	Acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno	70 – 100 %	40 días

En cuanto a los hongos, se conocen varios que son resistentes a la presencia de los HAPs en su medio ambiente. Los más comunes son los hongos lignolíticos, los cuales producen enzimas extracelulares con baja especificidad de sustrato, haciendo posible la degradación de varios contaminantes. El sistema lignolítico consiste en tres grupos principales de enzimas denominadas enzimas lignolíticas, en donde se encuentran la lignin peroxidasa, la mangneso peroxidasa, las fenoloxidasas y las enzimas productoras de peróxido. En algunos experimentos se han purificado varias de estas enzimas, las cuales fueron expuestas a los HAPs, encontrándose viable la degradación de estos últimos, lo que hace que no sea necesario el empleo del microorganismo completo (Haritash y Kaushik, 2009). Algunos de estos hongos son: *Aspergillus sp*, *Trichocladium canadense*, *Fusarium oxysporum*, capaces de degradar HAPs de 2 a 3 anillos, *Verticillium sp.* y *Achremonium sp.*, para HAPs de 4 a 7 anillos, como son el criseno, perileno, naftol-2,3a-pireno y decaciclono (Silva et al., 2009).

Para las algas, se conoce que las especies marinas procariontas o eucariotas fotoautótrofas pueden metabolizar a los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Se ha visto que el benzo[a]pireno es metabolizado en cis-dihidrodiol y quinonas en un periodo de 5 a 6 días por *Selenastrum capricornutum*, un alga de agua dulce, mediante el uso de un sistema de dioxigenasas, como el que se encuentra en los microorganismos procariontes heterótrofos, produciendo como compuesto mayoritario al 11,12-dihidrodiol en presencia de luz amarilla, y al 9,10-dihidrodiol con luz blanca (Haritash y Kaushik, 2009; Lindquist y Warshawsky, 1985; Warshawsky et al., 1995). Otras algas capaces de llevar a cabo este tipo de degradación son: *Sphingomonas yanoikuyae*, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*, *Skeletonema costatum* y *Nitzschia sp.*, con estas dos últimas se observó que existe una mayor degradación de los HAPs estudiados, fluoranteno y pireno, en mezcla que separados (Haritash y Kaushik, 2009; Hong et al., 2008).

Las rutas metabólicas sobre la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos por medio de los microorganismos anteriormente descritos han sido estudiadas; sin embargo, no se conocen algunas de ellas, principalmente las relacionadas con las algas. Ejemplos de rutas metabólicas para el caso de las bacterias y hongos se describe en las figuras 3.5 y 3.6.

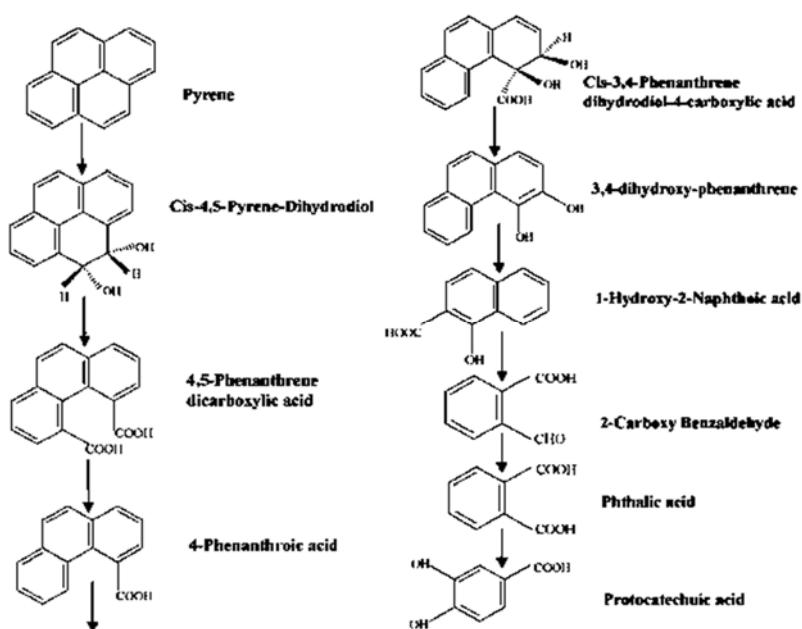


Figura 3.5. Degradación bacteriana del pireno por *Mycobacterium sp* (Rehmann et al., 1998).



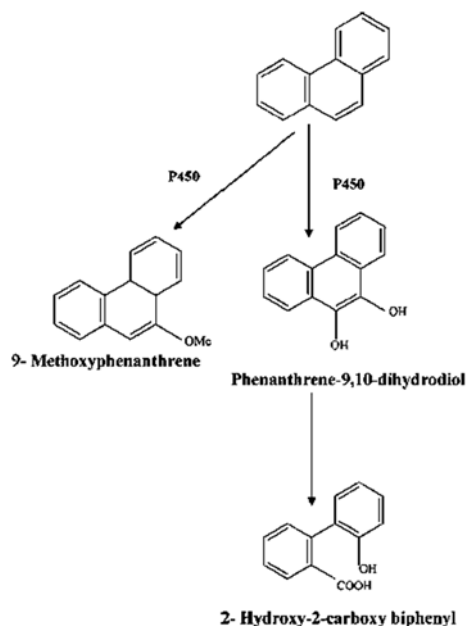


Figura 3.6. Degradación fúngica del fenantreno con *Irpex lacteus* (Cajthaml et al., 2002).

La mayoría de los compuestos de degradación provenientes del metabolismo de los HAPs por medio de los microorganismos, resultan ser más polares que los compuestos iniciales. Este aumento de polaridad de los metabolitos ayuda a sean más biodisponibles para otros microorganismos, debido a que su solubilidad en agua incrementa, permitiendo una posible degradación posterior hasta obtener una mineralización del contaminante. Sin embargo, es importante monitorear la formación de estos estos metabolitos a distintos tiempos de biodegradación, ya que se ha observado que algunos presentan una toxicidad mayor que el compuesto original, mientras que otros no afectan al organismo.

Por ello en el presente trabajo se identificó y monitoreó a distintos tiempos de exposición, la formación de tres metabolitos provenientes de la biodegradación del benzo[a]pireno por el alga *Selenastrum capricornutum*: el 9,10-dihidrodiol, el 4,5-dihidrodiol y el 7,8-dihidrodiol, y tres metabolitos del benzo[a]antraceno: el 5,6-dihidrodiol, el 8,9-dihidrodiol y el 10,11-dihidrodiol. En las tablas 3.3 y 3.4 se presentan algunas de las propiedades fisicoquímicas de estos metabolitos.

Tabla 3.3. Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos del benzo[a]pireno.

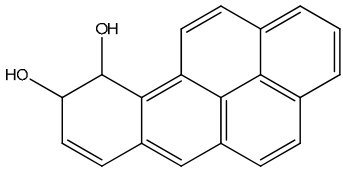
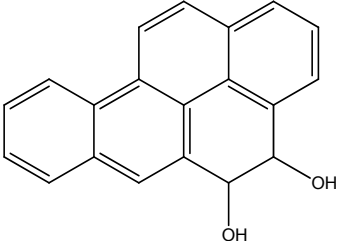
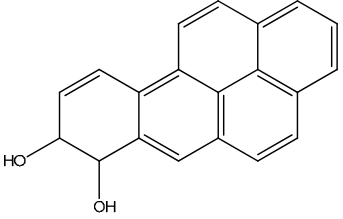
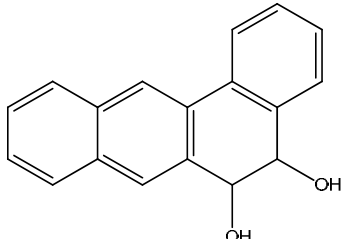
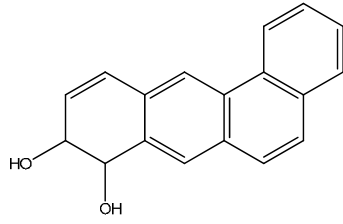
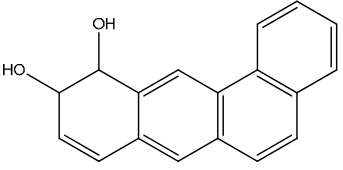
Compuesto	Metabolitos del benzo[a]pireno		
	9,10 - dihidrodiol	4,5 - dihidrodiol	7,8 - dihidrodiol
Estructura			
Fórmula condensada	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular (g/mol)	286.33	286.33	286.33
Estado físico	Sólido	Sólido	Sólido
Punto de fusión (°C)*	212.07	212.29	212.07
Punto de ebullición (°C)*	498.86	499.34	498.86
Solubilidad en agua (mg/L)*	0.4285	0.6095	0.4285
log K <sub>ow</sub> *	4.01	3.83	4.01
Presión de vapor (mmHg)*	6.7x10 <sup>-13</sup>	6.43x10 <sup>-13</sup>	6.7x10 <sup>-13</sup>

Tabla 3.4. Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos del benzo[a]antraceno.

Compuesto	Metabolitos del benzo[a]antraceno		
	5,6 - dihidrodiol	8,9 - dihidrodiol	10,11 - dihidrodiol
Estructura			
Fórmula condensada	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular (g/mol)	262.31	262.31	262.31
Estado físico	Sólido	Sólido	Sólido
Punto de fusión (°C)*	178.26	178.04	178.04
Punto de ebullición (°C)*	455.78	455.3	455.3
Solubilidad en agua (mg/L)*	2.654	1.866	1.866
log K <sub>ow</sub> *	3.25	3.42	3.42
Presión de vapor (mmHg)*	3.78x10 <sup>-11</sup>	3.94x10 <sup>-11</sup>	3.94x10 <sup>-11</sup>

\* Valores calculados con el software *Estimation Program Interface*® desarrollado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA), versión 4.11 (<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>)

### 3.1.5. Regulación de los HAPs

Debido a su alta toxicidad, los HAPs han sido altamente regulados por distintas dependencias gubernamentales en diversos países. Por ejemplo, en Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) ha propuesto a 16 HAPs como contaminantes prioritarios, basándose en sus propiedades tóxicas, biodisponibilidad, acumulación y concentraciones de formación. Esta organización marca un límite máximo permitido del benzo[a]pireno en agua potable de 200 ng/L.

Cabe destacar que en la mayoría de las regulaciones solo se incluye un límite permitido para el benzo[a]pireno, debido a que se ha demostrado que es el compuesto con mayor propiedad carcinógena; sin embargo, este no es el único HAP que posee propiedades tóxicas, por lo que es necesario mejorar estas regulaciones (Ali y Tarek, 2009; US-EPA, 2008; US-EPA, 1993).

En México existe la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 en la que están establecidos los límites permitidos para los HAPs en suelo (tabla 3.5). Además, la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) establece 100 ng/L como límite máximo permitido de HAPs totales en agua de abastecimiento para uso público y de 100,000 ng/L para aguas costeras y estuarios.

**Tabla 3.5. Límite máximo permitido para los hidrocarburos aromáticos policíclicos (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003).**

Hidrocarburo aromático policíclico	Uso de suelo predominante <sup>1</sup> (mg/kg de base seca)		
	Agrícola <sup>2</sup>	Residencial	Industrial <sup>3</sup>
Benceno	6	6	15
Tolueno	40	40	100
Etilbenceno	10	10	25
Xilenos (suma de isómeros)	40	40	100
Benzo[a]pireno <sup>4</sup>	2	2	10
Dibenzo[a,h]antraceno <sup>4</sup>	2	2	10
Benzo[a]antraceno <sup>4</sup>	2	2	10
Benzo[b]fluoranteno <sup>4</sup>	2	2	10
Benzo[k]fluoranteno <sup>4</sup>	8	8	80
Indeno[1,2,3-c,d]pireno <sup>4</sup>	2	2	10

1. Para suelos de uso mixto deberá aplicarse la especificación al menor valor de los usos de los suelos involucrados.
2. Agrícola incluye suelo forestal, recreativo y de conservación.
3. Industrial incluye comercial.
4. La determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares deberá realizarse únicamente en los casos que se pretende demostrar que se está cumpliendo con los límites máximos permitidos.

### 3.1.6. Métodos de análisis de HAPs y sus metabolitos

Existen reportados diferentes métodos de análisis para la determinación y cuantificación de HAPs, tanto en medio acuoso como en suelos. Comúnmente el análisis de los HAPs se lleva a cabo por una separación por cromatografía de gases (CG) acoplada a una detección con espectrómetro de masas (MS) o utilizando cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) con detectores de masas, arreglo de diodos (UV-DAD) o fluorescencia (FL). En cuanto a los tipos de detección, aquella que se realiza por medio de un espectrómetro de masas provee una mayor especificidad que con detección de FL o UV, lo cual resulta importante, ya que en ocasiones se dificulta la identificación de los HAPs en muestras ambientales complejas (Buseti et al., 2006). Sin embargo, con el detector UV-DAD se tiene la ventaja de obtener los espectros de absorbancia correspondientes a cada analito de interés, lo cual permite realizar una identificación de estos compuestos en muestras, siempre que sus espectros sean significativamente diferentes.

### 3.2. Métodos de preparación de muestras biológicas

El objetivo de un estudio analítico es obtener información, ya sea de sus características fisicoquímicas, su estructura o sus propiedades superficiales, o de la cantidad de un compuesto o sustancia. De manera general es posible dividir un método analítico en tres partes fundamentales: muestreo, preparación de la muestra y análisis de la misma.

El primer paso consiste en la recolección de la muestra que se desea analizar a partir de una o varias fuentes; en este paso es importante considerar ciertos aspectos, entre los cuales destacan la aleatorización de las fuentes de donde provenga la muestra y el asegurar que el tamaño de muestra que se tome sea representativa de la población que se quiera estudiar. El segundo paso es, generalmente, el que conlleva hasta tres cuartas partes del tiempo necesario para realizar un análisis completo de la muestra. Este paso es de gran importancia, ya que la mayor parte de las matrices, principalmente de origen biológico, no son aptas para su introducción directa a los equipos de análisis. Básicamente, la preparación de muestras consiste en la conversión de una matriz real a un formato de muestra que tenga la característica de poder ser analizada con algún método analítico. Todas las operaciones y manipulaciones aplicadas a las matrices que contienen los analitos de interés antes de la determinación instrumental de éstos son consideradas parte del tratamiento o preparación de las muestras.

Finalmente, el tercer paso hace referencia a las técnicas e instrumentos de análisis que están disponibles para ser utilizados en la determinación de los analitos. Sin embargo, a pesar de que en años recientes el desarrollo de técnicas de análisis y la mejora de la tecnología para la creación de nuevos instrumentos de análisis ha evolucionado a pasos agigantados, es prácticamente imposible la determinación o cuantificación de un analito perteneciente a una matriz sin la manipulación o tratamiento de ésta. El límite de detección de las técnicas analíticas es, en la mayoría de las veces, prácticamente establecido por el valor obtenido para el blanco, el cual depende de la preparación de la muestra (Mitra, 2003; Ramos, 2012).

Los objetivos de cualquier método de preparación de muestras son:

- Remover interferencias potenciales (para asegurar una buena separación y detección de los analitos) de la matriz de estudio, mejorando la sensibilidad del método analítico.
- Incrementar la concentración del analito, aumentando la sensibilidad del método de análisis.
- Convertir la matriz en la que se encuentra el analito en un complejo más simple para facilitar su análisis.
- Proveer un método robusto y reproducible cuyas variables no dependan de la matriz (eliminar lo mayormente posible el efecto matriz) (Smith, 2003).

Las técnicas de preparación de muestras más comunes para la extracción de HAPs en matrices acuosas involucran la extracción líquido-líquido o la extracción por Soxhlet, empleando el uso de disolventes no polares (tabla 3.6). Sin embargo, estas técnicas presentan varias desventajas y limitaciones, como el elevado consumo de disolventes o el uso de una gran cantidad de muestra. Por ello se ha trabajado en la mejora de los métodos de preparación de muestras y en el desarrollo de métodos novedosos que facilite el manejo de las muestras, disminuya el consumo de reactivos y la cantidad de muestra, así como el tiempo de extracción. Algunos ejemplos de estas mejoras, que han sido empleados de manera satisfactoria para la extracción de los HAPs y sus metabolitos son: la extracción en fase sólida y la dispersión de matriz en fase sólida (utilizadas en el presente trabajo), utilizando adsorbentes de fase reversa (no polares) o poliméricos (Olmos-Espejel et al., 2012; Liu et al., 2014). La descripción, ventajas y desventajas de estas dos últimas técnicas se abordarán en incisos posteriores.

**Tabla 3.6. Resumen de algunos métodos de extracción y análisis para la identificación o determinación de los HAPs y sus metabolitos en matrices biológicas.**

Método de análisis	Analitos	Fase estacionaria	Fase móvil	Matriz	Preparación de muestra	Referencia
CLAE-FL	BaA, CHR, 5-metilCHR, BbF, BkF, BaP, DaIP, DahA, IP, DaEP, DaiP, DahP	Columna C18, Vydac 201, TP54. (250 mm x 4.6mm x 5 µm)	Gradiente: MeCN-Agua (1 mL/min) 70-75 % (2 min) 75-100 % (15 min) 100 % (20 min)	Aceite vegetal (85 % aceite de soya, 15 % aceite de oliva)	Extracción líquido-líquido (hexano-N,N-dimetilformamida/agua (9:1))	(Tfouni et al., 2014)
CLAE-FL-DAD	16 HAPs prioritarios por la EPA	Columna C18-PAH, Waters. (250 mm x 4.6mm x 5 µm)	Gradiente: MeCN-Agua (1.2 mL/min)	Té verde ( <i>Camellia sinensis</i> )	Extracción asistida por ultrasonido (Hexano)	(García Londoño et al., 2015)
CLAE-FL	AC, AN, BaA, BkF, BghiP, BaP, DahA, NA, P	Columna Envirosep-PP (polimérica para HAPs), Phenomenex. (125 mm x 4.6mm x 4.6 µm)	Gradiente: MeCN-Agua (1 mL/min) 85-100 % (9 min)	Queso tipo Circassian	Extracción líquido-líquido (KOH etanólica 1 M-ciclohexano)	(Gul et al., 2015)
CG-EM	PHE, P	Columna capilar de Sílice Fundida. (30 m x 250 µm x 0.25 µm)	Helio (1 mL/min) 100-280 °C (20 °C/min)	<i>Vallisneria spirallis</i> (planta)	Extracción sólido-líquido (diclorometano)	(Liu et al., 2014)
CG-EM	16 HAPs prioritarios por la EPA	Columna no polar, DB-5MS. (30 m x 250 µm x 0.25 µm)	Helio (1 mL/min) 70 °C (1 min) 70-160 °C (40 °C/min) 160-300 °C (6 °C/min) 300 °C (10 min)	Café tostado	Extracción por líquidos presurizados (hexano-diclorometano (85:15), 100 °C, 10.34 MPa)	(Pissinatti et al., 2014)
CG-FID	BkF, BaP, IP, BghiP	Columna ZB-MS5 (30 m x 250 µm x 0.25 µm)	Helio 80 °C (4 min) 80-170 °C (8 °C/min) 170 °C (10 min) 170-250 °C (8 °C/min) 250 °C (10 min)	Carne hervida, a la parrilla o ahumada	Extracción líquido-líquido (KOH metanólica 2 M-Hexano)	(Olatunji et al., 2014)
CG-EM	NA, ACL, AC, FL, PHE, AN, F, P, BaA, CHR	Columna capilar, HP-5MS. (30 m x 250 µm x 0.25 µm)	Helio (1 mL/min) 75 °C (2 min) 75-150 °C (25 °C/min) 150-175 °C (3.3 °C/min) 175 °C (3 min) 175-200 °C (5 °C/min) 200 °C (2 min)	Infusiones de plantas (te negro, rojo y verde)	Extracción sortiva de espacio de cabeza (HSSE)	(Cacho et al., 2014)
CLAE-FL-DAD	16 HAPs prioritarios por la EPA	Supelcosil LC-PAHs (ODS, 250 mm x 3 mm x 5 µm)	Gradiente: MeCN-Agua 60 % (15 min) 60-100 % (15 min) 100 % (10 min)	Tejidos de pescado	Extracción por líquidos presurizados (diclorometano, 100 °C, 1500 psi)	(Zhao et al., 2014)

ANTECEDENTES

CG-EM	16 HAPs prioritarios por la EPA	Columna capilar, HP-5MS. (30 m x 250 µm x 0.25 µm)	Helio (1 mL/min) 120 °C (1 min) 120-200 °C (7 °C/min) 200 °C (1 min) 200-250 °C (5 °C/min) 250 °C (1 min) 250-290 °C (20 °C/min) 290 °C (10 min)	Pescado ahumado	Extracción asistida con microondas (KOH etanólica 2 M) acoplada a una extracción líquido-líquido dispersiva (diclorometano)	(Mohammadi et al., 2013)
CG-EM	16 HAPs prioritarios por la EPA	Columna capilar, Rtx-5MS. (30 m x 250 µm x 0.25 µm)	Helio (1.35 mL/min) 60 °C (1 min) 60-310 °C (5 °C/min) 310 °C (10 min)	Grano de arroz	QuEChERS	(Escarrone et al., 2014)
CLAE-FL	12 metabolitos del BaP (OHBaP)	Columna RP-Amida Columna β-ciclodextrina	MeCN:-fosfatos (pH 7) 55 % (1 mL/min) Agua (2.5 mL/min) MeOH-Agua 57 % (0.75 mL/min)	Orina humana		(Toriba et al., 2003)
CG-EM	12 metabolitos de los HAPs (OHHAP)	Columna capilar, HP-5MS. (30 m x 250 µm x 0.25 µm)	Helio (1 mL/min) 60 °C (3 min) 60-150 °C (10 °C/min) 150 °C (3 min) 150-210 °C (10 °C/min) 210 °C (3 min) 210-320 °C (10 °C/min) 320 °C (2 min)	Orina humana	Extracción líquido-líquido (hexano)	(Campo et al., 2008)
CG-EM	PHE, F	Columna capilar, HP-5MS. (30 m x 250 µm x 0.25 µm)	Helio 60-150 °C (15 °C/min) 150-220 °C (5 °C/min) 220-300 °C (10 °C/min) 300 °C (5 min)	Medio de cultivo con <i>Nitzschia</i> sp. (alga roja)	Medio líquido: Extracción líq-líq (diclorometano) Biomasa: extracción asistida por ultrasonido (diclorometano)	(Hong et al., 2008)
CG-EM/EM (Productos de degradación)/ CLAE-DAD (Degradación de los HAPs)	AN, PHE, F, P y sus productos de degradación	Columna capilar, HP-5MS. (30 m x 250 µm x 0.25 µm)/ Columna Lichro-Cart (LichroSphere) (250 mm x 5 mm x 5 µm)	Helio 60 °C (1 min) 60-150 °C (25 °C/min) 150-260 (10 °C/min) 260 °C (20 min)/ MeCN-Agua 85 %	Medio de cultivo con <i>Irpex lacteus</i> (hongo lignolítico)	Extracción líquido-líquido (etilacetato)	(Cajthaml et al., 2002)
CLAE-UV	BaP y sus productos de degradación	Columna C18, ODS, Whatman. (250 mm x 4.6mm x 5 µm)	Gradiente MeOH-Agua 80 % (4 min) 80-82 % (2 min) 82-92 % (3 min) 92-100 % (1 min)	Medio de cultivo con <i>Selenastrum capricornutum</i> (alga verde)	Medio: Extracción líquido-líquido (etilacetato) Biomasa: Extracción sólido-líquido (etilacetato)	(Warshawsky et al., 1995)

### 3.2.1. Extracción en fase sólida (EFS)

Una de las técnicas de extracción basada en el uso de adsorbentes más utilizada y estudiada es la extracción en fase sólida, la cual se fundamenta en los principios de la cromatografía de líquidos convencional. La EFS es un método de preparación de muestras líquidas en donde los analitos son concentrados y purificados por medio de la sorción de estos al circular la muestra a través de un cartucho (de 1 a 6 mL) desechable que contiene una cierta cantidad de fase sólida (Ramos, 2012; Thurman y Millis, 1998; Buldini et al., 2002).

La variedad de sorbentes comercialmente disponibles como la alúmina, el silicato de magnesio, el carbón grafitizado, la sílica (ya sea virgen o modificada) y los polímeros sintetizados, hacen que esta técnica sea adecuada para la extracción y determinación de analitos con diferentes estructuras y polaridades. Gracias a que los materiales con los que están formadas estas fases sólidas son similares a los que se utilizan comúnmente en la cromatografía de líquidos (exceptuando el tamaño de partícula que usualmente es de 10 a 60  $\mu\text{m}$ ) una gran gama de reactivos químicos y técnicas usados en la tecnología moderna de empaquetamiento pueden ser extrapolados a la preparación de cartuchos de fase sólida. Estos adsorbentes utilizados en EFS se clasifican de manera general en tres grupos: no polares, polares y de intercambio iónico, y su actividad es dependiente de las propiedades de la fase ligada al soporte y de cualquier sitio activo no recubierto con la fase ligada (Buldini et al., 2002; Ramos, 2012).

La extracción en fase sólida es realizada en cuatro pasos (figura 3.7): 1) acondicionamiento: en este paso se transfiere una cantidad seleccionada de un disolvente de polaridad adecuada para lograr que los grupos funcionales del adsorbente se solvaten y así haya una buena interacción de éstos con los analitos; 2) carga: se traspassa la muestra a través del cartucho con adsorbente previamente acondicionado con la finalidad de retener los analitos de interés; 3) lavado selectivo: se introduce un cierto volumen de un disolvente de polaridad adecuada para remover compuestos no deseados que se hayan quedado retenidos en la fase sólida, sin eluir a los analitos de interés; 4) elución: este último paso consiste en desorber de la fase sólida a los analitos aislados con la ayuda de un disolvente al cual sea más afín el analito de lo que es éste con el adsorbente (Buldini et al., 2002).



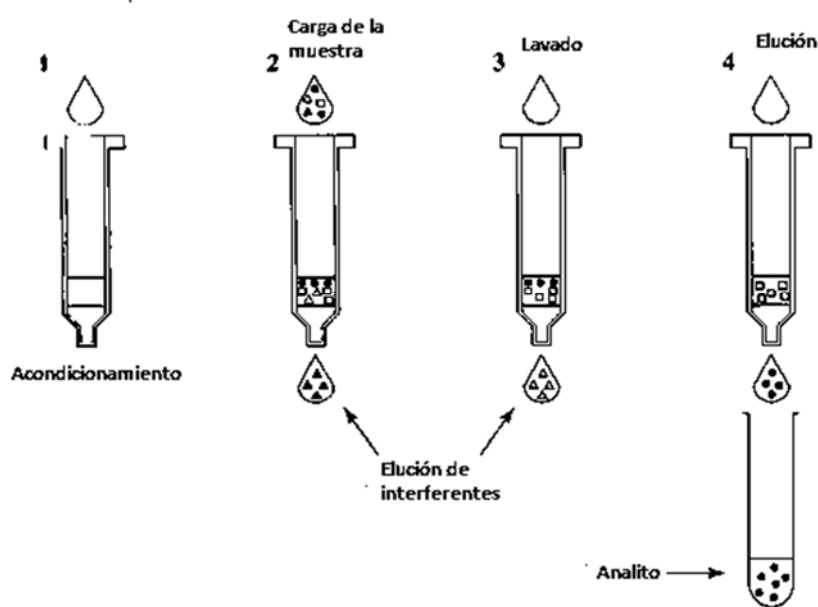


Figura 3.7. Pasos generales en la Extracción en Fase Sólida.

Entre las ventajas de la extracción en fase sólida se incluyen los altos porcentajes de recobro (superiores a un 70 %), la obtención de extractos puros, fácil automatización, compatibilidad con el análisis cromatográfico y la reducción en el consumo de disolventes orgánicos (Thurman & Millis 1998).

El desarrollo de métodos de extracción de HAPs por EFS ha sido extensamente estudiado (Luthe et al., 2001; Li y Lee, 2001; Zhou y Maskaoui, 2003) y se ha encontrado que, parámetros como el tipo de adsorbente, el flujo de carga, limpieza y elución, la adición de modificadores orgánicos a la muestra como el 2-propanol o acetonitrilo, el volumen de la muestra, el disolvente de elución y la presencia de compuestos como los ácidos húmicos afectan la reproducibilidad y los porcentajes de recuperación de los métodos. Además, la baja solubilidad e hidrofobicidad de los HAPs genera problemas de adsorción durante el muestreo, almacenaje y procedimientos de la EFS, por lo que en orden de evitar estas interferencias se utilizan disolventes orgánicos como modificadores en las muestras acuosas tales como acetonitrilo, 2-propanol o metanol (Busetti et al., 2006).

En el presente trabajo esta técnica se utilizó para el manejo del medio líquido del cultivo celular, con la finalidad de extraer los analitos de interés eliminando posibles interferencias provenientes de la matriz biológica.

### 3.2.2. Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)

La dispersión de matriz en fase sólida es una técnica de preparación de muestras que surgió como una modificación de la extracción en fase sólida. Este método es utilizado para cubrir la desventaja que presenta la EFS en cuanto a que no es posible extraer analitos de muestras sólidas, semisólidas y viscosas. La DMFS se basa en la ruptura de la matriz para lograr la dispersión y la extracción de los compuestos de interés. La extracción se da gracias a la fragmentación de la muestra por medio del adsorbente seleccionado, lo cual permite que los analitos estén disponibles para su separación de la matriz (Chen et al., 2008; Fidalgo-Used et al., 2007; Thurman y Millis, 1998).

El procedimiento general de esta técnica consiste básicamente de 4 pasos fundamentales (figura 3.8). Primero se lleva a cabo un maceramiento de la muestra con el adsorbente, previamente acondicionado de la misma forma que en la EFS, el cual debe de ser afín a los analitos, hasta adquirir una mezcla homogénea, de un tamaño de partícula pequeño y constante, la proporción muestra-adsorbente varía de acuerdo al tipo de matriz y de adsorbente que se utilice, de manera general la proporción adecuada para una buena extracción es 4:1 muestra-adsorbente. Después del macerado sigue el empaquetamiento, aquí se transfiere la mezcla homogénea a un cartucho vacío del mismo tipo de los que se utilizan en EFS poniendo en la parte inferior un frit (filtro) para evitar el paso de la mezcla fase sólida-muestra. Como tercer paso se realiza un lavado con algún disolvente adecuado para eliminar las posibles interferencias que se encuentren presentes en la matriz. Por último se lleva a cabo la elución de los analitos con un disolvente al cual presenten mayor afinidad que la que tienen con el adsorbente (Simpson, 2000).

Los parámetros a modificar para obtener una extracción más eficiente son: el tipo de adsorbente a utilizar (cualquier adsorbente de los que se utilizan en EFS que posee una suficiente dureza para facilitar la disgregación de la matriz), la proporción muestra-adsorbente, tipo y cantidad del disolvente de lavado, tipo y cantidad del disolvente de elución. Las ventajas que presenta la dispersión de matriz en fase sólida son las mismas que presenta la extracción en fase sólida con la diferencia que el tipo de muestras que se pueden tratar con esta técnica son de carácter sólido, semisólido y viscoso, dejando a un lado las muestras líquidas, las cuales son extraídas por medio de la EFS (Simpson, 2000; Thurman y Millis, 1998).

En el presente trabajo esta técnica se utilizó para el manejo de la biomasa del cultivo celular, con la finalidad de extraer los analitos de interés eliminando posibles interferencias provenientes de la matriz biológica.

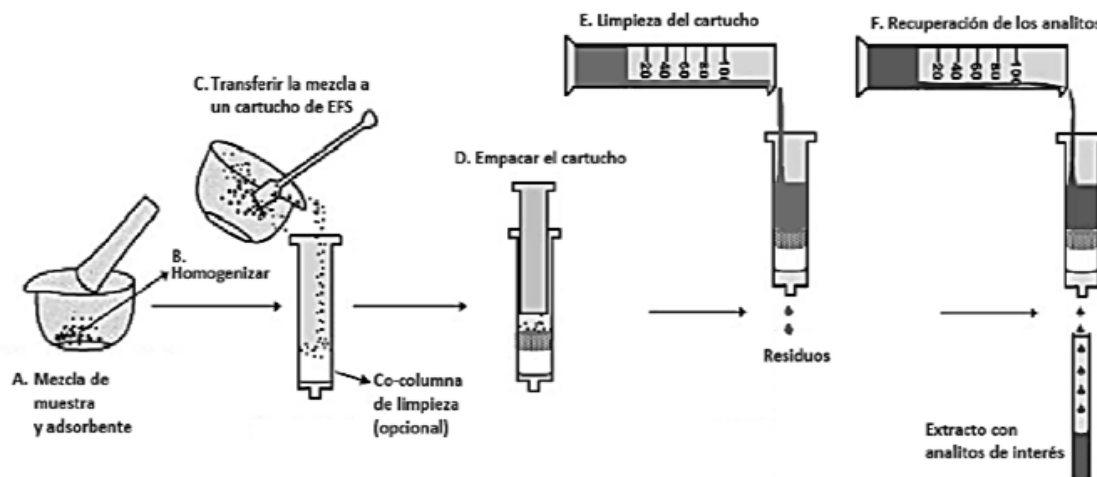


Figura 3.8. Pasos generales en la Dispersión de Matriz en Fase Sólida.

### 3.3. Preconcentración de los extractos del medio líquido y de la biomasa por EFS en línea a la CLAR

En la CLAR la sensibilidad instrumental, mínima cantidad de analito necesaria para obtener una señal (pico) que sea cuantificable, depende completamente del tipo de detector que se utilice. Así, detectores como el de espectrometría de masas o fluorescencia presentan una mayor sensibilidad (se pueden obtener señales provenientes de concentraciones del analito muy bajas) que detectores como el UV.

Por otro lado, se sabe que las señales obtenidas por los detectores aumentan de manera proporcional a la cantidad de analito insertado en la columna. Un mayor volumen de inyección presentará un pico más grande, debido a que la cantidad de analito será mayor. Sin embargo, inyectar altos volúmenes de muestra al sistema cromatográfico no es factible, ya que se necesitaría utilizar “loops” muy largos o de gran diámetro, además de que la dispersión del analito en la columna sería mayor y por consiguiente se presentarían picos más anchos en el cromatograma.

Una solución a este problema consiste en la preconcentración de grandes volúmenes de muestra (del orden de mililitros) en pequeñas columnas de guarda, empacadas,

generalmente, con el mismo tipo de adsorbente que la columna analítica. La preconcentración consiste en aplicar la muestra problema, en donde se encuentra el analito de interés a una concentración tan baja que no puede ser detectada mediante inyección directa al cromatógrafo, a través de una columna de preconcentración con ayuda de una bomba de baja presión externa al sistema cromatográfico.

Una vez que la muestra vaya pasando por la precolumna, el o los analitos de interés quedarán retenidos en ésta, por lo que es necesario empacarla con un adsorbente al que el analito sea afín, mientras que el disolvente de la muestra y sus demás componentes atravesarán la precolumna y serán depositados en los desechos. Cuando la muestra es completamente aplicada a través de la precolumna y se logra que los compuestos de interés sean retenidos por el adsorbente se hace pasar la fase móvil proveniente de la CLAR por la columna de preconcentración, arrastrando al analito hacia la columna analítica.

Se dice que la preconcentración de los analitos se hace en línea debido a que el sistema está conectado con el cromatógrafo. Esta conexión o acoplamiento se lleva a cabo gracias al uso de una válvula de seis puertos que permite controlar el flujo de la muestra hacia la precolumna (cuando está en posición de carga) sin que la fase móvil pase por ella, o la elución de los analitos que se encuentran en la precolumna por medio de la interacción con la fase móvil (posición de inyección) hacia la columna analítica. Un esquema general del sistema de preconcentración en línea se muestra en la figura 3.9, mientras que en la tabla 3.7 se presenta un resumen de algunos trabajos que involucran el uso de esta técnica.

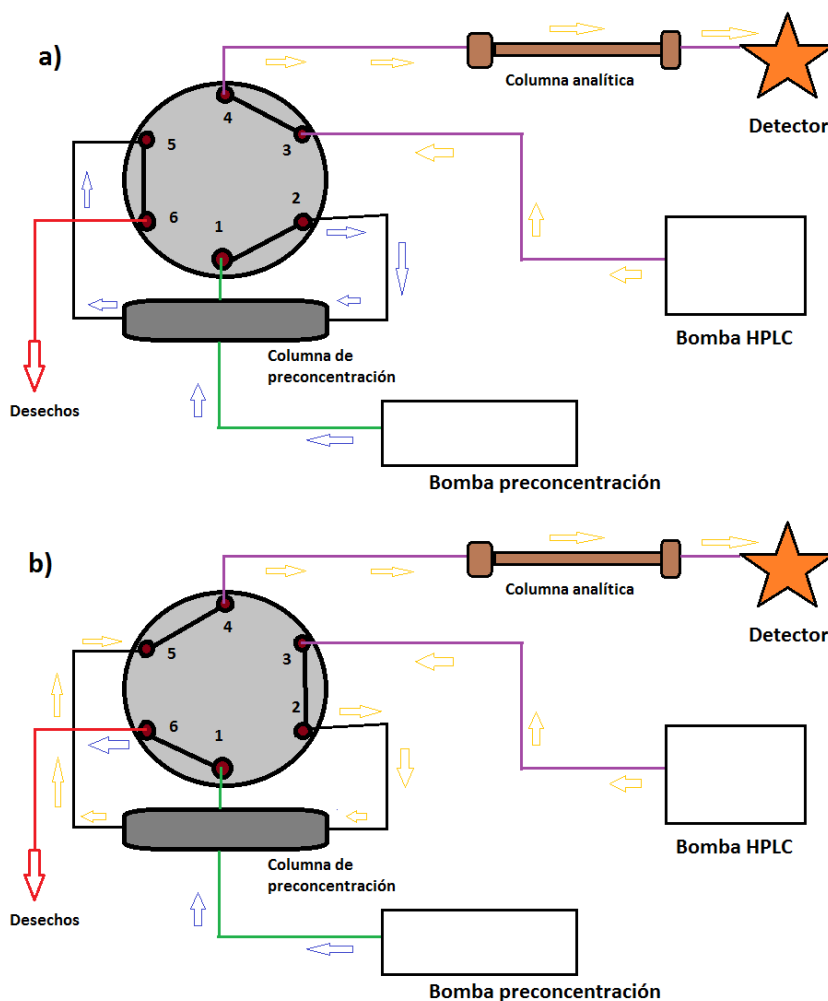


Figura 3.9. Esquema general de un sistema de preconcentración en línea acoplado a la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia. a) Posición de carga: los analitos son transferidos de la muestra a la columna de preconcentración, b) Posición de inyección: los analitos son transferidos a la columna analítica mediante la fase móvil.

Tabla 3.7. Ejemplos de métodos de análisis con preconcentración en línea.

Método de análisis	Analitos	Matriz	Preparación de muestra	Volumen preconcentrado	Referencia
CLAE - EM	AINEs	Plasma sanguíneo	EFS	1.3 mL	(Suenami et al., 2007)
CLAE - EM	Puerarin	Plasma sanguíneo	EFS	40 µL	(Wang et al., 2008)
CLAE - EM/EM	Tricloroban y sus metabolitos	Orina / suero sanguíneo	EFS	1 mL	(Zhou et al., 2012)
CLAE - UV	Captopril	Orina	EFS	2 mL	(Karakosta et al., 2012)
CLAE - FL	HAPs	Medio de cultivo/bio masa	EFS/DMFS	16.5 mL/6 mL	(Olmos-Espejel et al., 2013)

## 4. Metodología

### 4.1. Preparación de disoluciones “stock” de los metabolitos estudiados

Los analitos estudiados fueron tres metabolitos del BaP: 4,5-dihidrodiol, 7,8-dihidrodiol y 9,10-dihidrodiol, y tres del BaA: 5,6-dihidrodiol, 8,9-dihidrodiol y 10,11-dihidrodiol, los cuales se adquirieron de MRI Global Research Institute Missouri, USA y presentaron una pureza >99 %.

Con los estándares mencionados se prepararon disoluciones del 4,5-dihidrodiol, el 7,8-dihidrodiol y el 9,10-dihidrodiol a una concentración de 46, 20 y 41 µg/mL respectivamente; y del 5,6-dihidrodiol, el 8,9-dihidrodiol y el 10, 11-dihidrodiol a 67, 60 y 61 µg/mL, utilizando acetonitrilo (MeCN) (J. T. Baker grado HPLC) como disolvente, a partir de las cuales se realizaron diluciones empleando metanol (MeOH) (J. T. Baker grado HPLC) como disolvente, alcanzando una concentración de 10 µg/mL para cada metabolito, excepto para el 4,5-dihidrodiol del BaP cuya concentración fue de 9.2 µg/mL. Todas las disoluciones fueron almacenadas en congelación a -18 °C. Estas disoluciones fueron consideradas como disoluciones “stock”.

### 4.2. Caracterización espectral de los metabolitos estudiados. Obtención de sus espectros de absorbancia y sus longitudes de máxima absorbancia.

Para la caracterización espectral se empleó un cromatógrafo marca Waters equipado con una bomba binaria modelo 1525, un horno para columna modelo 1500 y un detector UV con arreglo de diodos (UV-DAD por sus siglas en inglés) modelo 2998, acoplado a un sistema de cómputo con el “software” Empower 3 para su control y el manejo de datos. Las condiciones cromatográficas utilizadas se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 4.1. Condiciones cromatográficas utilizadas en la caracterización espectral de los metabolitos. Concentración de los analitos 10 µg/mL.**

Fase móvil	Columna	Flujo	T de la columna	Vol. de inyección
MeOH:agua (90:10)	Nucleosil C <sub>18</sub> 100-5 (Macherey-Nagel) (150 x 4.6 mm), acondicionada con 15 mL de fase móvil	1 mL/min	30 °C	20 µL

Con el detector de UV-DAD se pudieron obtener los espectros de absorbancia de cada uno de los metabolitos estudiados, en un rango de barrido de 210 a 400 nm, así como su longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ).

### **4.3. Desarrollo de los métodos de análisis cromatográfico**

El análisis de los metabolitos estudiados se realizó por grupos, es decir, por una parte se analizaron los metabolitos pertenecientes al BaP, y por otro lado los correspondientes al BaA, por lo que fue necesario desarrollar un método cromatográfico para cada grupo, esto debido a que los ensayos de exposición se efectuaron individualmente para cada HAP.

#### **4.3.1. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los metabolitos del BaP**

Para la optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los metabolitos del BaP se probó una mezcla de metanol:agua como fase móvil a distintas proporciones, empleando un 90, 80 y 70 % del disolvente orgánico e inyectando 20  $\mu$ L de una disolución de los metabolitos a una concentración de 1  $\mu$ g/mL para el 9,10 y 7,8-dihidrodiol y de 0.92  $\mu$ g/mL para el 4,5-dihidrodiol en el sistema cromatográfico descrito anteriormente. La disolución fue preparada a partir de las disoluciones “stock” de cada uno de los metabolitos. Los parámetros considerados para seleccionar la fase móvil adecuada fueron el tiempo de retención de los analitos, el ancho de base de los picos correspondientes a cada analito y la resolución entre ellos.

La proporción óptima de fase móvil MeOH:agua para la separación de los metabolitos del BaP con disolución estándar fue con un 70 % de metanol. Sin embargo; al evaluar la selectividad de los métodos de determinación, en donde se realiza la extracción de los analitos de la matriz biológica ya sea el medio de cultivo o la biomasa, se encontraron interferentes sobre la señal del 9,10-dihidrodiol, por lo que se decidió utilizar un gradiente como fase móvil (cambio de composición de la fase móvil a través del tiempo de corrida), para evitar el traslape de las señales de los interferentes con la de los analitos. Las condiciones cromatográficas óptimas se presentan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los metabolitos del BaP

<b>Fase móvil</b>	Gradiente lineal MeOH:agua 60:40 – 70:30 (20 min)
<b>Columna</b>	Nucleosil C18 100-5 (Macherey-Nagel) (150 x 4.6 mm), acondicionada con 15 mL de fase móvil
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>T de columna</b>	30 °C
<b>Vol. de inyección</b>	20 µL
<b>λ de detección</b>	271.2 nm (4,5-dihidrodiol) 364.2 nm (7,8-dihidrodiol) 277.2 nm (9,10-dihidrodiol)

#### 4.3.2. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los metabolitos del BaA

De igual forma que para los metabolitos del BaP, la optimización de la separación de los metabolitos del BaA se realizó primero probando distintas proporciones de disolvente orgánico en una mezcla MeOH:agua como fase móvil: 90, 70, 60 y 50 % de MeOH en corridas isocráticas. Sin embargo, al no presentarse una buena separación entre las señales del 8,9-dihidrodiol y del 10-11-dihidrodiol se evaluaron tres gradientes de MeOH:agua como fase móvil. El primero inició con un 20 % de disolvente orgánico, manteniéndose constante por 20 min, enseguida se aumentó la proporción hasta 60 % durante 1 min permaneciendo así por 19 min más. El segundo comenzó con un 60 % de metanol por un tiempo de 5 min, disminuyendo de manera lineal hasta un 50 % en 2 min, manteniéndose así por 23 min más. Por último el tercer gradiente inició con un 50 % de disolvente orgánico sostenido por 15, seguido de un aumento lineal hasta un 55 % en 15 min, manteniéndose así por 7 min.

Para la optimización de la composición de la fase móvil, se inyectaron 20 µL de una disolución que contenía a los tres metabolitos del BaA a una concentración de 1 µg/mL, la cual fue preparada a partir de las disoluciones “stock”. Los parámetros cromatográficos considerados para seleccionar la mejor composición de la fase móvil fueron los evaluados en la optimización de las condiciones cromatográficas para los metabolitos del BaP. Las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los metabolitos del BaA se describen en la tabla 4.3.



**Tabla 4.3 Condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los metabolitos del BaA.**

<b>Fase móvil</b>	Gradiente MeOH:agua 50:50 (15 min) 50:50 – 55:45 (15 min) 55-45 (7 min)
<b>Columna</b>	Nucleosil C18 100-5 (Macherey-Nagel) (150 x 4.6 mm), acondicionada con 15 mL de fase móvil
<b>Flujo</b>	1 mL/min
<b>T de columna</b>	30 °C
<b>Vol. inyección</b>	20 µL
<b>λ de detección</b>	265.3 nm (5,6-dihidrodiol) 264.1 nm (8,9-dihidrodiol) 272.4 nm (10,11-dihidrodiol)

#### **4.4. Validación del sistema cromatográfico con inyección directa de disoluciones estándar de los analitos**

Para la validación del sistema cromatográfico se siguieron los criterios de las guías de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC) “Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos” y de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH por sus siglas en inglés) “Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology Q2 (R1)” (CCAyAC, 2011; ICH, 2005).

##### **4.4.1. Límite de detección y límite de cuantificación de los analitos**

Para la evaluación experimental de estos parámetros se inyectaron de forma directa diluciones de cada grupo de metabolitos, preparadas a partir de las disoluciones “stock” y llevadas a volumen con metanol, hasta encontrar la concentración mínima en la cual, la altura de la señal obtenida correspondiera tres veces más al tamaño de la señal de ruido, para el caso del límite de detección, y diez veces más, para el caso del límite de cuantificación (ICH, 2005). Las concentraciones utilizadas fueron: 0.2, 0.1, 0.05 y 0.025 µg/mL para los metabolitos del BaP y 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 µg/mL para los metabolitos del BaA.

Por otro lado, la evaluación teórica de estos dos límites se obtuvo con base en los parámetros de las curvas de calibración de los metabolitos descritas en el punto 4.4.2 y las siguientes ecuaciones (CCAyAC, 2011):

$$LD = \frac{3.3 sb_0}{m}$$

$$LC = \frac{10 sb_0}{m}$$

dónde:

sb<sub>0</sub>: la desviación estándar de la ordenada al origen de la regresión lineal

m: la pendiente de la recta obtenida en la regresión lineal

#### 4.4.2. Linealidad del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema de los metabolitos del BaP, se inyectaron, por triplicado, siete disoluciones de diferente concentración al sistema cromatográfico. Las concentraciones evaluadas fueron 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 µg/mL para el 7,8 y el 9,10-dihidrodiol y 0.046, 0.092, 0.184, 0.368, 0.552, 0.736 y 0.92 µg/mL para el 4,5-dihidrodiol. Mientras que para los metabolitos del BaA se inyectaron por triplicado seis disoluciones a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 µg/mL, para los tres metabolitos.

Una vez obtenida la respuesta correspondiente para cada nivel de concentración de los metabolitos, se prosiguió a realizar una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados con ayuda del programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.

#### 4.4.3. Precisión del sistema

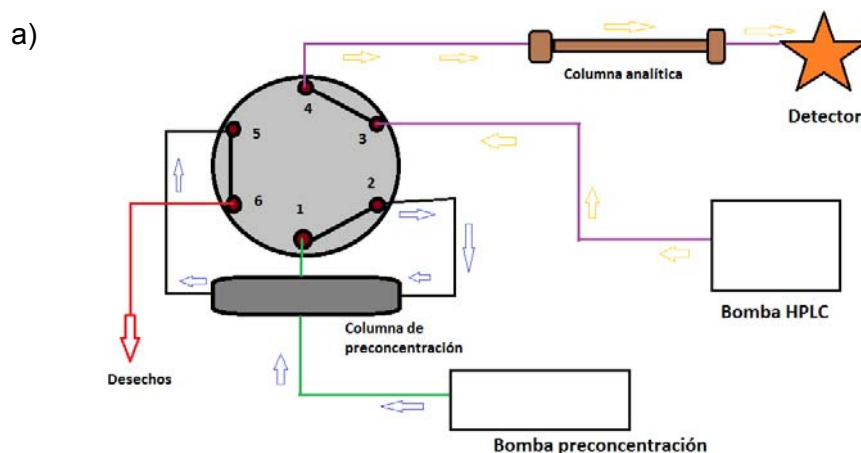
En la evaluación de este parámetro se inyectaron por triplicado, en dos días diferentes, tres disoluciones a una concentración baja, media y alta para los dos grupos de metabolitos, preparadas a partir de las disoluciones "stock" y aforadas con MeOH. Las concentraciones utilizadas para ambos grupos de metabolitos fueron: 0.5 (concentración baja), 0.7 (concentración media) y 0.9 µg/mL (concentración alta). Para determinar la precisión del sistema se calculó el coeficiente de variación expresado en porcentaje para cada metabolito en los tres niveles de concentración.

#### 4.5. Optimización de la preconcentración en línea acoplada al sistema cromatográfico

Debido a que los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación de los analitos con inyección directa no fueron lo suficientemente bajos para la determinación de

estos en los ensayos de exposición, fue necesario desarrollar un sistema de preconcentración en línea. Para encontrar las condiciones óptimas en el proceso de preconcentración de los metabolitos se probaron diversas mezclas de MeCN:agua a distintas proporciones, simulando la dilución de un extracto obtenido en la preparación de la muestra. Los porcentajes disolvente orgánico considerados fueron: 5, 10, 20 y 30 %. Para ello en 10 mL de las mezclas mencionadas fueron adicionados, independientemente, 20  $\mu$ L de una disolución de los metabolitos del BaP a una concentración de 1  $\mu$ g/mL, y 20  $\mu$ L de una disolución de los metabolitos del BaA a una concentración de 1  $\mu$ g/mL, resultando una concentración final de 2 ng/mL. Las mezclas adicionadas fueron aplicadas a una columna de preconcentración empacada con 30 mg de sílice Nucleosil C<sub>18</sub> de 100 Å de tamaño de poro y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula (Macherey-Nagel), con ayuda de una bomba Beckman (Solvent Delivery Module) modelo 1108, a un flujo de 2 mL/min. La sílice contenida en la columna de preconcentración fue previamente acondicionada con 4 mL de MeOH y 4 mL de MeOH al 10 % en agua a un flujo de 2 mL/min. Una vez que se transfirieron los 10 mL de la disolución y los analitos fueron retenidos en la columna de preconcentración se realizó un lavado con 4 mL de agua a un flujo de 2 mL/min, y se transfirieron los analitos al sistema cromatográfico por arrastre de la fase móvil empleando una válvula de 6 puertos (figura 4.1).

Las áreas de los picos cromatográficos obtenidas para los analitos preconcentrados con cada una de las distintas proporciones de la mezcla MeCN:agua fueron comparadas con las áreas de los analitos obtenidas por inyección directa. La proporción óptima de MeCN:agua para la preconcentración de los analitos fue del 10 %.



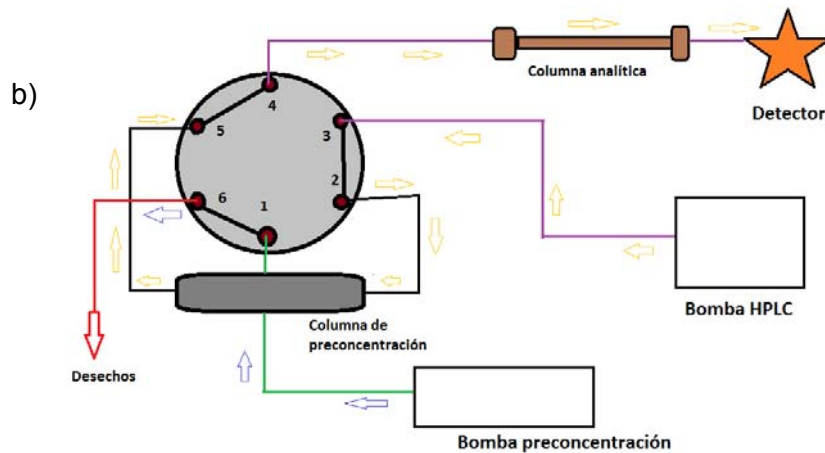


Figura 4.1. Esquema general del sistema de preconcentración en línea utilizado. a) Posición de carga de la muestra. El acondicionamiento, la carga de la muestra y los lavados, son efectuados en la columna de preconcentración por medio de la bomba de preconcentración y el efluente se deposita en los desechos. Mientras tanto la bomba del sistema cromatográfico está en funcionamiento y envía a la fase móvil hacia la columna cromatográfica y de ahí al detector. b) Posición de inyección. La transferencia de los analitos hacia la columna analítica y posteriormente al detector, se lleva a cabo por la fase móvil, la cual es enviada a través de la columna de preconcentración por medio de la bomba del sistema cromatográfico. La bomba de preconcentración puede estar en funcionamiento o no.

#### 4.6. Validación del sistema cromatográfico con preconcentración en línea de disoluciones estándar de los analitos

La validación del sistema cromatográfico con preconcentración en línea se realizó de la misma forma que para la inyección directa, evaluando los parámetros de límite de detección y cuantificación, linealidad y precisión del sistema. Las disoluciones utilizadas para cada parámetro fueron las mismas que para la validación por inyección directa, con la diferencia de que, en vez de inyectarse 20  $\mu\text{L}$  de cada disolución al sistema cromatográfico, se agregó este volumen a 10 mL de una mezcla MeCN:agua (10:90), los cuales fueron preconcentrados y transferidos al cromatógrafo para su análisis. Por consiguiente, las concentraciones utilizadas en los parámetros de la validación con preconcentración para los analitos son 500 veces más pequeñas que las utilizadas en la validación por inyección directa.

Así, las concentraciones utilizadas para evaluar el límite de detección y cuantificación experimentales fueron: 0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 ng/mL para los metabolitos del BaP y del BaA, para la linealidad: 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 ng/mL para los metabolitos del BaP y 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 ng/mL para los metabolitos del BaA, y en la precisión: 1, 1.4 y 1.8

ng/mL para los metabolitos de ambos HAPs. Cabe mencionar que con las curvas de calibración para cada metabolito se calcularon los límites de detección y cuantificación teóricos como en el punto 4.4.1.

#### 4.7. Crecimiento y mantenimiento de la microalga verde *Selenastrum capricornutum*

La cepa de *Selenastrum capricornutum* se mantuvo en condiciones axénicas sembrándose cada dos meses para su mantenimiento en tubos de ensaye con 10 mL de cultivo Bristol sólido, el cual se preparó mezclando 1.5 g de agar bacteriológico (MCD Lab) con 100 mL de medio Bristol líquido enriquecido con peptona proteosa (MCD Lab), 0.1 g/100 mL de medio Bristol. La composición del medio Bristol líquido se describe en la tabla 4.4.

**Tabla 4.4. Composición de 1 L de medio Bristol líquido.**

Mezcla de Sales en agua:		
NaNO <sub>3</sub>	10 g/400 mL	Alícuota tomada de la mezcla de sales :10 mL
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	10 g/400 mL	
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	3 g/400 mL	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g/400 mL	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7 g/400 mL	
NaCl	1 g/400 mL	
Agua		Aforo a 1 L

Una vez que el alga creció en el medio sólido, se tomó un cantidad de biomasa con un asa bacteriológica y se transfirió a un matraz Erlenmeyer que contenía 200 mL de medio Bristol líquido enriquecido con peptona proteosa (0.1 g/100 mL). Todo el material de vidrio empleado para el cultivo de *Selenastrum capricornutum* y el medio de cultivo líquido se esterilizaron en una autoclave eléctrica marca Tuttnauer modelo 2540EL a una temperatura de 121 °C por 15 min.

Los matraces ya inoculados con el alga se mantuvieron en agitación orbital para su crecimiento a una velocidad de 100 rpm, a temperatura ambiente y en una caja de madera alumbrados con lámparas fluorescentes de luz blanca con periodos de luz/oscuridad de 16/8 h, hasta alcanzar una absorbancia con valor de uno; la medición fue realizada en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific modelo Genesys 10S, a una

longitud de onda de 683 nm (longitud de onda de máxima absorbancia correspondiente a la clorofila) y utilizando como blanco agua destilada.

Cuando el cultivo presenta absorbancia de uno se considera que existe en el medio una cantidad de  $4-6 \times 10^6$  células/mL de medio de cultivo de acuerdo a la curva de crecimiento descrita por Olmos-Espejel et al., 2013. A esta concentración celular se utilizó el cultivo para la validación del método y los ensayos de exposición.

#### 4.8. Condiciones de la preparación de muestra

Para la preparación de la muestra, que consistió en la extracción de los metabolitos de los componentes del medio de cultivo (medio líquido y biomasa), se siguió el procedimiento desarrollado por Olmos-Espejel et al, 2013, el cual se describe a continuación.

##### 4.8.1. Pretratamiento de la muestra biológica

Se tomaron 15 mL de medio de cultivo con microalgas previamente homogenizado, cuyo crecimiento y mantenimiento se explicó en el numeral 4.7. Este volumen fue transferido a un tubo y centrifugado a una velocidad de 3900 rpm durante 15 min en una centrifuga marca Fisher Scientific modelo 225. El medio de cultivo fue separado de la biomasa para su preparación por EFS, mientras que la biomasa se dejó secar en un portaobjetos de vidrio para su posterior tratamiento por la técnica de DMFS (figura 4.2).

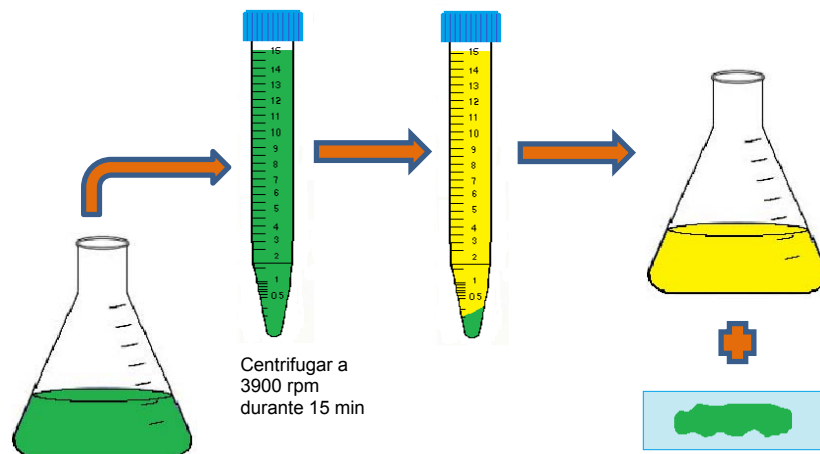


Figura 4.2. Pretratamiento de la muestra. Separación del medio líquido y de la biomasa del medio de cultivo para la extracción posterior de los metabolitos.

#### 4.8.2. Preparación del medio líquido por EFS

Para la EFS de los analitos en el medio de cultivo libre de microorganismos se realizó el siguiente procedimiento:

- a) El medio de cultivo fue transferido a un matraz Erlenmeyer de 50 mL en donde se le agregaron 3.75 mL de isopropanol grado HPLC (J. T. Baker) y, en el caso de la evaluación de los parámetros de validación del método analítico, 20 µL de una disolución a cierta concentración de los metabolitos del BaP y del BaA de manera independiente, se agitó y se dejó reposar por 15 min.
- b) Pasado este tiempo se aplicó el volumen resultante a través de un cartucho para EFS de 6 mL previamente empacado con 300 mg de sílice C<sub>18</sub> (Supelclean LC-18, Supelco) activada con MeOH (1 mL/g de sílice) y acondicionada con 3 mL de MeCN y 10 mL de agua a un flujo aproximado de 1 mL/min.
- c) Posteriormente se realizaron los cuatro lavados descritos a continuación para eliminar los posibles interferentes provenientes del medio de cultivo. El primero con 10 mL de agua, el segundo con 10 mL de MeCN al 10% en agua, el tercero con 3 mL de MeCN al 20 % en agua y el cuarto con 1 mL de MeCN al 30 % en agua. Todos a un flujo aproximado de 1 mL/min.
- d) Finalmente, se eluyeron por gravedad los analitos de interés utilizando 3 mL de MeCN al 55 % en agua. El extracto obtenido se diluyó hasta una proporción de MeCN del 10 % y se preconcentró para su posterior análisis.

El acondicionamiento, carga de la muestra y lavados se realizaron con ayuda de un Visiprep SPE Vacuum Manifold marca Supelco modelo 57030-U. En la figura 4.3 se presenta un esquema visual del procedimiento de extracción en fase sólida:

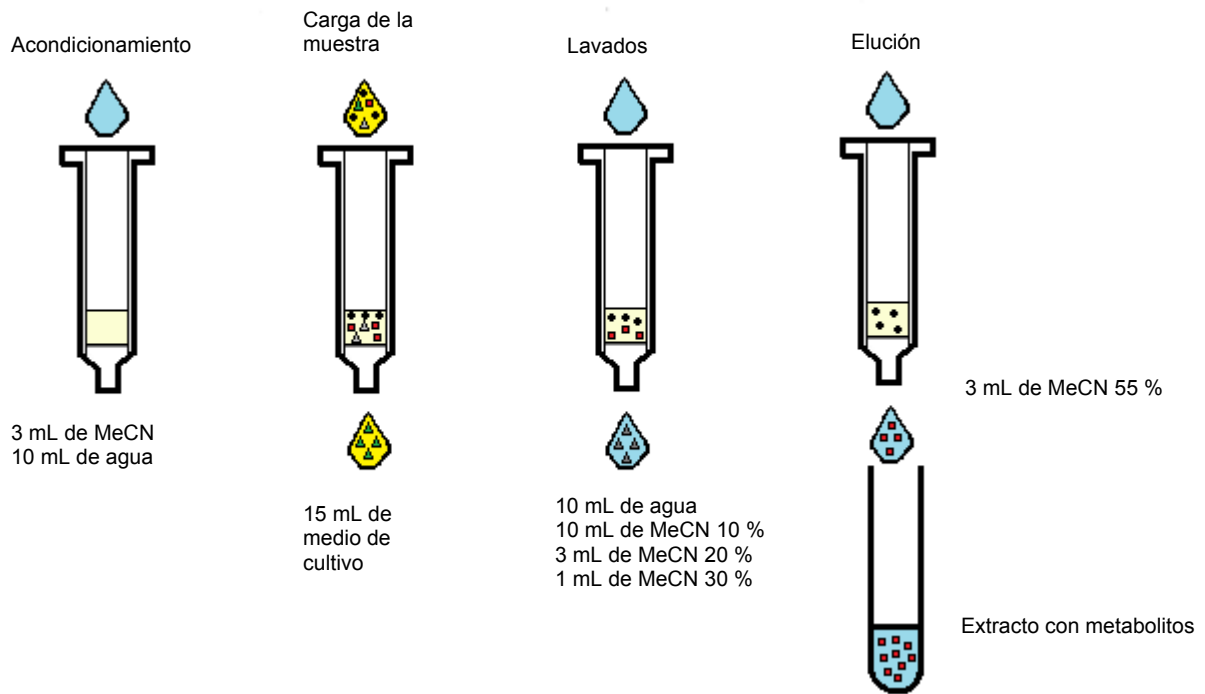


Figura 4.3. Procedimiento del método basado en la EFS para la extracción de los metabolitos del medio de cultivo líquido.

#### 4.8.3. Preparación de la biomasa por DMFS

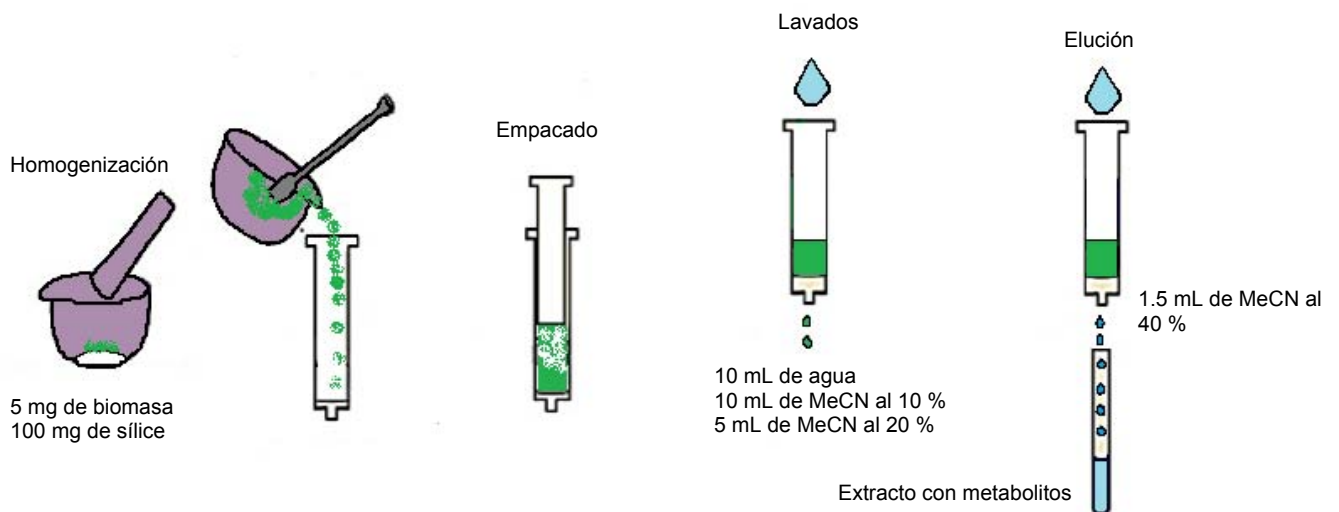
Para la extracción por DMFS de los analitos presentes en la biomasa se realizó el siguiente procedimiento:

- La biomasa una vez seca fue raspada del portaobjetos y pesada en una balanza microanalítica marca Ohaus modelo Discovery DV215CD. El peso de biomasa a utilizar fue de 5 mg.
- Posteriormente se transfirió la biomasa a un mortero de ágata y, en el caso de la evaluación de los parámetros de la validación se fortificó con una disolución a cierta concentración que contenía a cada grupo de metabolitos estudiados. La biomasa se combinó con 100 mg de sílice C<sub>18</sub> (Supelclean LC-18, Supelco) activada y se maceró con un pistilo de ágata. Una vez homogénea la mezcla se empacó en un cartucho para EFS de 1 mL.



- c) Ya empacado el cartucho se realizaron tres lavados a la fase dispersa algas/silíce C<sub>18</sub> con 10 mL de agua, 10 mL de MeCN al 10 % en agua y 5 mL de MeCN al 20 % en agua a un flujo de 1 mL/min con ayuda del Visiprep mencionado en la sección anterior.
- d) Finalmente, se prosiguió con la elución a gravedad de los analitos de interés con 1.5 mL de MeCN al 40 % en agua. El extracto obtenido se diluyó hasta una proporción de MeCN del 10 % y se preconcentró para su posterior análisis.

El acondicionamiento, carga de la muestra y lavados se realizaron con ayuda de un Visiprep SPE Vacuum Manifold marca Supelco modelo 57030-U. En la figura 4.4 se presenta un esquema de la metodología basada en la DMFS utilizada.



**Figura 4.4. Procedimiento del método basado en la DMFS para la extracción de los metabolitos de la biomasa del cultivo.**

#### 4.9. Validación de los métodos de determinación de los analitos

La validación de los métodos de determinación (extracción y análisis cromatográfico) se realizó siguiendo los criterios de las guías ya mencionadas.

#### **4.9.1. Validación del método con EFS y preconcentración en línea acoplado a CLAR-DAD para la determinación de los metabolitos del BaP**

##### **4.9.1.1. Selectividad del método**

Para la selectividad del método se preparó un blanco utilizando 15 mL de medio de cultivo sin metabolitos obtenido de acuerdo al numeral 4.8.1. El medio se preparó siguiendo el procedimiento de EFS descrito en el punto 4.8.2 y el extracto obtenido se diluyó hasta un volumen de 16.5 mL con agua desionizada para tener así una proporción de 10 % de MeCN. El extracto resultante se aplicó a la columna de preconcentración y posteriormente, se efectuó el análisis cromatográfico en línea utilizando las condiciones de separación optimizadas para los metabolitos del BaP. Una vez obtenidos los cromatogramas, se observaron en busca de interferentes en los tiempos de retención de los analitos.

##### **4.9.1.2. Límite de detección y límite de cuantificación del método**

Para evaluar los límites de detección y de cuantificación del método de análisis, se fortificaron 15 mL de medio de cultivo centrifugado y obtenido de un medio con microalgas, no expuestas a los HAPs, a una absorbancia de uno, con 20 µL de diversas diluciones de los metabolitos del BaP para obtener concentraciones de: 0.5333, 0.2667 y 0.1333 ng/mL de medio de cultivo. Se prosiguió con la preparación del medio como se describe en el punto 4.8.2 y los extractos recuperados se llevaron a un volumen de 16.5 mL con agua para obtener una proporción de MeCN del 10 %. La disolución resultante se preconcentró y se analizó en el sistema cromatográfico. Los límites experimentales se obtuvieron como en el inciso 4.4.1.

##### **4.9.1.3. Linealidad del método**

Para evaluar la linealidad del método se fortificaron 15 mL de medio de cultivo con distintos volúmenes de una disolución “stock” de los metabolitos a una concentración de 2 µg/mL, de tal forma que las concentraciones resultantes de los analitos en el medio fueron de 0.267, 0.53, 0.80, 1.33, 2.67, 5.33, 10.67 ng/mL. Los metabolitos fueron aislados de los medios de cultivo por el método de EFS y los extractos resultantes se diluyeron hasta

tener una proporción de MeCN del 10 % para su posterior preconcentración y análisis en el sistema cromatográfico. Cada nivel de concentración se analizó por triplicado y las respuestas obtenidas para cada metabolito en función de la concentración fueron ajustadas por el método de mínimos cuadrados con ayuda del programa estadístico ya mencionado, obteniéndose la ecuación de las rectas, así como el valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

#### **4.9.1.4. Precisión del método**

Para la precisión del método se prepararon, por triplicado, tres niveles de concentración de los analitos en 15 mL de medio de cultivo. Las concentraciones utilizadas fueron: 1.33 (baja), 4.00 (media) y 8.00 (alta) ng/mL. Los medios de cultivo fortificados se prepararon por el método de EFS y los extractos obtenidos fueron diluidos, preconcentrados y analizados. Con los promedios de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a cada nivel de concentración se calculó el coeficiente de variación.

#### **4.9.1.5. Recuperación del método**

Se calculó el porcentaje de recobro comparando la respuesta obtenida de un extracto con metabolitos proveniente del medio de cultivo fortificado con los analitos y sometido al procedimiento de EFS, contra la respuesta de un estándar preconcentrado. Las concentraciones utilizadas fueron: 0.27, 0.80 y 1.33 ng/mL para el medio de cultivo, y 0.4, 1.2 y 2.0 ng/mL para los estándares, de tal manera que la cantidad fortificada de los metabolitos en el medio de cultivo fue la misma que la de los estándares preconcentrados para cada nivel de concentración (alto, medio y bajo).

#### **4.9.2. Validación del método con EFS y preconcentración en línea acoplada a CLAR-DAD para la determinación de los metabolitos del BaA**

Los parámetros evaluados en la validación del método de determinación de los metabolitos del BaA en el medio de cultivo fueron los mismos que para la determinación de los metabolitos del BaP: la selectividad, el límite de detección y de cuantificación, la linealidad, la precisión y la recuperación, siguiendo la misma metodología para cada caso. Sin embargo; las concentraciones de las disoluciones utilizadas no fueron las mismas

para la linealidad y la precisión, siendo de 0.53, 0.8, 1.33, 2.67, 5.33, 10.67, 21.33 y 46.67 ng/mL, y de 1.33, 10.67 y 20 ng/mL, respectivamente. Esto último debido a que la formación de estos metabolitos en los ensayos de exposición se dio a una concentración mayor que para los metabolitos del BaP. Así mismo, en la evaluación de la recuperación se fortificó el medio de cultivo con metabolitos a una concentración final de 0.53 ng/mL en vez de 0.27 ng/mL como en el caso del BaP y se comparó con una concentración del estándar de 0.80 ng/mL, ya que el límite de cuantificación resultó ser más alto.

#### **4.9.3. Validación del método con DMFS y preconcentración en línea acoplado a CLAR-DAD para la determinación de los metabolitos del BaP**

##### **4.9.3.1. Selectividad del método**

La selectividad del método se evaluó con un blanco de biomasa. Para esto se tomaron 5 mg de biomasa no expuesta a los HAPs y se le aplicó el método de DMFS descrito en el punto 4.8.3. El extracto obtenido se diluyó agregando 4.5 mL de agua para tener un volumen total de 6 mL, con una proporción de MeCN del 10 %. Este volumen se preconcentró y los componentes de la matriz retenidos se transfirieron al sistema cromatográfico por medio de la fase móvil. El cromatograma resultante se analizó en busca de posibles interferentes presentes en los tiempos de retención de los metabolitos.

##### **4.9.3.2. Límite de detección y cuantificación**

Los límites de detección y cuantificación se evaluaron fortificando 5 mg de biomasa con diluciones hechas a partir de las disoluciones “stock” de los metabolitos. A la biomasa fortificada se le aplicó el método de DMFS y el extracto obtenido fue preconcentrado y analizado de la misma forma que en el inciso anterior. Las concentraciones evaluadas fueron: 2.4, 1.6, 0.8 y 0.4 ng/mg de biomasa. Los límites de detección y cuantificación se obtuvieron de la misma forma que en el numeral 4.4.1.

##### **4.9.3.3. Linealidad del método**

La linealidad del método se realizó fortificando la biomasa a distintos niveles de concentración. Las concentraciones utilizadas fueron: 2.4, 3.2, 4.0, 6.0, 8.0 y 16.0 ng/mg

de biomasa. Las muestras fueron tratadas por triplicado por el método descrito para la DMFS y los extractos obtenidos se diluyeron, se preconcentraron y se analizaron. Con las respuestas obtenidas en función de las concentraciones utilizadas se realizó un ajuste de mínimos cuadrados con ayuda del programa estadístico, obteniéndose las ecuaciones correspondientes y los valores de los coeficientes de determinación ( $r^2$ ).

#### **4.9.3.4. Precisión del método**

Este parámetro fue evaluado fortificando la biomasa a tres niveles de concentración: 2.8 (baja), 6.0 (media) y 12.0 (alta) ng/mg de biomasa. Las muestras fortificadas fueron preparadas por triplicado siguiendo el método de DMFS. Los extractos obtenidos fueron diluidos, preconcentrados y analizados. Con las respuestas adquiridas se calculó el coeficiente de varación para los tres niveles de concentración.

#### **4.9.3.5. Recuperación del método**

Se calculó el porcentaje de recobro comparando la respuesta obtenida de un extracto con metabolitos proveniente de la biomasa fortificada y sometida al procedimiento de DMFS, contra la respuesta de un estándar preconcentrado. Las concentraciones utilizadas fueron: 2.4, 3.2 y 4 ng/mg para la biomasa fortificada, y 1.2, 1.6 y 2.0 ng/mL para los estándares, de tal manera que la cantidad fortificada de los metabolitos en la biomasa fue la misma que la de los estándares preconcentrados para cada nivel de concentración (alto, medio y bajo).

#### **4.9.4. Validación del método con DMFS y preconcentración en línea acoplado a CLAR-DAD para la determinación de los metabolitos del BaA**

Los parámetros de desempeño del método evaluados, así como la metodología utilizada, fueron los mismos que para la determinación de los metabolitos del BaP: selectividad, límite de detección y cuantificación, linealidad, precisión y recuperación. Así mismo, las concentraciones utilizadas para la evaluación de los parámetros mencionados fueron las mismas que para los metabolitos del BaP, excepto las concentraciones de las disoluciones utilizadas para evaluar la linealidad, debido a que, de igual forma que en el medio de cultivo, la formación de estos metabolitos es mayor que para los metabolitos del

BaP; los niveles de concentración usados para evaluar la linealidad fueron: 2.4, 3.2, 4.0, 6.0, 8.0, 16.0, 32.0 y 80 ng/mg.

#### **4.10. Ensayos de exposición del alga *Selenastrum capricornutum* con los HAPs**

Los bioensayos de exposición se realizaron poniendo en contacto el alga con los HAPs de estudio de manera independiente. Para esto se tomaron 15 mL de medio de cultivo con algas a una absorbancia de uno y se trasvasaron a un matraz Erlenmeyer estéril, en donde se adicionaron 40 µL de una disolución de concentración de 105.47 µg/mL para el BaP o de 107.46 µg/mL para el BaA, de tal forma que la concentración final de los hidrocarburos en el medio de cultivo fue de 0.281 y 0.286 µg/mL respectivamente. Este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad con ayuda de una campana de flujo laminar Biological Safety Cabinet marca Biobase modelo 11231BBC86.

Los ensayos fueron puestos en agitación orbital a 100 rpm, en presencia de luz amarilla, en periodos de 0.75, 1.5, 3, 6, 12, 18, 24 y 48 h. Una vez transcurrido el tiempo se trasvasaron los 15 mL de medio de cultivo con algas a un tubo y se centrifugaron a 3900 rpm durante 15 min. El medio de cultivo fue separado y tratado por el método de EFS, mientras que la biomasa se extendió en un portaobjetos de vidrio y se dejó secar por un día para su posterior tratamiento por el método de DMFS.

Los extractos obtenidos se diluyeron, preconcentraron y analizaron en el sistema cromatográfico de acuerdo a los métodos descritos anteriormente. Con los datos obtenidos se realizó una curva de concentración de los metabolitos vs tiempo de exposición.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Caracterización espectral de los metabolitos estudiados

Para poder identificar a los metabolitos seleccionados provenientes de la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (BaP y BaA) por medio de la microalga verde *Selenastrum capricornutum* se utilizó un detector UV con arreglo de diodos (UV-DAD) porque, a pesar de ser menos sensible que un detector de fluorescencia o de espectrometría de masas, permite obtener el espectro de absorbancia de los estándares de los metabolitos, teniéndose así un parámetro que permite llevar a cabo la identificación de los productos de degradación.

Los espectros de absorción obtenidos para los metabolitos estudiados se muestran en la figura 5.1, mientras que en la tabla 5.1 se presentan sus longitudes de máxima absorbancia así como algunos parámetros cromatográficos

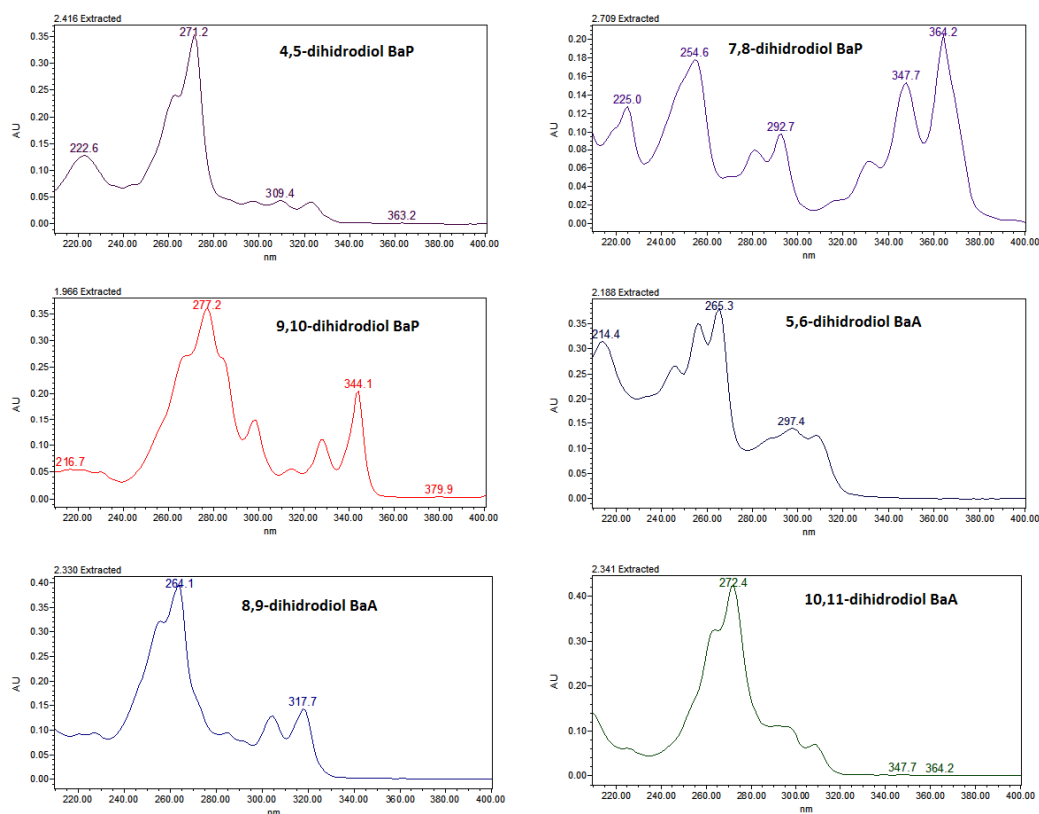


Figura 5.1. Espectros de absorción en la región ultravioleta-visible de los metabolitos estudiados.

**Tabla 5.1. Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaP y del BaA . Condiciones cromatográficas: Fase móvil: MeOH:agua (90:10); Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 4.6 x 150 mm; Flujo: 1 mL/min; T de columna: 30 °C; Vol. de inyección 20µL.**

Metabolito	Conc. (µg/mL)	t <sub>ret</sub> (min)	K'	Área (µVxs)	Altura (µV)	λ <sub>máx</sub>
9,10-dihidrodiol del BaP	10	1.966	0.14	2072221	360856	277.2
7,8-dihidrodiol del BaP	9.2	2.703	0.56	1494025	207220	364.2
4,5-dihidrodiol del BaP	10	2.416	0.40	2189300	352242	271.2
10,11-dihidrodiol del BaA	10	2.335	0.35	2610166	429870	272.4
8,9-dihidrodiol del BaA	10	2.330	0.35	2525375*	393693*	264.1 / 317.7
5,6-dihidrodiol del BaA	10	2.185	0.26	2175051	379712	265.3

\* Los valores correspondientes al área y altura del 8,9-dihidrodiol del BaA fueron obtenidos a una λ de 264.1 nm.

Como se puede observar en la figura 5.1, los espectros de absorción de los metabolitos difieren unos de los otros, a pesar de que son isómeros entre sí, lo que permitió conocer si los compuestos formados en la biodegradación del BaP y del BaA correspondían a estos metabolitos, por medio de la comparación de sus espectros y no solo por la comparación de los parámetros cromatográficos como el tiempo de retención.

Respecto a las longitudes de máxima absorbancia, éstas no son iguales para todos los metabolitos e incluso hay algunos que presentan longitudes de onda que, a pesar de no corresponder a la máxima absorbancia, sobresalen en el espectro de absorción, tal es el caso del 9,10 y 7,8-dihidrodiol del BaP y del 8,9-dihidrodiol del BaA. En éste último, como se verá más adelante, resultó benéfica la presencia de otro máximo de absorbancia, ya que, a pesar de que su respuesta es menor, corresponde a una longitud de onda en donde el 10,11-dihidrodiol del BaA casi no tiene absorbancia, evitando así la baja resolución (separación entre las señales) que se presenta entre los dos picos (inciso 5.2.2). Esta presencia de diferentes máximos de absorción también es útil para poder discriminar interferentes provenientes de la matriz que se presentan en los cromatogramas en tiempos cercanos a los tiempos de retención de los analitos de interés.

## 5.2. Desarrollo de los métodos de análisis cromatográfico

Para facilitar el estudio de la biodegradación de los HAPs, así como para tener una mejor identificación de los metabolitos formados por la exposición de éstos con el alga *Selenastrum capricornutum* y reducir los tiempos de análisis, se decidió trabajar con los metabolitos agrupándolos en dos conjuntos: uno conformado por los dihidrodioles pertenecientes al BaP y otro por los dihidrodioles del BaA. Debido a esto fue necesario el desarrollo de dos métodos de análisis, uno para cada grupo de metabolitos.



### 5.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los metabolitos del BaP

En el desarrollo del método de análisis cromatográfico para la determinación de los metabolitos del BaP se evaluaron diversas mezclas de MeOH:agua como fase móvil. Las proporciones de disolvente orgánico utilizadas fueron 90, 80, y 70 %. Las corridas cromatográficas se realizaron de manera isocrática, es decir, manteniendo durante todo el tiempo de corrida la misma proporción de disolvente orgánico, obteniéndose para las proporciones de 90 y 80 % de MeOH una baja resolución entre las señales de los analitos. Para el primer caso se obtuvo un solo pico, mientras que para el segundo se obtuvieron dos.

Para la proporción de 70 % de metanol, se logró ver la separación de los tres metabolitos, obteniéndose una buena resolución entre los picos (valores superiores a 1.5). En la figura 5.2 se muestran el cromatograma obtenido a las longitudes de onda de máxima absorbancia de los analitos para una mezcla de los metabolitos del BaP utilizando una fase móvil con 70 % de MeOH. Los parámetros cromatográficos se presentan en la tabla 5.2.

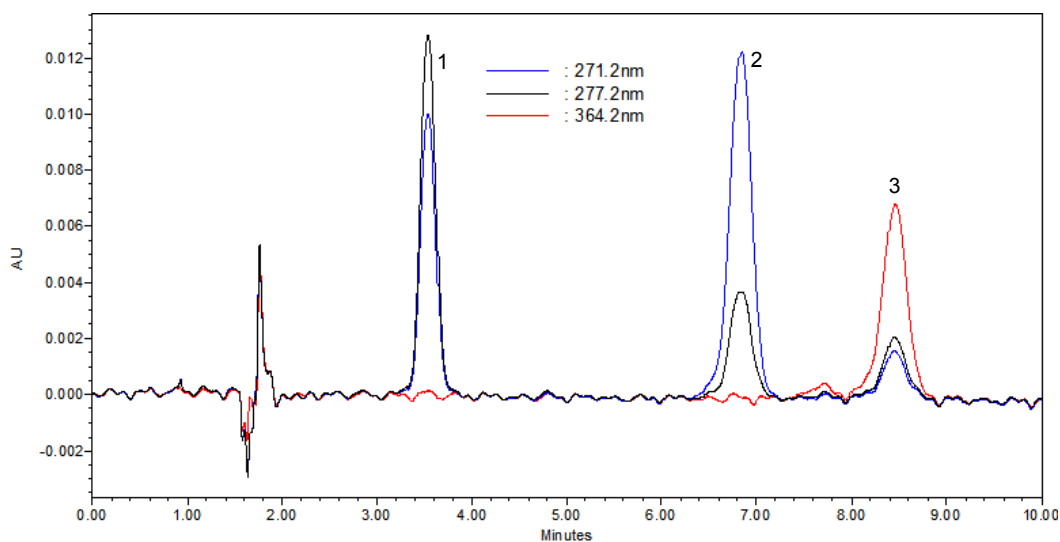


Figura 5.2. Cromatograma obtenido para una mezcla de metabolitos del BaP a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 1) 9,10-dihidrodiol, 2) 4,5-dihidrodiol, 3) 7,8-dihidrodiol. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: MeOH:agua (70:30), Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm, T Columna: 30 °C, Flujo: 1 mL/min, Vol. inyección: 20  $\mu\text{L}$ .

Tabla 5.2. Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaP obtenidos a una de  $\lambda$  277.2 nm. Las condiciones cromatográficas son las descritas en la figura 5.2.

Parámetro	Metabolito		
	9,10-dihidrodiol	4,5-dihidrodiol	7,8-dihidrodiol
tr (min)	3.624	6.958	8.562
Área ( $\mu\text{V} \times \text{s}$ )	148480	63816	37406
Altura ( $\mu\text{V}$ )	13372	3813	1967
k'	1.0936	3.0196	3.9463
N	635.68	1581.08	3274.84
$\alpha$	2.7611		1.3069
R	5.2302		2.4707

A pesar de que, como se observa en la tabla 5.2, con un 70 % de MeOH como fase móvil se obtiene una buena separación de los picos cromatográficos, se decidió evaluar un gradiente en la fase móvil, ya que al realizar la selectividad de los métodos de análisis (sección 5.6.1.1.1) se presentaron interferencias provenientes de la matriz sobre la señal correspondiente al 9,10-dihidrodiol. El gradiente evaluado fue lineal, empezando con una proporción de MeOH:agua 60:40 y terminando con una proporción 70:30 en un tiempo de 20 min. El cromatograma obtenido para esta fase móvil a las diferentes longitudes de onda de máxima absorbancia de los analitos, así como sus parámetros cromatográficos se presentan en la figura 5.3 y en la tabla 5.3.

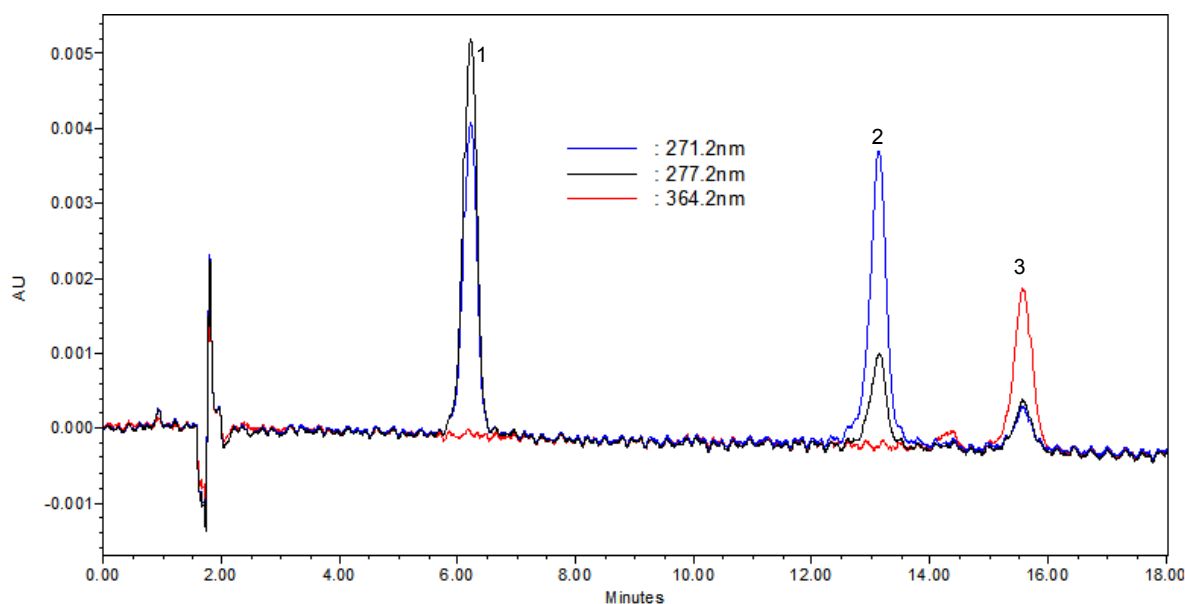


Figura 5.3. Cromatograma obtenido para una mezcla de metabolitos del BaP a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 1) 9,10-dihidrodiol, 2) 4,5-dihidrodiol, 3) 7,8-dihidrodiol. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 60:40 – 70:30 (20 min), Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm, T Columna: 30 °C, Flujo: 1 mL/min, Vol. inyección: 20  $\mu\text{L}$ .

Tabla 5.3. Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaP obtenidos a una de  $\lambda$  277.2 nm. Las condiciones cromatográficas son las descritas en la figura 5.3.

Parámetro	Metabolito		
	9,10-dihidrodiol	4,5-dihidrodiol	7,8-dihidrodiol
tr (min)	6.136	13.014	15.429
Área ( $\mu\text{V} \times \text{s}$ )	216791	68151	44010
Altura ( $\mu\text{V}$ )	13534	3416	2169
k'	2.445	6.307	7.663
N	706.70	3445.41	6708.55
$\alpha$	2.5794		1.2150
R	7.599		2.944

Como se observa en la figura 5.3 los analitos presentan una buena separación entre sí, lo que hace factible su cuantificación, ya que presentan valores para las resoluciones entre los picos (R) mayores a 1.5.

### 5.2.2. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los metabolitos del BaA

En la optimización de las condiciones cromatográficas para los metabolitos del BaA se evaluaron distintas proporciones de MeOH en agua como fase móvil, con la finalidad de obtener una buena separación en los picos correspondientes a los tres analitos. Las proporciones utilizadas fueron 90, 70, 60 y 50 %, observándose que con un 90 y un 70 % de MeOH no se obtuvo una buena separación de los tres analitos, ya que para el primer caso solo se presentó una señal en el cromatograma, mientras que en el segundo dos señales.

Al disminuir el porcentaje de MeOH a un 60 % se empezó a notar una pequeña separación entre el segundo compuesto (8,9-dihidrodiol) y el tercero (10,11-dihidrodiol), y cuando se disminuyó hasta un 50 % ya se dio una separación de los tres analitos. Sin embargo, el tiempo de corrida necesario para que se lleve a cabo la separación de los tres picos utilizando una fase móvil con 50 % de MeOH, es de 45 min, lo cual es excesivo para el análisis de tres analitos, además de que los picos obtenidos se presentan ensanchados, por lo que no es práctico realizar el análisis con esta proporción de fase móvil (figura 5.4).

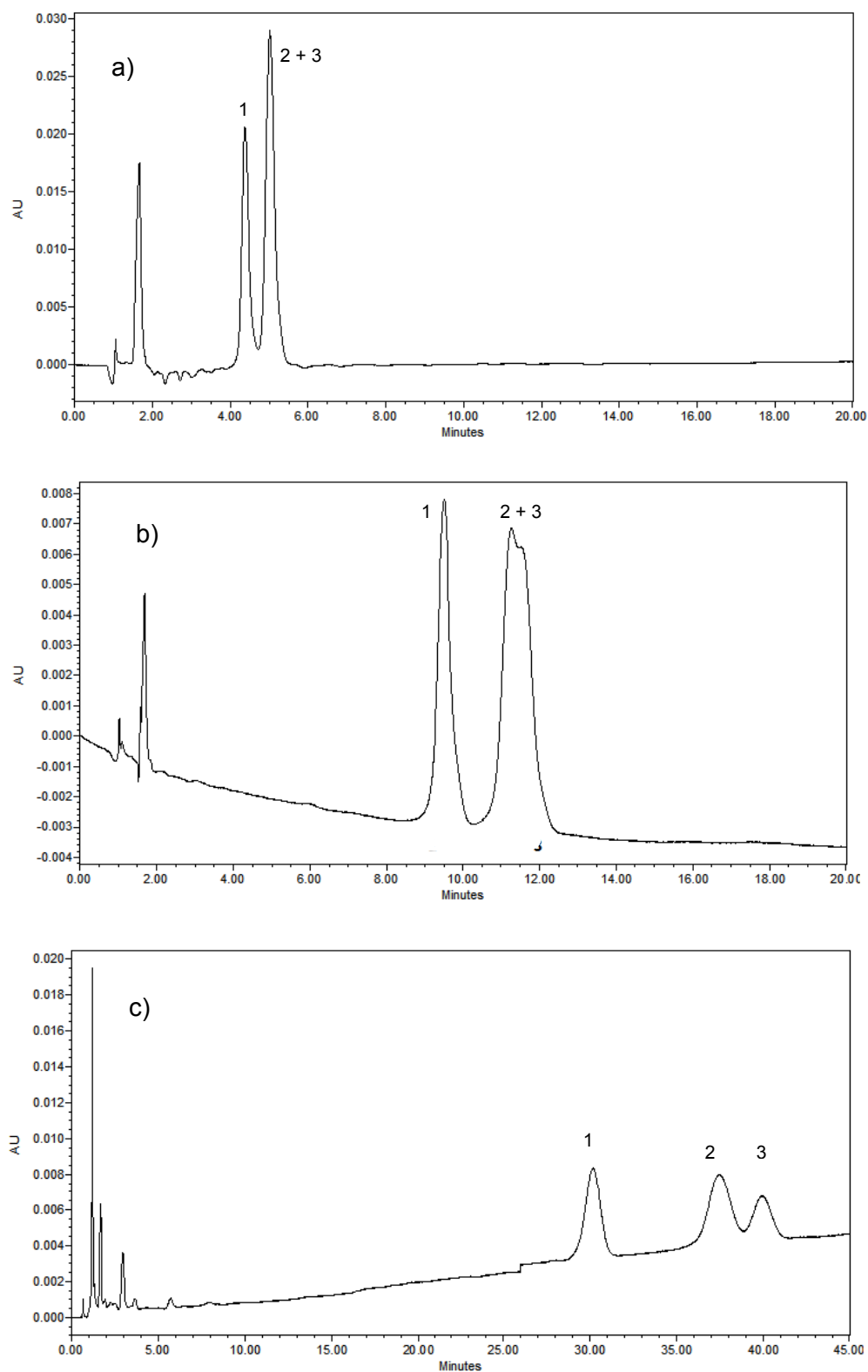
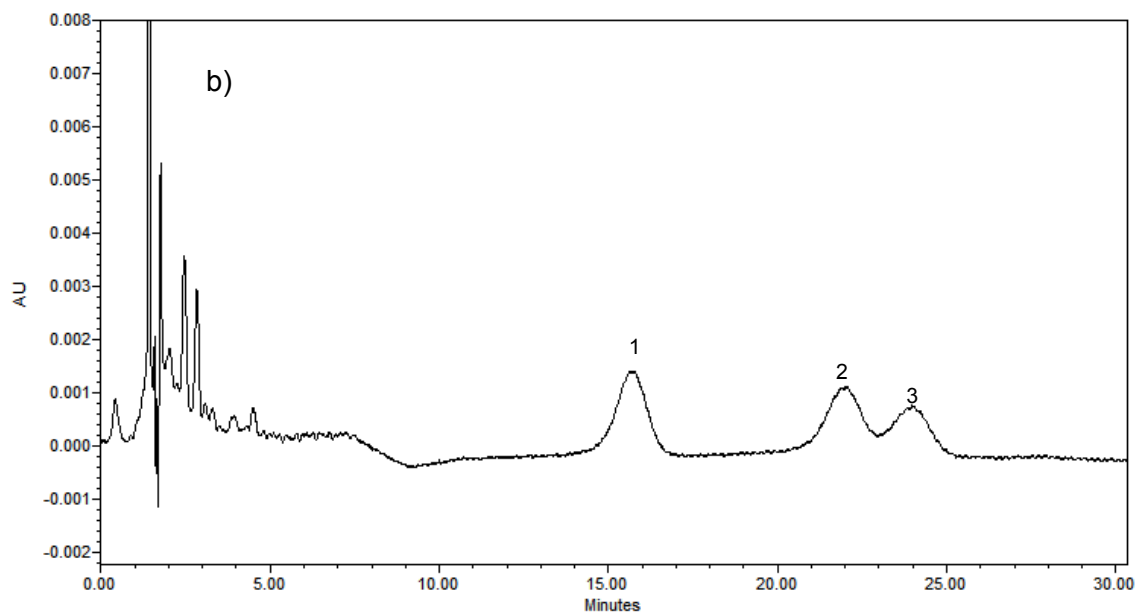
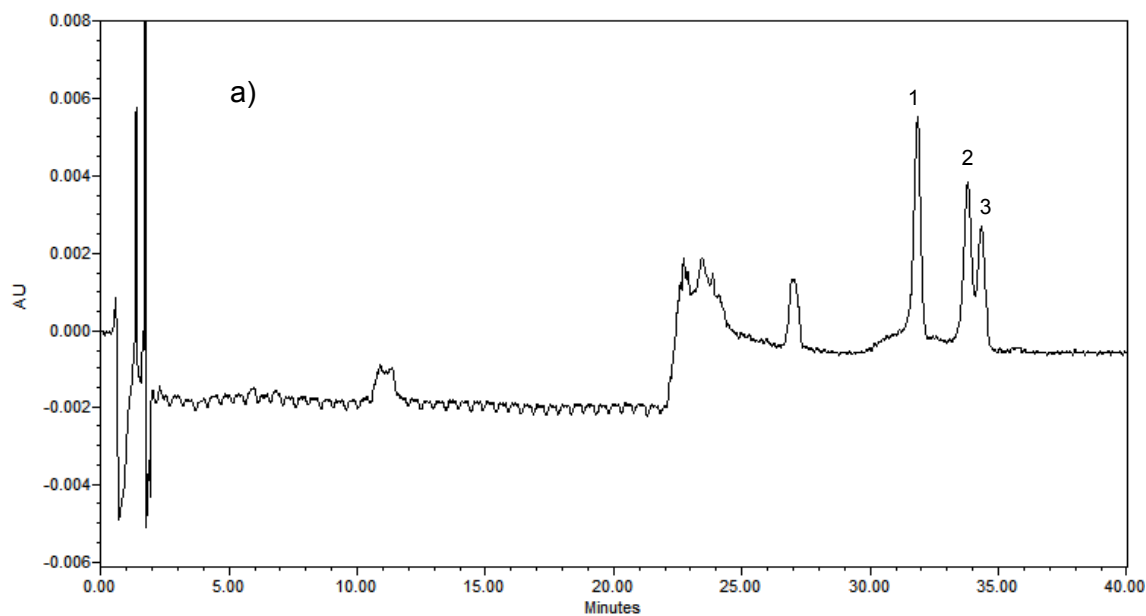


Figura 5.4. Cromatogramas obtenidos para una mezcla de metabolitos del BaA a una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$ . 1) 5,6-dihidrodiol, 2) 8,9-dihidrodiol, 3) 10,11-dihidrodiol. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: MeOH:agua: a) 70:30, b) 60:40, c) 50:50; Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5  $\mu\text{m}$ , 150 x4.6 mm; T Columna: 30 °C; Flujo: 1 mL/min; Vol. inyección: 20  $\mu\text{L}$ ;  $\lambda$ : 265.3 nm.

Debido a esto, fue necesario probar diversos gradientes escalonados de MeOH:agua, como fase móvil. Los gradientes evaluados fueron tres: a) 20:80 (20 min), 20:80 - 60:40 (1 min, gradiente lineal), 60:40 (19 min); b) 60:40 (5 min), 60:40 -50:50 (2 min, gradiente lineal), 50:50 (23 min); y c) 50:50 (15 min), 50:50 – 55:45 (15 min, gradiente lineal), 55:45 (7 min). En la figura 5.5 se presentan los cromatogramas obtenidos para los gradientes utilizados, observándose que para el primer gradiente no hay una buena separación en los dos últimos picos, mientras que con los otros dos gradientes si se da una buena separación.



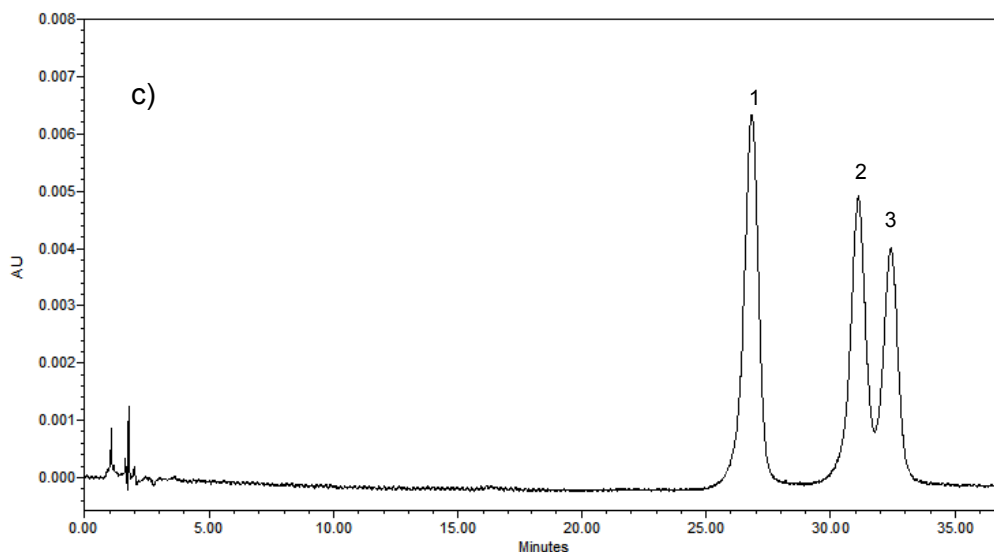
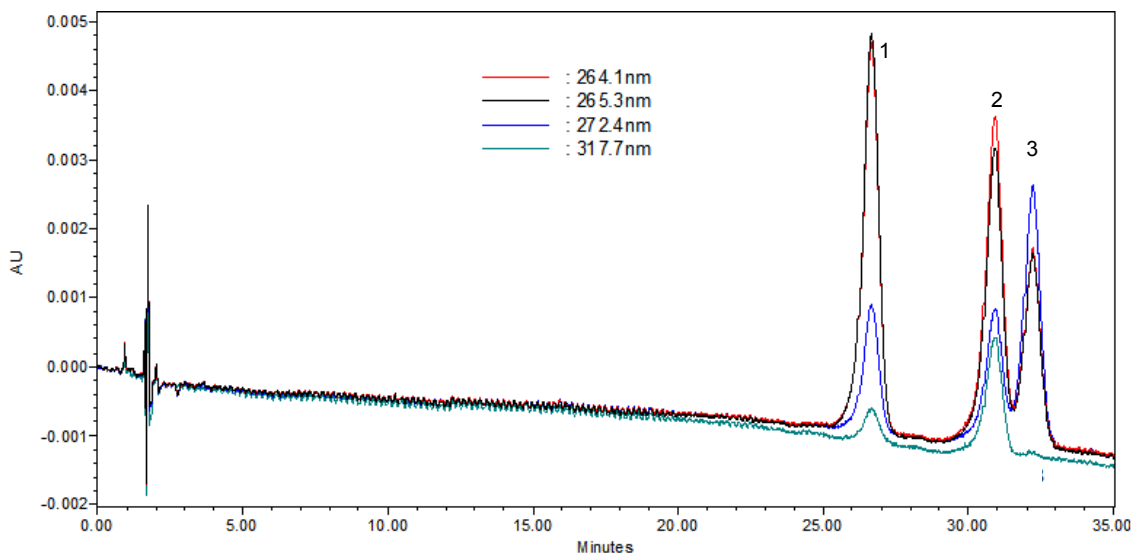


Figura 5.5. Cromatogramas obtenidos para una mezcla de metabolitos del BaA a una concentración de 1 µg/mL. 1) 5,6-dihidrodiol, 2) 8,9-dihidrodiol, 3) 10,11-dihidrodiol. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: a) 20:80 (20 min), 20:80 - 60:40 (1 min), 60:40 (19 min); b) 60:40 (5 min), 60:40 - 50:50 (2 min), 50:50 (23 min); y c) 50:50 (15 min), 50:50 - 55:45 (15 min), 55:45 (7 min); Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 x4.6 mm; T Columna: 30 °C; Flujo: 1 mL/min; Vol. inyección: 20 µL; λ: 265.3 nm.

A pesar de que el tiempo de corrida para el segundo gradiente fue menor que en el tercero, se decidió trabajar utilizando este último debido a que, al calcular la resolución entre los dos últimos picos, resulta tener un valor mayor para el tercero que para el segundo, 0.81 y 0.79 respectivamente, ya que en el segundo gradiente se obtienen los picos más anchos; además de no ser común usar un gradiente en donde se disminuya la proporción del disolvente orgánico debido a que la estabilidad de la columna se retarda. El cromatograma correspondiente al tercer gradiente obtenido a las tres longitudes de onda máxima de los analitos, así como los parámetros cromatográficos de cada metabolito se presentan nuevamente en la figura 5.6 y en la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaP obtenidos a una de λ 265.3 nm. Las condiciones cromatográficas son las descritas en la figura 5.6.

Parámetro	Metabolito		
	5,6-dihidrodiol	8,9-dihidrodiol	10,11-dihidrodiol
tr (min)	26.885	31.127	32.464
Área (µV x s)	106306	83154	62458
Altura (µV)	2748	2223	1746
k'	18.0404	21.0446	21.9646
N	2481.51	4131.41	8600.01
α	1.1665		1.0437
R	2.0713		0.8016



**Figura 5.6. Cromatograma obtenido para una mezcla de metabolitos del BaA a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y detección con 4 diferentes longitudes de onda. 1) 5,6-dihidrodiol, 2) 8,9-dihidrodiol, 3) 10,11-dihidrodiol. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 50:50 (15 min), 50:50 – 55:45 (15 min), 55:45 (7 min); Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm; T Columna: 30 °C; Flujo: 1 mL/min; Vol. inyección: 20  $\mu\text{L}$ .**

Es posible notar en la figura y en la tabla anterior que la resolución entre los picos 2 y 3 correspondientes al 8,9 y al 10,11-dihidrodiol no es óptima, ya que tiene un valor inferior a 1.5, aunque es la máxima que se pudo obtener. Afortunadamente, si se obtiene el cromatograma a una longitud de onda de 317.7 nm solo se presenta el pico correspondiente al 8,9-dihidrodiol (compuesto 2), el cual ya no se sobrepone con el pico 3 (10,11-dihidrodiol), y es de fácil integración. Por lo tanto, resulta conveniente trabajar con esta longitud de onda para cuantificar a este analito, a pesar de que la respuesta obtenida es menor (aproximadamente la mitad de la obtenida con la longitud de máxima absorbancia).

### **5.3. Validación del sistema cromatográfico con inyección directa de estándares de los analitos**

Para la validación del sistema del sistema cromatográfico se tomó como referencia los criterios de las guías de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC) “Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos” (2011) y de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH por sus siglas en inglés) “Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology Q2 (R1)” (2005).

### 5.3.1. Metabolitos del BaP

#### 5.3.1.1. Límite de detección y cuantificación

El límite de detección se define como la concentración a la cual puede detectarse el analito pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas; mientras que el límite de cuantificación corresponde a la concentración más baja a la cual el analito puede cuantificarse con una precisión y veracidad aceptables, bajo las condiciones experimentales (CCAyAC, 2011).

En la tabla 5.5 se recopilan los valores del límite de detección y cuantificación, obtenidos de manera experimental (por inyección de disoluciones diluidas) junto con los obtenidos de manera teórica (a partir de la curva de calibración).

**Tabla 5.5. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) teóricos y experimentales para los metabolitos del BaP en inyección directa.**

Metabolito	LD <sub>exp</sub> (µg/mL)	LD <sub>teórico</sub> (µg/mL)	LC <sub>exp</sub> (µg/mL)	LC <sub>teórico</sub> (µg/mL)
9,10-dihidrodiol	0.025	0.029	0.05	0.11
4,5-dihidrodiol	0.023	0.038	0.046	0.12
7,8-dihidrodiol	0.05	0.057	0.1	0.11

Como se puede observar, los límites de detección y cuantificación obtenidos mediante la curva de calibración (teóricos) presentan valores más altos que los obtenidos experimentalmente (por comparación de la altura de la señal del analito y la señal del ruido), por lo que se decidió considerar los límites obtenidos experimentalmente, para así poder detectar o identificar concentraciones más bajas de los metabolitos del BaP en los ensayos de exposición posteriores.

#### 5.3.1.2. Linealidad del sistema

El parámetro de linealidad representa la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado (CCAyAC, 2011).

La respuesta obtenida para varias disoluciones de los metabolitos del BaP a diferentes concentraciones, resultó tener un comportamiento lineal, debido a que presentaron



valores del coeficiente de correlación mayor a 0.995, respecto al ajuste realizado por el método de mínimos cuadrados con ayuda del software StatGraphics Centurion, además de que el análisis estadístico se obtuvo un valor P menor al error establecido, el cuál fue del 5 %. Los intervalos de concentración, en los que existe linealidad, así como los coeficientes de correlación, la pendiente de la curva y la ordenada, para cada metabolito se presentan en la tabla 5.6.

**Tabla 5.6. Parámetros obtenidos en la linealidad del sistema por inyección directa de los metabolitos del BaP.**

Metabolitos	Intervalo de concentración (µg/mL)	Pendiente (µVxs/µg/mL)	Ordenada al origen (µVxs)	r
<b>9,10-dihidrodiol</b>	0.05 – 1.00	206160	-2212.42	0.9966
<b>4,5-dihidrodiol</b>	0.046 – 0.92	219510	-4690.74	0.9959
<b>7,8-dihidrodiol</b>	0.10 – 1.00	157035	-4401.95	0.9976

### 5.3.1.3. Precisión del sistema

Para la precisión del sistema se realizaron tres inyecciones para tres concentraciones diferentes por dos días. Los valores de los coeficientes de variación a los tres niveles de concentración se mencionan en la tabla 5.7.

**Tabla 5.7. Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaP. Evaluación del sistema por inyección directa (n=6).**

Concentración (µg/mL)	CV %		
	9,10-dihidrodiol	4,5-dihidrodiol	7,8-dihidrodiol
<b>0.9</b>	0.736	0.692	0.197
<b>0.7</b>	0.533	0.600	0.361
<b>0.5</b>	0.488	0.611	0.275

Para todos los casos se obtuvo un coeficiente de variación menor al 1 %, lo cual cae dentro del criterio de aceptación mencionado en la guía de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC) “Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos” (2011), por lo que se puede decir que el método es repetible.

### 5.3.2. Metabolitos del BaA

#### 5.3.2.1. Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección experimentales y teóricos obtenidos para los metabolitos provenientes del BaA se presentan en la tabla 5.8. Al igual que para los metabolitos del BaP, los experimentales se obtuvieron por inyección de diversas concentraciones, mientras que los teóricos a partir de las curvas de calibración correspondientes (5.3.2.2).

Tabla 5.8. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) teóricos y experimentales para los metabolitos del BaA en inyección directa.

Metabolito	LD <sub>exp</sub> (µg/mL)	LD <sub>teórico</sub> (µg/mL)	LC <sub>exp</sub> (µg/mL)	LC <sub>teórico</sub> (µg/mL)
5,6-dihidrodiol	0.05	0.061	0.1	0.13
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	0.05	0.054	0.1	0.16
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	0.1	0.095	0.2	0.29
10,11-dihidrodiol	0.05	0.059	0.1	0.18

Es posible observar que para los tres metabolitos los límites de detección y cuantificación teóricos (provenientes de la curva de calibración) son mayores que los obtenidos de manera experimental. Además, los límites correspondientes al 8,9-dihidrodiol a una longitud de onda de 264.1 nm son menores que los que presenta a 317.7 nm. Sin embargo; como se ha mencionado, el trabajar a una longitud de onda de 317.7 nm es más selectivo, debido a que solo se tiene la señal del 8,9-dihidrodiol, facilitando su cuantificación.

#### 5.3.2.2. Linealidad del sistema

Las curvas de calibración obtenidas a partir de la respuesta de diversas disoluciones de los metabolitos del BaA, resultaron ser lineales para el rango de concentración trabajado, al tener un valor del coeficiente de correlación mayor a 0.995, calculado por el método de mínimos cuadrados con ayuda del software estadístico StatGraphics Centurión, además de presentar un valor P menor al error establecido para el análisis de varianza, el cual fue del 5 %. Los datos pertenecientes a las regresiones lineales se muestran en la tabla 5.9.

Tabla 5.9. Parámetros obtenidos en la linealidad del sistema por inyección directa de los metabolitos del BaA.

Metabolitos	Intervalo de concentración (µg/mL)	Pendiente (µVxs/µg/mL)	Ordenada al origen (µVxs)	r
5,6-dihidrodiol	0.1 – 1.0	315834	-966.049	0.9966
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	0.1 – 1.0	279759	-5497.34	0.9988
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	0.2 – 1.0	78473	-167.867	0.9955
10,11-dihidrodiol	0.1 – 1.0	254581	-11130.7	0.9986

### 5.3.2.3. Precisión del sistema

Al igual que para los metabolitos del BaP, la precisión del sistema se realizó inyectando por triplicado durante dos días, tres muestras de diferente concentración de los metabolitos del BaA. En la tabla 5.10 se muestran los valores obtenidos de los coeficientes de variación de los tres analitos, los cuales representan la repetibilidad del sistema.

Tabla 5.10. Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaA. Evaluación del sistema por inyección directa (n=6).

Concentración (µg/mL)	CV %			
	5,6-dihidrodiol	8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	10,11-dihidrodiol
0.9	0.415	0.734	0.402	0.861
0.7	0.472	0.869	0.750	0.401
0.5	0.570	0.794	0.672	0.993

Al observar los valores de los coeficientes de variación para los tres metabolitos en los tres niveles de concentración, se puede concluir que el sistema cromatográfico presenta una buena precisión, ya que los valores son inferiores al 1 %, lo que está dentro del criterio de aceptación de la guía antes mencionada. Por ello se puede decir que el método de análisis es repetible.

### 5.4. Optimización de la preconcentración en línea acoplada al sistema cromatográfico

Aun cuando los límites de detección y cuantificación instrumentales del sistema cromatográfico para el análisis de los dos grupos de metabolitos son bajos, no fueron suficientes para poder determinar por inyección directa las concentraciones de los analitos

provenientes de la biodegradación de los HAPs por la microalga verde, por lo que fue necesario la implementación de un sistema de preconcentración por EFS en línea, con el cual fue posible detectar concentraciones más bajas (del orden de ng/mL), mediante la concentración de volúmenes de muestra mayores en una precolumna conectada en línea al sistema cromatográfico. El esquema y el procedimiento utilizado para realizar la preconcentración en línea se describe en el punto 4.3.3 perteneciente al apartado de la metodología.

Un parámetro importante a optimizar para la preconcentración en línea fue la proporción de disolvente orgánico (acetonitrilo) necesario para llevar a cabo la carga de la muestra. Para ello se realizaron preconcentraciones probando distintas proporciones del disolvente orgánico: 5, 10, 20 y 30 %. La proporción de 0 % de acetonitrilo fue descartado, debido a que, como se describirá más adelante, las muestras a preconcentrar son previamente tratadas, ya sea por EFS o DMFS, obteniéndose extractos constituidos por una mezcla de agua y MeCN, la cual es necesario diluirla con agua para poder ser preconcentrada logrando la mínima pérdida de los analitos.

Como se puede notar en los gráficos 5.1 y 5.2, la proporción de acetonitrilo en el extracto afecta el porcentaje de recuperación de los analitos, tanto para el grupo de los metabolitos del BaP como para el de los metabolitos del BaA. Para el primer caso se obtuvo un mejor porcentaje de recuperación para los tres analitos con una proporción de acetonitrilo del 5 %; sin embargo, se decidió trabajar con un 10 % de MeCN, debido a que se necesitó agregar un menor volumen de agua para diluir los extractos provenientes de la preparación de la muestra, haciendo más rápida la aplicación de la muestra; además los porcentajes de recuperación fueron muy similares a los que se presentaron con un 5 % de disolvente orgánico. Para el segundo caso, el porcentaje de acetonitrilo en el que se presentó un mejor recobro fue del 10 %, lo cual es favorable debido a que los volúmenes a preconcentrar son pequeños.

Se observó que para proporciones superiores a un 10 % del disolvente orgánico, el porcentaje de recuperación obtenido, tanto para los metabolitos del BaP como los del BaA, disminuye. Esto se debe a que se presenta una fuga de los analitos al momento de preconcentrar la muestra, ya que entre mayor proporción de MeCN esté presente más afines son al disolvente, y éste funciona como un eluyente llegando más rápido al volumen

de fuga. El aumento en el porcentaje de recuperación que se presentó al cambiar de un 5 % a un 10 %, para los metabolitos del BaA se puede explicar debido a interacciones que presentan los analitos con el vidrio del vial en el que se lleva a cabo la preconcentración. Un 5 % de MeCN no es suficiente para desorber a todas las posibles moléculas de metabolitos que se hayan quedado adsorbidas en el vidrio, mientras que un 10 % ya evita esta interacción.

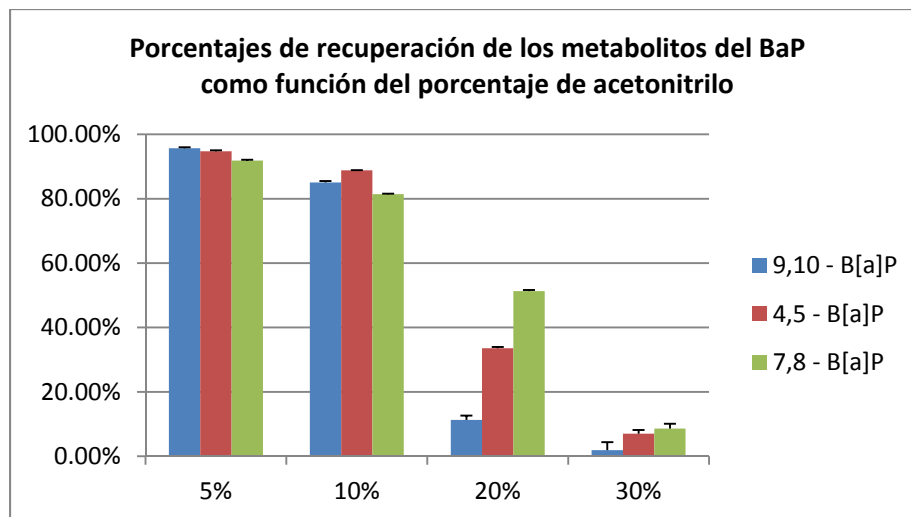


Gráfico 5.1. Influencia de la proporción de disolvente orgánico en el porcentaje de recuperación obtenido para la preconcentración de los metabolitos del BaP.

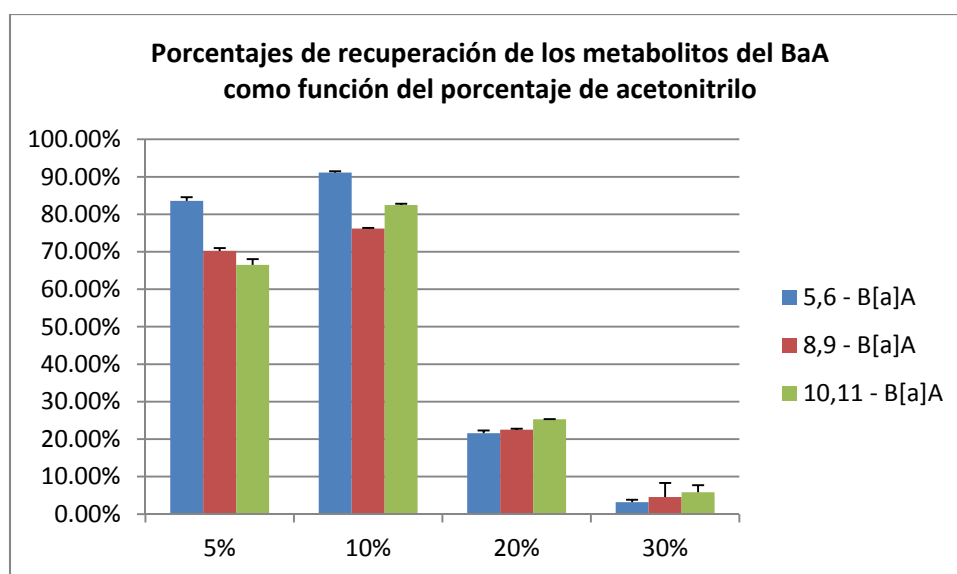


Gráfico 5.2. Influencia de la proporción de disolvente orgánico en el porcentaje de recuperación obtenido para la preconcentración de los metabolitos del BaA.

## 5.5. Validación del sistema cromatográfico con preconcentración en línea de estándares de los analitos

### 5.5.1. Metabolitos del BaP

#### 5.5.1.1. Límite de detección y cuantificación

Al igual que en la validación del sistema por inyección directa, los límites de detección y cuantificación obtenidos de manera experimental resultaron ser más bajos que los que se obtuvieron de manera teórica (a través de la curva de calibración correspondiente) (tabla 5.11). Sin embargo, es posible observar que los límites de detección y cuantificación pertenecientes al sistema con preconcentración por EFS en línea de los analitos son mucho más bajos que los que presenta el sistema por inyección directa, entre 250 y 500 veces más pequeños. Esto es importante porque así la sensibilidad del sistema cromatográfico aumenta haciendo posible la identificación y cuantificación posteriores de los metabolitos producidos por *Selenastrum capricornutum* en los ensayos de exposición, ya que las concentraciones a las que se forman los metabolitos son del orden de ng/mL.

Tabla 5.11. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) teóricos y experimentales para los metabolitos del BaP con preconcentración en línea.

Metabolito	LD <sub>exp</sub> (ng/mL)	LD <sub>teórico</sub> (ng/mL)	LC <sub>exp</sub> (ng/mL)	LC <sub>teórico</sub> (ng/mL)
9,10-dihidrodiol	0.1	0.15	0.2	0.23
4,5-dihidrodiol	0.05	0.10	0.1	0.30
7,8-dihidrodiol	0.1	0.13	0.2	0.27

#### 5.5.1.2. Linealidad del sistema

Las respuestas de los analitos obtenidas a diferentes concentraciones, presentaron una tendencia lineal. Esto se asegura debido a que, los valores de coeficiente de correlación obtenidos por el método de mínimos cuadrados fueron mayores a 0.995, mientras que los valores P resultantes del análisis estadístico fueron menores que el error establecido, el cual corresponde al 5 %. Los parámetros obtenidos en las regresiones lineales se presentan en la tabla 5.12.

Tabla 5.12. Parámetros obtenidos en la linealidad del sistema con preconcentración en línea de los metabolitos del BaP.

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mL)	Pendiente ( $\mu\text{Vxs}/\mu\text{g/mL}$ )	Ordenada al origen ( $\mu\text{Vxs}$ )	r
9,10-dihidrodiol	0.2 – 2.0	79449.3	1196.92	0.9976
4,5-dihidrodiol	0.1 – 2.0	104914	-11691.2	0.9950
7,8-dihidrodiol	0.2 – 2.0	65401.4	-6115.77	0.9972

### 5.5.1.3. Precisión del sistema

Los valores de las coeficientes de variación obtenidos para tres niveles de concentración de los metabolitos, preconcentradas por triplicado por dos días se muestran en la tabla 5.13. Se puede decir que el método cromatográfico es repetible, ya que los coeficientes de variación expresados en porcentaje son menores al 2 %, lo que cumple con los parámetros establecidos en las guías de apoyo.

Tabla 5.13. Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaP. Evaluación del sistema con preconcentración en línea (n=6).

Concentración (ng/mL)	CV %		
	9,10-dihidrodiol	4,5-dihidrodiol	7,8-dihidrodiol
1.8	0.878	0.799	0.809
1.4	0.861	1.017	0.486
1.0	1.290	1.205	1.663

### 5.5.2. Metabolitos del BaA

#### 5.5.2.1. Límite de detección y cuantificación

De la misma manera que para la preconcentración de los metabolitos del BaP, los límites de detección y cuantificación obtenidos en la validación del sistema para la preconcentración de los metabolitos del BaA resultaron ser más bajos que los obtenidos por inyección directa de los analitos. Éstos fueron entre 250 y 500 veces más bajos. De igual forma los límites experimentales son menores que los obtenidos teóricamente por lo que se prefirió considerar con los primeros, para así poder detectar y cuantificar concentraciones más bajas de los metabolitos producidos en los ensayos de exposición.

Al presentarse concentraciones de orden de ng/mL para los límites obtenidos por preconcentración, es posible identificar y cuantificar los metabolitos producidos durante la biodegradación de los HAPs. En la tabla 5.14 se mencionan los valores de los límites de cuantificación y detección para los metabolitos del BaA.

Tabla 5.14. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) teóricos y experimentales para los metabolitos del BaA con preconcentración en línea.

Metabolito	LD <sub>exp</sub> (ng/mL)	LD <sub>teórico</sub> (ng/mL)	LC <sub>exp</sub> (ng/mL)	LC <sub>teórico</sub> (ng/mL)
5,6-dihidrodiol	0.1	0.11	0.2	0.28
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	0.1	0.11	0.2	0.26
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	0.2	0.26	0.4	0.49
10,11-dihidrodiol	0.1	0.13	0.2	0.24

### 5.5.2.2. Linealidad del sistema

La respuesta obtenida a partir de disoluciones de los metabolitos con diferente concentración, presentó un comportamiento lineal. Esto se puede aseverar debido a que los valores de coeficiente de correlación fueron mayores a 0.995, además de que los valores P resultantes del análisis de varianza fueron menores al error establecido que fue del 5 %. Los parámetros obtenidos por medio del ajuste de mínimos cuadrados se presentan en la tabla 5.15.

Tabla 5.15. Parámetros obtenidos en la linealidad del sistema con preconcentración en línea de los metabolitos del BaA.

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mL)	Pendiente (μVxs/μg/mL)	Ordenada al origen (μVxs)	r
5,6-dihidrodiol	0.2 – 2.0	128546	7314.82	0.9956
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	0.2 – 2.0	102702	-448.496	0.9964
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	0.4 – 2.0	28522.4	1523.7	0.9967
10,11-dihidrodiol	0.2 -2.0	101531	-4504.44	0.9968

### 5.5.2.3. Precisión del sistema

Debido a los valores de los coeficientes de variación obtenidos a partir de las respuestas de los metabolitos a tres niveles de concentración, es posible decir que el sistema cromatográfico con preconcentración es repetible, es decir, presenta buena precisión de acuerdo a los límites establecidos en las guías de apoyo. En la tabla 5.16 se muestran dichos valores.



Tabla 5.16. Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaA. Evaluación del sistema con preconcentración en línea (n=6).

Concentración (ng/mL)	CV%			
	5,6-dihidrodiol	8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	10,11-dihidrodiol
1.8	1.038	0.814	0.837	1.301
1.4	1.184	0.708	1.107	1.044
1.0	1.422	0.654	0.785	1.277

## 5.6. Validación de los métodos de determinación de los analitos

Se considera a un método de análisis como el conjunto que involucra la preparación de muestra y el sistema analítico, en este caso el sistema cromatográfico. La preparación de la muestra se realizó por medio de dos técnicas de extracción, la EFS y la DMFS, por lo que para cada grupo de metabolitos se tuvieron dos métodos de análisis, uno por cada técnica de extracción. El uso de dos métodos se debe a que, para cumplir el propósito de aislar, cuantificar e identificar los metabolitos formados a causa de la biodegradación de los HAPs, es necesario analizar tanto el medio de cultivo, en donde se encuentran las microalgas y en el que los metabolitos son excretados, como la célula misma (biomasa), en donde estarán los metabolitos producidos que no han sido excretados. En consecuencia, se tuvieron dos tipos de matrices que deben de ser tratadas según sus propiedades. Para el medio líquido fue posible utilizar un método por EFS en la preparación de muestras, mientras que para la biomasa fue posible utilizar un método por DMFS. A pesar de que existen otros métodos aplicables a la preparación de estos dos tipos de muestras, las ventajas que ofrecen la EFS y la DMFS, como los bajos costos, buena precisión y uso de volúmenes pequeños de disolventes y muestras, las hacen apropiadas para cumplir los objetivos del presente trabajo.

### 5.6.1. Validación del método con EFS y preconcentración en línea acoplado a CLAR-DAD para el análisis del medio líquido

#### 5.6.1.1. Metabolitos del BaP

##### 5.6.1.1.1. Selectividad del método

La selectividad es la capacidad del método de determinar inequívocamente a los analitos en presencia de componentes que se espera estén presentes en la matriz de estudio.

Estos componentes pueden ser impurezas, productos de degradación de los analitos o componentes de la matriz (ICH, 2005).

Para la evaluación de este parámetro se utilizó un blanco de medio de cultivo que había estado en contacto con las microalgas, el cual fue preparado por el método de EFS. El extracto resultante se diluyó hasta obtener un 10 % de MeCN, resultando así un volumen final de 16.5 mL. Este último volumen fue preconcentrado por EFS en línea.

En las figuras 5.7 y 5.8 se muestran los cromatogramas obtenidos para el blanco a distintas composiciones de fase móvil. El primero es con una fase móvil isocrática con una proporción 70:30 de MeOH:agua, mientras que el segundo con un gradiente de una mezcla MeOH:agua, el cual fue utilizado posteriormente para la determinación de los metabolitos en los bioensayos.

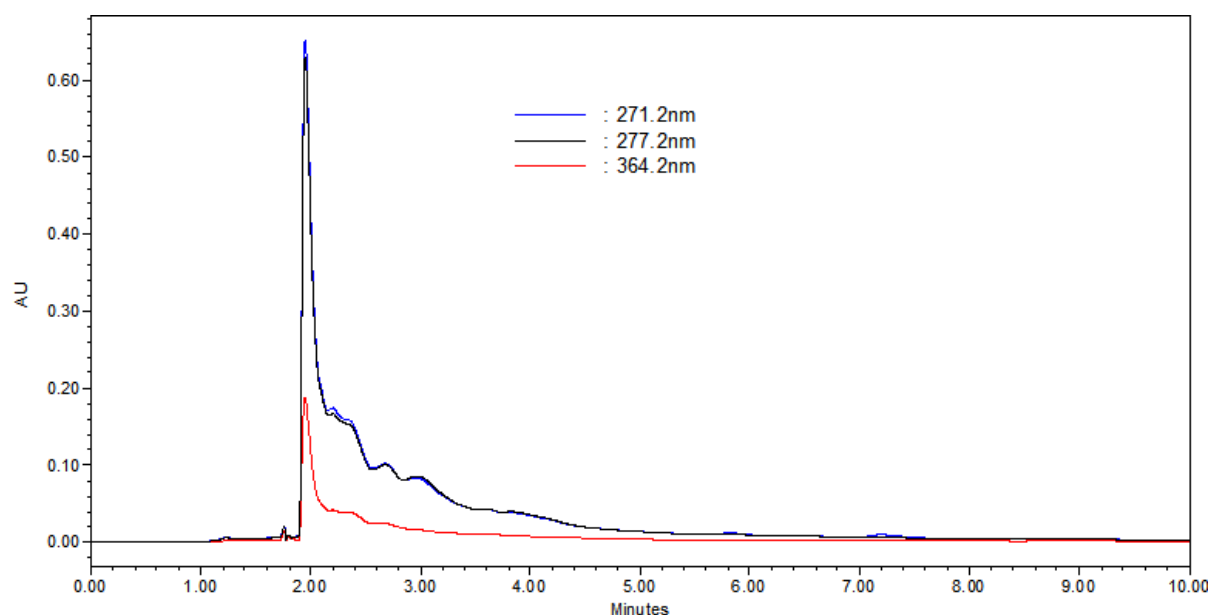
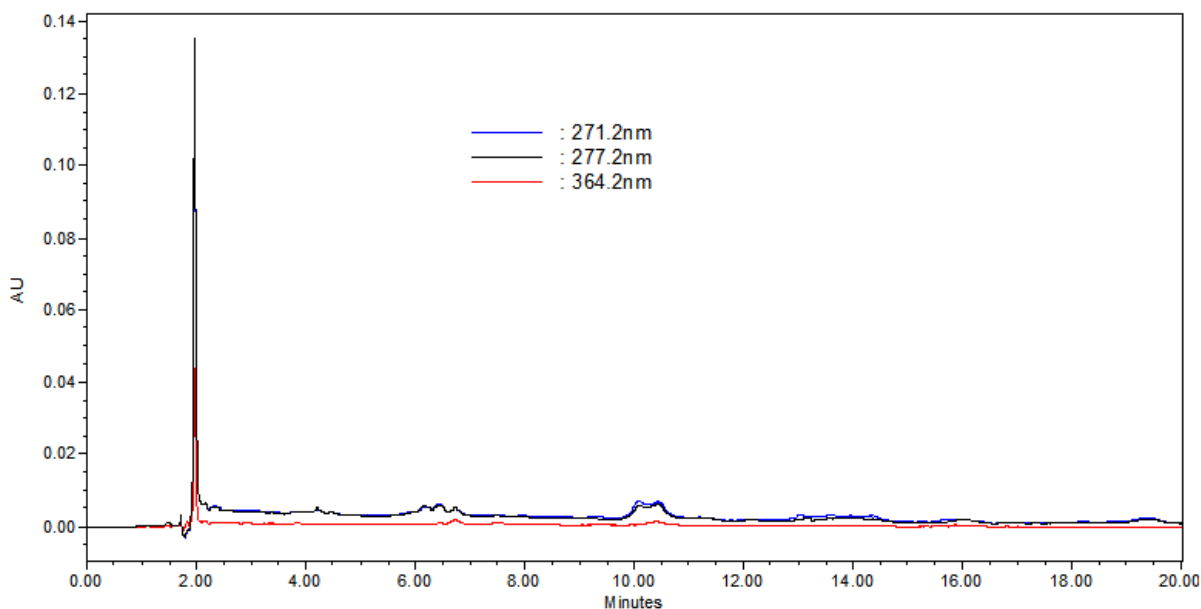


Figura 5.7. Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido al preconcentrar un blanco del medio de cultivo preparado por EFS. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: MeOH:agua (70:30), Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 x 4.6 mm, T Columna: 30 °C, Flujo: 1 mL/min, Vol. de preconcentración: 16.5 mL.



**Figura 5.8. Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido al preconcentrar un blanco del medio de cultivo preparado por EFS. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 60:40 – 70:30 (20 min), Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 x 4.6 mm, T Columna: 30 °C, Flujo: 1 mL/min, Vol. de preconcentración: 16.5 mL.**

En figura 5.7 se observa la presencia de una señal que interfiere con el pico correspondiente al 9,10-dihidrodiol del BaP, el cual tiene un tiempo de retención de 3.5 minutos para estas condiciones cromatográficas. Debido a esto fue necesario buscar otra composición en la fase móvil con la finalidad de evitar estos interferentes. Para ello se decidió trabajar con un gradiente, empezando con una proporción 60:40 de MeOH-agua, la cual se modificó de manera lineal hasta una proporción 70:30 durante 20 minutos. Esto ayudó a evitar los interferentes, que como se puede ver en la figura 5.8, se presentan como pequeñas señales a los seis y diez minutos de corrida, lo cual no interfiere con la señal producida por el 9,10-dihidrodiol, que bajo estas condiciones cromatográficas resulta a un tiempo de retención de 6.3 minutos, logrando que el método sea selectivo para el análisis de estos metabolitos. Además el uso del gradiente en la fase móvil hace que el tiempo de corrida no sea tan largo.

En la figura 5.9 se muestra un cromatograma de un extracto obtenido por EFS del medio de cultivo fortificado y preconcentrado por EFS en línea, utilizando el gradiente de elución mencionado anteriormente.

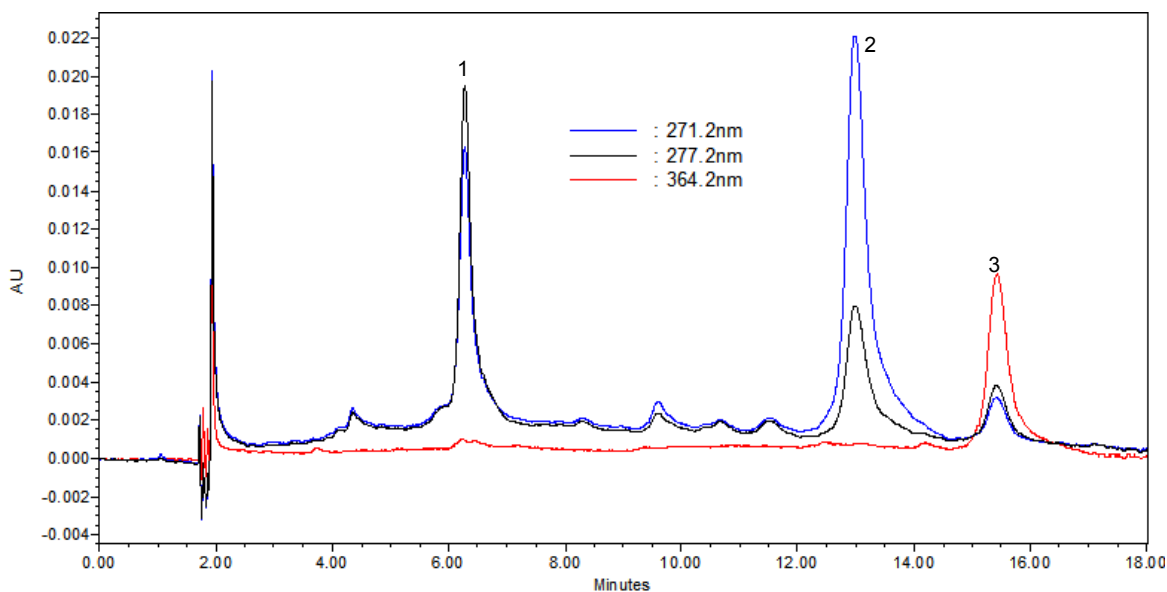


Figura 5.9. Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido de la preconcentración del extracto resultante de una EFS del medio de cultivo adicionado con los metabolitos del BaP (2.67 ng/mL de medio). 1) 9,10-dihidrodiol, 2) 4,5-dihidrodiol, 3) 7,8-dihidrodiol. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 60:40 – 70:30 (20 min), Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 x 4.6 mm, T Columna: 30 °C, Flujo: 1 mL/min, Vol. de preconcentración: 16.5 mL.

#### 5.6.1.1.2. Límite de detección y cuantificación

En la tabla 5.17 se presentan los límites de detección experimentales para los metabolitos del BaP con EFS como método de extracción. Se observó que los valores obtenidos son menores a 0.27 ng/mL, lo cual fue suficientemente bajo para poder identificar y cuantificar la presencia de los metabolitos en los ensayos de exposición del alga *Selenastrum capricornutum* a los HAPs. Los límites de detección y cuantificación teóricos no se presentan, debido a que las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva de calibración fueron muy grandes, por lo que se obtiene un gran error al calcularlos.

Tabla 5.17. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) experimentales para los metabolitos del BaP con EFS y preconcentración en línea.

Metabolito	LD <sub>exp</sub> (ng/mL de medio)	LC <sub>exp</sub> (ng/mL de medio)
9,10-dihidrodiol	0.1333	0.2667
4,5-dihidrodiol	0.1227	0.2453
7,8-dihidrodiol	0.1333	0.2667

### 5.6.1.1.3. Linealidad del método

Las respuestas obtenidas a diferentes concentraciones de los metabolitos en el medio de cultivo, resultaron seguir una tendencia lineal, esto dado a que en el análisis estadístico realizado se obtuvieron valores P más pequeños que el error establecido, el cual fue del 5 %. Además los valores de los coeficientes de correlación para cada metabolito fueron mayores que 0.997, lo cual cumple con el criterio establecido en las guías consultadas, en donde se menciona que para decir que un intervalo de trabajo es lineal debe de presentar un coeficiente de correlación mayor a 0.98 para residuos y contaminantes en agua y alimentos. Los parámetros obtenidos en las regresiones lineales por el método de mínimos cuadrados se presentan en la tabla 5.18.

**Tabla 5.18. Parámetros obtenidos en la linealidad del método (respuesta vs concentración) para los metabolitos del BaP con EFS y preconcentración en línea.**

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mL de medio)	Pendiente ( $\mu\text{Vxs}/\mu\text{g/mL}$ )	Ordenada al origen ( $\mu\text{Vxs}$ )	r
9,10-dihidrodiol	0.27 – 10.67	104638	6837.09	0.9980
4,5-dihidrodiol	0.27 – 10.67	188721	-18191.5	0.9984
7,8-dihidrodiol	0.27 – 10.67	84358.8	-16027.0	0.9971

Por otra parte, en la tabla 5.19 se presentan los parámetros obtenidos de la relación concentración recuperada vs concentración adicionada, en donde la pendiente corresponde al recobro global obtenido en el método y el coeficiente de correlación indica que este recobro es prácticamente constante al intervalo de concentraciones evaluadas.

**Tabla 5.19. Parámetros obtenidos en la linealidad del método (concentración recuperada vs concentración adicionada) para los metabolitos del BaP con EFS y preconcentración en línea.**

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mL de medio)	Pendiente	Ordenada al origen	r
9,10-dihidrodiol	0.27 – 10.67	0.9341 $\pm$ 0.0536	0.0126 $\pm$ 0.0487	0.9979
4,5-dihidrodiol	0.27 – 10.67	0.8899 $\pm$ 0.0359	0.0093 $\pm$ 0.0326	0.9990
7,8-dihidrodiol	0.27 – 10.67	0.8269 $\pm$ 0.0528	0.0077 $\pm$ 0.0480	0.9974

### 5.6.1.1.4. Precisión del método

Como se puede observar en la tabla 5.20, el método de determinación resultó ser repetible en el rango de concentraciones evaluadas, ya que los valores obtenidos para los coeficientes de variación de las señales de los metabolitos a los tres niveles de

concentración fueron menores al 5 %, lo cual está dentro de los criterios de aceptación establecidos en las guías de apoyo, donde se menciona que para residuos y contaminantes en agua y alimentos a un intervalo de concentración de 1 a 10 ng/mL el coeficiente de variación obtenido debe de ser menor al 20 %. Los valores de los coeficientes de variación resultaron ser mayores que los obtenidos en la validación del sistema por inyección directa y por preconcentración debido a que el método de análisis contempla como paso adicional la preparación de muestra obteniéndose así una mayor variabilidad en los resultados.

**Tabla 5.20. Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaP. Evaluación del método con EFS y preconcentración en línea (n=6).**

Concentración (ng/mL de medio)	CV %		
	9,10-dihidrodiol	4,5-dihidrodiol	7,8-dihidrodiol
8.0	2.975	1.769	3.154
4.0	3.297	4.079	3.254
1.3	3.750	3.561	2.427

#### 5.6.1.1.5. Recuperación del método

El método presentó un buen porcentaje de recuperación. Como se puede notar en la tabla 5.21, el porcentaje de recobro calculado, comparando las respuestas obtenidas de los extractos de EFS preconcentrados contra las obtenidas por preconcentración de una disolución estándar fortificada, es mayor del 83.0 %, lo que cumple con el criterio establecido por las guías de apoyo, el cual está fijado en un rango de 60 a 120 % para residuos y contaminantes en agua y alimentos a una concentración de 1 a 10 ng/mL.

**Tabla 5.21. Porcentajes de recuperación para los metabolitos del BaP comparando la respuesta de una disolución estándar preconcentrada contra la respuesta obtenida por la preconcentración de un extracto de EFS proveniente del medio líquido.**

Metabolito	Cantidad adicionada (µg)	Concentración de la disolución estándar a preconcentrar (ng/mL)	Concentración fortificada en el medio de cultivo (ng/mL)	% Recobro
9,10-dihidrodiol	0.020	2.0	1.33	94.4
	0.012	1.2	0.80	94.87
	0.004	0.4	0.27	98.27
4,5-dihidrodiol	0.020	2.0	1.33	89.96
	0.012	1.2	0.80	89.25
	0.004	0.4	0.27	93.80
7,8-dihidrodiol	0.020	2.0	1.33	83.05
	0.012	1.2	0.80	84.42
	0.004	0.4	0.27	84.4

### 5.6.1.2. Metabolitos del BaA

#### 5.6.1.2.1. Selectividad del método

Para evaluar la selectividad del método se preconcentró un extracto obtenido por la preparación de un blanco de medio líquido por EFS. En el cromatograma resultante se prosiguió a la identificación de señales provenientes de la matriz que pudieran interferir en las señales obtenidas para los analitos (figura 5.10).

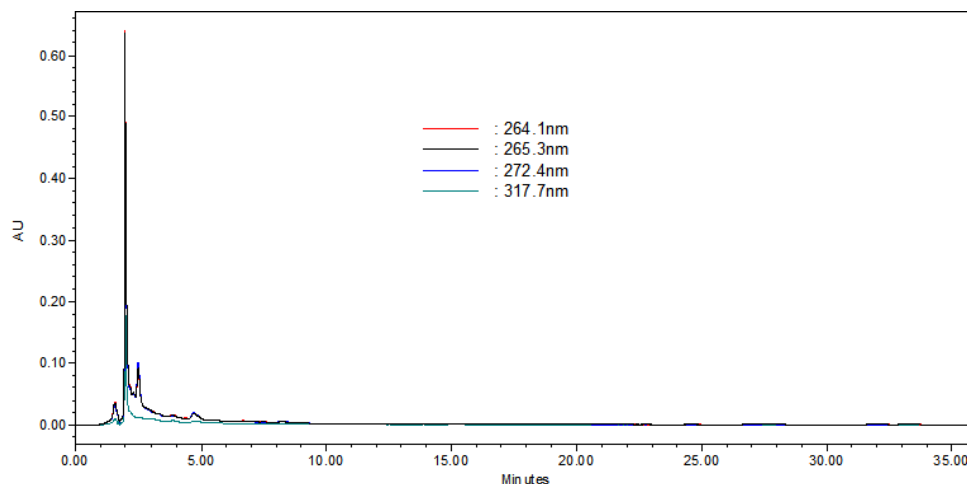


Figura 5.10. Cromatograma obtenido a diferentes longitudes de onda al preconcentrar un blanco del medio de cultivo preparado por EFS. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 50:50 (15 min), 50:50 – 55:45 (15 min), 55:45 (7 min); Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 x 4.6 mm; T Columna: 30 °C; Flujo: 1 mL/min; Vol. de preconcentración: 16.5 mL.

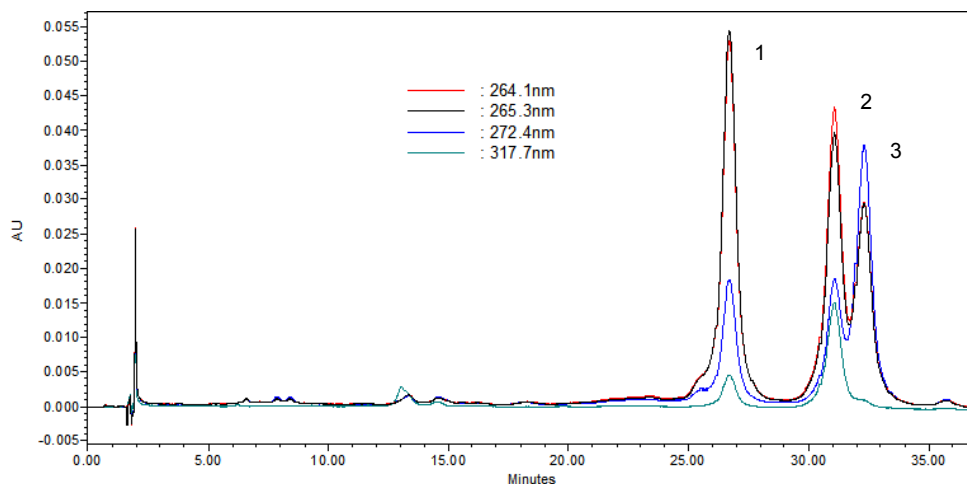


Figura 5.11. Cromatograma obtenido a diferentes longitudes de onda de la preconcentración del extracto resultante de una EFS del medio de cultivo adicionado con los metabolitos del BaA (10.67 ng/mL de medio). 1) 5,6-dihidrodiol, 2) 8,9-dihidrodiol, 3) 10,11-dihidrodiol. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 50:50 (15 min), 50:50 – 55:45 (15 min), 55:45 (7 min); Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 x 4.6 mm; T Columna: 30 °C; Flujo: 1 mL/min; Vol. de preconcentración: 16.5 mL.

Como es posible notar en las figuras 5.10 y 5.11, no existe presencia de interferentes provenientes del medio en los tiempos de retención que corresponden a los analitos, por lo que no fue necesario modificar las condiciones cromatográficas desarrolladas al inicio, obteniendo así un método de análisis selectivo.

#### 5.6.1.2.2. Límite de detección y cuantificación

De igual forma que para los metabolitos del BaP, los límites de detección y cuantificación teóricos para los metabolitos del BaA no fueron calculados, debido a que las concentraciones utilizadas para la elaboración de la curva de calibración fueron muy grandes, lo cual causa gran error en el cálculo. Los valores de los límites de detección y cuantificación experimentales se presentan en la tabla 5.22, en donde se muestra que presentan valores inferiores a 0.6 ng/mL, excepto para el 8,9-dihidrodiol a la longitud de onda de 317.7 nm, los cuales son menores a 0.8 ng/mL. Estos valores son lo suficientemente bajos para poder identificar y cuantificar a los metabolitos producidos en la biodegradación de los HAPs a la concentración con la que se expone a la microalga verde.

Tabla 5.22. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) experimentales para los metabolitos del BaA con EFS y preconcentración en línea.

Metabolito	LD <sub>exp</sub> (ng/mL de medio)	LC <sub>exp</sub> (ng/mL de medio)
5,6-dihidrodiol	0.2667	0.5333
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	0.2667	0.5333
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	0.5333	0.8000
10,11-dihidrodiol	0.2667	0.5333

#### 5.6.1.2.3. Linealidad del método

El método de determinación de los metabolitos del BaA, con extracción por EFS y preconcentración por EFS en línea, resultó ser lineal en el rango de concentraciones evaluadas. Los valores estadísticos P fueron menores al error establecido del 5 %, mientras que los coeficientes de correlación obtenidos por el método de mínimos cuadrados fueron mayores a 0.996 (tabla 5.23), lo cual cumple con el criterio establecido por las guías de apoyo, en donde dice que para residuos y contaminantes en alimentos y agua el coeficiente de correlación de la linealidad debe de ser mayor a 0.98 para que se considere lineal.



Tabla 5.23. Parámetros obtenidos en la linealidad del método (respuesta vs concentración) para los metabolitos del BaA con EFS y preconcentración en línea.

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mL de medio)	Pendiente ( $\mu\text{Vxs}/\mu\text{g/mL}$ )	Ordenada al origen ( $\mu\text{Vxs}$ )	r
5,6-dihidrodiol	0.53 – 46.67	209321	-157006	0.9979
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	0.53 – 46.67	141234	-104410	0.9973
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	0.8 – 46.67	67648.2	-36439.0	0.9973
10,11-dihidrodiol	0.53 – 46.67	214929	-337853	0.9967

Además, de la relación de la concentración recuperada contra concentración adicionada resultó que los porcentajes de recuperación globales fueron mayores al 80 % (valor de la pendiente por 100) y que estos fueron constantes dentro del intervalo de concentraciones evaluadas (tabla 5.24).

Tabla 5.24. Parámetros obtenidos en la linealidad del método (concentración recuperada vs concentración adicionada) para los metabolitos del BaA con EFS y preconcentración en línea.

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mL de medio)	Pendiente	Ordenada al origen	r
5,6-dihidrodiol	0.53 – 46.67	0.8407±0.0151	0.0149±0.0488	0.9976
8,9-dihidrodiol	0.53 – 46.67	0.9022±0.0675	-0.0047±0.0639	0.9965
10,11-dihidrodiol	0.53 – 46.67	0.8919±0.0632	0.0118±0.0598	0.9969

#### 5.6.1.2.4. Precisión del método

El método analítico resultó ser repetible para los tres niveles de concentración evaluados. Los coeficientes de variación obtenidos para los tres metabolitos fueron menores al 4 % (tabla 5.25), lo que cumple con el criterio de aceptación establecido en las guías de apoyo, donde se menciona que debe de tener un valor menor al 20 % para un rango de concentraciones de 10 a 100 ng/mL y menor del 30 % para un rango de 1 a 10 ng/mL. Por esto se considera que el método tiene una buena precisión.

Tabla 5.25. Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaA. Evaluación del método con EFS y preconcentración en línea (n=6).

Concentración (ng/mL de medio)	CV %			
	5,6-dihidrodiol	8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	10,11-dihidrodiol
20.00	3.499	3.267	1.573	3.059
10.67	3.348	0.728	3.851	3.915
1.33	2.040	2.329	2.458	0.958

### 5.6.1.2.5. Recuperación del método

El porcentaje de recuperación obtenido para el método de análisis de los metabolitos del BaA con EFS, resultó estar comprendido en un intervalo del 84.73 al 91.05 % para los tres analitos, lo que cumple con la especificación establecida en las guías de apoyo para la validación de los métodos de análisis, en donde dice que el porcentaje de recuperación debe ser del 60 al 120 %, para el rango de concentraciones evaluadas.

**Tabla 5.26. Porcentajes de recuperación para los metabolitos del BaA comparando la respuesta de una disolución estándar preconcentrada contra la respuesta obtenida por la preconcentración de un extracto de EFS proveniente del medio líquido.**

Metabolito	Cantidad adicionada (µg)	Concentración de la disolución estándar a preconcentrar (ng/mL)	Concentración fortificada en el medio de cultivo (ng/mL)	% Recobro
5,6-dihidrodiol	0.020	2.0	1.33	85.20
	0.012	1.2	0.80	85.85
	0.008	0.8	0.53	86.96
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	0.020	2.0	1.33	89.98
	0.012	1.2	0.80	89.56
	0.008	0.8	0.53	89.39
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	0.020	2.0	1.33	84.73
	0.012	1.2	0.80	84.79
10,11-dihidrodiol	0.020	2.0	1.33	90.00
	0.012	1.2	0.80	91.02
	0.008	0.8	0.53	91.05

### 5.6.2. Validación del método con DMFS y preconcentración en línea acoplado a CLAR-DAD para el análisis de la biomasa

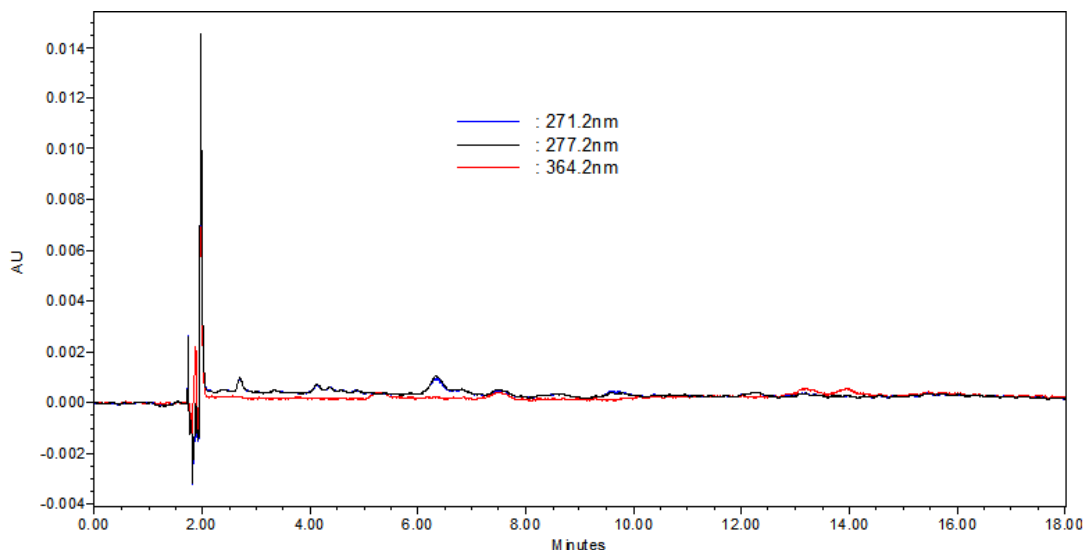
#### 5.6.2.1. Metabolitos del BaP

##### 5.6.2.1.1. Selectividad del método

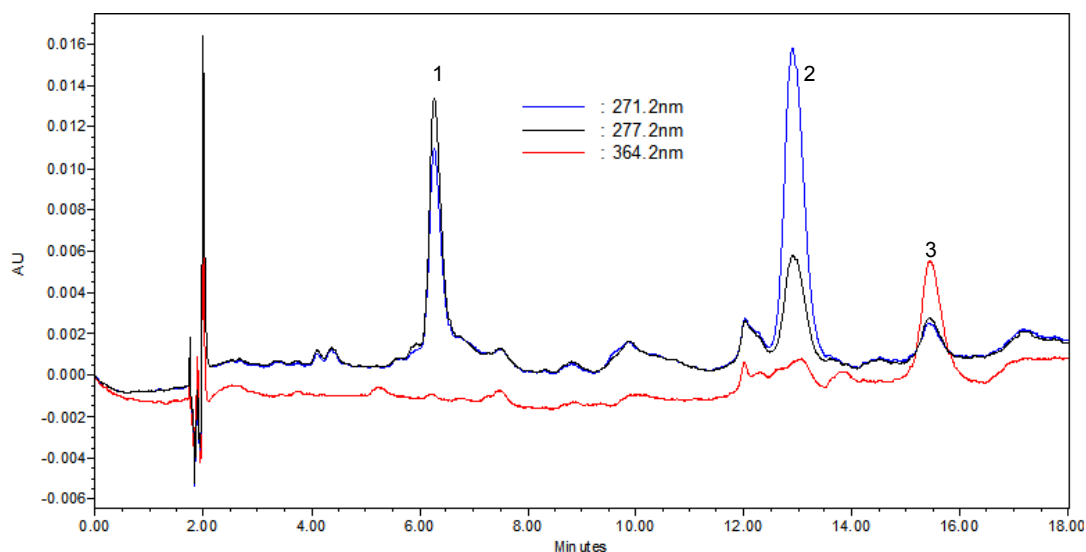
Al igual que en el método de análisis con EFS, para evaluar la selectividad del método con DMFS, se analizó cromatográficamente un blanco. Para esto se preconcentró un extracto resultante de la preparación por DMFS de 5 mg de biomasa seca que no estuvo en contacto con el BaP, el cual fue previamente diluido con agua hasta tener una proporción del 10 % de MeCN. El análisis del blanco se realizó con la finalidad de identificar posibles interferentes provenientes de la matriz de trabajo.

En las figuras 5.12 y 5.13 se presentan los cromatogramas referentes al blanco y a un extracto fortificado, los cuales fueron obtenidos con la fase móvil en gradiente descrita con

anterioridad (numeral 4.3.2), con la finalidad de evitar la presencia de interferentes en las señales de los analitos. Como es posible notar en los cromatogramas, los posibles interferentes que se observan en el en el blanco de biomasa no afectan las señales provenientes de los metabolitos del BaP, lo que implica que el método es selectivo para estos analitos.



**Figura 5.12.** Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido al preconcentrar un blanco de biomasa preparado por DMFS. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 60:40 – 70:30 (20 min), Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 X 4.6 mm, T Columna: 30 °C, Flujo: 1 mL/min, Vol. de preconcentración: 6 mL, λ: 277.2 nm.



**Figura 5.13.** Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido de la preconcentración del extracto resultante de una DMFS de la biomasa adicionada con los metabolitos del BaP (2.67 ng/mg de biomasa). 1) 9,10-dihidrodiol, 2) 4,5-dihidrodiol, 3) 7,8-dihidrodiol. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 60:40 – 70:30 (20 min), Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 x 4.6 mm, T Columna: 30 °C, Flujo: 1 mL/min, Vol. de preconcentración: 6 mL.

### 5.6.2.1.2. Límite de detección y cuantificación

En la tabla 5.27 se presentan los valores experimentales de los límites de detección y cuantificación del método para los metabolitos del BaP con DMFS. Es posible observar que estos son menores a 1.6 ng/mg de biomasa, lo cual hace que el método desarrollado sea factible para la identificación y detección de los metabolitos del BaP en los ensayos de exposición de los HAPs con el alga *Selenastrum capricornutum*.

Tabla 5.27. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) experimentales para los metabolitos del BaP con DMFS y preconcentración en línea.

Metabolito	LD <sub>exp</sub> (ng/mg de biomasa)	LC <sub>exp</sub> (ng/mg de biomasa)
9,10-dihidrodiol	0.4	0.8
4,5-dihidrodiol	0.8	1.6
7,8-dihidrodiol	0.8	1.6

### 5.6.2.1.3. Linealidad del método

En la tabla 5.28 se presentan los parámetros obtenidos en las regresiones lineales aplicadas a las curvas de calibración de la respuesta de los metabolitos en función de su concentración.

Tabla 5.28. Parámetros obtenidos en la linealidad del método (respuesta vs concentración) para los metabolitos del BaP con DMFS y preconcentración en línea.

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mg de biomasa)	Pendiente	Ordenada al origen	r
9,10-dihidrodiol	2.4 – 16.0	24941.1	-4671.28	0.9975
4,5-dihidrodiol	2.4 – 16.0	34725.3	-10163.2	0.9971
7,8-dihidrodiol	2.4 – 16.0	19804.8	-21322.7	0.9965

Con base en los parámetros obtenidos en las regresiones lineales de las curvas de calibración de los metabolitos es posible aseverar que la relación entre las respuestas de los analitos y la concentración de estos sigue un comportamiento lineal. Esto se sustenta con los valores estadísticos P, los cuales fueron menores al error establecido de 5 %, para los tres casos. Además de que los coeficientes de correlación (r) son mayores a 0.996, lo que cumple con lo establecido en las guías de apoyo utilizadas, en donde se menciona que deben ser mayores a 0.98 para poder considerar que el método es lineal. Por otra parte, en la tabla 5.29 se presentan los parámetros obtenidos de la relación concentración recuperada vs concentración adicionada, en donde la pendiente

corresponde al recobro global obtenido en el método y el coeficiente de correlación indica que este recobro es prácticamente constante al intervalo de concentraciones evaluadas.

**Tabla 5.29. Parámetros obtenidos en la linealidad del método (concentración recuperada vs concentración adicionada) para los metabolitos del BaP con DMFS y preconcentración en línea.**

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mg de biomasa)	Pendiente	Ordenada al origen	r
9,10-dihidrodiol	2.4 – 16.0	0.6774±0.0807	0.1971±0.264	0.9912
4,5-dihidrodiol	2.4 – 16.0	0.7205±0.0534	-0.1339±0.174	0.9966
7,8-dihidrodiol	2.4 – 16.0	0.5780±0.1063	0.1326±0.347	0.9794

#### 5.6.2.1.4. Precisión del método

Los coeficientes de variación obtenidos para las respuestas de los analitos a tres niveles de concentración (tabla 5.30), fueron menores al 5 %, por lo que es posible decir que el método de análisis presenta buena precisión evaluada como repetibilidad, ya que se cumple el criterio establecido en las guías de apoyo, el cual dice que la variabilidad debe de ser menor al 15 % para un intervalo de concentraciones de 0.1 a 100 mg/kg.

**Tabla 5.30. Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaP. Evaluación del método con DMFS y preconcentración en línea (n=6).**

Concentración (ng/mg de biomasa)	CV %		
	9,10-dihidrodiol	4,5-dihidrodiol	7,8-dihidrodiol
12.0	3.485	3.570	3.982
6.0	3.078	2.886	4.574
2.8	3.236	3.485	3.284

#### 5.6.2.1.5. Recuperación del método

El porcentaje de recuperación del método de análisis, que se obtuvo por la comparación de la respuesta del extracto proveniente de la biomasa preconcentrado contra la respuesta de una disolución estándar preconcentrada, resultó tener valores comprendidos entre 61.0 y 77.0 %. Los recobros correspondientes a los tres niveles de concentración del 9,10-dihidrodiol cumplen con la especificación establecida en las guías de apoyo, en donde se plantea que el porcentaje de recuperación del método debe de estar comprendido entre 70 y 110 %, mientras que los recobros obtenidos para el 4,5-dihidrodiol y para el 7,8-dihidrodiol son menores y no cumplen con el criterio establecido. Esto debido a que la proporción del eluyente (40 % MeCN) y el volumen utilizado (1.5 mL),

no son los adecuados para extraer una mayor cantidad de los analitos. No obstante, estos parámetros no se maximizaron porque en pruebas anteriores se observó que a una mayor proporción de MeCN se presentaba elución de los HAPs junto con los metabolitos, lo que interferiría en el análisis cromatográfico de estos últimos.

Sin embargo, a pesar de que los recobros mencionados anteriormente, no cumplen con la especificación, es importante mencionar que son lo suficientemente altos para cumplir con el objetivo del método de análisis de trazas, lo cual se ve reflejado en los límites de detección y cuantificación, además de que al tener una buena repetibilidad se asegura que la variación entre determinaciones es pequeña.

**Tabla 5.31. Porcentajes de recuperación para los metabolitos del BaP comparando la respuesta de una disolución estándar preconcentrada contra la respuesta obtenida por la preconcentración de un extracto de DMFS proveniente de la biomasa.**

Metabolito	Cantidad adicionada (µg)	Concentración de la disolución estándar a preconcentrar (ng/mL)	Concentración fortificada en la biomasa (ng/mg)	% Recobro
9,10-dihidrodiol	0.020	2.0	4.0	76.59
	0.016	1.6	3.2	72.93
	0.012	1.2	2.4	73.05
4,5-dihidrodiol	0.020	2.0	4.0	68.52
	0.016	1.6	3.2	68.32
	0.012	1.2	2.4	66.16
7,8-dihidrodiol	0.020	2.0	4.0	61.45
	0.016	1.6	3.2	61.09
	0.012	1.2	2.4	63.89

### 5.6.2.2. Metabolitos del BaA

#### 5.6.2.2.1. Selectividad del método

De la misma forma que para el método de análisis de los metabolitos del BaP, se preconcentró un extracto obtenido por DMFS proveniente de la biomasa para observar posibles interferentes provenientes de la matriz.

En las figuras 5.14 y 5.15 se muestran los cromatogramas obtenidos del blanco y del extracto fortificado respectivamente. Se observa que no existe presencia de interferentes en los tiempos a los que se obtienen las señales provenientes de los analitos, por lo que el método resultó selectivo.

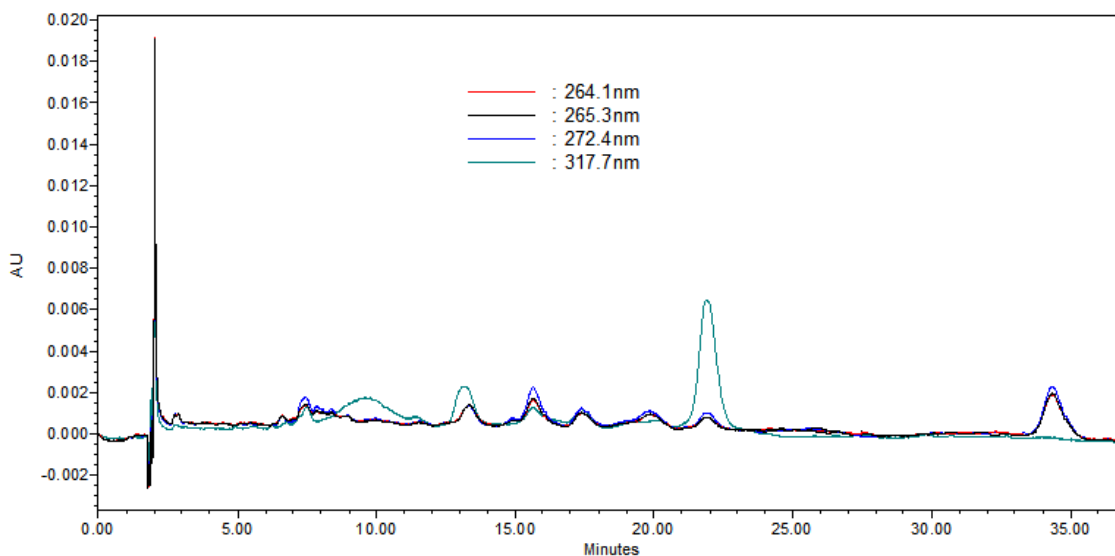


Figura 5.14. Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido al preconcentrar un blanco de biomasa preparado por DMFS. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 50:50 (15 min), 50:50 – 55:45 (15 min), 55:45 (7 min); Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 x 4.6 mm T Columna: 30 °C; Flujo: 1 mL/min; Vol. de preconcentración: 6 mL.

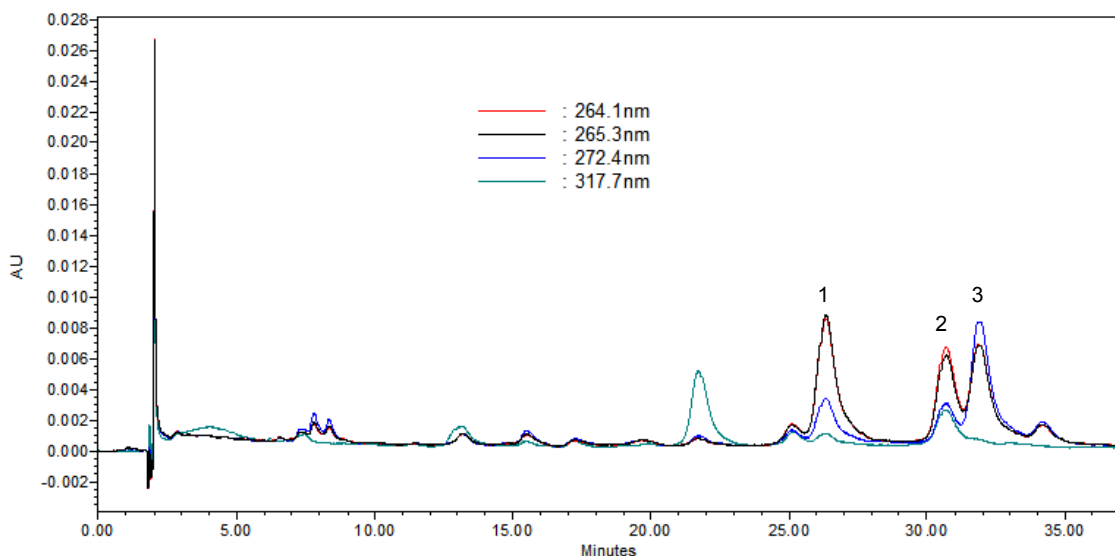


Figura 5.15. Cromatograma a diferentes longitudes de onda obtenido de la preconcentración del extracto resultante de una DMFS de la biomasa adicionada con los metabolitos del BaA (16 ng/mg de biomasa). 1) 5,6-dihidrodiol, 2) 8,9-dihidrodiol, 3) 10,11-dihidrodiol. Condiciones cromatográficas: Fase móvil: Gradiente MeOH:agua: 50:50 (15 min), 50:50 – 55:45 (15 min), 55:45 (7 min); Columna: Nucleosil C<sub>18</sub>, Macherey-Nagel, 100 Å, 5 µm, 150 x 4.6 mm; T Columna: 30 °C; Flujo: 1 mL/min; Vol. de preconcentración: 6 mL.

### 5.6.2.2.2. Límite de detección y cuantificación

Los valores del límite de detección y cuantificación se presentan en la tabla 5.32. Se puede notar que las concentraciones referentes a estos límites son menores a 1.6 ng/mg de biomasa, excepto para el 8,9-dihidrodiol a la longitud de onda de 317.7 nm, en donde son menores a 2.4 ng/mg de biomasa. Estos límites son lo suficientemente bajos para cumplir con el objetivo de poder identificar y cuantificar los metabolitos producidos por la biodegradación del BaA.

Tabla 5.32. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) experimentales para los metabolitos del BaA con DMFS y preconcentración en línea.

Metabolito	LD <sub>exp</sub> (ng/mg de biomasa)	LC <sub>exp</sub> (ng/mg de biomasa)
5,6-dihidrodiol	0.8	1.6
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	0.8	1.6
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	1.6	2.4
10,11-dihidrodiol	0.8	1.6

### 5.6.2.2.3. Linealidad del método

El método de análisis resultó ser lineal en un intervalo de concentraciones de 2.4 a 80 ng/mg de biomasa. Esto debido a que en el análisis estadístico se obtuvieron valores P menores al error establecido del 5 %. Además de que los coeficientes de correlación obtenidos por el método de mínimos cuadrados para la regresión lineal fueron mayores a 0.996, lo que cumple con la especificación marcada en las guías de apoyo. Los parámetros de la regresión lineal aplicada a las curvas de calibración de los metabolitos se muestran en la tabla 5.33.

Tabla 5.33. Parámetros obtenidos en la linealidad del método (respuesta vs concentración) para los metabolitos del BaA con DMFS y preconcentración en línea.

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mg de biomasa)	Pendiente	Ordenada al origen	r
5,6-dihidrodiol	2.4 – 80.0	19553.9	18788.1	0.9975
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	2.4 – 80.0	20938.3	16097.2	0.9967
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	2.4 – 80.0	11082.4	-10967.3	0.9990
10,11-dihidrodiol	2.4 – 80.0	23258.0	-8426.21	0.9973



Por otra parte, en la tabla 5.34 se presentan los parámetros obtenidos de la relación concentración recuperada vs concentración adicionada, en donde la pendiente corresponde al recobro global obtenido en el método y el coeficiente de correlación indica que este recobro es prácticamente constante al intervalo de concentraciones evaluadas.

**Tabla 5.34. Parámetros obtenidos en la linealidad del método (concentración recuperada vs concentración adicionada) para los metabolitos del BaA con DMFS y preconcentración en línea.**

Metabolitos	Intervalo de concentración (ng/mg de biomasa)	Pendiente	Ordenada al origen	r
<b>5,6-dihidrodiol</b>	2.4 – 80.0	0.7795±0.0731	-0.1547±0.239	0.9945
<b>8,9-dihidrodiol</b>	2.4 – 80.0	0.6924±0.0541	-0.0375±0.177	0.9962
<b>10,11-dihidrodiol</b>	2.4 – 80.0	0.6655±0.1089	-0.0211±0.355	0.9837

#### 5.6.2.2.4. Precisión del método

Como es posible observar en la tabla 5.35, los coeficientes de variación de las respuestas obtenidos a tres niveles de concentración para los metabolitos del BaA presentan valores inferiores al 6 %, lo cual cumple con lo establecido en las guías de apoyo para la validación del método de análisis, en donde se marca que el método debe tener una variación menor al 15 %, por lo que es posible afirmar que el método de análisis es repetible.

**Tabla 5.35. Valores de los coeficientes de variación obtenidos a los tres niveles de concentración para los metabolitos del BaA. Evaluación del método con DMFS y preconcentración en línea (n=6).**

Concentración (ng/mL de biomasa)	CV %			
	5,6-dihidrodiol	8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	10,11-dihidrodiol
<b>12.0</b>	4.749	5.395	3.659	4.184
<b>6.0</b>	1.836	2.411	2.803	3.413
<b>2.8</b>	4.386	3.487	4.895	1.926

#### 5.6.2.2.5. Recuperación del método

Los porcentajes de recuperación obtenidos para el método de análisis de los metabolitos del BaA con DMFS resultaron entre el 65 y el 76 %. Solo el recobro obtenido para el 5,6-dihidrodiol a ese intervalo de concentraciones cumple con el parámetro establecido en la guía de apoyo. Sin embargo, al igual que para el método de los metabolitos del BaP con DMFS como método de extracción, los porcentajes de recobro son suficientemente altos

para poder cumplir con el objetivo para lo que fue diseñado el método de análisis, identificar y cuantificar la producción de los metabolitos a causa de la biodegradación. Este bajo porcentaje se debe, entre otras cosas, a que la proporción del eluyente (40:60 MeCN-agua) no es lo suficientemente fuerte para poder desorber a los analitos de la sílice. No obstante en trabajos anteriores se escogió esta proporción de MeCN como eluyente, debido a que a proporciones más altas se presentaba fuga de los HAPs y estos interfieren en el análisis de los metabolitos.

**Tabla 5.36. Porcentajes de recuperación para los metabolitos del BaA comparando la respuesta de una disolución estándar preconcentrada contra la respuesta obtenida por la preconcentración de un extracto de DMFS proveniente de la biomasa.**

Metabolito	Cantidad adicionada ( $\mu\text{g}$ )	Concentración de la disolución estándar a preconcentrar ( $\text{ng/mL}$ )	Concentración fortificada en la biomasa ( $\text{ng/mg}$ )	% Recobro
5,6-dihidrodiol	0.020	2.0	4.0	73.31
	0.016	1.6	3.2	75.04
	0.012	1.2	2.4	70.21
8,9-dihidrodiol (264.1 nm)	0.020	2.0	4.0	68.14
	0.016	1.6	3.2	68.49
	0.012	1.2	2.4	67.40
8,9-dihidrodiol (317.7 nm)	0.020	2.0	4.0	67.02
	0.016	1.6	3.2	68.89
	0.012	1.2	2.4	69.63
10,11-dihidrodiol	0.020	2.0	4.0	65.65
	0.016	1.6	3.2	66.81
	0.012	1.2	2.4	65.05

## 5.7. Ensayos de exposición del alga *Selenastrum capricornutum* con los HAPs

Como se mencionó en el punto 4.9 referente a la metodología, los ensayos de exposición de la microalga con los HAPs se realizaron de manera individual, es decir, se expuso a *Selenastrum capricornutum* con el BaP y con el BaA por separado. Después de cada tiempo de exposición, el análisis de los metabolitos se realizó tanto en el medio de cultivo como en la biomasa.

### 5.7.1. Exposición al BaP

En las figuras 5.16, 5.17 y 5.18 se puede observar la evolución de las señales obtenidas de los extractos preconcentrados provenientes del medio líquido y de la biomasa a los

distintos tiempos de monitoreo y a las longitudes de onda de máxima absorbancia de los metabolitos estudiados. Para el caso del medio de cultivo líquido, se notaron señales a los tiempos de retención correspondientes al 9,10, 4,5 y 7,8-dihidrodiol, las cuales aumentan o disminuyen según los tiempos de exposición. Al obtener los espectros de absorción de estos picos cromatográficos y compararlos con los obtenidos para los estándares en medio de cultivo fortificado (figura 5.19), se observó una gran similitud, lo cual permite aseverar la presencia de los metabolitos estudiados y, por lo tanto, afirmar que los tres dihidrodioles se forman por la biodegradación del BaP por *Selenastrum capricornutum*.

Estos resultados complementan a los obtenidos por Lindquist y Warshawsky en 1985, donde se encontró la formación del 9,10-dihidrodiol y del 11,12-dihidrodiol como metabolitos principales de la degradación del BaP en un tiempo de 4 días. Por otra parte es posible observar la presencia de, al menos, tres señales más que evolucionan en función de los tiempos de exposición, una con un tiempo de retención aproximado de 14 minutos (entre las señales correspondientes al 4,5 y 7,8-dihidrodiol, cuyos tiempos de retención son 13.01 y 14.4 minutos respectivamente) y las otras dos a los 7.8 y 8.6 minutos.

Debido a la falta de estándares para comparar las señales desconocidas, no fue posible identificar estos picos cromatográficos. No obstante se puede plantear que el pico obtenido a los 14 minutos de tiempo de corrida corresponde a la señal del 11,12-dihidrodiol del BaP, esto con base en el trabajo anteriormente mencionado (Lindquist y Warshawsky, 1985) en el cual se obtiene la señal de este metabolito entre las señales correspondientes al 4,5 y al 7,8-dihidrodiol. Las otras dos señales mencionadas, no fue posible identificarlas y no se sabe si son otros dihidrodioles, algún otro producto de degradación de los HAPs o algún producto del metabolismo del alga.

La evolución de las tres señales desconocidas se presenta en la figura 5.20, mientras que en la figura 5.21 se muestra el espectro de absorción extraído del tercer pico que posiblemente es el 11,12-dihidrodiol.

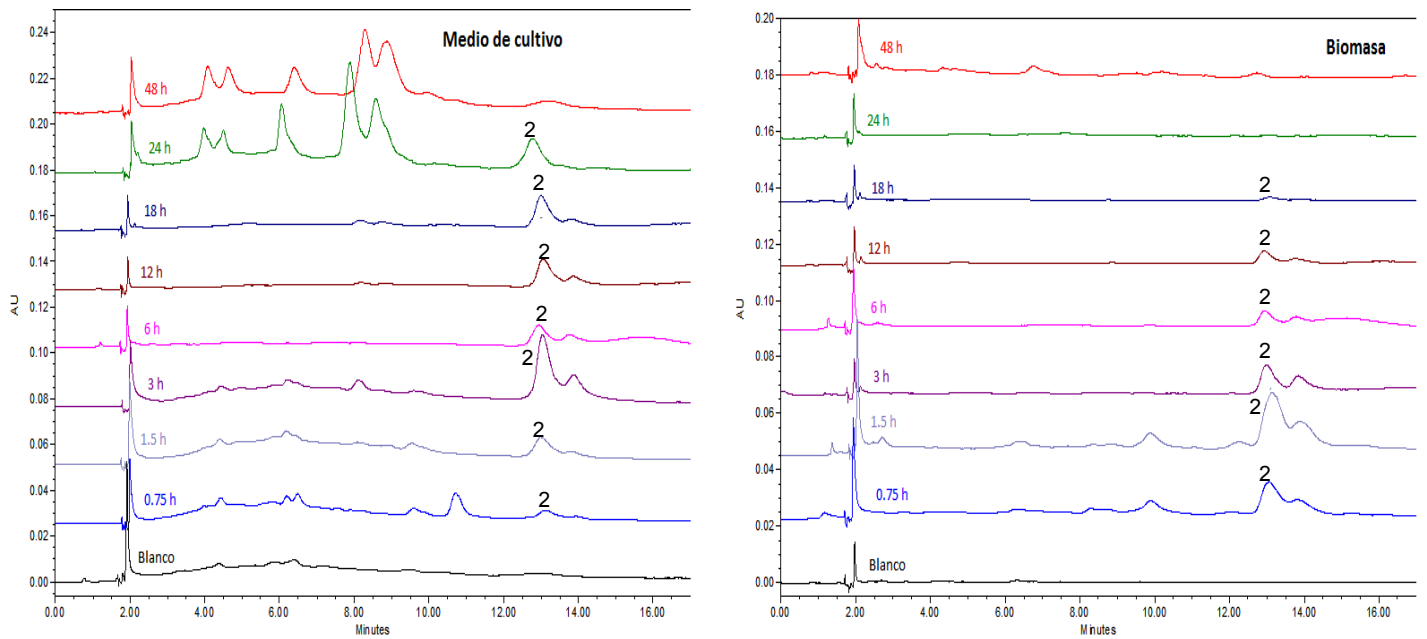


Figura 5.16. Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 4,5-dihidrodiol del BaP (2). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorción del metabolito mencionado (271.2 nm).

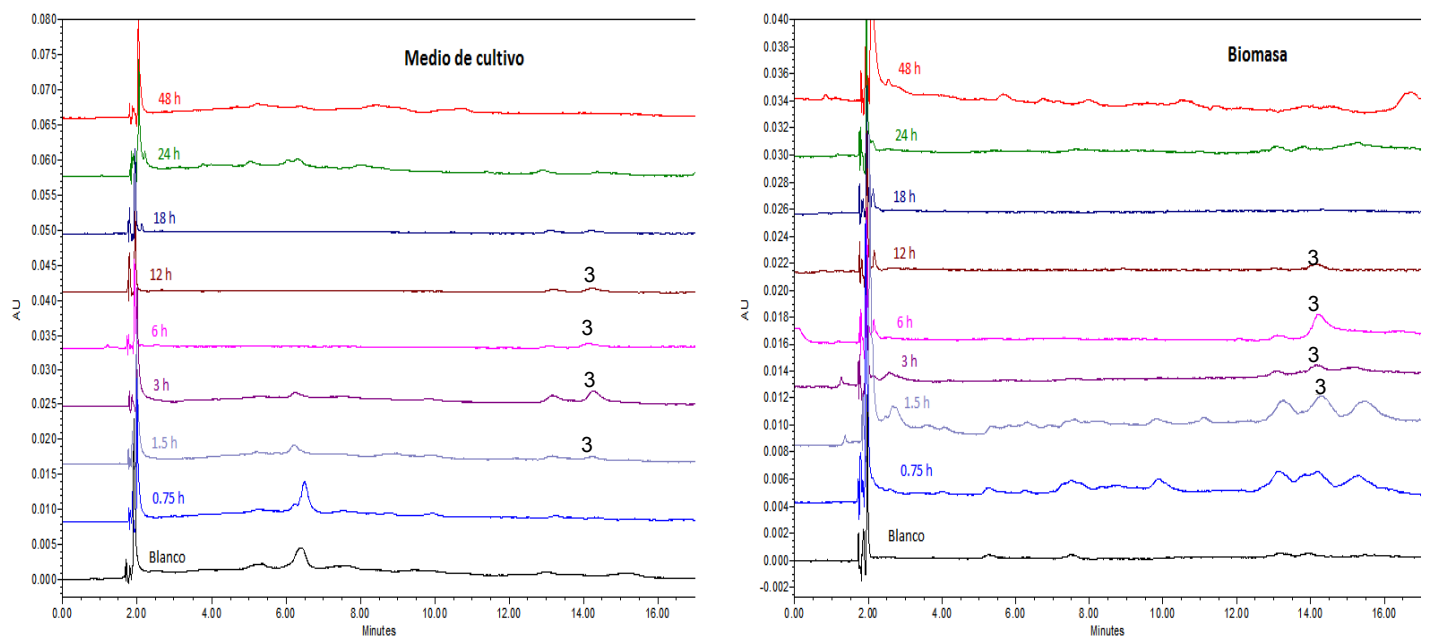


Figura 5.17. Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 7,8-dihidrodiol del BaP (3). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorción del metabolito mencionado (364.2 nm).

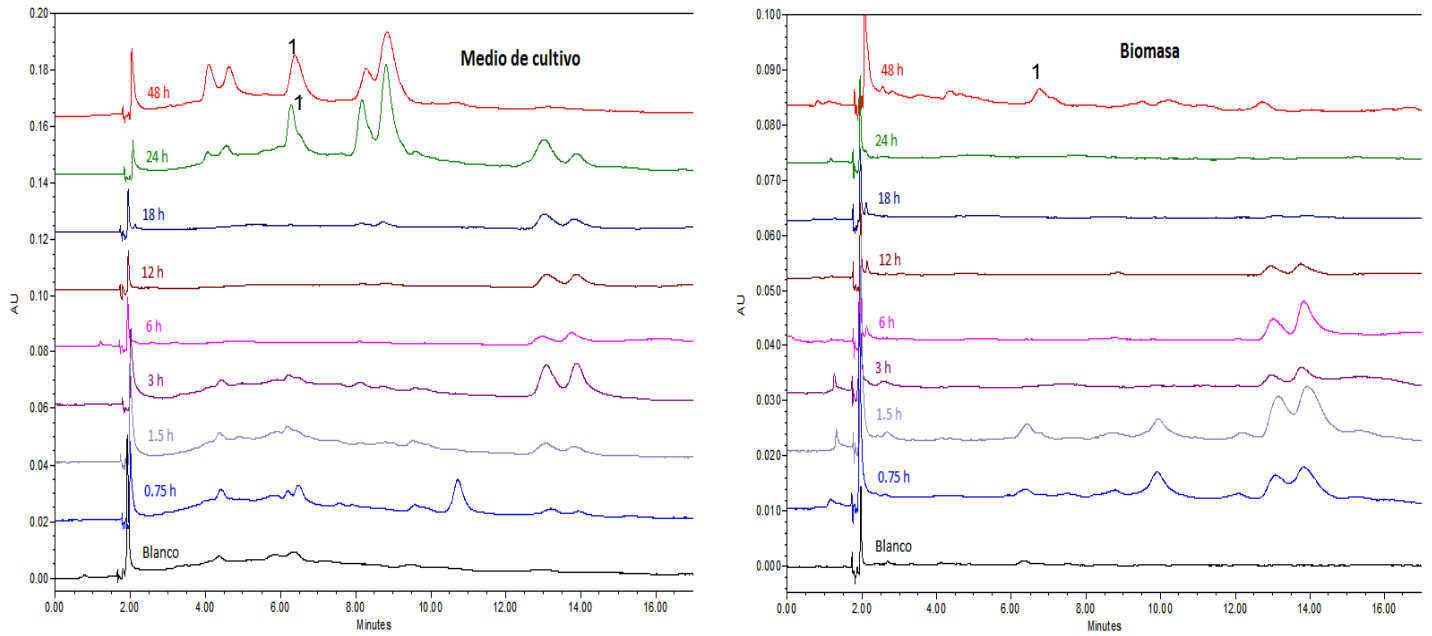


Figura 5.18. Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 9,10-dihidrodiol del BaP (1). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del metabolito mencionado (277.2 nm).

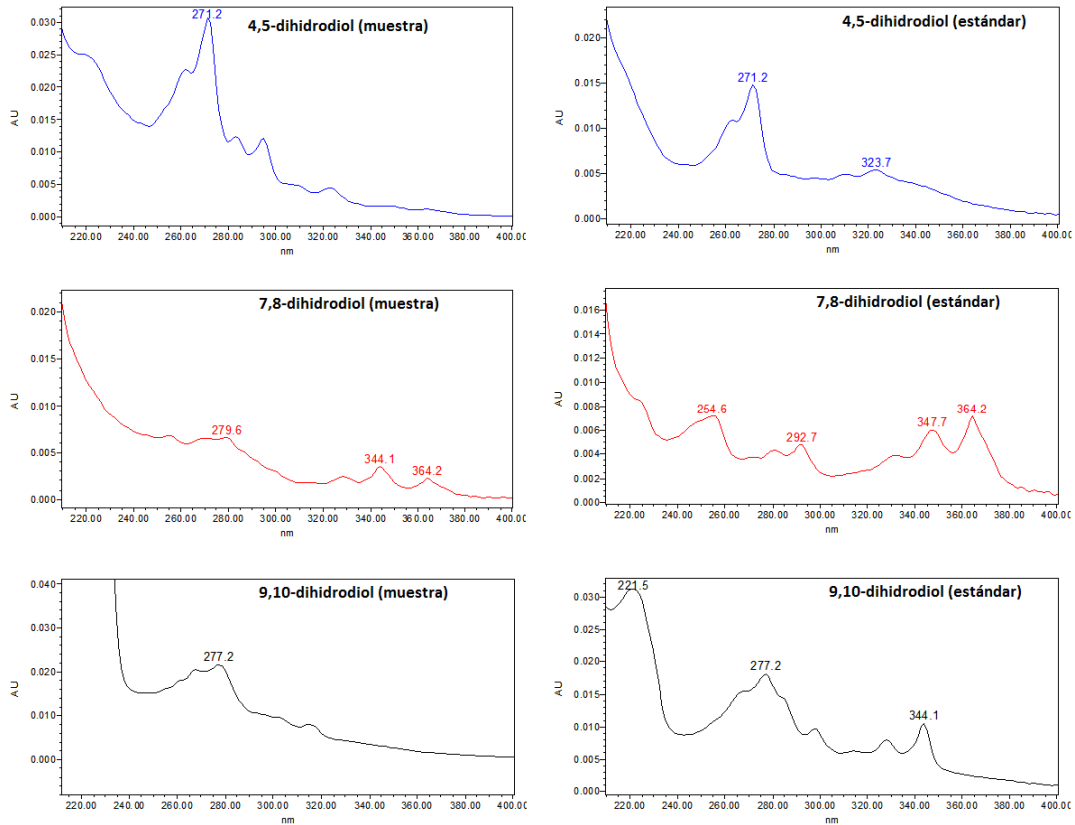


Figura 5.19. Comparación de los espectros de absorción extraídos de las señales obtenidas en el medio líquido para los ensayos de exposición del BaP, con los correspondientes a los estándares en medio de cultivo fortificado.

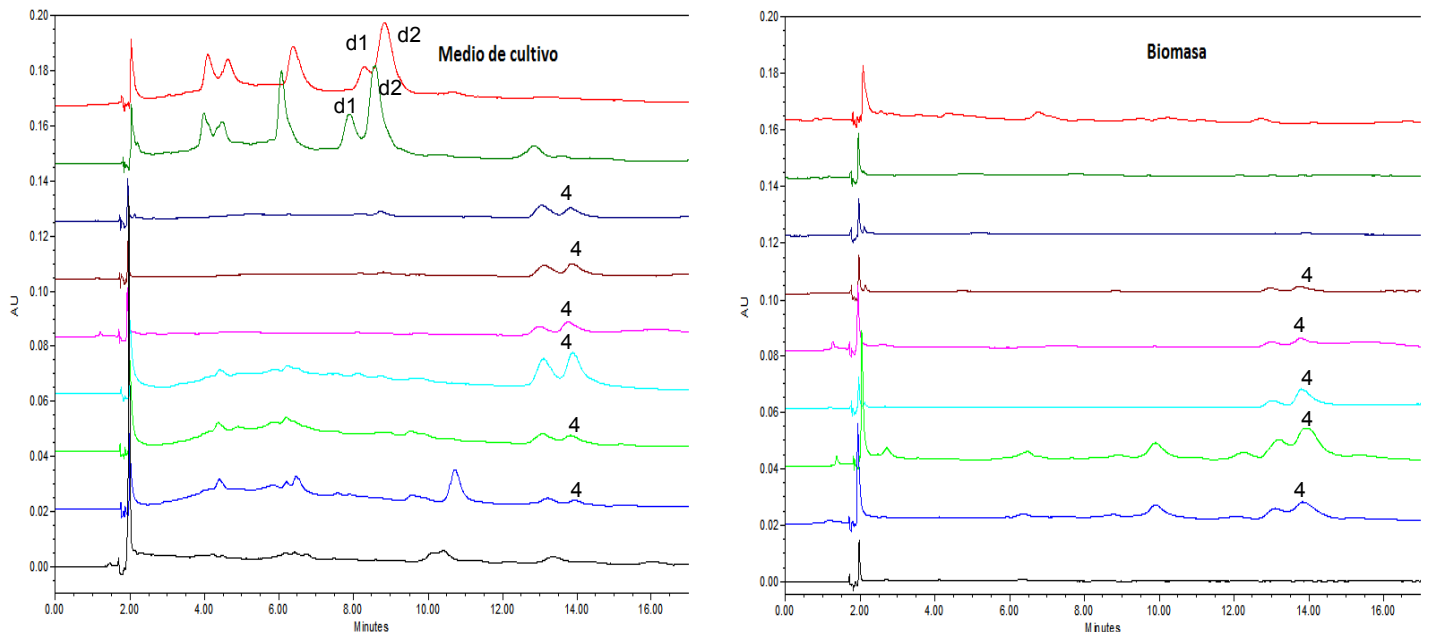


Figura 5.20. Evolución de las señales desconocidas en el medio de cultivo y en biomasa respecto al tiempo de exposición. (4) Posible 11,12-dihidrodiol, (d1) y (d2) Compuestos desconocidos. Cromatograma obtenido a una longitud de onda de 278.4 nm.

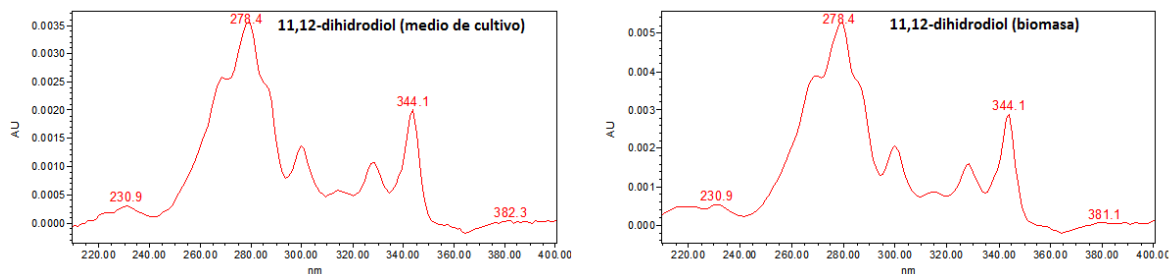


Figura 5.21. Espectros de absorción extraídos del pico, tanto en el medio de cultivo como en la biomasa, que posiblemente corresponde al 11,12-dihidrodiol del BaP.

De igual forma que en el análisis cromatográfico del medio líquido, el realizado en la biomasa presenta tres señales en los tiempos de retención correspondientes a los tres metabolitos estudiados. Al comparar los espectros de absorbancia de los tres picos cromatográficos con los obtenidos para los estándares en la biomasa fortificada, se observa una gran similitud entre ellos presentando los mismos máximos de absorbancia (figura 5.22), por lo que se puede decir que se formaron el 4,5, 7,8 y 9,10-dihidrodiol debido a la degradación del BaP por la microalga verde.

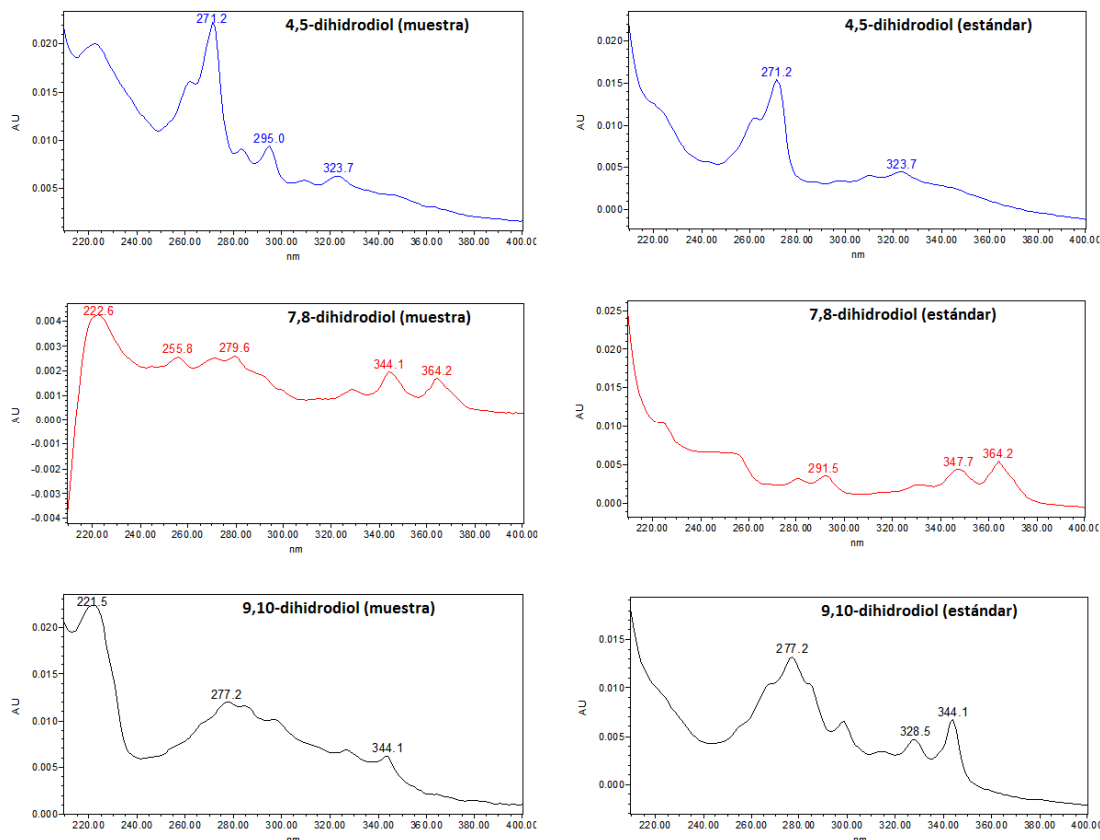


Figura 5.22. Comparación de los espectros de absorción extraídos de las señales obtenidas en la biomasa para los ensayos de exposición del BaP, con los correspondientes a los estándares en biomasa fortificada.

Así mismo, en la biomasa como en el medio se da la presencia del pico cromatográfico con tiempo de retención de 14 minutos, que como se había explicado anteriormente, podría deberse al 11,12-dihidrodiol. Por otro lado, en el análisis de la biomasa no se observan las otras dos señales, a los 7.8 y 8.6 minutos, que se presentan en el medio de cultivo, por lo que probablemente se traten de productos generados en el metabolismo celular de la microalga.

El comportamiento de la concentración de los metabolitos estudiados del BaP en el medio (gráfico 5.3) muestra que desde el primer tiempo de exposición (0.75 h) existe una biodegradación del hidrocarburo aromático policíclico por el alga *Selenastrum capricornutum*, debido a la presencia del 4,5-dihidrodiol, aunque en muy baja concentración. Este metabolito fue el primero que se detectó, iniciando en una concentración de 0.31 ng/mL de medio en un tiempo de exposición de 45 minutos, concentración que fue incrementando hasta alcanzar un máximo de 3.07 ng/mL de medio en un tiempo de exposición de 3 horas, para después disminuir a una concentración de

1.04 ng/mL de medio a las 48 horas de exposición. Un comportamiento similar se observó en el caso del 7,8-dihidrodiol, con la diferencia que este empezó a formarse a un tiempo de exposición de 1.5 horas a concentraciones más bajas que el 4,5-dihidrodiol, para llegar a un máximo de concentración de 0.59 ng/mL de medio a las 3 horas, la cual disminuyó hasta quedar por debajo del límite de detección correspondiente a este metabolito a partir de las 18 horas de exposición. Por otro lado, el 9,10-dihidrodiol empezó a formarse en tiempos de exposición del alga al HAP superiores a 18 horas, cuya concentración aumentó hasta 3.96 ng/mL de medio a las 48 horas de exposición, concentración que resultó ser mayor que la concentración máxima formada para el 4,5 y 7,8-dihidrodiol. Para el 9,10-dihidrodiol no fue posible observar si presentaba una disminución en su concentración, igual que para los otros metabolitos, debido a los tiempos de exposición con los que se trabajó.

La preferencia en la formación del 4,5 y del 7,8-dihidrodiol en la biodegradación del BaP puede explicarse mediante el impedimento estérico. Estas posiciones están menos impedidas que las utilizadas para formar el 9,10-dihidrodiol (tabla 3.3), ya que para este último se da la adición de los grupos funcionales en la zona del HAP denominado “bahía”, en la cual se encuentra una mayor densidad electrónica, debido a la presencia de una gran cantidad de enlaces dobles C-C. Sin embargo, este último es el que se termina formando a una mayor concentración conforme pasa el tiempo, debido a una posible estabilidad del metabolito.

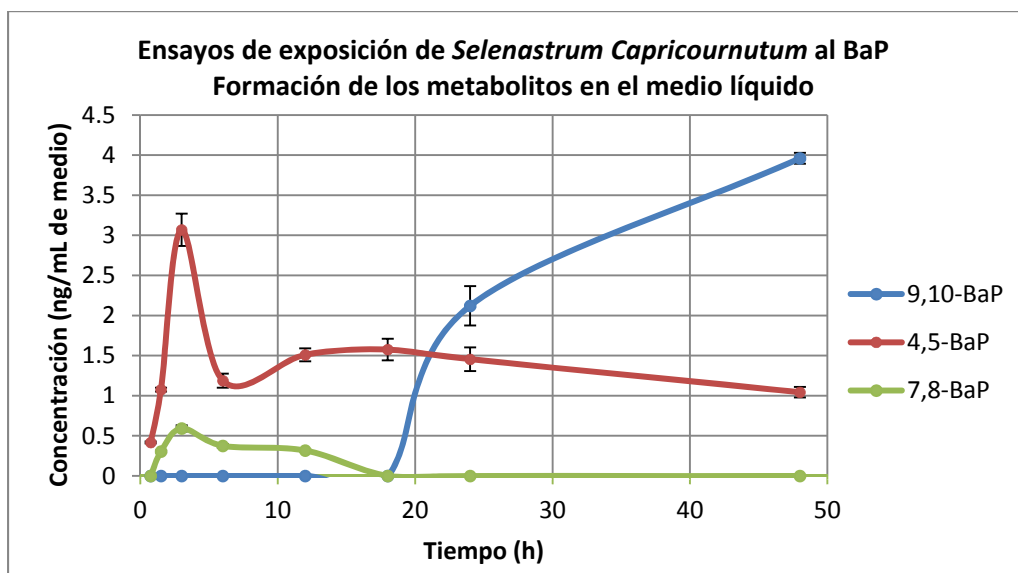


Gráfico 5.3. Formación de los metabolitos del BaP en el medio de cultivo como función del tiempo de exposición.



Para el caso de la biomasa (interior de la célula), la formación de metabolitos se dio en el mismo orden, lo cual es lógico, ya que los metabolitos encontrados en el medio de cultivo provienen de la excreción celular. Se pudo observar la presencia del 4,5 y del 7,8-dihidrodiol a los primeros tiempos de exposición (0.75 h), diferenciando solo en el tiempo en el que se alcanza la máxima concentración formada, teniendo para el primer metabolito un tiempo de 1.5 horas con una concentración de 13.08 ng/mg de biomasa, mientras que para el segundo un tiempo de 6 horas con una concentración máxima de 2.72 ng/mg de biomasa (gráfico 5.4). Estos dos metabolitos presentaron el mismo comportamiento que en el medio líquido, su concentración aumentó hasta llegar a un máximo para después disminuir. Para el 9,10-dihidrodiol, al igual que en el medio, no se detectó en los primeros tiempos de exposición, sino hasta después de las 24 horas, aumentando su concentración a partir de este tiempo. La concentración máxima de éste fue de 3.13 ng/mg, siendo en este caso, menor que la concentración máxima del 4,5-dihidrodiol, pero mayor a la del 7,8-dihidrodiol. No fue posible identificar un comportamiento para el 9,10-dihidrodiol, debido a los tiempos de exposición máximos evaluados.

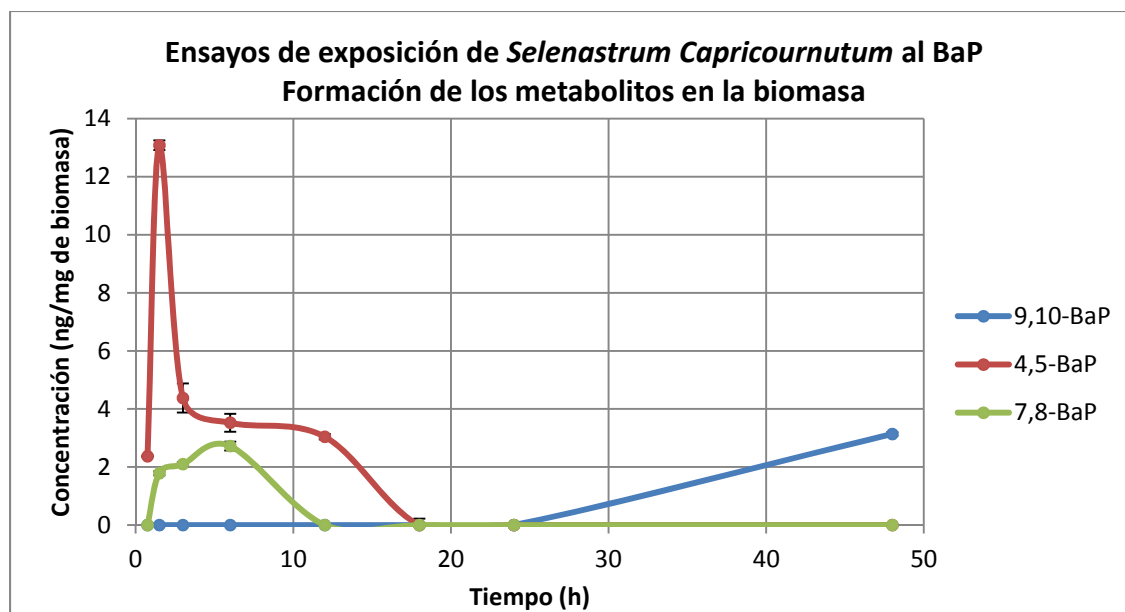
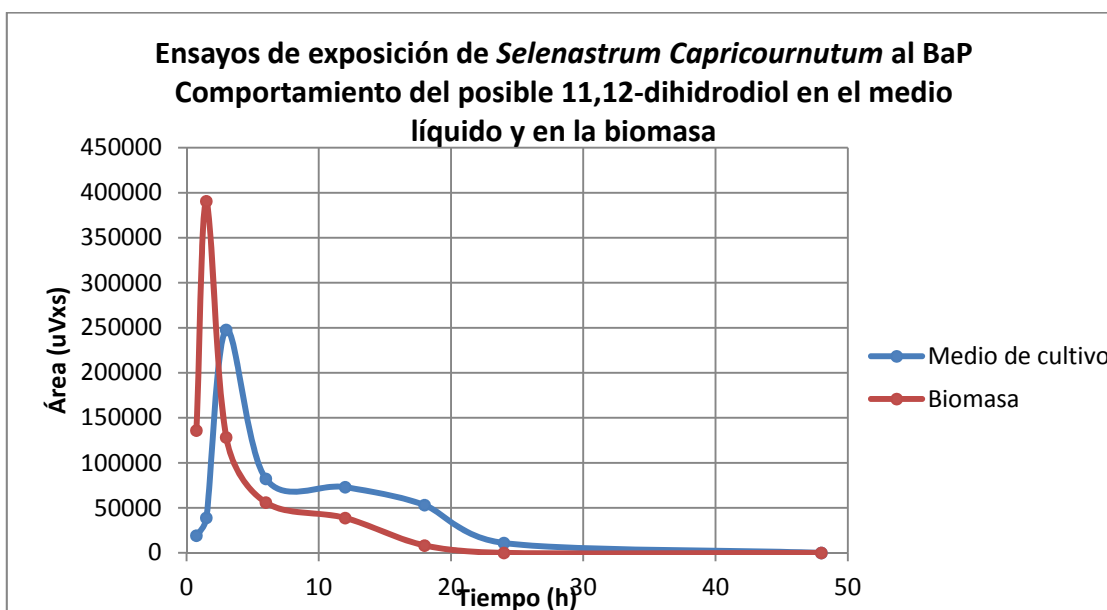


Gráfico 5.4. Formación de los metabolitos del BaP en la biomasa como función del tiempo de exposición.

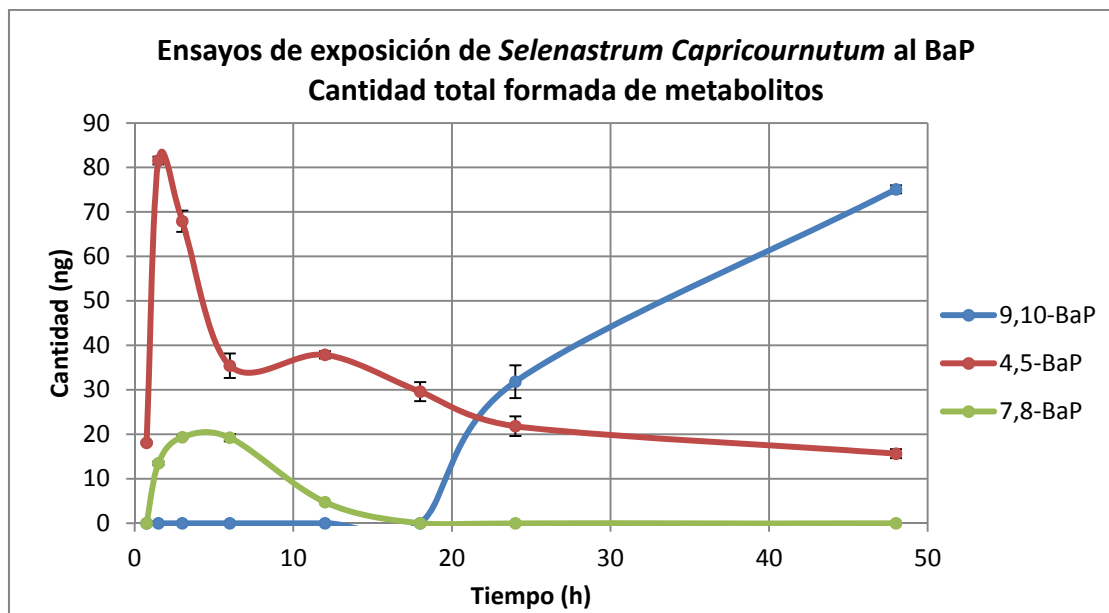
La variación de la señal obtenida del posible 11,12-dihidrodiol del BaP respecto al tiempo, tanto en el medio de cultivo como en la biomasa se presenta en el gráfico 5.5. Para éste

se observó un comportamiento similar al visto en el 4,5 y 7,8-dihidrodiol, en el cual se alcanza un máximo de formación a un tiempo de 3 horas para el medio de cultivo y de 1.5 horas para la biomasa. En tiempos de exposición superiores a los mencionados, la respuesta del metabolito disminuyó, lo que indica un decremento en la concentración formada.



**Gráfico 5.5. Comportamiento del posible 11,12-dihidrodiol en medio de cultivo y biomasa.**

Al contemplar la cantidad total formada de cada metabolito (suma de la cantidad encontrada en el medio de cultivo y de la cantidad proveniente de la biomasa), mostrada en el gráfico 5.6, se observó que el comportamiento de los metabolitos sigue la misma tendencia que en el medio y la biomasa. Para el 4,5 y 7,8-dihidrodiol se presentó un máximo de cantidad de 82 y 19 ng a un tiempo de exposición de 1.5 y 3 horas respectivamente, la cual disminuyó después de dichos tiempos. En cambio la cantidad del 9,10-dihidrodiol aumentó a partir de las 18 horas de exposición alcanzando un valor de 75 ng a las 48 horas de exposición. Este análisis de cantidades totales muestra que el metabolito formado primeramente es el 4,5-dihidrodiol, aunque no es posible aseverar que se formó en las cantidades más altas, ya que los tiempos de exposición evaluados no fueron lo suficientemente largos para observar si la cantidad obtenida del 9,10-dihidrodiol es la cantidad máxima o siguió aumentando.



**Gráfico 5.6.** Cantidad total de los metabolitos formados por la biodegradación del BaP como función del tiempo de exposición.

Debido a que los dihidrodioles estudiados son isómeros y a que el peso molecular que presentan es el mismo, es posible sumar las cantidades totales formadas de cada uno. Con esto se obtiene una cantidad neta de compuestos de degradación formados. La cantidad neta en función del tiempo se presenta en el gráfico 5.7, en el cual se puede observar que no existe un comportamiento definido. Primero se da un aumento en la formación de los compuestos de degradación hasta llegar a un máximo de 95 ng a un tiempo de exposición de 1.5 horas, cantidad que disminuye hasta las 18 horas, para después aumentar y alcanzar una cantidad neta de productos de degradación de 91 ng en 48 horas. Este comportamiento indefinido puede atribuirse a que no se está considerando la cantidad formada del 11,12-dihidrodiol, que, como se ha comentado, es posible que se encuentre presente.

Considerando la cantidad máxima neta de las especies de degradación del BaP (95 ng), la cual se da a un tiempo de exposición de 1.5 horas (gráfico 5.7) y, considerando que el peso molecular de los dihidrodioles del BaP es el mismo (286.33 g/mol) debido a que son isómeros, es posible calcular la cantidad neta de moles formados a partir del HAP, los cuales son  $3.32 \times 10^{-10}$  moles. Si se compara esta cantidad de moles con los moles iniciales del BaP en el ensayo de exposición ( $1.67 \times 10^{-8}$  moles), obtenidos a partir de la cantidad inicial de BaP (4.220  $\mu\text{g}$ ) y de su peso molecular (252.3 g/mol), es posible

obtener el porcentaje de metabolitos formados, referido a la cantidad de HAP. El porcentaje resultante es de 1.99 %. Sin embargo; este valor no es indicativo de la cantidad degradada de BaP a este tiempo de exposición, la cual resulta ser mayor (Olmos-Espejel et al, 2013), ya que es posible que se presente alguna degradación de los metabolitos formados, ya sea por sustancias presentes en el medio, en la composición atmosférica o por el alga verde, debido a que estos compuestos tienden a ser más reactivos, lo que se ve reflejado en la disminución de la cantidad total formada de cada analito en función del tiempo.

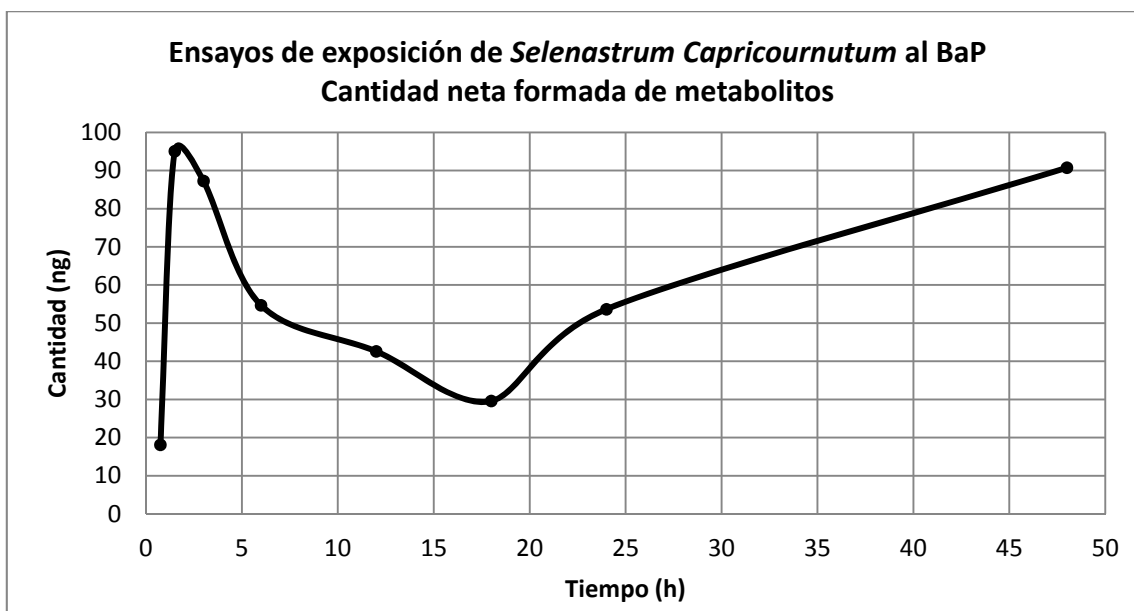


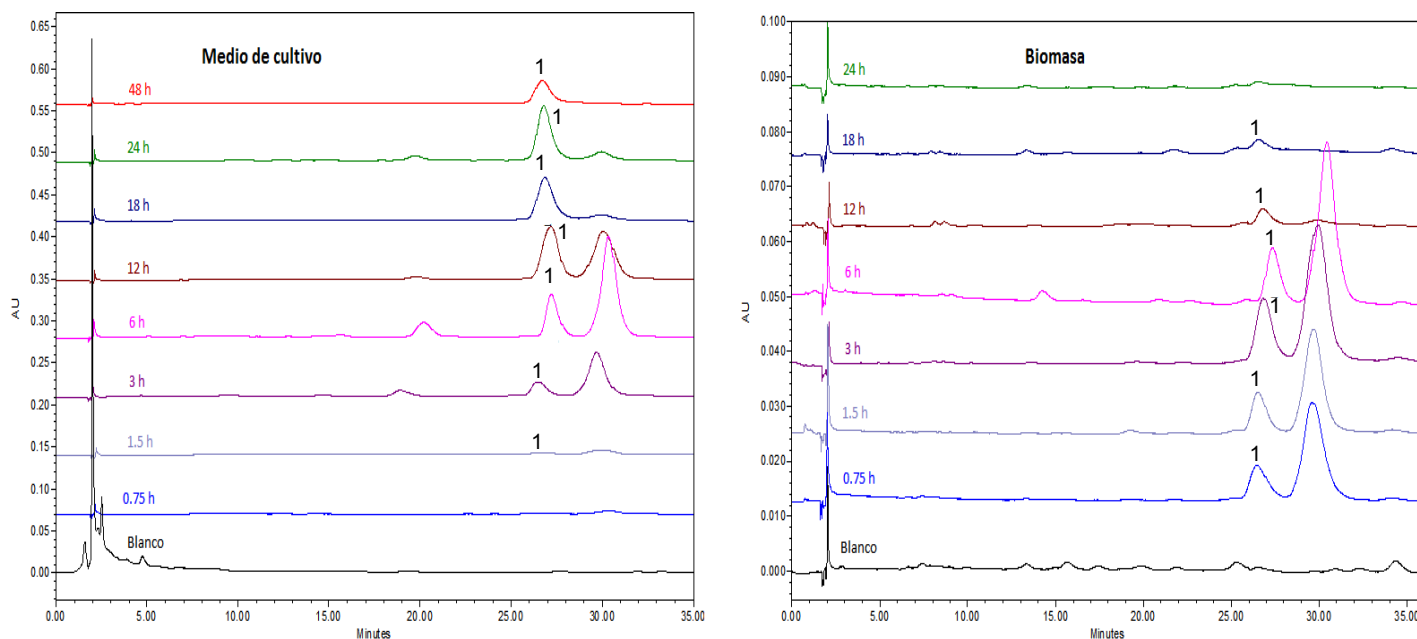
Gráfico 5.7. Cantidad neta formada de los productos producidos por la biodegradación del BaP como función del tiempo de exposición.

### 5.7.2. Exposición al BaA.

En el caso del BaA, para los extractos obtenidos del medio de cultivo se observaron dos señales en los tiempos de retención característicos del 5,6 y 10,11-dihidrodiol a las longitudes de onda de máxima absorbancia de los metabolitos estudiados (265.3, 264.1 y 272.4 nm), como se muestra en las figuras 5.23, 5.24 y 5.25, en las que se presenta la evolución de las señales en función del tiempo de retención tanto en el medio de cultivo como en la biomasa y donde no se notó la presencia de una señal correspondiente al 8,9-dihidrodiol. Sin embargo, al obtener el cromatograma a la longitud de onda de 317.7 nm (figura 5.26), en la cual no se obtiene una respuesta del 10,11-dihidrodiol, debido a que no

presenta absorbancia a esa longitud de onda, fue posible observar un pico cromatográfico situado a un tiempo de retención que coincide con el tiempo de retención característico del 8,9-dihidrodiol (29.5 minutos).

Para confirmar que las señales que se obtuvieron correspondieran a los metabolitos estudiados, se compararon sus espectros de absorción con los obtenidos para los estándares adicionados al medio de cultivo y a la biomasa. Esta comparación se presenta en las figuras 5.27 y 5.28, en las cuales se observa que existe una gran similitud entre ellos, lo que permite aseverar la formación de los metabolitos estudiados por la degradación del BaA. La ausencia del pico correspondiente al 8,9-dihidrodiol en los cromatogramas obtenidos a las longitudes de onda de máxima absorbancia se debe a que la producción del 10,11-dihidrodiol es mayor que la del 8,9-dihidrodiol, lo que provoca un traslape de la señal del primero con la del segundo, impidiendo que esta última sea visible.



**Figura 5.23. Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 5,6-dihidrodiol del BaA (1). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del metabolito mencionado (265.3 nm).**

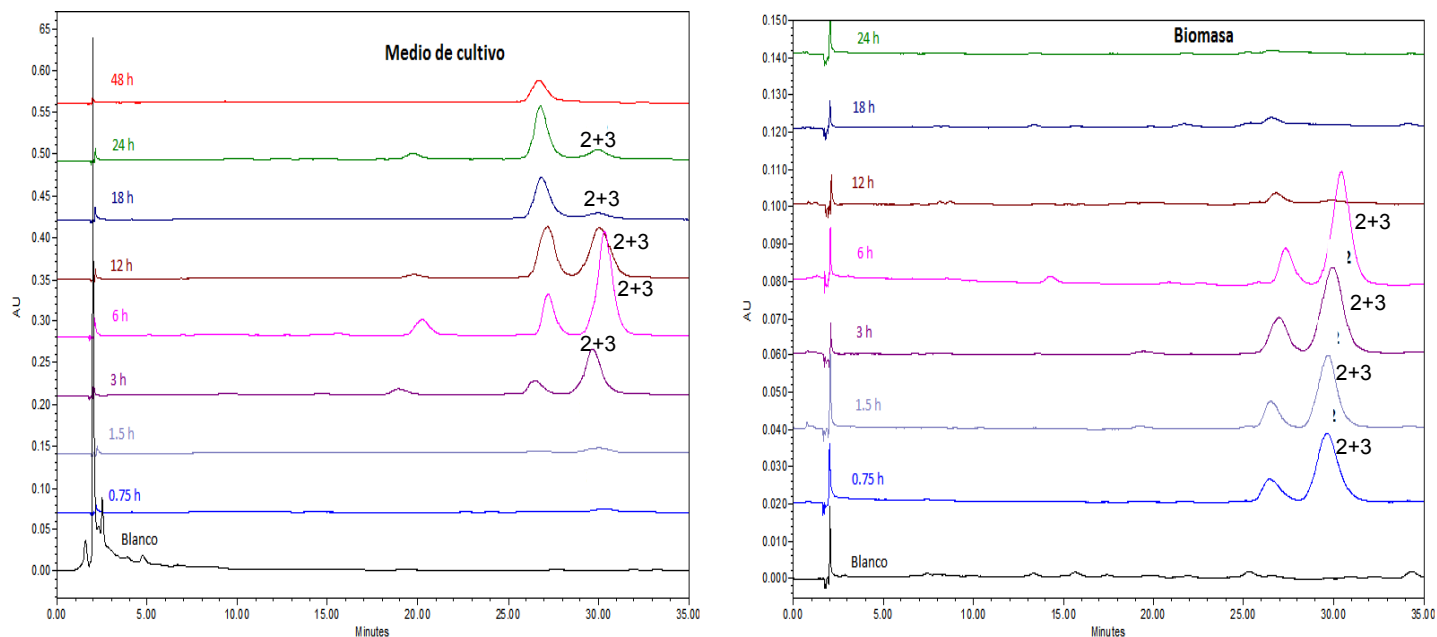


Figura 5.24. Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en la biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 8,9 (2) y del 10,11-dihidrodiol del BaA (3). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del 8,9-dihidrodiol (264.1 nm).

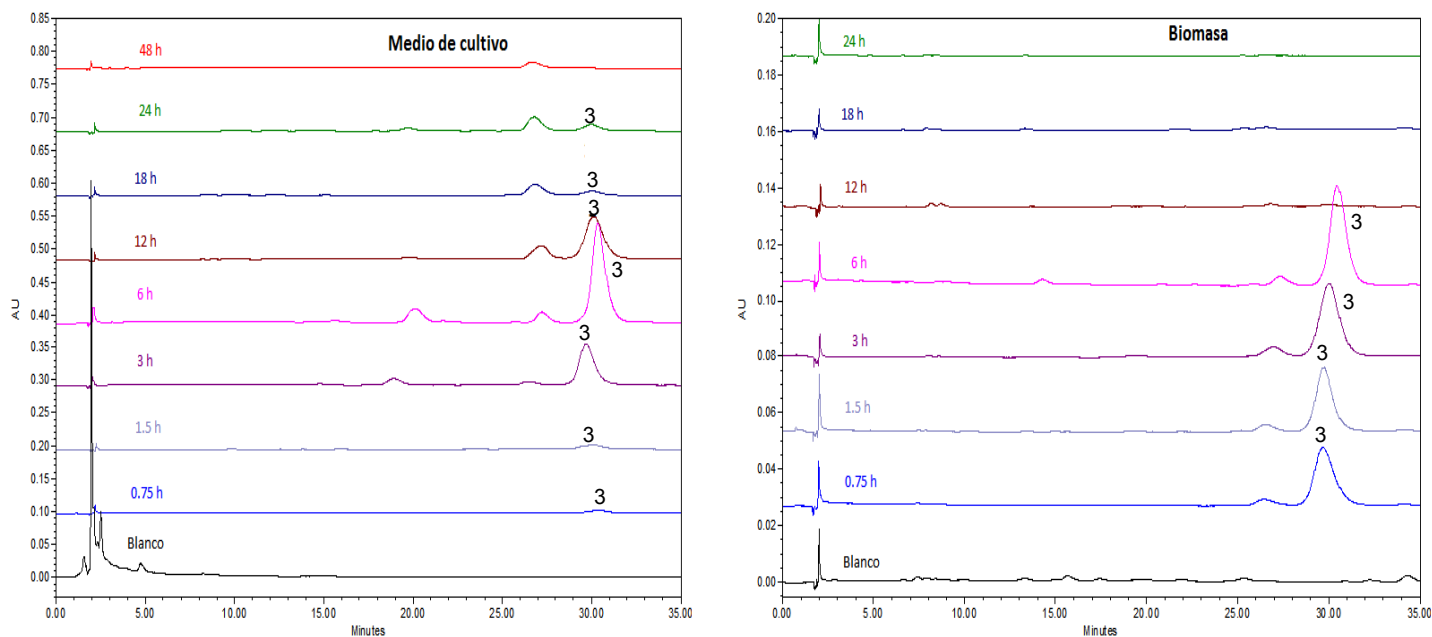


Figura 5.25. Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en la biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 10,11-dihidrodiol del BaA (3). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorbancia del metabolito mencionado (272.4 nm).

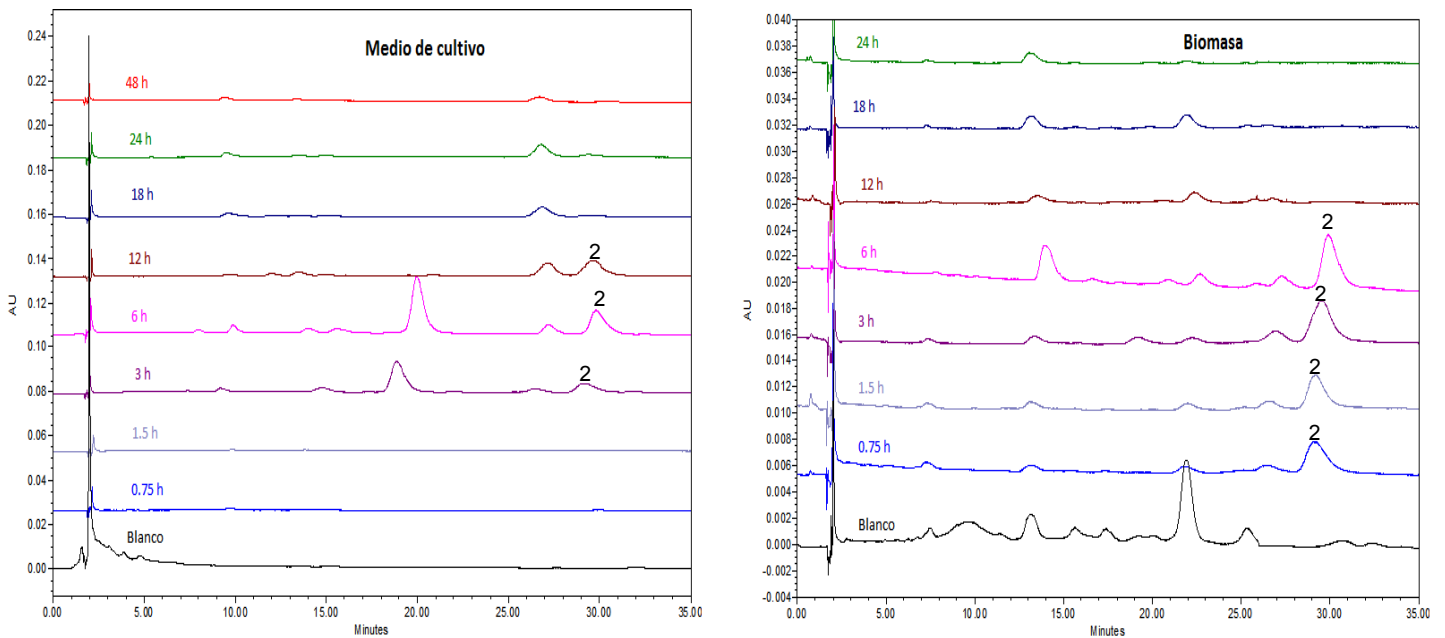


Figura 5.26. Evolución de la señal encontrada en el medio de cultivo y en la biomasa respecto al tiempo de exposición, cuyo tiempo de retención es igual al característico del 8,9-dihidrodiol del BaA (2). Cromatograma obtenido a la longitud de máxima absorción del metabolito mencionado (317.7 nm).

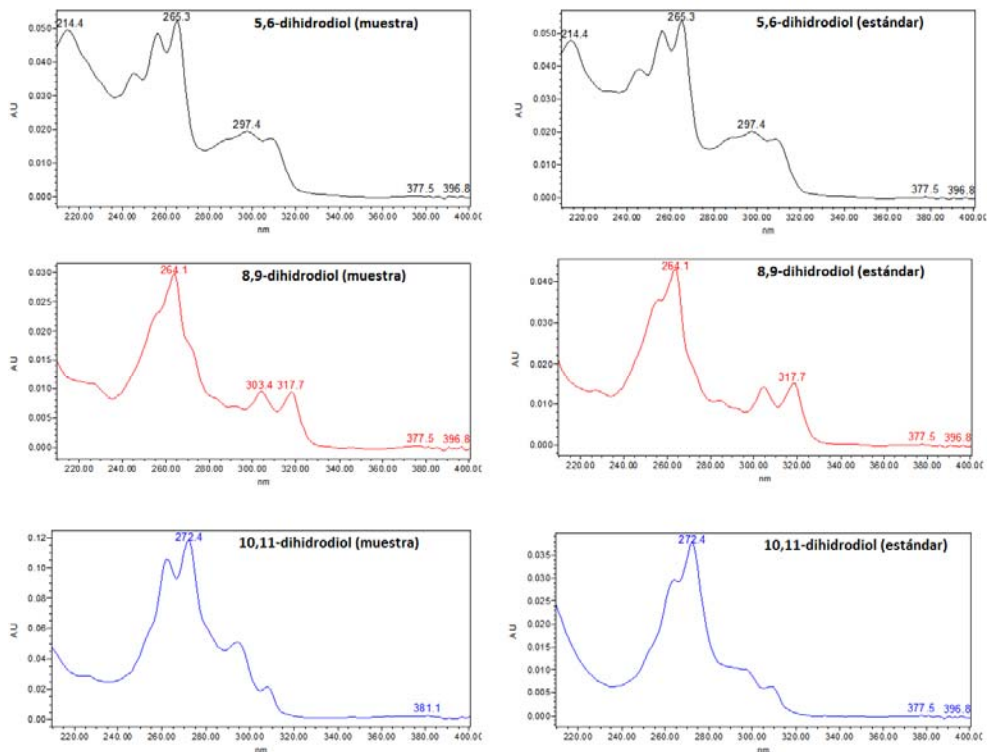
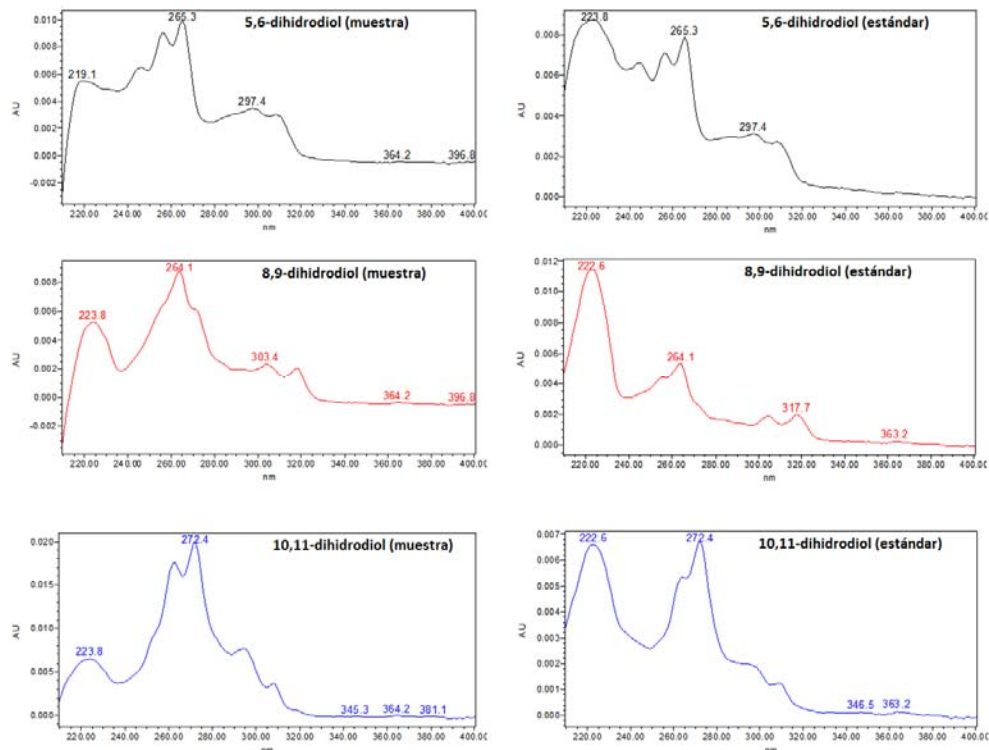


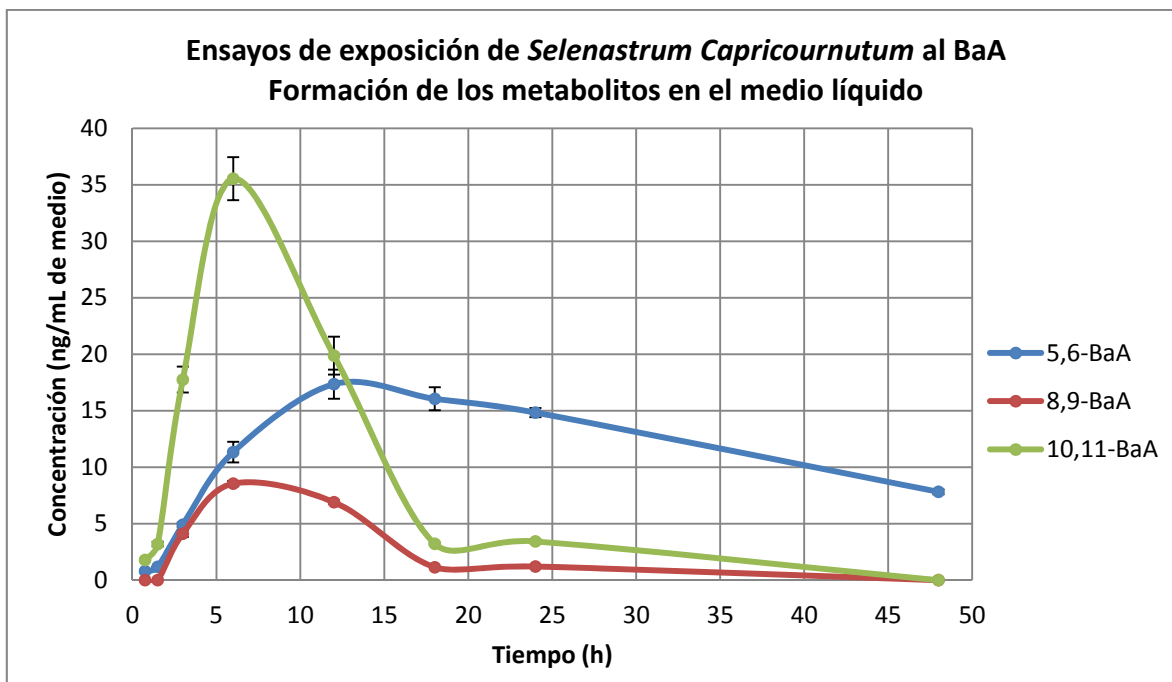
Figura 5.27. Comparación de los espectros de absorción extraídos de las señales obtenidas en el medio líquido para los ensayos de exposición del BaA, con los correspondientes a los estándares en medio de cultivo fortificado.



**Figura 5.28. Comparación de los espectros de absorción extraídos de las señales obtenidas en la biomasa para los ensayos de exposición del BaA, con los correspondientes a los estándares en medio de cultivo fortificado.**

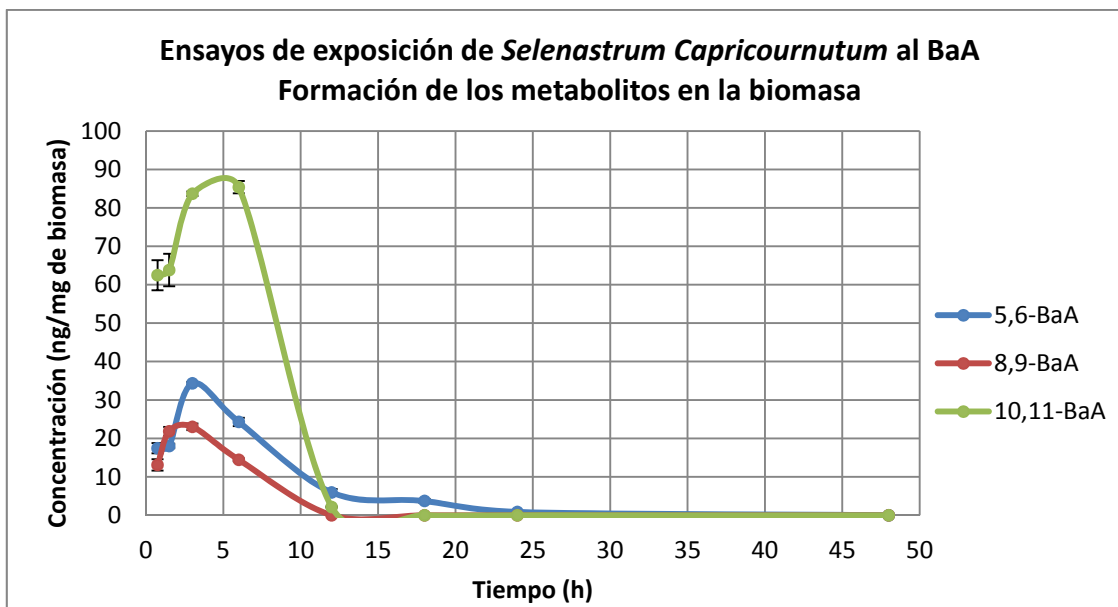
Al graficar la concentración de los metabolitos del BaA en el medio de cultivo en función del tiempo de exposición (gráfico 5.8), se observó que desde los primeros tiempos comienza la formación de los tres metabolitos. El 10,11-dihidrodiol es el metabolito que se produjo a mayor concentración, seguido del 5,6-dihidrodiol y por último el 8,9-dihidrodiol, el cual se formó en concentraciones más pequeñas. Los tres metabolitos presentaron el mismo comportamiento, su concentración aumentó hasta llegar a un máximo y a partir de ahí comenzó a disminuir. Para el 10,11-dihidrodiol la concentración máxima, 35.54 ng/mL de medio, se presentó a las 6 horas, disminuyendo hasta llegar a una concentración que no fue posible cuantificar, en un tiempo de exposición de 48 horas. En el caso del 5,6-dihidrodiol, la concentración máxima producida, que fue de 17.35 ng/mL de medio, se presentó a las 12 horas de exposición, la cual fue disminuyendo hasta una concentración de 7.82 ng/mL de medio a las 48 horas. Mientras que para el 8,9-dihidrodiol se presentó una concentración máxima a las 6 horas, de 8.55 ng/mL de medio, disminuyendo a hasta una concentración inferior al límite de detección del método a las 48 horas de exposición.





**Gráfico 5.8. Formación de los metabolitos del BaA en el medio de cultivo como función del tiempo de exposición.**

Por otra parte, en la biomasa se observó la formación de metabolitos desde los 45 minutos de exposición (gráfico 5.9). Esto concuerda con la rápida aparición de los metabolitos en el medio de cultivo, ya que estos provienen de la excreción celular. De la misma manera que en el medio de cultivo el metabolito que se formó en mayores concentraciones es el 10,11-dihidrodiol, seguido del 5,6-dihidrodiol y por último el 8,9-dihidrodiol. El comportamiento de la formación de los metabolitos es muy similar a la que siguen en el medio de cultivo, es decir, se produjo un aumento de concentración hasta llegar a un máximo para después disminuir. Para el caso del 10,11-dihidrodiol, la concentración máxima, 85.39 ng/mg de biomasa, se dio a un tiempo de 6 horas de exposición, mientras que para los dos metabolitos se dio a las 3 horas, teniendo como concentraciones máximas 34.31 y 23.00 ng/mg de biomasa, para el 5,6 y el 8,9-dihidrodiol, respectivamente. Los tres metabolitos llegaron a una concentración mínima que se encuentra por debajo sus respectivos límites de cuantificación. Para el 10,11 y el 8,9-dihidrodiol esto sucedió a las 12 horas, mientras que para el 5,6-dihidrodiol a las 24 horas.

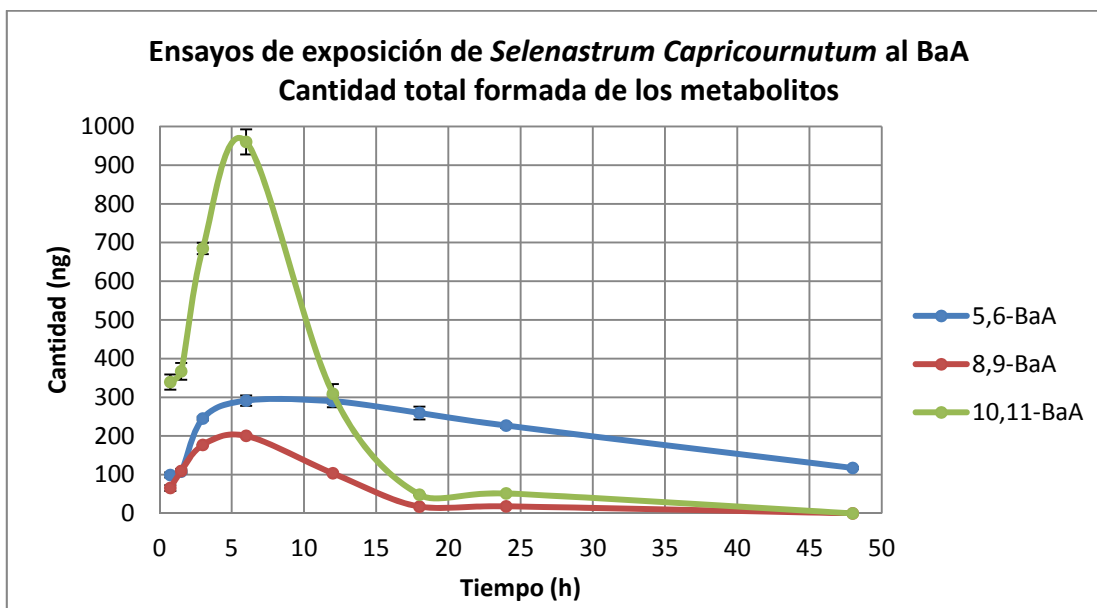


**Gráfico 5.9.** Formación de los metabolitos del BaP en la biomasa como función del tiempo de exposición.

La disminución de la concentración de los metabolitos en la biomasa puede deberse a que el alga absorbe una cantidad máxima del HAP, la cual empieza a degradar excretando los productos formados, de tal manera que las cantidades de estos disminuyen en el interior de la célula. Mientras que la disminución de los metabolitos en el medio puede deberse a diversos factores, como una degradación posterior de estos por agentes del medio o de la atmósfera presentes, la luz o incluso de la misma alga. Sin embargo, no existe ningún mecanismo o ruta metabólica descrita, en la cual basarse para explicar con detalle este comportamiento.

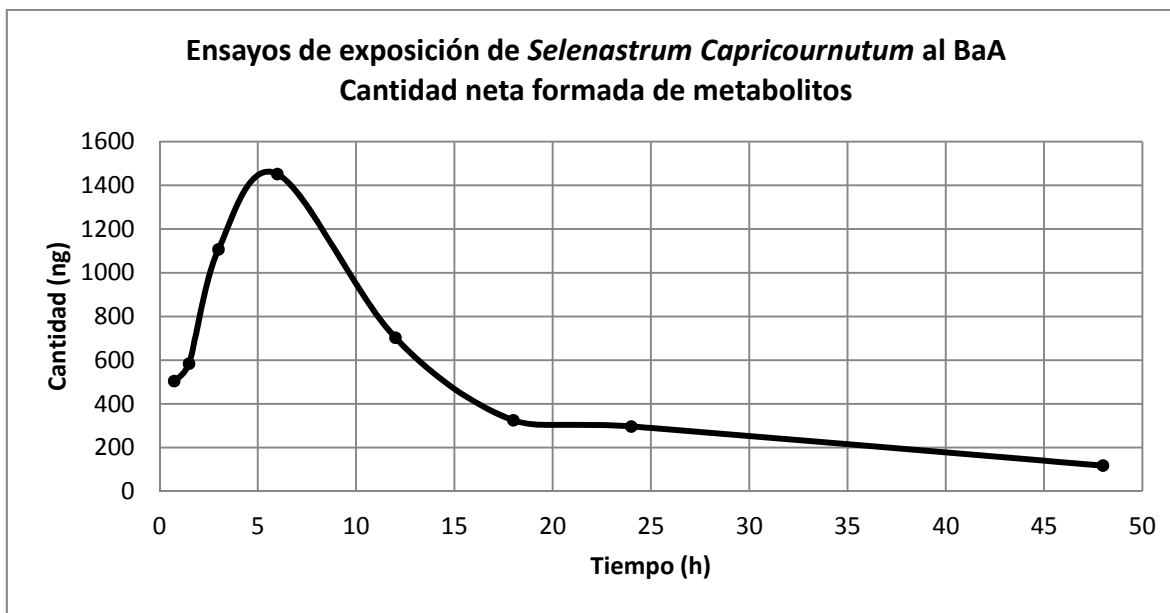
Al graficar la cantidad total de los metabolitos formados, es decir, la suma de la cantidad de cada metabolito en el medio de cultivo más la cantidad de cada uno presente en la biomasa, en función de la concentración, es posible observar que se mantiene la misma tendencia encontrada para la formación de estos en el medio líquido y en la biomasa (gráfico 5.10). La cantidad de éstos aumenta hasta llegar a un máximo y después disminuye. Este comportamiento se ve más marcado para el 10,11-dihidrodiol, cuya cantidad máxima fue de 960 ng, que para los otros metabolitos. Para el 5,6-dihidrodiol, cuya cantidad máxima formada fue de 309 ng, la tendencia es menos notoria, ya que la disminución que presenta sigue una pendiente menos pronunciada. Por último, en el caso del 8,9-dihidrodiol las cantidades formadas son más bajas, llegando a una concentración

máxima de 200 ng. La preferencia en la formación del 10,11-dihidrodiol es difícil de explicar, pero se supone a una mayor reactividad del HAP en esa parte de la molécula.



**Gráfico 5.10. Cantidad total de los metabolitos formados por la biodegradación del BaP como función del tiempo de exposición.**

Si se considera que los metabolitos formados (dihidrodiol) son isómeros y presentan el mismo peso molecular, es posible sumar las concentraciones totales de los tres para obtener así una concentración neta de los productos de degradación formados, la cual será dependiente del tiempo de exposición. En el gráfico 5.11 se presenta la cantidad neta formada respecto al tiempo de exposición, en donde se observa que sigue la misma tendencia que la que presentan los metabolitos de manera individual, aumenta la cantidad hasta llegar a un máximo y después disminuye. La cantidad neta máxima se forma en un tiempo de exposición de 6 horas, correspondiente a 1452 ng. Considerando esta cantidad y el peso molecular de los metabolitos (262.31 g/mol) se obtiene el número de moles de metabolitos formados ( $5.53 \times 10^{-9}$  moles), el cual al ser comparados con los moles iniciales del BaA ( $1.88 \times 10^{-8}$  moles), calculados a partir del peso inicial del BaA (4.300  $\mu$ g) y de su peso molecular (228.29 g/mol), corresponde a un 29.41 %. Porcentaje que, al igual, que para el BaP no representa la degradación completa del HAP.



**Gráfico 5.11.** Cantidad neta formada de los productos producidos por la biodegradación del BaP como función del tiempo de exposición.

Comparando los porcentajes equivalentes a las cantidades netas máximas formadas de los dihidrodioles como productos de degradación del BaP y del BaA, se nota que para este último es mayor, lo que implica una mayor facilidad de la degradación de este HAP en comparación al BaP. Esto concuerda con el tiempo de exposición necesario para lograr una alta formación de metabolitos, el cual es menor para el BaA que para el BaP. Este fenómeno está relacionado con el tamaño y el peso molecular del HAP. Se ha encontrado que mientras más pequeño es el HAP, la degradación sobre este es más sencilla y rápida, probablemente debido a una mayor facilidad para introducirse a la célula de estudio (Plaza-Bolaños et al. 2010; Ali & Tarek 2009). Otra diferencia encontrada en la degradación del BaP y del BaA fue la aparición de un mayor número de compuestos de degradación para el primero que para el segundo. Esto se puede deber al tamaño de la molécula, la cual al ser más grande presenta un mayor número de lugares para que ocurran las reacciones involucradas en la degradación provenientes del metabolismo celular del alga *Selenastrum capricornutum*.

Debido a la formación inmediata de dihidrodioles provenientes de la degradación de los HAPs como productos principales, es posible decir que una de las enzimas principales en llevar a cabo la biodegradación del BaP y del BaA forma parte de un complejo de dioxigenasas como lo supone Warshasky (1985).

## 6. Conclusiones

- Se caracterizaron espectrofotométricamente los metabolitos del Benzo[a]Pireno y del Benzo[a]Antraceno, presentando distintos espectros de absorción, lo que facilitó su identificación en los ensayos de exposición posteriores.
- Se desarrollaron y validaron dos métodos de determinación con preconcentración en línea para la determinación de los productos de degradación del BaP en medio líquido y en biomasa, y dos para los productos de degradación del BaA en las matrices mencionadas. La validación de estos métodos arrojó resultados satisfactorios, confirmando que éstos pueden ser aplicados para cumplir los objetivos para los que fueron desarrollados, monitorear la formación de los metabolitos provenientes de los HAPs en los ensayos de exposición con la microalga *Selenastrum capricornutum*.
- Los valores obtenidos en los parámetros evaluados para la validación de los métodos cumplieron con las especificaciones recomendadas en las guías de apoyo. Para los métodos con EFS los coeficientes de correlación en la linealidad fueron mayores a 0.9967, los coeficientes de variación menores a 4.1 % y los porcentajes de recuperación entre 83 y 98.3 %, mientras que para los métodos con DMFS se obtuvieron coeficientes de correlación mayores a 0.9965, coeficientes de variación menores a 5.4 % y porcentajes de recuperación entre 61 y 77 %. Los límites de cuantificación estuvieron comprendidos en un rango de concentraciones entre 0.24 y 0.80 ng/mL de medio de cultivo para los métodos con EFS y entre 0.80 y 2.4 ng/mg de biomasa para los métodos con DMFS, los cuales fueron lo suficientemente bajos para poder monitorear la aparición de los metabolitos en los ensayos de exposición, además de que la selectividad corroboró la ausencia de interferentes provenientes de la matriz, resultando así métodos precisos y selectivos para los analitos de interés.
- En los ensayos de exposición de la microalga al BaP se observó la formación, en primera instancia, del 4,5 y el 7,8-dihidrodiol (después de 45 minutos), seguidos de la formación del 9,10-dihidrodiol a tiempos superiores de 24 h. Los primeros dos metabolitos presentaron un comportamiento similar (aumento de la cantidad formada hasta llegar a un máximo seguido de una disminución de ésta), el cual fue diferente para el 9,10-dihidrodiol, a los tiempos de exposición estudiados. Por otra parte, se observó la aparición de otras tres señales, de las cuales una posiblemente

corresponde al 11,12-dihidrodiol con base a trabajos reportados con anterioridad (Lindquist y Warshawsky, 1985), así como al comportamiento que presentó. De los tres metabolitos identificados, el 4,5-dihidrodiol se formó en una mayor cantidad (82 ng), seguido del 9,10 (75 ng) y por último el 7,8-dihidrodiol (19 ng). La cantidad máxima formada de los metabolitos del BaP resultó ser de un 1.99 % respecto a la cantidad inicial del BaP y se dio a un tiempo de 1.5 h.

- Para la biodegradación del BaA se dio la formación de los metabolitos desde los primeros tiempos de exposición. Los tres metabolitos presentaron el mismo comportamiento (aumento en la concentración hasta alcanzar un máximo seguido de una disminución de ésta). El 10,11-dihidrodiol se formó a una mayor cantidad (960 ng), seguido del 5,6 (309 ng) y por último del 8,9-dihidrodiol (200 ng). No se observó la presencia de alguna otra señal que indicara la formación de otro producto de la biodegradación. La cantidad máxima formada de metabolitos, la cual se dio a un tiempo de 6 h, resultó ser de un 29.41 % respecto a la cantidad inicial del BaA,.
- Comparando los porcentajes máximos de formación de los metabolitos del BaP con los del BaA, se pudo observar que la degradación del BaA resulta ser más rápida, formándose mayores cantidades de dihidrodioles que para la degradación del BaP.

### Perspectivas

- Evaluar la degradación de otros HAPs pesados como el Benzo[b]Fluoranteno y el Benzo[k]Fluoranteno por el alga *Selenastrum capricornutum*.
- Monitorear los productos de degradación obtenidos en la exposición de *Selenastrum capricornutum* a una mezcla de los 4 HAPs.
- Caracterizar los otros posibles metabolitos que se producen por la biodegradación del BaP.
- Aplicar los métodos de análisis en el monitoreo de la degradación de los HAPs por *Selenastrum capricornutum* en biorreactores.

## 7. Referencias

- Ali, O., Tarek, S., 2009. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from Ismailia Canal water by chlorine, chlorine dioxide and ozone. *Desalination and Water Treatment*, 1(1-3), pp.289–298.
- Bekki, K. et al., 2013. Biological Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Derivatives. *Journal of UOEH*, 35(1), pp.17–24.
- Buha, A., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxipedia*. Archivo en línea. URL: <http://toxipedia.org/display/toxipedia/Polycyclic+Aromatic+Hydrocarbons>. Visitado el 15 de abril del 2014.
- Buldini, P., Ricci, L., Sharma, J., 2002. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 975, pp.47–70.
- Bumpus, J., 1989. Biodegradation of polycyclic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), pp.154–158.
- Buseti, F. et al., 2006. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), pp.104–115.
- Cacho, J.I. et al., 2014. Use of headspace sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in herbal infusions. *Journal of Chromatography A*, 1356, pp.38–44.
- Cajthaml, T., Möder, M., Kačer, P., 2002. Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 974, pp.213–222.
- Campo, L., Rossella, F., Fustinoni, S., 2008. Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 875(2), pp.531–40.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, 2008. *Canadian Soil Quality Guidelines Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Documento científico de apoyo. ISBN 978-1-896997-79-7. 218 pp.
- Chen, Y. et al., 2008. Sample preparation. *Journal of chromatography. A*, 1184(1-2), pp.191–219.
- Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura, 2011. *Criterios para la evaluación de métodos fisicoquímicos*. Guía de apoyo. CCAYAC-P-058. México.

- Dabestani, R., Ivanov, I., 1999. A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology*, 70(1), pp.10–34.
- Eom, I. et al., 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(2), pp.190–205.
- Escarrone, A. et al., 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Food Chemistry*, 146, pp.597–602.
- Fidalgo-Used, N., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A., 2007. Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chimica Acta*, 590(1), pp.1–16.
- Fu, P. et al., 2012. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *Journal of Environmental Science and Health. Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 30(1), pp.1–41.
- Gan, S., Lau, E., Ng, H., 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, 172(2-3), pp.532–49.
- García Londoño, V., Reynoso, C., Resnik, S., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) survey on tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Argentina. *Food Control*, 50, pp.31–37.
- Gilbert, S.G., 2004. *A Small Dose of Toxicology*. Abingdon, UK. Taylor & Francis. 2° edición.
- González, D. et al., 2012. Wastewater polycyclic aromatic hydrocarbons removal by membrane bioreactor. *Desalination and Water Treatment*, 42(1-3), pp.94–99.
- Gul, O. et al., 2015. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in Circassian cheese by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, pp.82–86.
- Guo, W. et al., 2007. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. *Chemosphere*, 68(1), pp.93–104.
- Haritash, A., Kaushik, C., 2009. Seasonal and spatial occurrence and distribution of respirable particulate-bound atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Hisar City (India) and their potential health-risks. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 8(1), pp.73–80.
- Haritash, K., Kaushik, C., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), pp.1–15.



- Hofrichter, M., Scheibner, K., 1998. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), pp.399–404.
- Hong, Y. et al., 2008. Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Marine Pollution Bulletin*, 56(8), pp.1400–5.
- Hwang, H., Hu, X., Zhao, X., 2007. Enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by environmentally friendly techniques. *Journal of Environmental Science and Health. Part C: Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 25(4), pp.313–52.
- International Conference on Harmonisation, 2005. *Validation of analytical Procedures: text and methodology Q2(R1)*. Guía de apoyo. 4° versión. Estados Unidos.
- Karakosta, T., Tzanavaras, P., Themelis, D., 2012. Automated determination of total captopril in urine by liquid chromatography with post-column derivatization coupled to on-line solid phase extraction in a sequential injection manifold. *Talanta*, 88, pp.561–566.
- Klaassen, C.D., 2008. *Casarett & Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons*. 7° edición. USA. McGraw-Hill.
- Lindquist, B., Warshawsky, D., 1985. Identification of the 11,12-dihydro-11,12-dihydroxybenzo(a)pyrene as a major metabolite produced by the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 130(1), pp.71–75.
- Li, N., Lee, H., 2001. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water. Negative effect of humic acid. *Journal of Chromatography A*, 921, pp.255-263.
- Liu, H. et al., 2014. Effect of plant density on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated sediments with *Vallisneria spiralis*. *Ecological Engineering*, 73, pp.380–385.
- Lorenzi, D. et al., 2012. The application of an in vitro gastrointestinal extraction to assess the oral bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from a former industrial site. *Analytica Chimica Acta*, 735, pp.54–61.
- Luthe, G., Broeders, J., Brinkman, U., 2001. Monofluorinated polycyclic aromatic hydrocarbons as internal standars to monitor trace enrichment and desorption of their parent compounds during solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 933, pp.27-35.
- Manariotis, I., Karapanagioti, H., Chrysikopoulos, C., 2011. Degradation of PAHs by high frequency ultrasound. *Water Research*, 45(8), pp.2587–94.

- Manoli, E., Samara, C., 2008. The removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the wastewater treatment process: experimental calculations and model predictions. *Environmental Pollution*, 151(3), pp.477–85.
- Mitra, S., 2003. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. 1° edición. USA. John Wiley & Sons Inc.
- Mohammadi, A. et al., 2013. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish samples by a new microextraction technique and method optimisation using response surface methodology. *Food Chemistry*, 141(3), pp.2459–65.
- Olatunji, O. et al., 2014. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in processed meat products using gas chromatography - flame ionization detector. *Food Chemistry*, 156, pp.296–300.
- Olmos-Espejel, J., García-Llasera, M., 2011. Methodology for quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in protozoa cultures. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55(2), pp.113–119.
- Olmos-Espejel, J., García-Llasera, M., Velasco-Cruz, M., 2012. Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1262, pp.138–147.
- Penning, T. et al., 1999. Dihydrodiol Dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chemical Research in Toxicology*, 12(1), pp.1–18.
- Pissinatti, R. et al., 2015. Simultaneous analysis of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: Optimization, in-house method validation and application to an exploratory study. *Food Control*, 51, pp.140-148.
- Plaza-Bolaños, P., Frenich, A., Vidal, J., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), pp.6303–26.
- Providenti, M., Lee, H., Trevors, J., 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology*, 12(6), pp.379–395.
- Purcaro, G., Moret, S., Conte, L., 2013. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, 105, pp.292–305.
- Ramos, L., 2012. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221, pp.84–98.

- Ramsauer, B. et al., 2011. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in urine of non-smokers and smokers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), pp.877–89.
- Rehmann, K. et al., 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. *Chemosphere*, 36(14), pp.2977–2992.
- Romanoff, L. et al., 2006. Automated solid-phase extraction method for measuring urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human biomonitoring using isotope-dilution gas chromatography high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 835(1-2), pp.47–54.
- Romero, M., Cazau, M., 1998. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollution*, 101, pp.355–359.
- Roy, S. et al., 1990. Benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene exposure in the aquatic plant *Fontinalis antipyretica*: Uptake, elimination and the responses of biotransformation and antioxidant enzymes. *Cancer Letters*, 49(1), pp.1301–1311.
- Rubio-Clemente, A., Torres-Palma, R., Peñuela, G., 2014. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: a review. *The Science of the Total Environment*, 478, pp.201–25.
- Silva, I., Grossman, M., Durrant, L., 2009. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(2), pp.224–229.
- Simpson, N., 2000. *Solid-phase extraction. Principles, techniques and applications*. 1° edición. US. Marcel Dekkers.
- Smith, R., 2003. Before the injection — modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000, pp.3–27.
- Song, M. et al., 2012. Formation of a 3,4-diol-1,2-epoxide metabolite of benz[a]anthracene with cytotoxicity and genotoxicity in a human in vitro hepatocyte culture system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33(2), pp.212–25.
- Suenami, K. et al., 2007. On-line sample extraction and enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs by pre-column in capillary liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 846, pp.176–183.
- Tfouni, S. et al., 2014. Incidence of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oil blends. *Food Control*, 46, pp.539–543.
- Thurman, E. & Millis, M., 1998. *Solid-phase extraction. Principles and practice*. 1° edición, USA. John Wiley & Sons Inc.

- Toriba, A. et al., 2003. Method for determining monohydroxybenzo[a]pyrene isomers using column-switching high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 312(1), pp.14–22.
- United States Environmental Protection Agency, 2008. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Documento científico de apoyo. Estados Unidos.
- United States Environmental Protection Agency, 1993. *Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Documento científico de apoyo. Estados Unidos.
- Vela, N. et al., 2012. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from groundwater by heterogeneous photocatalysis under natural sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 232, pp.32–40.
- Wang, Q. et al., 2008. Quantification of puerarin in plasma by on-line solid-phase extraction column switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its applications to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 863, pp.55–63.
- Ward, O., Singh, A., Van Hamme, J., 2003. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30(5), pp.260–70.
- Warshawsky, D. et al., 1995. Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-Biological Interactions*, 97(2), pp.131–148.
- Wick, A. & Haus, N., 2011. *Remediation of PAH-contaminated soils and sediments: A literature review*, USA. Documento de apoyo del Instituto Politécnico y Universidad Estatal de Virginia.
- Ye, D., Siddiqi, M., 1995. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental Science & Technology*, 30(1), pp.136–142.
- Yuan, S., Shiung, L., Chang, B., 2002. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by inoculated microorganisms in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(1), pp.66–73.
- Zhao, Z. et al., 2014. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues in several tissues of edible fishes from the largest freshwater lake in China, Poyang Lake, and associated human health risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, pp.323–31.
- Zhou, J., Maskaoui, K., 2003. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay, China. *Environmental Pollution*, 121(2), pp.269–281.

- Zhou, X., Ye, X., Calafat, A., 2012. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method for the quantification of triclocarban and its oxidative metabolites in human urine and serum. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 881-882, pp.27–33.