



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Análisis cromatográfico aplicado en la evaluación de la
biorremoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio
acuoso con diferentes cantidades de microalgas**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA:

MIRIAM DÍAZ ROJAS



MÉXICO, D.F.

AÑO 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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: **Dr. José Luz González Chávez**

Vocal: **Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero**

Secretario: **Dra. Martha Patricia García Camacho**

1° Suplente: Eduardo Bonilla Espinosa

2° Suplente: Nuria Esturau Escofet

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 208 de Análisis de Trazas del edificio “F”, 1° piso y laboratorio 3D anexo del edificio “A”, 3° piso, ambos en la Facultad de Química, Circuito Interior Ciudad Universitaria.

ASESORA DEL TEMA:

Dra. Martha Patricia García Camacho _____

SUSTENTANTE:

Miriam Díaz Rojas _____

Índice

Portada.....	0
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS	7
Capítulo 1. ANTECEDENTES.....	8
1.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP).....	8
1.2. Origen, formación y síntesis.....	8
1.3. Propiedades fisicoquímicas y generales de los HAP.....	10
1.4. Los HAP como contaminantes en el ambiente	11
1.4.1. Contaminación del agua.....	12
1.4.2. Contaminación del aire.....	15
1.4.3. Contaminación del suelo y sedimentos	16
1.5. Toxicidad.....	17
1.5.1. Toxicidad en mamíferos y humanos	18
1.6. Biorremediación	20
1.7. Biodegradación	22
1.7.1. Biodegradación con Bacterias.....	24
1.7.2. Biodegradación con Hongos.....	24
1.7.3. Biodegradación con Algas	25
1.7.3.1. Mecanismo y variables importantes para la biodegradación de HAP empleando microalgas.....	26
1.7.3.2. <i>Selenastrum capricornutum</i>	29
1.7.3.3. Concentración de células.....	30
1.8. Cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR (High Performance Liquid Chromatography HPLC).....	31
1.8.1. Parámetros cromatográficos.....	33
1.9. Preparación de muestras	38
1.9.1. Extracción en fase sólida (EFS).....	39
1.9.2. Dispersión en Matriz de Fase Sólida (DMFS).....	41
1.9.3. Ventajas de la EFS y DMFS	44

1.10. Validación de metodologías y técnicas analíticas	44
1.10.1. Grado de validación	46
1.10.2. Definición de los parámetros de desempeño para una revalidación parcial	46
Capítulo 2. MATERIALES Y EQUIPOS	50
2.1. Reactivos y disoluciones estándar	50
2.2. Sistema cromatográfico	50
2.3. Materiales para preparación de muestras (EFS y DMFS)	51
2.4. Medios de cultivo y mantenimiento de las microalgas	51
2.5. Otros equipos y materiales	52
Capítulo 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	53
3.1. Metodología general de experimentación	53
3.2. Análisis Cromatográfico	54
3.2.1. Verificación de la detección de los HAPs por CLAR-UV-DAD	54
3.2.2. Revalidación del sistema cromatográfico	54
3.2.2.1. Precisión del sistema cromatográfico	54
3.2.2.1.1. Preparación de disoluciones	55
3.2.2.2. Intervalo lineal del sistema	55
3.2.2.3. Límite de detección y límite de cuantificación del sistema con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la regresión	56
3.3. Preparación de muestras	57
3.3.1. Metodología general de EFS	57
3.3.2. Metodología general de DMFS	58
3.3.3. Revalidación de los métodos	59
3.3.3.1. Precisión intermedia y Repetibilidad de los métodos (EFS y DMFS con CLAR-UV)	59
3.3.3.2. Intervalo lineal de los métodos (EFS y DMFS con CLAR-UV)	60
3.4. Crecimiento y mantenimiento de cultivos de microalgas: optimización y estandarización del número de microalgas para alcanzar las cantidades deseadas	61
3.5. Ensayos de exposición con diferentes concentraciones de microalgas	63
Capítulo 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	64
4.1. Análisis cromatográfico	64
4.1.2. Revalidación del sistema cromatográfico	64
4.1.2.1. Precisión intermedia y repetibilidad del sistema cromatográfico	64

4.1.2.2. Linealidad del sistema.....	65
4.1.2.3. Límites de detección y cuantificación	67
4.2. Revalidación del método	69
4.2.1. Precisión intermedia y Repetibilidad de los métodos (EFS y DMFS con CLAR-UV)	69
4.2.2. Linealidad de las metodologías (EFS y DMFS) acopladas a CLAR-UV-DAD.....	71
4.3. Crecimiento y mantenimiento de cultivos de microalgas: optimización y estandarización del número de microalgas.....	74
4.4. Ensayos de exposición con diferentes concentraciones de microalgas	75
4.4.1. BaP	77
4.4.2. BaA	83
4.4.3. BbF	88
4.4.4. BkF.....	94
4.4.4. Comparación puntual a un solo tiempo (1.5 h) empleando diferente cantidad de células en medio líquido con BaP	99
Capítulo 5. CONCLUSIONES	102
REFERENCIAS	103
ANEXOS	109
Anexo 1	109
Anexo 2	111
Anexo 3	114
Anexo 4	125

INTRODUCCIÓN

Existe un incremento constante de contaminantes cancerígenos y mutagénicos en el ambiente, algunos de ellos son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Se encuentran en el aire, agua y suelo, porque se generan por diversas actividades antropogénicas y una gran variedad de fenómenos naturales. Los HAP son considerados agentes xenobióticos, ya que son sustancias ajenas o extrañas a la composición y metabolismo natural de los organismos vivos; son utilizadas como indicadores de un estado biológico que puede reflejar la exposición a través de una respuesta celular precoz o susceptibilidad adquirida (Alcalá, 2012). Ésta es una de las principales razones por las que hoy en día resulta de gran importancia disminuir su concentración o eliminación total en lugares donde su presencia podría causar daños graves en el ecosistema o generar problemas de salud a las personas expuestas a estos ambientes. Por esta razón, desde hace muchos años se han estudiado diversas formas de eliminar o tratar los sitios contaminados, el tipo de tratamiento dependerá de la parte del ecosistema que se quiera tratar.

Para el tratamiento y remoción de los HAP en ambientes acuosos existe una gran variedad de tratamientos químicos, físicos y biológicos; entre los tratamientos químicos convencionales empleados en la eliminación de HAP en agua se utilizan agentes oxidantes como permanganato de potasio (KMnO_4) y el ozono (O_3) (Beltran & Ovejero, 1995), otras técnicas empleadas son la fotólisis directa y procesos avanzados de oxidación que emplean la reactividad del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) generado del agua empleando diferentes agentes oxidantes, fuentes de energía y catalizadores, para romper los enlaces dobles de algunos HAP; la oxidación electroquímica empleando reactores Fenton, donde se utilizan disoluciones de peróxido de hidrógeno catalizado con hierro (II), es una de las técnicas más novedosas empleadas como un paso previo antes de ser tratado con microorganismos (Homem et al., 2009).

A pesar de la variedad de tratamientos, el tratamiento utilizando microorganismos para la remoción de HAP en sedimentos y cuerpos de agua resulta más económico que emplear un método químico o físico. Sin embargo, en muchos casos aún no se han asentado los parámetros para mejorar el proceso de remoción. El empleo de bacterias y hongos hoy está ampliamente estudiado, al grado de conocer las enzimas específicas que emplea

cada uno de estos microorganismos. Desde la década de los noventa se conoce la capacidad de una amplia gama de hongos y bacterias capaces de degradar al Benzo[a]pireno en suelos y agua contaminados y desde hace poco se ha logrado elucidar el mecanismo a través del cual estos microorganismos son capaces de degradarlo, por una hidrólisis oxidativa formando una serie de metabolitos hidroxilados y quinonas (Zang et al., 2007).

En el caso de la biorremediación por microalgas existen menos reportes, aunque el uso de microalgas verdes para la remoción de HAP de baja masa molar como el fluoranteno y el pireno se conoce desde hace varios años, sólo hasta hace un par de años se han empezado a estudiar las microalgas para la remoción los HAP de alta masa molar (Luo et al., 2014). Entre las especies más utilizadas se encuentran *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda*, *Selenastrum capricornutum*, *Skeletonema costatum* y *Nitzschia sp.* (Hong et al., 2008; Lei et al., 2007).

Cada una de estas especies presenta diferentes mecanismos de remoción, ya sea por bioacumulación o por degradación, los cuales dependen de su morfología, tamaño (radio de las células) y la concentración de algas en el medio (Lei et al., 2002). Hoy en día, se siguen estudiando los parámetros que permitan estudiar con precisión y sensibilidad el proceso de remoción de HAPs utilizando microalgas. En el presente trabajo se optimizó y validó una metodología analítica basada en la extracción con adsorbentes y cromatografía de líquidos de alta resolución para cuatro HAP de alta masa molar: Benzo[a]pireno (BaP), Benzo[k]antaceno (BaA), Benzo[k]fluoranteno (BkF) y Benzo[b]fluoranteno (BbF), con el fin de estudiar su remoción de un medio acuoso de cultivo variando el número de células de la microalga *Selenastrum capricornutum* a diferentes tiempos de exposición. Se usaron cultivos de microalga con una concentración variada de células vivas (5.0×10^6 , 2.5×10^6 y 1.25×10^6 células/mL), de esta manera se evaluó la influencia de la concentración de células en la remoción en un medio expuesto a cada uno de los HAP. Se determinó a los HAP (por separado) en los componentes del cultivo, los cuales son el medio líquido y la biomasa expuesta. La metodología analítica previamente desarrollada en el grupo de investigación fue revalidada y permitió monitorear en el tiempo las cantidades residuales de los diferentes hidrocarburos y calcular los porcentajes de remoción y degradación.

OBJETIVOS

General:

- Usar metodología analítica cromatográfica para evaluar la desaparición del Benzo[a]pireno, Benzo[a]antraceno, Benzo[k]fluoranteno y , Benzo[b]fluoranteno en medio de cultivo acuoso, por efecto de la remoción por la microalga de agua dulce *Selenastrum capricornutum*, con diferentes cantidades de células.

Objetivos particulares:

- Aplicar una metodología analítica basada en la extracción de los HAP con adsorbentes y la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica UV para la determinación de los HAPs en el medio líquido y la biomasa de cultivos de microalgas expuestos a diferentes tiempos y cantidades de microorganismos.
- Realizar la curva de crecimiento de la microalga *Selenastrum capricornutum* empleando mediciones espectrofotométricas de clorofila y técnicas de cuantificación de microorganismos viables como número más probable y el número de microorganismos totales utilizando la cámara de Neubauer; con el fin de establecer relación entre absorbancia y número de células.

Capítulo 1. ANTECEDENTES

1.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)

Los hidrocarburos aromáticos (HAP) son moléculas orgánicas estables formadas únicamente por hidrógeno y carbono, tienen dos o más anillos aromáticos fusionados. Se consideran como una serie de hidrocarburos que contienen varios anillos de seis miembros, análogos al benceno, conectados entre ellos por que comparten un par de átomos de carbono adyacentes, lo cual da lugar a anillos fusionados. El ejemplo más simple es el naftaleno. En general los hidrocarburos que presentan propiedades similares a las del benceno se denominan aromáticos; aquellos que contienen anillos bencénicos fusionados se denominan hidrocarburos aromáticos policíclicos o polinucleares (HAP). Igual que el benceno, muchos de estos compuestos poseen gran estabilidad y geometría plana. Aparte del naftaleno, no se fabrican HAP con propósitos comerciales, no obstante, algunos se extraen del alquitrán del carbón y si se comercializan (Baird & Cann, 2014).

Conceptualmente hay dos maneras de fusionar un tercer anillo de benceno a una molécula de naftaleno, uno resulta de una orientación lineal de los centros de los anillos, mientras que el otro es consecuencia de una disposición ramificada.

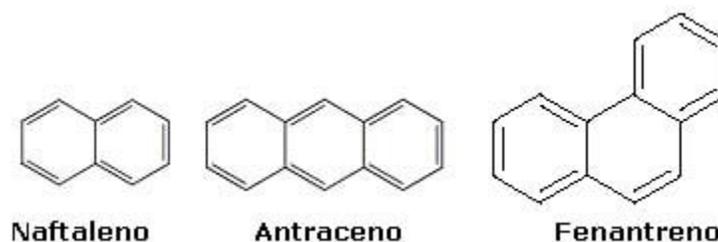


Figura 1. Naftaleno, antraceno y su isómero fenantreno

Los HAP sencillos son el fenantreno y el antraceno con tres anillos; aunque pueden llegar a estar formados por cuatro, cinco, seis o siete anillos fusionados, pero los más comunes son los que contienen cinco o seis anillos; los que tienen seis anillos son conocidos como HAP alternantes, algunos de estos compuestos son llamados “HAP benzoides”.

1.2. Origen, formación y síntesis

Los HAP son uno de los más comunes y antiguos tipos de contaminantes ambientales, ya sea en el aire, en el agua o en el suelo. De manera natural y antropogénica se forman durante la combustión incompleta de materia orgánica a altas temperaturas (500-800°C) o su calentamiento prolongado que genera reacciones de pirolisis (100-300°C) seguida de una recombinación (Haritash & Kaushik, 2009). Se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, los podemos encontrar en el suelo, sedimentos, agua, aire, plantas y animales, como resultado de procesos naturales y antropogénicos (Guo et al., 2007). De manera natural se generan durante los incendios forestales, erupciones volcánicas y pozos petroleros, sin embargo, la mayoría de ellos se generan por actividades antropogénicas, muchos de ellos durante procesos de combustión, en especial de materia orgánica durante la actividad industrial u otra actividad humana: cocinar con carbón, fumar e incinerar la basura.

El mecanismo de formación de estos compuestos durante la combustión es complejo, principalmente se debe a la re-polimerización de fragmentos de hidrocarburo que se forman durante el “cracking”, es decir la ruptura en partes más pequeñas de una molécula de gran tamaño. Los fragmentos que contienen dos átomos de carbono son particularmente abundantes después de ocurrir el cracking y la combustión parcial, es muy probable la combinación de dos fragmentos C_2 para formar una cadena radial libre de C_4 , que podría adicionar otro fragmento C_2 para formar una cadena lineal de seis o un anillo de seis miembros. Estas reacciones ocurren rápidamente si uno de los fragmentos originales es un radical libre. Las reacciones de re-polimerización ocurren particularmente bajo condiciones de deficiencia de oxígeno, la velocidad de formación de los HAP aumenta al disminuir la relación oxígeno-combustible. Los fragmentos ricos en carbono se combinan para formar los HAP, los cuales son moléculas más estables que tienen una relación C:H alta (Baird & Cann, 2014). La pirolisis de materia orgánica es una de las principales fuentes de generación y persistencia de los HAP en el aire, sedimentos, agua y alimentos (Baek et al., 1991). El crudo del petróleo contiene entre 0.2 y 7 % de HAP combinados con otros compuestos poliaromáticos, en general el petróleo contiene únicamente hidrocarburos que contienen dos y tres anillos, durante el proceso de refinamiento de este combustible es donde se forman los HAP, a través de procesos catalizados de cracking y dependerá de la temperatura de destilación. Muchos compuestos poliaromáticos que contienen entre dos y tres anillos predominan en las balsas de residuos, por otra parte los hidrocarburos que predominan durante la combustión incompleta de materia orgánica son los de tres o más anillos fusionados. La

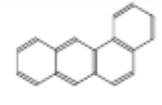
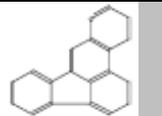
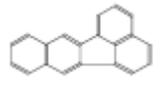
presencia de los compuestos polinucleares puede ser utilizada como huella para localizar pozos petroleros (Gupta, 2014).

Estudios recientes han logrado identificar y cuantificar los hidrocarburos que se generan durante la combustión en motores de diesel que se generan a través de reacciones de pirólisis en zonas del motor ricas en combustible, como el sistema de enfriamiento del cilindro de aceite; algunos de los hidrocarburos formados en estas condiciones son el naftaleno, fenantreno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno y benzo[k]fluoranteno, siendo el pireno el de menor concentración (0.12 µg/g) y el naftaleno el de mayor concentración (2 µg/g) (Lea-Langton et al., 2013).

1.3. Propiedades fisicoquímicas y generales de los HAP

Los HAP de alta masa molar en estado puro son compuestos sólidos cristalinos de colores llamativos que van del blanco al amarillo o verde pálido, la solubilidad en agua depende de la temperatura, pH, fuerza iónica y los componentes de la matriz, sin embargo, de manera general su solubilidad en disolventes polares disminuye a medida que el número de anillos aumenta en la molécula, se disuelven con facilidad en disolventes no polares, grasas y aceites, ésta es una de las razones por las cuales se acumulan en el tejido graso de muchos organismos vivos, sus puntos de ebullición, fusión y su volatilidad siguen la misma tendencia al aumentar los anillos, las presiones de vapor son variables, se sabe que los HAP con presiones de vapor bajas se encuentran asociados en partículas, por otro lado aquellos que tienen presiones de vapor altas se encuentran en forma de vapor dentro del aire a temperatura ambiente, son termodinámicamente muy estables por la gran cantidad de estructuras resonantes. A continuación, en la tabla 1, se muestran las propiedades fisicoquímicas de los compuestos estudiados en este trabajo. Tienen una alta carga fotoeléctrica, por esta razón son abundantes en pequeñas fracciones en las partículas de la atmósfera, agua dulce y sedimentos marinos; en suelos muy húmedos pueden disolverse o estar repartidos en la fase acuosa, esto dependerá de su coeficiente de reparto octanol - agua (K_{ow}) (Cerniglia & Sutherland, 2001).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los HAP de estudio (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995)

Estructura	Nombre común y abreviatura	No. de CAS	Fórmula Molecular	Masa molar relativa	Punto de ebullición (°C)	Apariencia física	log K _{ow}	Solubilidad en agua a 25 °C (mg/L)
	Benzo[a]pireno BaP	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	252.3	495	Cristales amarillos-verde	6.35	0.00162
	Benzo[a]antraceno BaA	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂	228.3	438	Cristales anaranjados	5.91	0.0090
	Benzo[b]fluoranteno BbF	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂	252.3	481	Cristales incoloros	5.78	0.0015
	Benzo[k]fluoranteno BkF	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂	252.3	480	Cristales amarillos	6.11	0.0008

1.4. Los HAP como contaminantes en el ambiente

Se consideran contaminantes ambientales ubicuos por que se pueden encontrar en una gran cantidad de lugares dentro de un ecosistema; desde hace varios años su estudio ha llamado la atención de un sin número de investigadores en todo el mundo interesados en estudiar contaminantes en el agua, aire y suelo, porque la mayoría de estos compuestos son altamente cancerígenos, mutagénicos y se consideran sustancias teratogénicas (Manoli & Samara, 2008). Adicionalmente son contaminantes orgánicos persistentes por su gran estabilidad química y su resistencia a diferentes tipos de degradación, por esta razón en muchos países industrializados están estrictamente regulados por diversas leyes ambientales, sin embargo, en países poco desarrollados su regulación es casi inexistente. Pueden existir en más de cien diferentes combinaciones en el ambiente, por esta razón The National Waste Minimization Program, que es una institución dependiente de la Environmental Protection Agency (EPA), los agrupa de acuerdo con la información del

inventario de emisiones tóxicas, donde se consideran veinte hidrocarburos aromáticos policíclicos prioritarios, los de baja masa molar se encuentran dentro de la lista de contaminantes prioritarios de la EPA como el naftaleno y el antraceno (Environmental Protection Agency, 2008).

Se sabe que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, los podemos encontrar en el suelo, sedimentos, agua, aire, plantas y animales, como resultado de procesos naturales y antropogénicos (Chen et al., 2004).

Tabla 2. HAP prioritarios para la EPA de acuerdo con su toxicidad

No.	Nombre de los HAP's prioritarios	Número CAS	No.	Nombre de los HAP's prioritarios	Número CAS
1	Benzo(a)antraceno	56-55-3	11	Dibenzo(a,h)antraceno	53-70-3
2	Benzo(a)fenantreno(criseno)	218-01-9	12	Dibenzo(a,e)fluoranteno	5385-75-1
3	Benzo(a)pireno	50-32-8	13	Dibenzo(a,e)pireno	192-65-4
4	Benzo(b)fluoranteno	205-99-2	14	Dibenzo(a,h)pireno	189-64-0
5	Benzo(j)fluoranteno	205-82-3	15	Dibenzo(a,l)pireno	191-30-0
6	Benzo(k)fluoranteno	207-08-9	16	7H-Dibenzo(c,g)carbazol	194-59-2
7	Benzo(j,k)fluoreno (fluoranteno)	206-44-0	17	7,12-Dimethylbenz(a)antraceno	57-97-6
8	Benzo(r,s,t)pentafeno	189-55-9	18	Indeno(1,2,3-cd)pireno	193-39-5
9	Dibenz(a,h)acridina	226-36-8	19	3-Metilcolantreno	56-49-5
10	Dibenz(a,j)acridina	224-42-0	20	5-Metilcriceno	3697-24-3

1.4.1. Contaminación del agua

Los compuestos poliaromáticos una vez que son liberados en la atmósfera a través de emisiones de gas, pueden depositarse por evaporación o resuspensión de partículas en suelos y cuerpos acuosos. Dentro de la atmósfera los HAP pueden ser transportados a cortas y largas distancias, para posteriormente pasar por una deposición húmeda o seca

en el agua, suelo y vegetación (Birgül et al., 2011). Otra manera en la que los poliaromáticos pueden entrar en ecosistemas acuáticos es a través de pozos petroleros en el mar, deposición atmosférica por derrames accidentales o intencionales de crudo o productos derivados del petróleo durante el proceso de refinación o trasportación. Los poliaromáticos en agua pueden estar unidos a partículas suspendidas, sedimentos o bioacumularse en una amplia variedad de organismos acuáticos, incluso biomagnificarse en la cadena alimenticia, además una pequeña parte de estas sustancias pueden permanecer solubilizadas (Rubio et al., 2014). Si los HAP se encuentran en la fase acuosa pueden entrar al subsuelo y posteriormente filtrarse a los mantos acuíferos para formar parte del sistema acuático-subterráneo. El movimiento o transporte global de los HAP en la naturaleza se sintetiza en la figura 2.

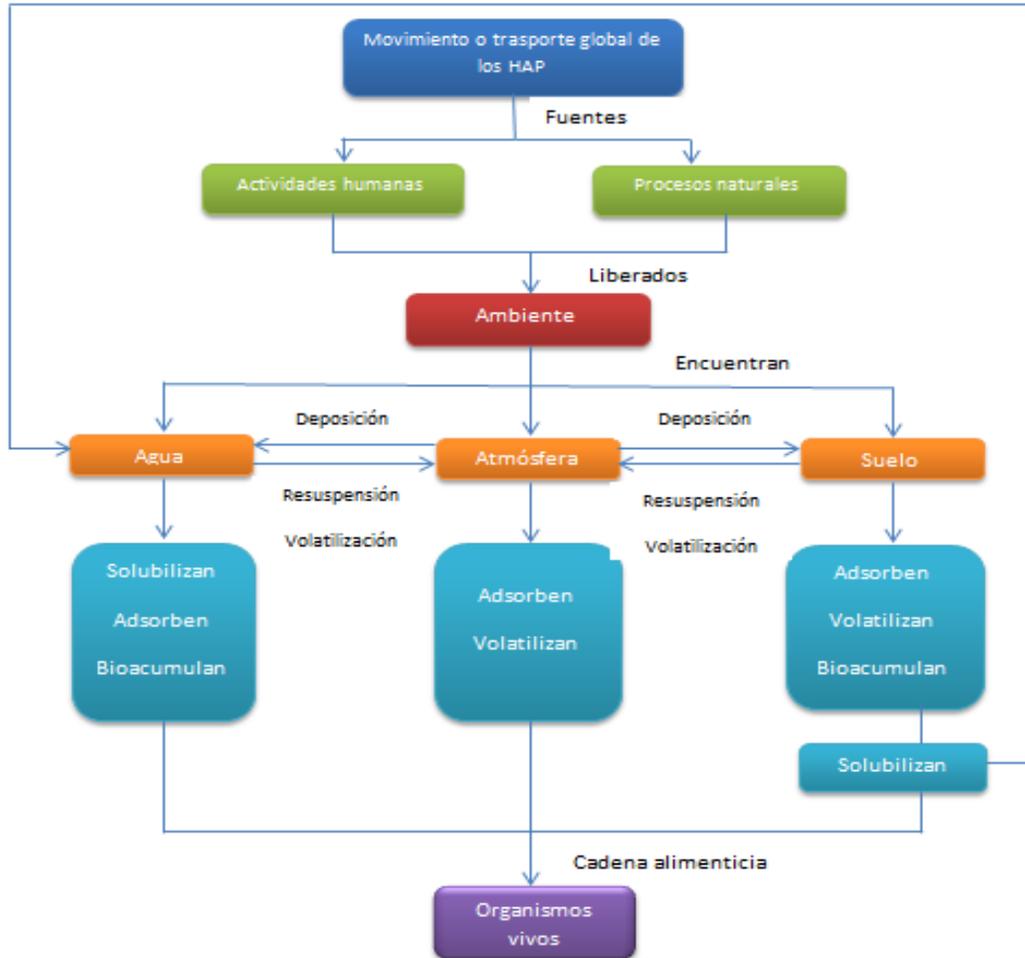


Figura 2. Fuentes de emisión y destino de los HAP en el ambiente (Rubio et al., 2014)

En los últimos veinte años numerosas investigaciones se han concentrado en estudiar las formas de transporte no sólo de los HAP, también de un gran número de contaminantes orgánicos persistentes, por sus siglas en inglés “POPs”, en el medio, así como su distribución en las distintas fases como: vapor/particulada en la atmosfera, sedimento/agua, suelo/agua, biota/agua y agua/aire.

Un gran número de “POPs” son serios contaminantes en el agua, entre los que destacan los HAP, debido a que se generan en cantidades sustanciales en la producción de derivados de alquitrán de carbón, como la creosota, que es un conservante de la madera. La lixiviación de los HAP de la creosota utilizada para preservar los maderos inmersos en muelles de pesca y similares, representan una fuente significativa de contaminación para los crustáceos como las langostas (Chen et al., 2004). Existe evidencia de que gran parte de esos hidrocarburos son componentes de los efluentes de las industrias papeleras, causando efectos nocivos sobre los peces. Las costas y plataformas oceánicas son regiones de suma importancia económica, social y albergan ecosistemas altamente productivos y diversos, también son los sitios más vulnerables frente a impactos humano, problemas ambientales causados en tierra, así como la contaminación de ríos, por lo tanto su destrucción y/o contaminación amenazan los beneficios proporcionados por este tipo de ecosistemas. De manera específica se sabe que debido a las propiedades hidrofóbicas de los compuestos poliaromáticos tienden a ser fuertemente adsorbidos en partículas suspendidas entre el agua de la superficie y los sedimentos del fondo, de esta manera se incorporan principalmente a los sedimentos que tienen como depósito principal el medio marino (Bouloubassi et al., 2012). La extracción y distribución de metales, la industrialización que introdujo la extracción, refinación y combustión de derivados del petróleo para alimentar la creciente demanda de energía ha dado como resultado que los HAP se puedan encontrar de forma ubicua en ambientes acuáticos y terrestres. La contaminación ambiental con poliaromáticos es una preocupación mundial, ya que existen informes de contaminación importante en una amplia variedad de sistemas costeros y de agua dulce (Gauthier et al., 2014).

Un ejemplo cercano de contaminación por derrames de petróleo se presenta en la línea costera del Golfo de México, donde la EPA realizó estudios de las concentraciones de HAP (Environmental Protection Agency, 2014). Estudios más formales señalan que la duración de dicho derrame fue de ochenta y siete días, entre Abril y Julio del 2010, demuestran que múltiples ecosistemas alrededor de la línea costera sufrieron niveles

diferentes de exposición, señalan que el grado en que cada ecosistema pudo haber sido dañado depende de las propiedades físicas, químicas y factores biológicos, así como los cambios inherentes que pudieron ocurrir en el petróleo como resultado de la disolución, erosión, degradación, adsorción y dispersión. Por lo tanto, durante y después del periodo de descarga, diferentes tipos y fases de crudo/petróleo estuvieron presentes (crudo degradado o disperso) en el agua y sedimentos que representan un peligro potencial para la vida acuática. Sus estudios demostraron la presencia total de 10 828 HAP en agua del golfo, dentro de estos poliaromáticos encontrados se encuentran los 16 señalados como prioritarios por la EPA. El análisis y cuantificación se realizó a través de extracción líquido-líquido seguida de una cromatografía de gases acoplada a un detector de masas en modo de monitoreo selectivo de iones (SIM por sus siglas en inglés) (Echols et al., 2014).

1.4.2. Contaminación del aire

Los HAP son contaminantes comunes del aire y están muy implicados en la degradación de la salud humana en algunas ciudades. La concentración de estos compuestos en atmósferas exteriores es de unos pocos nanogramos por centímetro cúbico, pero pueden alcanzar diez veces esta concentración en lugares muy urbanizados, debido a que se generan principalmente por la combustión incompleta de materia que contiene carbono. Las concentraciones elevadas de los HAP en interiores son debido al humo de tabaco y a la quema de madera y carbón. El estado físico y vida media de los HAP en el aire depende de su masa y la temperatura ambiente, por otra parte su vida media está determinada por su presión de vapor. Se sabe que los hidrocarburos que contienen cuatro anillos o menos se encuentran en forma de gases si son emitidos en la atmósfera y después de menos de un día en el aire son degradados por medio de una secuencia de reacciones con radicales libres que empieza por la adición del radical $\cdot\text{OH}$ a un doble enlace. En contraste con sus análogos de menor tamaño, los HAP con más de cuatro anillos bencénicos no se mantienen mucho tiempo en el aire como moléculas gaseosas, debido a sus bajas presiones de vapor se condensan y se adsorben sobre superficies de las partículas de hollín y ceniza. Se sabe que durante el invierno, incluso los más pequeños se adsorben sobre partículas, porque sus presiones de vapor disminuyen al bajar la temperatura. Se sabe que se adsorben principalmente sobre partículas de tamaño

submicrométrico, partículas respirables, por esta razón pueden ser transportadas hasta los pulmones al respirar.

Este tipo de hidrocarburos se introducen en el ambiente debido a diversas fuentes: gases de escape de los motores de combustión alimentados por gasolina y especialmente los motores de diesel, el alquitrán del humo de los cigarrillos, la superficie de la comida carbonizada o quemada, el humo procedente de la quema de madera o carbón y otros procesos de combustión incompleta donde el carbón no se convierte completamente en CO o CO₂. Si bien los HAP constituyen solo un 0.1 % de la materia particulada atmosférica, su presencia en el aire es preocupante por sus diversas propiedades tóxicas. Los gases de escape de los vehículos viejos y aquellos con motores de diesel son los principales contribuyentes de la presencia de estos hidrocarburos en las ciudades; los hornos de fundición de aluminio son otra fuente de emisión a la atmósfera, ya que los ánodos de grafito calientes se deterioran con el tiempo y liberan los hidrocarburos.

Un cuerpo de agua puede actuar como una fuente de poliaromáticos en el ambiente, pueden existir en una gran cantidad de formas en este tipo de ecosistemas, pueden estar solvatados, unidos a la materia orgánica disuelta, adsorbidos o suspendidos en partículas y asociados a sedimentos superficiales. Desde hace varios años se ha prestado gran atención en la distribución, partición, composición y fuentes de los HAP en agua y sedimentos (Qin et al., 2014).

1.4.3. Contaminación del suelo y sedimentos

Los suelos contaminados por compuestos orgánicos, en especial los HAP, son un serio problema ambiental y de salud pública, la gran mayoría de ellos se encuentran en áreas cercanas a plantas de explotación de carbón o petróleo y en los alrededores de las empresas dedicadas a la fabricación del coque. La remediación de suelos depende de la naturaleza, el nivel de contaminación y el tamaño del lugar; hoy en día las técnicas más empleadas involucran una desorción térmica, oxidación química *in situ* y biorremediación que incluye la fitorremediación, siendo esta última técnica la menos dañina sobre las propiedades del suelo, así como la más respetuosa con el medio ambiente y con la versatilidad de poder ser aplicada *on site* o *in situ* (Pernot et al., 2014). Los sedimentos en los ecosistemas acuáticos actúan como grabadoras de la contaminación ambiental a lo

largo del tiempo, de esta manera proveen información útil para entender el ciclo de químicos tóxicos en los ecosistemas acuáticos y evaluar la eficacia de las legislaciones ambientales para tomar medidas encaminadas a reducir el impacto de las actividades antropogénicas (Fernández et al., 2012). Una vez que los poliaromáticos se introducen dentro del suelo muestran una gran afinidad por la fase orgánica, esto por su alta hidrofobicidad, también se pueden disolver en la fase líquida no acuosa o sobre partículas de alquitrán de carbón y materia orgánica, para progresivamente quedar atrapados en los micro-poros de los suelos; el desgaste del suelo contribuye a la acumulación de los HAP a lo largo del tiempo y actúa como sumideros de estos compuestos (Techer et al., 2012).

Un ejemplo cercano de contaminación con HAP en México lo encontramos al margen del río Coatzacoalcos (desemboca en el Golfo de México), donde se localiza la refinería “Lázaro Cárdenas”, sirve como el principal canal de transporte del crudo y productos refinados. El río y sus humedales han servido como depósito de desechos desde el establecimiento de la refinería en 1906. El gobierno mexicano reconoce esta área como una zona crítica para la regulación y protección ambiental desde 1990, por esta razón desde hace varios años se estudia la presencia de diversos contaminantes orgánicos, dichas investigaciones han reportado concentraciones alarmantes de fluoranteno, naftaleno, fenantreno y acenafteno en diversos niveles de sedimentos (Fernández et al., 2012).

1.5. Toxicidad

Gran parte de la contaminación se disuelve o permanece suspendida en el agua para después ser depositada en los suelos o sedimentos, dando como resultado contaminación terrestre y acuática que impacta a los ecosistemas dañando e intoxicando en la mayoría de los casos a la biota y en última instancia a los seres humanos. Industrias como la petroquímica, farmacéutica, de insecticidas y fertilizantes son las que generan los desechos más peligrosos, éstos pueden ser orgánicos como inorgánicos. La mayoría de los desechos orgánicos son aromáticos polinucleares, considerados como unos de los más tóxicos (Gupta, 2014). Las posiciones relativas en el espacio de los anillos fusionados en los poliaromáticos juegan un papel muy importante a la hora de determinar su nivel de comportamiento cancerígeno en animales. Aquellos con propiedades cancerígenas más potentes poseen una región de bahía como se muestra en la figura 3,

formada por la ramificación de la secuencia de anillos bencénicos: la organización de los átomos de carbono en forma de bahía abierta otorga indirectamente un elevado grado de reactividad bioquímica al HAP.



Figura 3. HAP con bahía

1.5.1. Toxicidad en mamíferos y humanos

La toxicidad de los HAP se le atribuye en gran medida a los metabolitos generados, éstos presentan propiedades genotóxicas, carcinogénicas y tienen la característica de ser compuestos oxigenados más reactivos; universalmente están regulados por enzimas de tipo hemo-tiolato monooxigenasas, pertenecientes a una diversa superfamilia de hemoproteínas llamada citocromo P450 (por sus siglas en inglés CYP450). Algunas de las características principales de esta familia de proteínas es que utilizan oxígeno molecular para realizar las reacciones de oxidación sobre los sustratos, se encuentran principalmente en el retículo endoplasmático de la células del hígado y en menor cantidad en otros órganos, están acopladas a la cadena de transporte de electrones, es por esta razón que enlazando al oxígeno molecular lo activan y de esta modo oxidan al sustrato.

En la *fase I* se realizan una serie de reacciones de biotransformación, donde se funcionalizan los HAP. En esta primera fase la actividad de la enzima CYP450 aumenta, en especial la CYP45-1A, esto ocurre después de la exposición a los poliaromáticos. La reacción de oxidación catalizada por CYP450 monooxigenasa sobre los HAP incrementa el carácter hidrofílico; los productos sintetizados después del incremento en la actividad enzimática de la CYP45-1A pueden ser desintoxicantes o tóxicos. En la desintoxicación se forman compuestos que rápidamente son excretados de los organismos en la orina y bilis. Cuando estos metabolitos no son excretados, los efectos tóxicos más relevantes incluyen la síntesis de compuestos más reactivos que en contacto con el ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y otras macromoléculas reaccionan generando

daños irreversibles. Esta segunda ruta metabólica conocida como *fase II* implica un nuevo aumento en la actividad de la CYP45-1A que es mediada por receptores aril hidrocarbonados (AHH) en el citosol de las células, la unión química de HAP hidrolizados y los AHH producen una respuesta biológica, de esta manera la CYP45-1 vuelve a metabolizar a los compuestos hidrolizados generando intermediarios aún más oxidados (epóxidos y dihidrodioles) que en la mayoría de los casos son más tóxicos que el hidrocarburo original. El mecanismo más reconocido de carcinogénesis es efectuado por los metabolitos generados con la CYP45-1A (Gupta et al., 2014; Gauthier et al., 2014). En el caso del BaP el epóxido específico de interés para el comportamiento cancerígeno se muestra en la figura 4. Una fracción de estas moléculas de epóxido añade H_2O para hidrolizar los carbonos adyacentes. El doble enlace (mostrado en la primer estructura de la figura 4 que está en el mismo anillo que los dos grupos $-OH$ sufre una epoxidación y genera de este modo la molécula que tiene actividad cancerígena, por adición de iones H^+ a la tercera estructura se forma un catión muy estable que puede enlazarse con las moléculas de ADN induciendo a mutaciones y cáncer (Baird & Cann, 2014).

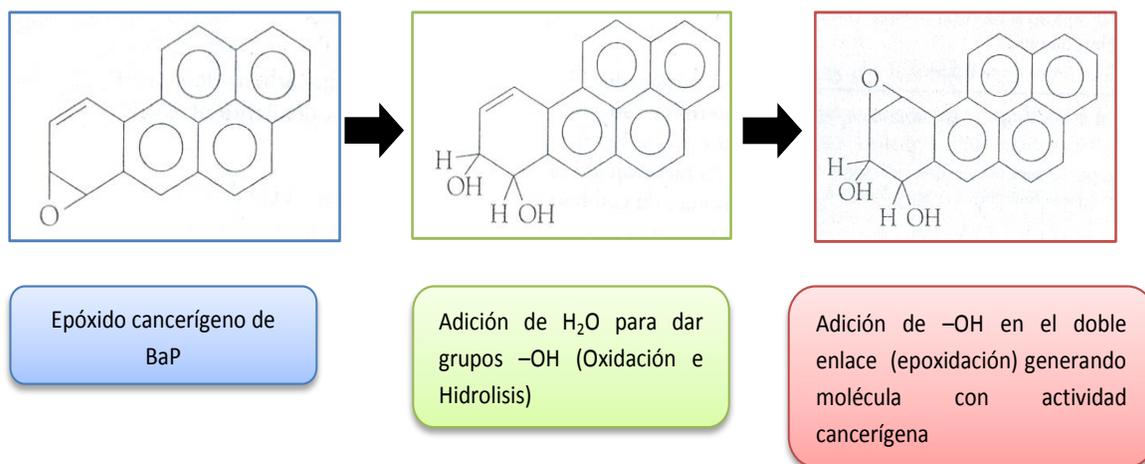


Figura 4. Mecanismo general de carcinogénesis de los HAP

Un gran número de investigaciones han establecido que las moléculas de HAP por si mismas no son agentes cancerígenos, para esto deben transformarse por medio de varias reacciones metabólicas (fase I y II), antes de producir las especies que producen cáncer (Baird & Cann, 2014).

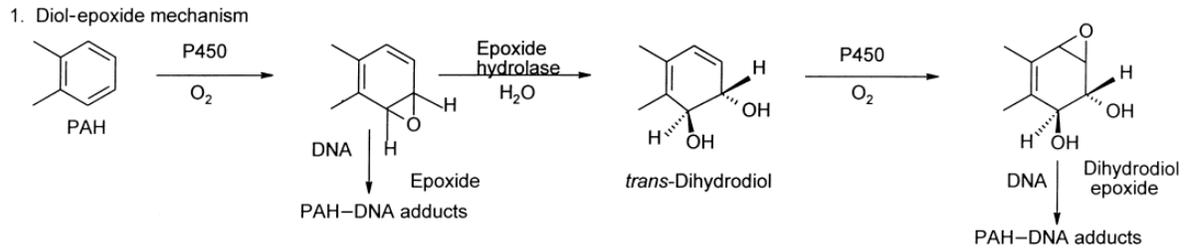


Figura 5. Mecanismo diol-epóxido (Gadd P., 2001)

La adsorción de los poliaromáticos en muchos tejidos es resultado de su difusión pasiva a través de las membranas, una característica atribuida a su naturaleza no polar y la lipofilidad compartida entre los HAP y las membranas lipídicas; se sabe que estos compuestos no se acumulan de manera específica, sin embargo, una vez adsorbidos su distribución en los tejidos presenta un comportamiento específico. En estudios realizados con peces en agua contaminada con naftaleno y antraceno reveló que el naftaleno se acumuló exclusivamente en el intestino, mientras que la mayoría del antraceno se acumuló en el hígado y los riñones. Basados en estas diferencias generales de la distribución de los hidrocarburos en los tejidos, se sabe que la toxicidad se basa en la capacidad de estos tejidos para metabolizar y desintoxicar a los órganos de dichos compuestos (Gauthier et al., 2014). Este tipo de compuestos pueden entrar a diversos organismos a través de la respiración, ingestión de alimentos contaminados, al estar en contacto con superficies contaminadas pueden entrar por los poros de la piel y se ha demostrado que una vez metabolizados pueden penetrar la placenta y causar daños en el embrión o feto (Laskin et al., 2008).

1.6. Biorremediación

La biorremediación usa microorganismos para degradar contaminantes orgánicos en suelo, agua y lodos; también se considera como un grupo de tecnologías que usa microorganismos para degradar o transformar contaminantes dañinos a compuestos menos tóxicos como dióxido de carbono, agua y sales inorgánicas (Environmental Protection Agency, 2006). Los microorganismos transforman los contaminantes para usarlos como fuentes de energía o a través de un co-metabolismo (proceso mediante el cual una sustancia que normalmente no es biodegradable es biodegradada sólo en presencia de una fuente de carbono adicional indispensable para el crecimiento del

microorganismo (Observatorio de Salud y Medio Ambiente de Andalucía, 1997)), esta ruta metabólica es una de las principales cuando los co-sustratos son agentes xenobióticos recalcitrantes. Los compuestos finales de esta transformación son menos peligrosos o más susceptibles a la degradación biológica, sin embargo, puede ocurrir la formación de compuestos que se acumularán en el ambiente si no son intermediarios de otras rutas catabólicas, o si no están presentes microorganismos capaces de utilizarlos como sustratos. (García & Peralta, 2008) De manera más específica la biorremediación involucra la producción de energía a través de reacciones de óxido reducción dentro de las células, estas reacciones están ligadas de manera directa con la respiración microbiana y funciones biológicas esenciales para el mantenimiento y la reproducción. Los sistemas de suministro dentro de las células necesitan de una fuente de energía (generalmente donadores de electrones), un aceptor de electrones y nutrientes. Existen diferentes clases de aceptores de electrones involucrados en los procesos de biorremediación como oxígeno, manganeso, hierro (III), dióxido de carbono, nitratos y sulfatos, cada una de estas especies con un potencial de óxido reducción específico que determinara su abundancia en dichos procesos biológicos. Para estimular y mejorar la actividad microbiana es indispensable que durante su cultivo y crecimiento se propicien las mejores condiciones aeróbicas o anaeróbicas, sustratos orgánicos, agentes oxidantes/reductores, nutrientes y cualquier otro factor que pueda limitar la remoción en su ausencia (Environmental Protection Agency, 2004).

El primer paso en cualquier proceso de este tipo es el desarrollo de un modelo conceptual del sitio (MCS) necesario para evaluar el potencial de aplicación del proceso de biorremoción. El MCS debe considerar la naturaleza y el alcance de la contaminación, las características del lugar (hidrogeología, geoquímica), condiciones de óxido reducción, el potencial de biodegradación, destino y transporte de los contaminantes, así como los lugares de disposición de residuos. Una vez establecido y refinado el MCS se puede elegir el microorganismo o grupos de microorganismos apropiados para realizar la transformación de los contaminantes (Berkeley & Hazen, 2010).

La biorremediación puede ser *in situ* o *ex situ*. En los tratamientos *in situ* la remediación se realiza en el lugar; este enfoque puede ser ventajoso ya que los costos de manejo de materiales y algunos impactos ambientales pueden ser reducidos. Sin embargo, en los procesos *in situ* puede estar limitado por la capacidad de controlar o manipular el ambiente físico y químico durante la biorremediación. Los procesos *ex situ*, por otro lado,

implican la extracción de los medios contaminados hacia un área de tratamiento. (Environmental Protection Agency, 2006). Cualquiera de los procesos de biorremediación debe considerar los siguientes aspectos:

1. La caracterización de proceso de degradación, indispensable para el tratamiento de cualquier agente xenobiótico.
2. El desarrollo de protocolos técnicos para delimitar los intervalos de degradación y las enzimas involucradas.
3. A largo plazo, considerar el diseño y la ingeniería de un sistema de biorremediación o bio-tratamiento (reactores) para la optimización del proceso.
4. Continua revisión de información sobre los riesgos ecológico y de salud asociados a la exposición con estos compuestos (Cerniglia & Sutherland, 2001).

Hoy en día el uso de microorganismos o sistemas biológicos para la remediación de ambientes contaminados con HAP sigue despertando gran interés, el uso de estos para la remediación se conoce desde la década de los setentas, para el caso de los poliaromáticos presentes en suelo y agua (Schoeny, Cody, & Warshawsky, 1988). Durante los últimos treinta años las investigaciones sobre la degradación de HAP han dado como resultado el aislamiento de una amplia variedad de bacterias, hongos y algas capaces de degradar HAP de baja masa molar; los HAP de alta masa molar son recalcitrantes, resistentes a la degradación con microorganismos, sin embargo, se ha demostrado que algunos hongos y algas son capaces de transformar estos compuestos de manera parcial (Juhasz & Naidu, 2000).

1.7. Biodegradación

La mayoría de los HAP una vez que son liberados en el ambiente pueden adsorberse, volatilizarse, sufrir degradación química o por fotólisis, pese a esto la degradación microbiana sigue jugando un papel importante por ser uno de los mayores procesos de degradación. Algunos de los factores que son determinantes en la biodegradación están determinados por las condiciones ambientales, el número y tipo de microorganismos, la naturaleza y estructura química de los contaminantes. Algunos de los factores más importantes se esquematizan en la figura 6.

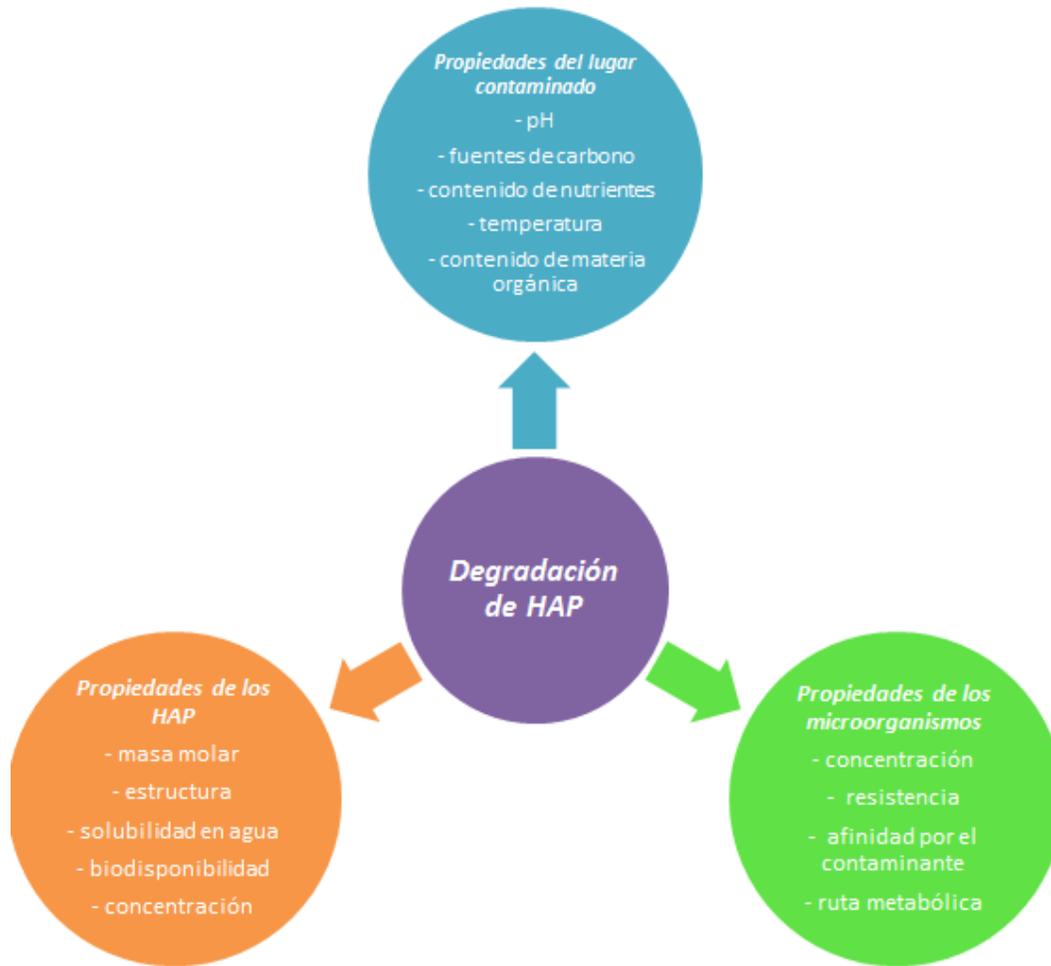


Figura 6. Factores bióticos y abióticos que afectan la degradación de los HAP (Doyle, Muckian, Hickey, & Clipson, 2008)

La biodegradación y/o biotransformación en compuestos más sencillos y en el mejor de los casos hasta sales minerales, agua y dióxido de carbono en condiciones aeróbicas o en metano para las anaeróbicas, dependerá de varios factores abióticos como: pH del medio, temperatura, nivel de oxígeno, la estructura química de los agentes xenobióticos y la disponibilidad de nutrientes; entre los factores bióticos encontramos el grado de adaptación de los microorganismos, las propiedades de transporte de las células y el reparto entre el medio de cultivo y los microorganismos (Doyle et al., 2008) (Haritash & Kaushik, 2009). La elucidación del proceso de biodegradación es uno de los puntos clave para determinar el alcance de la técnica y determinar si los metabolitos formados son tóxicos o biológicamente inactivos.

1.7.1. Biodegradación con Bacterias

Un gran número de bacterias aisladas de sedimentos y lodos contaminados con poliaromáticos son conocidas por su capacidad para degradar estos compuestos, entre las más estudiadas se encuentran: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium spp.*, *Haemophilus spp.*, *Rhodococcus spp.* y *Paenibacillus spp.* Los estudios acerca de la degradación de hidrocarburos poliaromáticos empleando cultivos de bacterias aisladas de suelos contaminados como *Mycobacterium spp.*, han permitido conocer los productos de la degradación parcial de compuestos como el pireno después de ensayos de exposición de entre 1 y 8 días, demostrando que dicha bacteria es capaz de utilizar al hidrocarburo como fuente de carbono y generar energía (Haritash & Kaushik, 2009). La degradación bacteriana generalmente inicia con la oxidación de los poliaromáticos a dihidrodioles y en una etapa posterior a productos dihidroxilados través de la acción enzimática de dioxigenasas; estos microorganismos generalmente adicionan dos moléculas de oxígeno en uno de los anillos de benceno por acción de proteínas intracelulares (dioxigenasas o monooxigenasas) formando cis-dihidrodioles que son convertidos a catecol o productos dihidroxilados. Los metabolitos generados a partir de catecol son convertidos a compuestos alifáticos que pueden ser utilizados en el metabolismo central, de esta manera la oxidación por dioxigenasas no sólo es un precursor de la ruptura de uno de los anillos, también juega un papel importante en la asimilación del hidrocarburo en las bacterias; cuando se degrada uno de los anillos, el segundo es atacado de manera similar al primero y así de manera sucesiva hasta tener un producto de degradación parcial (Warshawsky, Ladow, & Schneider, 2007) (Doyle et al., 2008).

1.7.2. Biodegradación con Hongos

Una gran variedad de hongos lignolíticos han demostrado tener la capacidad de degradar una amplia variedad de metales pesados como cromo tri y hexavalente (Gomez & Bertel, 2008), también son capaces de degradar de manera parcial y sólo en algunas especies de manera total, compuestos orgánicos como pesticidas organofosforados e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Algunas de las especies más utilizadas para la degradación de poliaromáticos son *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus ostreatus*. La degradación de los hongos lignolíticos ha sido intensamente

estudiada desde hace muchos años, en parte por la estructura irregular de la lignina; se sabe que las enzimas involucradas son extracelulares y con una afinidad a una gran variedad de sustratos (son inespecíficas), haciéndolos adecuados para la degradación de compuestos orgánicos muy estables como los HAP. El sistema lignolítico está compuesto por tres grupos principales de enzimas: la lignina peroxidasa, peroxidases dependientes de magnesio, las fenoloxidasas (lacasas y tirosinasas) y peroxidases (Haritash & Kaushik, 2009). La degradación de los hongos lignolíticos se da por reacciones de radicales oxidados no específicos catalizada por enzimas extracelulares generando como producto principal quinonas, algunas especies de hongos una vez sintetizada la quinona son capaces de mineralizarla hasta CO_2 . Hongos no lignolíticos generalmente oxidan a los poliaromáticos a través de enzimas citocromo P450 (monooxigenasas y epoxi hidrolasas) que catalizan reacciones para la síntesis de trans-dihidrodiolés, éstas son altamente regio y esteroespecíficas, otros metabolitos formados incluyen fenoles y quinonas, cabe mencionar que estos metabolitos son similares a los generados por los mamíferos (Cerniglia & Sutherland, 2001).

1.7.3. Biodegradación con Algas

Las algas fotoautótrofas marinas procariontes (*cianobacterias* o algas verde azuladas) y eucariontes (algas verdes (*Chlorophyta*), diatomeas cafés y rojas (*Phaeophyta* y *Rhodophyta*) tienen la capacidad de metabolizar a los HAP como una forma de eliminar al contaminante evitando algún daño celular (Fuentes, 2012). Algunas de las cianobacterias como *Oscillatoria sp.* y *Agmenellum quadruplicatum* degradan el naftaleno y el fenantreno a compuestos dihidroxilados (Warshawsky et al., 1995), mientras que un conjunto de microalgas pertenecientes al phylum de cianobacterias cultivadas en materia orgánica proveniente de los sedimentos contaminados y en asociación simbiótica con plantas como *Phragmites australis* capaz de degradar poliaromáticos como el pireno y el BaP (Yan, Jiang, Li, & Shi, 2014). Desde la década de los noventa la microalga de agua dulce *Selenastrum capricornutum* (eucarionte perteneciente al phylum *Chlorophyta*) creciendo en condiciones fotoautótrofas metaboliza al BaP a cis-dihidrodiolés, las enzimas involucradas en este proceso son dioxigenasas, las mismas que participan en los procariontes heterótrofos; este microorganismo es capaz de conjugar este tipo de compuestos para poder excretarlos al medio. Aunque son pocos los estudios recientes con respecto a la capacidad de degradación de la microalga, éstos ya no se limitan a

hidrocarburos de baja masa molar, se contempla la degradación de aquellos de alta masa molar y en algunos casos mezclas de ellos (Luo et al., 2014). Una de las limitantes al estudiar la transformación de los HAP pesados es la evidencia de su potencial fototoxicidad para algunas especies como *Anabaenaflos aquae*, se sabe que la toxicidad de los HAP radica en la formación de quinonas después de periodos prolongados de exposición. En el caso del BaP las quinonas formadas son 1,6-, 3-6- y 6-12-quinona. El daño asociado a estos compuestos en las células implica la arilación, oxidación, intercalación e inducción dentro de las cadenas de ADN generando radicales libres específicos que interfieren con la respiración mitocondrial (Warshawsky et al., 1995). La biorremediación de agua residual proveniente del acuocultivo con altas concentraciones de fósforo y amoníaco, ha empleado la asociación simbiótica entre bacterias y microalgas (*Chlorella sp.*), con este tipo de asociaciones los requerimientos para el crecimiento de los microorganismos se reducen; durante el proceso de respiración la bacteriana se produce CO_2 y se consume O_2 , mientras que la microalga lo hace de manera inversa (Lananan et al., 2014). De manera general las micro y macro algas verdes son componentes importantes del agua salada y dulce, su contribución a la degradación y desintoxicación de HAP sigue siendo relevante. Un mejor entendimiento del proceso de degradación de estos compuestos empleando microalgas ayudará en el desarrollo y mejoramiento de la remoción de contaminantes en los ecosistemas.

1.7.3.1. Mecanismo y variables importantes para la biodegradación de HAP empleando microalgas

En este apartado se tratará de manera general las variables reportadas para la degradación de poliaromáticos con microalgas. Cualquier microorganismo remueve contaminantes a través de una rápida y pasiva adsorción fisicoquímica en las paredes de la célula o sobre su superficie (biosorción), similar al fitoplancton y plantas; los contaminantes se acumulan dentro de las células por una absorción pasiva para ser degradados por una serie de enzimas. El esquema de la figura 7 presenta las diferentes rutas metabólicas empleadas para la remoción de HAP por tres tipos de microorganismos.

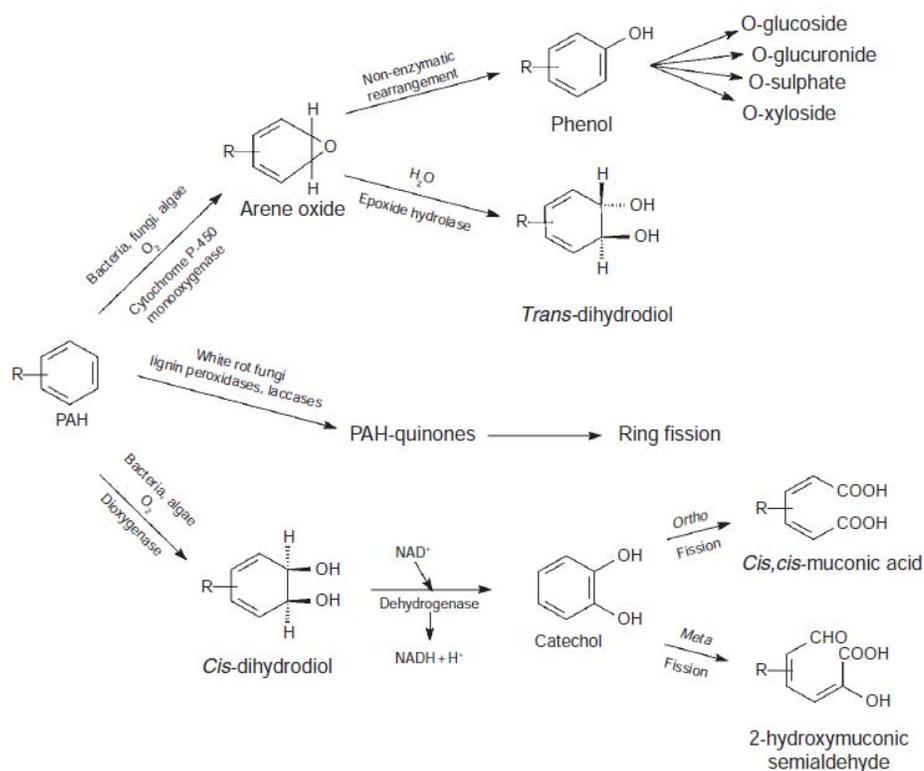


Figura 7. Posibles rutas metabólicas utilizando diferentes microorganismos en condiciones aeróbicas (Doyle et al. 2008)

Se conocen al menos 18 especies de microalgas de diferentes grupos taxonómicos, que incluyen a las cianobacterias, diatomeas y las microalgas de paredes verdes, rojas y cafés, capaces de metabolizar una gran variedad de poliaromáticos, algunas de estas especies se presentan en la tabla 3. Se sabe que la remoción de HAP empleando este tipo de microorganismos es específica para cada especie, debido a la diferencia en la composición y el tamaño de la pared celular.

Tabla 3. Ejemplos de microalgas empleadas en la biorremoción de HAP

Microalga	Phyllum	Composición de la pared celular	Color y tipo de pigmento	HAP que degradan
<i>Agmenellum quadruplicatum</i> , <i>Anabaena flosaquae</i>	Cianobacterias	Muerína (peptidoglucano)	Verde-azulada, Clorofila A	Naftaleno, fenantreno, benzo[a]pireno

<i>Chlamydomona</i> ssp., <i>Chlorella miniata</i>, <i>Scenedesmus platydiscus</i>, <i>Scenedesmus quadricauda</i>, <i>Selenastrum capricornutum</i>, <i>Synechocysti</i> ssp., <i>Ankistrodesmus braunii</i>	Chlorophyta	Celulosa	Verde, Clorofila A y B	Pireno, benzo[a]pireno, Benzo[a]antraceno, Benzo[k]fluoranteno y Bezo[b]fluoranteno
<i>Skeletonema</i>, <i>Costatum</i>, <i>Nitzschia</i> sp.	Ochrophyta	Celulosa	Café, clorofila A y C(xantofilas)	Fluoranteno y Fenantreno

El mecanismo involucrado en la remoción de HAP empleando microalgas es similar al que presentan al estar en contacto con metales pesados y algunos compuestos orgánicos como el tributilestaño o la atrazina. Inicia con una remoción rápida a través de una adsorción fisicoquímica (en la superficie de la célula) seguida de una lenta absorción pasiva (dentro de la célula), acumulación y degradación (Tang, Hoaglang, & Siegfried, 1998), se sabe que el grado de bioacumulación de compuestos orgánicos tóxicos es específica para cada especie. En el caso del fenantreno se ha reportado una adsorción pasiva diferente para dos clases de microalgas, *Nitzschia* sp., presenta un adsorción del 67.2% después de un periodo de incubación de 6 horas, por su parte *Skeletonema costatum* mostró una adsorción de 9.9% bajo las mismas condiciones (Hong et al., 2008).

La presencia de metabolitos dihidroxilados de HAP sugiere que la microalga *S. capricornutum* degrada poliaromáticos de baja masa molar utilizando monooxigenasas, similar a las que emplean algunos hongos. Los productos dihidroxilados de algunos poliaromáticos se sintetizan a partir de trans-dihidrodiololes o cis-dihidrodiololes para finalmente formar los metabolitos dihidroxilados. *S. capricornutum* metaboliza al BaP utilizando dioxigenasas (similar a las bacterias) en cuatro diferentes cis-dihidrodiololes (Warshawsky, 1995).

1.7.3.2. *Selenastrum capricornutum*

Las algas eucariontes son parte esencial de un gran número de ecosistemas que van desde ambientes marinos de agua dulce, hasta aguas termales en el hielo. Representan más de la mitad de la producción primaria total en la base de la cadena alimenticia, son organismos muy variados y especializados. Su clasificación radica principalmente en el tipo y composición de los pigmentos fotosintéticos presentes en las diferentes especies de microalgas (figura 8). Los productos de almacenamiento y composición de la pared celular juegan un papel importante para su clasificación. Existe una clasificación sistemática de las algas eucariontes que divide a las especies en cinco grandes grupos: *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas cafés), *Pyrrophyceae* (dinoflageladas), *Rhodophyceae* (algas rojas) y *Chrysophyceae* (algas verdes y amarillas). Se sabe que la capacidad de adaptación de este tipo de microorganismos a un gran número de condiciones ambientales se refleja en una excepcional variedad de patrones de lípidos, así como su capacidad de sintetizar una serie de compuestos inusuales (Guschina & Harwood, 2006).

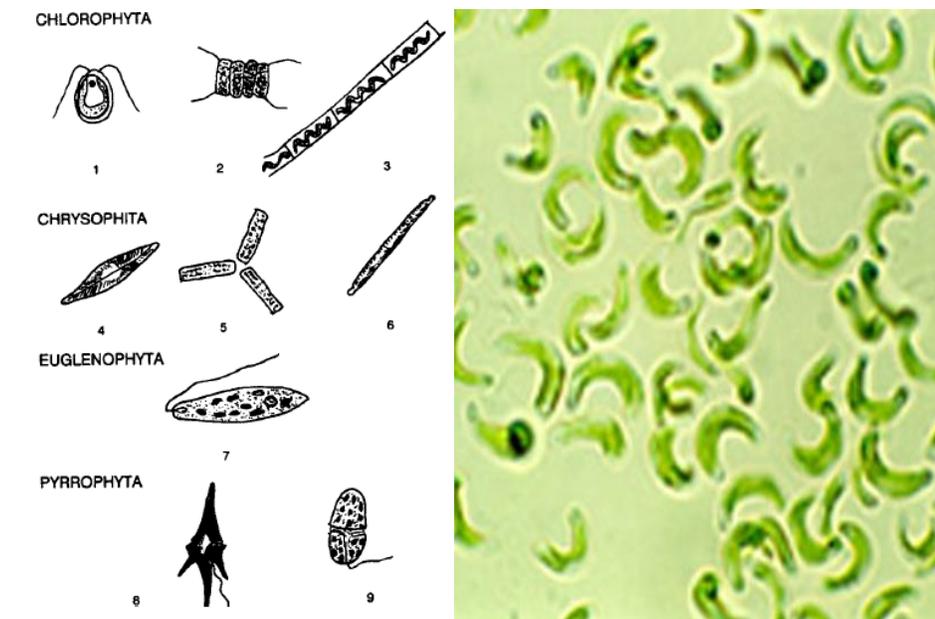


Figura 8. Algunas microalgas encontradas en el agua potable y residual (1) *Chlamydomonas*, (2) *Scenedesmus*, (3) *Spyrogira*, (4) *Navicula*, (5) *Tabellaria*, (6) *Synedra*, (7) *Euglena*, (8) *Ceratium*, (9) *Gymnodinium*. *Selenastrum capricornutum* (derecha) (Bitton, 2001)

Selenastrum capricornutum es una microalga unicelular con dimensiones entre 12 μm de largo y 5.9 μm de ancho, con forma de media luna como se muestra en la figura 8, de

agua dulce perteneciente al grupo de las *Chlorophyceae* o algas verdes, fotosintética y autótrofa. Es empleada en un gran número de protocolos en bioensayos para evaluar la toxicidad química. Este microorganismo originalmente fue aislado del río Nitelva localizado en Noruega en 1959. El 50% de su pared celular está compuesta principalmente por ácidos grasos de 16 y 18 carbonos (ácido palmítico y oleico) (McLarnon & Rolph, 1998). Este tipo de microalga puede formar parte del fitoplancton y juegan un rol importante como productores primarios en ambientes acuáticos, pueden llevar a cabo la oxidación de un sin número de compuestos en los estanques de tratamiento de aguas residuales. Como ya se mencionó *S. capricornutum* es un microorganismo fotoautótrofo, su pared celular contiene clorofila A y B; realiza una fotosíntesis oxigénica (usa como fuente de energía la luz y agua como donador de electrones), crece en medios minerales con suplementos nutricionales ricos en péptidos, aminoácidos, nitrógeno, utiliza como fuente de carbono CO₂. En condiciones naturales muchas de los requerimientos nutricionales los proveen las bacterias. Este tipo de microalga tiene una reproducción sexual y asexual (Bitton, 2001).

1.7.3.3. Concentración de células

La bioacumulación de compuestos orgánicos por acción de una amplia variedad de especies de algas ha sido ampliamente demostrada. El tamaño y la morfología de cada célula juegan un rol importante en un gran número de actividades fisiológicas, como la captación de nutrientes y la regulación de productos de desecho (sistemas de secreción). Algunos autores sugieren que una proporción grande entre área superficial y biovolumen para una microalga, tendrá un potencial de adsorción mayor, esto se demostró en bioensayos con atrazina (Tang et al., 1998). La remoción de poliaromáticos empleando diferentes especies de microalgas está directamente relacionada con la densidad celular inicial empleada; en general una densidad celular alta o biomasa provee una mayor área superficial, volumen de adsorción y absorción de contaminantes, que conduce a una mejor eliminación en un periodo de tiempo más corto. En el 2006 Chan et al. descubrieron que la remoción de una mezcla de fenantreno, fluoranteno y pireno empleando *S. capricornutum* aumentaba con una densidad celular inicial de 1×10^7 células/mL en comparación con la empleada de manera regular de 5×10^4 células/mL; adicionalmente a la densidad celular empleada, otras propiedades como la composición y el tamaño de la

pared celular así enzimas involucradas en el proceso de desintoxicación de HAP podrían ser importantes al determinar las diferencias entre cada especie para la eliminación de estos compuestos (Hong et al., 2008).

La remoción y degradación de poliaromáticos por determinado tipo de microalgas debe ser evaluada y optimizada; se sabe que la eficiencia en la remoción está afectada por la concentración de algas en el medio, porque mayor biomasa proporciona más superficie de células, volumen, enzimas para la adsorción, absorción y degradación del contaminante. Sin embargo, si la biomasa es demasiado alta, las células se agregan, lo que lleva a una reducción en el área efectiva para a adsorción (Chan, Luan, Hung, & Fung, 2006). A una concentración celular extremadamente alta algunos de los problemas más frecuentes son: la competición por recursos, la distribución no homogénea de luz causada por la congregación de células originando que las células incapaces de obtener luz no realicen una actividad metabólica óptima (Mallick & Rai, 1993), restricción del crecimiento y por lo tanto una disminución en el potencial de degradación. Otra razón por la que se evita utilizar cantidades grandes de biomasa es el aumento de productos de excreción (compuestos orgánicos) por parte de las microalgas que se acumulan en el medio obligando a los metales pesados y contaminantes orgánicos a unirse reduciendo su biodisponibilidad para la captación de las algas (Lei et al., 2007).

1.8. Cromatografía de líquidos de alta resolución CLAR (High Performance Liquid Chromatography HPLC)

En este tipo de cromatografía la fase móvil (disolvente que desciende a través de la columna) es líquido. La fase estacionaria (se encuentra fija en el interior) son normalmente partículas sólidas empaquetadas dentro de una columna. El reparto de los solutos entre la fase móvil y la fase estacionaria da lugar a la separación. El fluido que entra por la columna se llama eluyente, el fluido que sale por un extremo de la columna se llama eluato y el proceso de paso de un líquido a través de la columna se llama elución (Harris, 2012) (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2010).

La cromatografía de líquidos se divide en varias categorías en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria.

- Cromatografía de adsorción: el soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas de la fase estacionaria, cuanto más fuertemente se adsorbe un soluto, más lentamente atraviesa la columna.
- Cromatografía de reparto: el soluto se disuelve en la fase líquida con la que está recubierta la superficie de un soporte sólido.
- Cromatografía de intercambio iónico: existen aniones o cationes covalentemente unidos a la fase estacionaria sólida llamada resina. Los iones en disolución de carga opuesta son atraídos hacia la fase estacionaria por fuerzas electrostáticas.
- Cromatografía de exclusión molecular: separa moléculas por su tamaño, las moléculas de mayor tamaño pasan más rápidamente, no hay interacción activa entre las dos fases.
- Cromatografía de afinidad: es la más selectiva, emplea interacciones específicas entre una clase de moléculas de soluto y una segunda molécula que está unida covalentemente (inmovilizada) en la fase estacionaria.

La CLAR es una de las diferentes técnicas instrumentales empleadas para la separación de muestras, comparada con otras técnicas se destaca por:

- Ser universalmente aplicable, muy pocas son las muestras que son difíciles de separar empleando esta técnica.
- Los ensayos, de manera general suelen tener presiones por debajo de ± 0.5 %, cuando se trata de matrices simples.
- Existe una amplia variedad de equipos, columnas y otros materiales disponibles comercialmente, permitiendo el uso del equipo en un gran número de aplicaciones
- un gran número de laboratorios que trabajan en el análisis de mezclas químicas están equipados con CLAR, siendo en la mayoría de los casos su primera elección.

De forma simplificada el análisis cromatográfico inicia cuando la muestra se inyecta para pasar a través de la columna (este paso puede ser automatizado), el disolvente continuamente fluye a través de la columna y los compuestos separados son detectados continuamente cuando salen de la columna, la señal resultante en función del tiempo se grafica en un cromatograma. Después del proceso de inyección el “software” instalado en la computadora controla por completo la operación, al final genera un informe sobre el análisis de la muestra (proporcionando áreas, tiempos de retención, etc.). Otras

características de esta técnica es el uso de bombas de alta presión (permiten separaciones más rápidas) y el uso de columnas reutilizables y eficaces, con todo esto se logra un mejor control del proceso obteniendo resultados más precisos y reproducibles. Después de la inyección de la muestra la separación de sus componentes se lleva a cabo dentro de la columna, hasta que son eluidos y detectados empleando equipos de absorción ultravioleta o espectrómetros de masas, el procedimiento anterior se describe en la figura 9. La separación está determinada por el tipo de columna, que consiste en un tubo cilíndrico de determinadas proporciones llena con partículas esféricas con un diámetro entre 1.5-5 μm ; en la mayoría de los casos estas partículas son de sílice porosa, dentro de cada poro se encuentra un recubrimiento con la fase estacionaria (C_{18}) unido a la partícula de sílice.

En CLAR el análisis comúnmente se realiza en fase reversa, donde la columna está empacada con un soporte no polar (C_{18}) y como fase móvil un disolvente polar o mezcla de disolventes polares (metanol-agua). Si la composición del disolvente permanece constante a lo largo del análisis cromatográfico se le conoce como elución isocrática; por otra parte si durante el proceso, el porcentaje de una mezcla de disolventes va cambiando se le llama elución con gradiente.

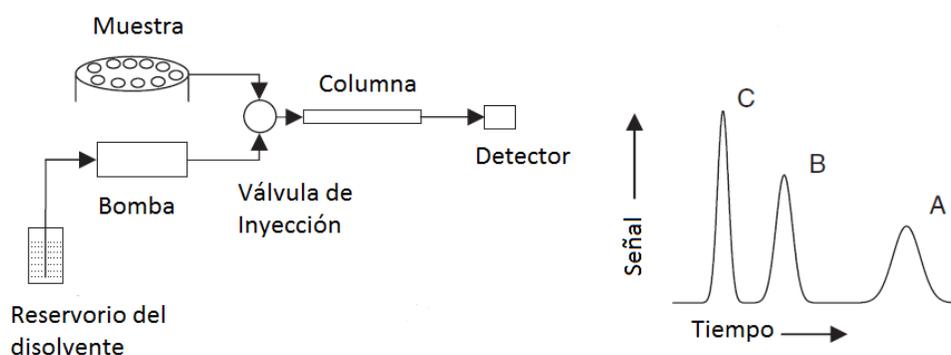


Figura 9. Diagrama general de un equipo de CLAR (derecha), cromatograma en función del tiempo (izquierda) (Snyder et al., 2010)

1.8.1. Parámetros cromatográficos

El proceso de separación de una muestra con diferentes componentes presenta dos comportamientos característicos:

1. Migración diferencial: las moléculas de los componentes de una muestra presentan diferentes velocidades medias de migración a través de la columna, sin esta diferencia de migración entre los diferentes solutos no puede existir una separación.
2. Esparcimiento molecular: cuando un soluto pasa a través de la columna sus moléculas se van esparciendo dentro de ella. El volumen que abarcan las moléculas de soluto dentro de la columna se define como banda. Cuando una banda deja la columna la información se recaba en el cromatograma como un pico. La identidad de cada pico se determina por el tiempo que tarda en dejar la columna.

Una vez que se tiene en mente los dos procesos fundamentales que tiene lugar dentro de una columna cromatográfica podemos empezar describir algunos conceptos fundamentales (Snyder et al., 2010) (Harris, 2012) (Snyder & Kirkland, 1979).

Tiempo de retención (t_R): para cada soluto es el tiempo que transcurre desde la inyección de una muestra hasta que los componentes llegan al detector (aparición de la parte superior del pico en el cromatograma)

Tiempo muerto (t_0 o t_m): tiempo de retención del pico del disolvente, que no interacciona con la fase estacionaria y atraviesa la columna en el mínimo tiempo posible.

Velocidad de flujo lineal (u): es la velocidad con la que la fase móvil atraviesa la columna

Velocidad de migración (u_x): velocidad con la que cada soluto se mueve a través de la columna, está determinada por la fracción R que representa la cantidad de moléculas presentes en la fase móvil en cualquier momento

$$u_x = R u \quad \text{Ecuación 1}$$

Velocidad de la fase móvil (u): distancia media recorrida por la fase móvil por unidad de tiempo (cm/s)

Flujo (F): gasto en volumen del disolvente por unidad de tiempo, medido a la salida de la columna y a temperatura ambiente (mL/min)

Volumen de retención: volumen de la fase móvil necesaria para eluir un soluto determinado en la columna

$$V_R = t_R F \quad \text{Ecuación 2}$$

Coefficiente de reparto: el equilibrio de distribución implicado en la cromatografía están descritos por ecuaciones simples que suponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y móvil, así para una especie x:

$$X(\text{fase móvil}) \Leftrightarrow X(\text{fase estacionaria}) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde K es la constante de distribución y está definida por:

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{Ecuación 4}$$

C_s es la concentración molar del analito en la fase estacionaria y C_m es la concentración molar del analito en la fase móvil.

Factor de retención (k'): también conocido como factor de capacidad, relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna; para un conjunto de condiciones definidas k' es una medida del tiempo que transcurre un soluto en la fase estacionaria y el tiempo transcurrido en la fase móvil.

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{C_s}{C_m} \frac{V_s}{V_m} = K \frac{V_s}{V_m} = K \Psi \quad \text{Ecuación 5}$$

El equilibrio del soluto entre ambas fases (constante de distribución) se representa con k y ψ representa a la relación de fases. El valor de k' es importante para cada pico ya que nos permite mejorar la calidad en la separación; este parámetro también se emplea para describir las velocidades de migración de los analitos en la columna, en términos experimentales se puede representar como:

$$k = k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Ecuación 6}$$

Selectividad (α): muestra de la afinidad de los solutos por las fases implicadas, indica el potencial de separación de los solutos en el sistema, pero no mide la separación real, este parámetro siempre debe ser mayor a 1, al aumentar la separación de los componentes es

mejor; de manera simple este parámetro se puede definir como el cociente de los tiempos de retención ajustados (t'_R).

$$t'_R = t_R - t_0 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\alpha = \frac{t'_{RB}}{t'_{RA}} = \frac{t_{RB} - t_0}{t_{RA} - t_0} \quad \text{Ecuación 8}$$

Hay dos factores que determinan el grado con el que se pueden separar los compuestos por cromatografía. Uno es la **diferencia de tiempos** de elución de los respectivos picos: cuanto más distantes sean mejor separación. El otro factor es la **anchura de los picos (w)**: cuanto más ancho sean los picos, peor será la separación. Al pasar por la columna cromatográfica los solutos tienden a difundirse según una curva gaussiana, con desviación estándar σ . Si el soluto pasa mucho tiempo en la columna más ancha se hace la banda. Para medir la anchura de la banda se emplea: la anchura $w_{1/2}$ media a la mitad de la altura del pico o la anchura en la base w , medida entre los cortes de las tangentes trazadas en los flancos de mayor pendiente. De acuerdo con el comportamiento gaussiano de los picos sabemos que:

$$w_{1/2} = 2.35\sigma \quad \text{Ecuación 9}$$

$$w = 4\sigma \quad \text{Ecuación 10}$$

Altura de plato teórico (H): es la constante de proporcionalidad entre la varianza de la banda (σ^2) y la distancia que ha recorrido (x), en cromatografía la altura de un plato se considera como término que relaciona la anchura de una banda con la distancia que ha recorrido el analito a través de la columna, cuanto más pequeña es la altura del plato, más estrecha es la banda. Una columna es más eficiente si tiene más platos teóricos.

$$H = \frac{\sigma^2}{x} \quad \text{Ecuación 11}$$

Los distintos analitos que pasan por la columna tienen diferentes alturas de plato, porque tienen diferentes coeficientes de difusión, la altura de un plato en CLAR vale aproximadamente 10 μm . Para un soluto que sale de la columna con longitud L , el número de platos teóricos N en toda la columna es:

$$N = \frac{L}{H} \quad \text{Ecuación 12}$$

Si sustituimos el valor de σ despejado de la ecuación 2 y se sustituye en la ecuación, cambiando x por L tenemos:

$$H = \frac{w^2}{16L} \quad \text{Ecuación 13}$$

De esta manera al sustituir el valor de H obtenido en la ecuación 5 en la ecuación 4 podemos llegar a una relación más simple entre N y L:

$$N = \frac{16L^2}{w^2} \quad \text{Ecuación 14}$$

Eficiencia de la columna: capacidad relativa de una columna para proporcionar picos estrechos y se define por el número de platos teóricos

Número de platos teóricos en una columna: se puede calcular con las siguientes relaciones.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_1/2} \right)^2 \quad \text{Ecuación 15}$$

Resolución: es la separación entre los picos (en unidades de tiempo o de volumen) entre la suma de la anchura de los picos, para un análisis cualitativo es conveniente que este parámetro sea mayor a 1.5.

$$\text{Resolución} = \frac{\Delta t_R}{\frac{1}{2}\Sigma w} = \frac{\Delta V_R}{\frac{1}{2}\Sigma w} \quad \text{Ecuación 16}$$

De manera práctica podemos entender la resolución como una medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos analitos con picos adyacentes. La relación entre el número de platos de una columna, el factor de capacidad, la selectividad y la resolución es:

$$\text{Resolución} = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2(t_{R_B} - t_{R_A})}{W_A + W_B} \quad \text{Ecuación 17}$$

Son tres los factores que influyen en la resolución cromatográfica: retención, selectividad y eficiencia

$$\text{Resolución} = \left[\frac{k'}{1+k'} \right] \left[\frac{\alpha-1}{\alpha} \right] \left[\frac{\sqrt{N}}{4} \right] \quad \text{Ecuación 18}$$

1.9. Preparación de muestras

La preparación de muestra es la serie de pasos necesarios para convertir la muestra en una forma adecuada para el análisis, esta preparación puede comprender la disolución de la muestra, la extracción del analito de una matriz compleja, la concentración de un analito diluido hasta concentraciones que puedan ser medidas, la conversión química del analito en una forma detectable y la eliminación o enmascaramiento de especies interferentes.

Las inyecciones directas de las muestras resultan más convenientes y precisas, sin embargo, en la mayoría de las muestras analizadas por CLAR se mide su masa y/o se disuelven antes de la inyección en el equipo. Los mejores resultados se obtienen cuando la composición del disolvente empleado en las muestras tiene propiedades similares a la fase móvil, de esta manera se minimiza el tiempo de estabilización de la línea base. Algunas muestras necesitan una separación parcial (pretratamiento) antes de su análisis, esto con el fin de eliminar interferentes, concentrar los analitos dentro de la muestra o eliminar compuestos dañinos para el sistema cromatográfico, por esta razón es importante conocer la naturaleza de la matriz y la concentración aproximada o probable de los analitos. En muchos casos el desarrollo de una adecuada metodología de preparación o pretratamiento de muestras puede ser más desafiante que la separación cromatográfica. Cabe señalar que la preparación de muestras es una parte esencial del análisis con CLAR, proporcionando una disolución reproducible y homogénea apta para ser inyectada en la columna. Algunos de los objetivos principales de los pretratamientos son proveer alícuotas:

1. de muestras relativamente libres de interferentes
2. que no dañen a la columna
3. compatibles con el método desarrollado en el equipo de CLAR, evitando que el disolvente empleado afecte los tiempos de retención y resolución del analito

En muchos casos se desea que la concentración de los analitos sea la adecuada para mejorar la detección o separación, ésta es una de las razones por las que en este trabajo se emplearon dos métodos de extracción.

La extracción de compuestos orgánicos en muestras acuosas involucra un equilibrio de reparto entre una fase acuosa y una fase orgánica similar al que se representa con la ecuación 3 en la página 37; esta fase orgánica puede ser un disolvente líquido,

algún adsorbente o superficie polimérica. Sin importar el tipo de fase orgánica sigue los mismos principios que una extracción, de esta manera se pueden aplicar las ecuaciones para calcular las fracciones necesarias para la extracción de compuestos orgánicos o rendimiento de extracción.

$$E = \left(\frac{C_0 V_0}{C_0 V_0 + C_{ac} V_{ac}} \right) \quad \text{Ecuación 19}$$

$$E = \frac{K_d V}{1 + K_d V} \quad \text{Ecuación 20}$$

$$E = 1 - \frac{1}{(1 + K_d V)^n} \quad \text{Ecuación 21}$$

Donde C_0 y C_{ac} son las concentraciones del compuesto orgánico en las fases respectivas, K_d es el cociente entre la concentración del compuesto en la fase orgánica entre la acuosa y V la relación de fases.

1.9.1. Extracción en fase sólida (EFS)

Hoy en día esta técnica de preparación de muestra es una de las más utilizadas como una alternativa viable y ecológica frente a la extracción líquido-líquido clásica en compuestos orgánicos no volátiles en muestras acuosas. La EFS puede ser descrita como una cromatografía simple, donde el adsorbente es la fase estacionaria y la fase móvil es de manera obligatoria la disolución que contiene al analito (Hennion, 2000). Puede ser utilizada para concentrar y/o limpiar una muestra antes de su análisis instrumental. De manera simple esta técnica se utiliza en un adsorbente empacado en un cartucho de plástico, donde la muestra acuosa con el analito se carga directamente en el cartucho. El paso de la muestra a través del cartucho puede ser empleando un sistema de vacío o a gravedad. La selección de adsorbente adecuado es crucial para la retención selectiva del analito y la eliminación de interferentes. El adsorbente antes de ser empleado debe ser lavado con un disolvente apropiado con el fin de eliminar compuestos residuales del material. Finalmente empleando una secuencia de elución adecuada se eliminan los interferentes y es posible eluir el o los compuestos de interés para su análisis directo o ser sometidos a un proceso de evaporación para concentrar más la muestra (Nickerson, 2011).

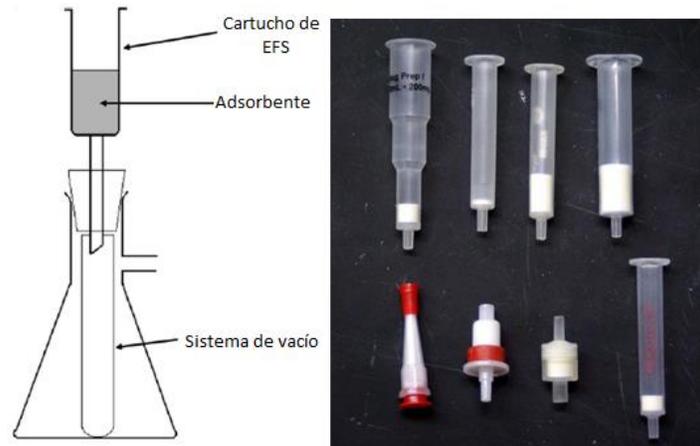


Figura 10. Componentes físicos básicos de un sistema de EFS fuera de línea (izquierda), cartuchos de EFS comerciales (derecha)

Los aspectos más importantes al momento de emplear la EFS son (Simpson & Wells, 2000):

- Selección del tipo y cantidad de adsorbente: los adsorbentes empleados se clasifican como de fase normal, de fase reversa y de intercambio iónico. Los adsorbentes más comunes están compuestos de partículas de sílice irregulares, con diámetros entre 30 y 60 μm , unidas químicamente a una amplia variedad de grupos funcionales como cadenas alquílicas de 18 ó 8 carbonos. Los adsorbentes con grupos funcionales no polares como en cromatografía de líquidos se conocen como de fase reversa y se emplean de manera preferencial para la retención de compuestos con la misma polaridad como los HAP.
- Determinación del volumen de muestra que se puede aplicar en el cartucho sin tener pérdidas en el recobro.
- Selección del disolvente o disolventes y los volúmenes empleados en la secuencia de lavado y elución o desorción, pasos cruciales durante el proceso para evitar pérdidas del analito. Los disolventes comúnmente empleados en fase reversa son agua, metanol, isopropanol y acetonitrilo.

Los cartuchos empleados tanto en EFS son de polipropileno o politetrafluoroetileno, con una entrada lo suficientemente amplia para introducir el adsorbente y la muestra, la salida del cartucho es estrecha; la masa de adsorbente se coloca dentro del cartucho entre dos

frits de polietileno (similares a papel filtro) que se colocan en la salida y en la parte superior. De manera general el proceso de la EFS se puede resumir en los siguientes pasos (Dean, 2013):

1. Hidratación del adsorbente, lo que permite que las cadenas alquílicas colapsadas o torcidas en la superficie de la sílice al solvotarse se extiendan, de esta manera se asegura un buen contacto entre los compuestos y los grupos funcionales, el adsorbente debe mantenerse húmedo en cada una de las etapas para evitar porcentajes de recobro bajos.
2. Acondicionamiento del adsorbente empleado un disolvente similar a la solución de muestra que se va a extraer.
3. Carga de la muestra: se pasa a través del adsorbente por succión por vacío o por gravedad, con la elección adecuada de fase estacionaria. En este paso se espera que los compuestos de interés sean retenidos en lugar de material extraño y otros compuestos relacionados, sin embargo, esta situación ideal no siempre ocurre ya que compuestos con estructuras similares sin duda serán retenidos.
4. Lavado del adsorbente que contiene a la muestra: permite la eliminación de interferentes y material extraño.
5. La elución de los compuestos de interés del adsorbente se realiza usando la cantidad mínima de disolvente, para favorecer una pre-concentración de estos.

Existen dos modalidades para la EFS: **en línea (on-line)**, donde la preparación de la muestra está conectada al sistema cromatográfico y la manipulación de la muestra es menor, dando pie al desarrollo de procesos automatizados; por otro lado tenemos la modalidad **fuera de línea (off-line)**, la preparación de la muestra se realiza de manera independiente del análisis instrumental y la manipulación de la muestra para su pre-concentración es mayor, por lo que el error asociado aumenta.

1.9.2. Dispersión en Matriz de Fase Sólida (DMFS)

Es una técnica de preparación de muestra análoga a la EFS, combina las etapas de extracción y limpieza, permitiendo el procesamiento de una muestra en paralelo. Ha demostrado ser una técnica eficiente para el aislamiento de una gran variedad de drogas,

pesticidas, compuestos de origen antropogénico y natural, así como una amplia gama de compuestos en plantas y tejidos animales (Inamuddin & Mohammad 2014; Dean, 2013).

Una de sus principales aplicaciones se da en los procesos analíticos para la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras biológicas sólidas, semi-sólidas o con alta viscosidad. Los principios físicos y químicos básicos en los que se fundamenta esta técnica involucran fuerza aplicada a la muestra por mezcla mecánica para producir una completa ruptura y/o disgregación de los componentes, permitiendo la interacción de ésta con los grupos funcionales dentro del soporte sólido (como sílice C18). De esta manera, la muestra se dispersa sobre la superficie del material produciendo, a través de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas de los diversos componentes, una fase con características cromatográficas únicas para realizar el aislamiento de los analitos (Barker, 2007). El procedimiento general se presenta en la figura 11, donde se pueden observar los pasos básicos de una DMFS.

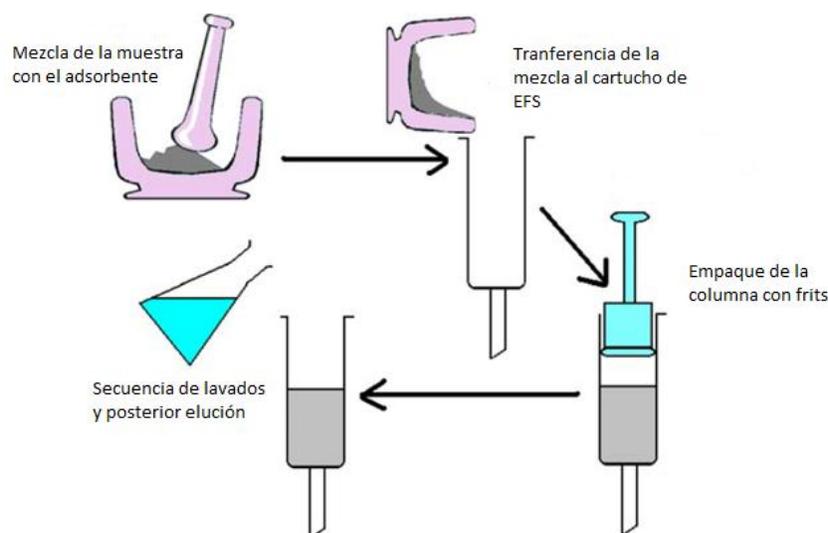


Figura 11. Procedimiento general de la dispersión de matriz en fase sólida (Dean, 2013)

De manera similar a la EFS, la DMFS elimina muchas de las desventajas y complicaciones de la extracción líquido-líquido y supera en muchos aspectos a la EFS cuando se debe trabajar con muestras no líquidas, debido a que todas las formas clásicas de cromatografía de líquidos requieren que la muestra esté en disolución. Otra de las ventajas que presenta esta técnica son los tiempos de extracción cortos. Hay dos

modalidades cuando se realiza la DMFS, al igual que en la EFS (Inamuddin & Mohammad, 2014):

1. Que los analitos sean retenidos en la columna y los interferentes sean eliminados en secuencias de lavados, para finalmente eluir los analitos.
2. Que los interferentes de la matriz donde se encuentra el analito son retenidos de manera selectiva en la columna y el analito sea eluido directamente.

De manera general, en el proceso de DMFS la muestra y el adsorbente se colocan dentro de un mortero de vidrio o ágata para ser mezclados de manera física con ayuda del pistilo por lo menos treinta segundos, una vez transcurrido este tiempo el contenido del mortero es trasferido a un cartucho de EFS con las dimensiones adecuadas, la longitud total de la columna estará compuesta por la mezcla, para finalmente realizar un secuencia de lavados como se realizan en le EFS y finalmente la desorción de los analitos de interés. (Barker, 2007; Capriotti et al., 2010)

Hay una serie de puntos a considerar al trabajar con esta técnica de preparación de muestras (Dean, 2013):

- Elección del material de soporte de acuerdo con las características del analito (s) que se desean aislar o extraer.
- La proporción entre la muestra y el adsorbente comúnmente debe variar entre 1:1 y 1:4 m/m, por ejemplo en la relación 1:4, por 0.5 g de muestra se requieren 2.0 g de adsorbente.
- La adición de agentes quelantes, ácidos y bases pueden afectar o mejorar la limpieza y elución de los compuestos.
- Selección de disolventes para la eliminación de interferentes.
- Selección de disolventes (s) para la elución del analito.
- Volumen de elución que dependerá de la relación de masa muestra-adsorbente.
- Influencia de la matriz donde se encuentra el analito, da características propias a la muestra e influye directamente en la recuperación.
- Puede requerir procedimientos de limpieza adicionales antes o después de su análisis.

1.9.3. Ventajas de la EFS y DMFS

De manera general las ventajas de la EFS y la DMFS se pueden observar en el diagrama de la figura 12. Cabe señalar que ambas técnicas han sido ampliamente utilizadas en un sin número de muestras biológicas y ambientales, se han desarrollado metodologías para la determinación de más de setenta compuestos orgánicos semi-volátiles, que incluyen pesticidas con diferentes propiedades químicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y bifenilos policlorados en muchos tejidos animales (Capriotti et al., 2013), en muchos otros casos estas técnicas fueron comparadas con otros métodos de extracción dando como resultado mejores porcentajes de recuperación y mayor precisión (Capriotti et al., 2010).



Figura 12. Procedimiento general de la dispersión de matriz en fase sólida (Dean, 2013)

1.10. Validación de metodologías y técnicas analíticas

Cuando se tiene el interés en medir un componente en una muestra es necesario contar con una metodología de medición (método analítico). Por esta razón se hace uso del método científico para alcanzar el desarrollo de un método realizando estudios

experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo, un proceso que permite cumplir este fin es la validación.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra a través de resultados experimentales, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir cumple con su propósito (Colegio Nacional de QFB de México A. C., 2002).

La validación examina las características de desempeño de un método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse de éste cuando se aplique a un tipo de muestra específico. Los parámetros de desempeño recomendados para la validación completa o parcial de un método que realiza mediciones por CLAR se encuentran en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de desempeño a evaluar de acuerdo con el grado de validación (Centro Nacional de Metrología, 2008)

Validación completa	Validación parcial
1. Recuperación	1. Recuperación
2. Sensibilidad	2. Límite de detección
3. Selectividad	3. Límite de cuantificación
4. Robustez	4. Intervalo lineal y de trabajo
5. Límite de detección	5. Reproducibilidad (medición durante al menos tres días)
6. Límite de cuantificación	6. Repetibilidad
7. Intervalo lineal y de trabajo	7. Sesgo
8. Reproducibilidad	8. Incertidumbre
9. Repetibilidad	
10. Sesgo (evaluado a partir de la recuperación)	
11. Incertidumbre	

La incertidumbre se estimará tomando en cuenta que el mensurando depende de un método de ensayo o prueba, es decir la medición es posterior a una serie de etapas complejas de tratamiento de muestras.

1.10.1. Grado de validación

El alcance de la validación o revalidación requerida dependerá de la naturaleza de los cambios hechos para la aplicación de un método en diferentes laboratorios, diferente instrumentación o diferentes analistas y las circunstancias en las que el método vaya a ser usado. Por lo tanto los parámetros de desempeño a evaluar dependerán del grado de validación requerida.

- ✓ **Revalidación:** comprobación de que el método analítico mantiene su desempeño cuando existen cambios en la composición de la muestra, el método o cambios críticos en el proceso de fabricación (Colegio Nacional de QFB de México A. C., 2002).

Un método validado debe ser revalidado si el alcance original de la metodología (por ejemplo el intervalo de concentraciones) ha cambiado o los procedimientos de preparación de muestra son diferentes.

Tabla 5. Requisitos de validación (Centro Nacional de Metrología, 2008)

SITUACIÓN	GRADO DE VALIDACIÓN O REVALIDACIÓN REQUERIDA
Desarrollo de un método para un problema en particular	Completo
Existe un método evaluado para aplicarlo en un problema en particular	Completo
Un método establecido, realizar una revisión para incorporar innovaciones	Parcial o completo
Un método establecido, extenderlo o adaptarlo a un problema nuevo	Parcial o completo
Cuando el control de calidad indica que un método establecido cambia con el tiempo	Parcial o completo
Establecer un método en un laboratorio diferente	Parcial
Establecer un método con diferente instrumentación	Parcial
Establecer un método con diferente operador	Parcial

1.10.2. Definición de los parámetros de desempeño para una revalidación parcial

Debido a que se trabajó con una metodología analítica ya validada se decidió realizar un proceso de revalidación parcial, todos los parámetros de una validación completa se evaluaron por (Velasco Cruz, 2011). Los métodos de preparación de muestra fueron los

mismos empleados en el trabajo de Velasco, sin embargo, los intervalos de concentración, el sistema cromatográfico y la cantidad de muestra empleada fueron diferentes (BIPM, 2009) (Eurachem, 2005) (Centro Nacional de Metrología, 2008).

1. **Recuperación o recobro:** fracción del analito adicionada a una muestra de prueba (muestra fortificada o adicionada) previa al análisis, que es determinada efectivamente por el método.
2. **Límite de detección:** concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.
3. **Límite de cuantificación:** concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.
4. **Intervalo lineal y de trabajo:** concentraciones incluidas entre las concentraciones superiores e inferiores del analito, para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal. Conjunto de valores del mensurando para los cuales se pretende que el error de un instrumento de medición caiga dentro de límites especificados. Es el intervalo de concentraciones de analito en que su respuesta es proporcional a la concentración (Harris, 2012).
5. **Reproducibilidad:** condiciones según las cuales los resultados de prueba se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos.
6. **Repetibilidad (de resultados de mediciones):** se refiere al grado de concordancia de los resultados, cuando las condiciones se mantienen constantes, con el mismo analista, reactivos, equipo e instrumentos llevado a cabo dentro de un corto periodo de tiempo, mismos días.
7. **Precisión intermedia:** Precisión de un método analítico, expresada como concordancia relativa obtenida entre las determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio por un mismo analista en diferentes días.

8. **Sesgo:** la diferencia entre el valor esperado de los resultados de prueba y un valor de referencia aceptado. Es el error sistemático total en contraste con el error aleatorio.
9. **Incertidumbre:** parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podría atribuirse razonablemente la mensurando, este parámetro puede ser una desviación estándar.

A continuación se definirán algunos otros parámetros importantes durante un proceso de validación analítica.

Precisión: es la proximidad de la concordancia entre los resultado de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas; sólo depende de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor especificado. Las mediciones cuantitativas de la precisión se determinan a través de la reproducibilidad y la repetibilidad.

Linealidad: define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

Error (de medición): diferencia entre un valor medido de una magnitud y un valor de referencia.

Error aleatorio: componente del error de medida que en mediciones repetidas varía de manera impredecible, son los originados por parámetros que no se consideran en la medición (desconocidos) y sólo se puede estimar. Los errores aleatorios de un conjunto de mediciones repetidas forman una distribución que puede representarse por su esperanza matemática y por su varianza.

Error sistemático: componente del error de medida que en mediciones repetidas permanece constante o varía de manera apreciable, son conocidos y controlables, éstos se minimizan o eliminan a través de las buenas prácticas de laboratorio y procedimientos para garantizar la calidad de los resultados, caracterizar al error sistemático en un

procedimiento analítico es la desviación estándar (positiva o negativa) de la media de los resultados analíticos con respecto al valor verdadero.

Exactitud: proximidad entre el valor medido y un valor verdadero de un mensurando. Se dice que una medición es más exacta cuando más pequeño es el error asociado.

Las ecuaciones, parámetros y criterios de aceptación para la validación del sistema cromatográfico y los métodos de preparación de muestras, se muestran en la metodología experimental.

Construcción de curvas de calibración: representan la respuesta de un método analítico en función de cantidades conocidas de analito, con el propósito de poder interpretar la respuesta a cantidades desconocidas de analito (Harris, 2012).

Capítulo 2. MATERIALES Y EQUIPOS

2.1. Reactivos y disoluciones estándar

- Estándar sólido de benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[k]fluoranteno y benzo[b]fluoranteno con una pureza de $\geq 99\%$ (Chem Service, PA).
- Sílice C18 con un diámetro de partícula de $45\ \mu\text{m}$ (Supelco, EUA).
- Metanol y acetonitrilo grado HPLC (JT Baker, México).
- Isopropanol con una pureza mayor al 99% (JT Baker, México).
- Nitrato de sodio (NaNO_3), cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), cloruro de sodio (NaCl), ácido nítrico concentrado (HNO_3), todas estas sustancias de grado reactivo (JT Baker y Sigma Aldrich, México).
- Proteosa peptona grado reactivo (MCD LAB, México).
- Agar grado reactivo (MCD LAB, México).
- Disolución de HNO_3 al 3% y 10% (v/v).
- Disoluciones estándar de los poliaromáticos ya mencionados preparadas en acetonitrilo, intervalo de concentración de 100 y $40\ \mu\text{g/mL}$.
- Disolución estándar en acetonitrilo de BaP a 40.76 y $101.89\ \mu\text{g/mL}$, BaA a 40.128 y $105.6\ \mu\text{g/mL}$, BkF a 40.96 y $99.90\ \mu\text{g/mL}$, BbF a 41.39 y $103.48\ \mu\text{g/mL}$.

2.2. Sistema cromatográfico

- Bucle de inyección de $20\ \mu\text{L}$ (Rheodyne).
- Jeringa de $50\ \mu\text{L}$ (Hamilton).
- Pre-columna de guarda de acero inoxidable de $13/4.5$ (Upchurch- Scientific), empacada con sílice de fase inversa Nucleosil C-18 (Phenomenex).
- Columna analítica Agilent de $150 \times 4.60\ \text{mm}$ empacada con fase inversa Eclipse XDB-C18 tamaño de partícula $3.5\ \mu\text{m}$ (Agilent).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con bomba ProStar 210 (Varian).

- Detector de UV de arreglo de diodos Polychrom 9065 (Varian).
- Software de control y procesamiento de datos Star Workstation, versión 6.0 (Varian).

2.3. Materiales para preparación de muestras (EFS y DMFS)

- Cartuchos de empaque para extracción en fase sólida de 6 y 1 mL (Varian, EUA).
- Frites superiores e inferiores para cartuchos de 1 y 6 mL (Varian, EUA).
- Jeringa de 20 mL con adaptador de polipropileno (HenkeSass Wolf, Tuttlingen, Alemania).
- Mortero con pistilo de ágata de 20 mL.
- Viales con tapón de rosca de 1, 10 y 40 mL.
- Espátula cromo-níquel.
- Micropipetas de 2-20, 20-200 y 100-1000 μ L (Eppendorf, Alemania).
- Matraces Erlenmeyer de 50, 125, 250 mL.
- Portaobjetos de vidrio
- Tubos de centrifuga de 15 mL (BD Biosciences, EUA).
- Vasos de precipitados de 20, 50 y 100 mL.

2.4. Medios de cultivo y mantenimiento de las microalgas

- La microalga de agua dulce *Selenastrum capricornutum*, se obtuvo de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Austin Texas. Para su conservación se sembró en agar sólido y en medio líquido para los ensayos de exposición, con los micro y macro nutrientes necesarios contenidos en el medio Bristol. Se realizó una curva de absorbancia en función del número de células, leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 684.5 nm, que corresponde a la absorbancia de la clorofila tipo A presente en las microalgas.

- Medio Bristol compuesto por: NaNO_3 (2.94 mM), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.17 mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 mM), K_2HPO_4 (0.43 mM), KH_2PO_4 (1.29 mM) y NaCl (0.43 mM) en una disolución de 1 000 mL de medio.
- Lámparas de luz fría de 14 watts.
- Autoclave manual, All American 75X.
- Autoclave eléctrica, Tuttnauer 2540EL.

Los medios de cultivo sólido están compuestos de agar, medio Bristol y proteosa peptona, el medio líquido se compone de medio Bristol y proteosa peptona a una concentración 1% m/v, dentro de tubos de ensayo o matraces previamente esterilizados a 120 °C por 20 minutos. Los ciclos de luz oscuridad para este microorganismo fueron de 16 y 8 horas respectivamente, para favorecer su crecimiento los cultivos líquidos se encontraron en agitación constante y a temperatura ambiente. En estas condiciones este tipo de microalga tardaba en alcanzar la fase logarítmica (óptima para procesos de degradación), con una absorbancia de 1.0 y un número de células aproximado de 5×10^6 células/mL, entre 15 y 20 días dependiendo de las condiciones climáticas.

2.5. Otros equipos y materiales

- Probeta graduada de 10 mL tipo A.
- Pipetas graduadas de 10 y 5 mL tipo A.
- Espectrofotómetro Genesys 10S (ThermoScientific).
- Balanza analítica AG 245 (Mettler Toledo, Suiza).
- Baño de ultrasonido 1510 (Brason, EUA).
- Centrífuga 2-5 (Osterode am Harz, Alemania).
- Agitador orbital para matraces de 50 mL 2346Q (ThermoScientific).
- Mecheros Bunsen.
- Propipeta.

Capítulo 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. Metodología general de experimentación

Las etapas de la metodología general de experimentación se muestran en la figura 13. Como se trabajó con un método validado previamente por (Velasco Cruz, 2011) para el análisis de los hidrocarburos, antes de los ensayos de exposición, solo se realizó un proceso de revalidación “in house”. Para el análisis cromatográfico de los hidrocarburos estudiados (BaP, BaA, BkF y BbF), solo se realizó una verificación ya que se trabajó con el mismo equipo y columna; no se trabajaron mezclas de los hidrocarburos, sino con los compuestos de manera individual, por los que no fue necesaria la optimización de una separación cromatográfica.

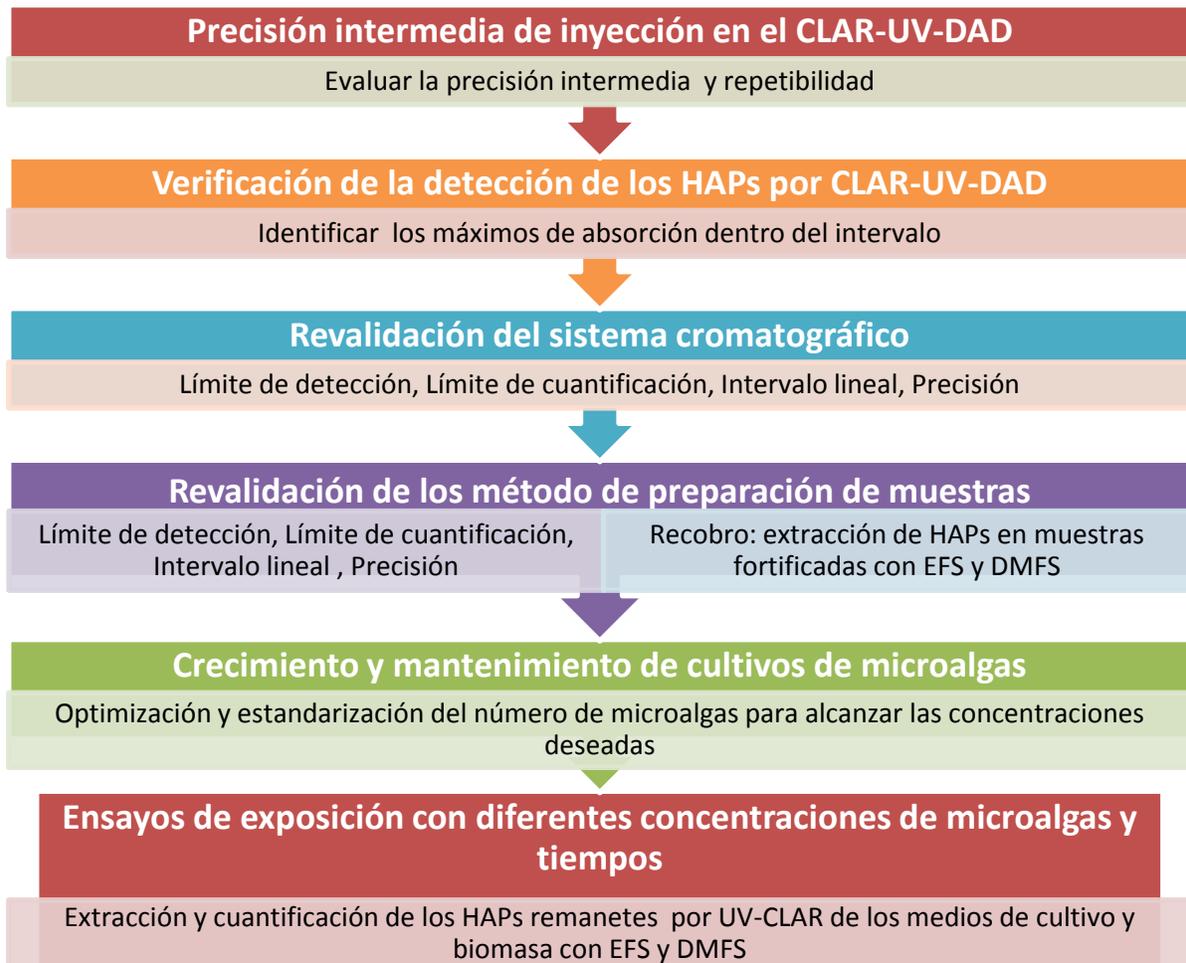


Figura 13. Metodología general de experimentación

3.2. Análisis Cromatográfico

Condiciones:

- Fase móvil empleada: flujo isocrático a 1 mL/min, 100 % metanol.
- Fase estacionaria: columna analítica Agilent de 150 × 4.60 mm empacada con fase inversa Eclipse XDB-C18 tamaño de partícula 3.5 µm.
- Detector de UV de arreglo de diodos Polychrom 9065, a la longitud máxima de absorción correspondiente para cada hidrocarburo.
- El coeficiente de variación (CV) para la respuesta analítica, después de la inyección para la reproducibilidad y repetibilidad: $CV \leq 5\%$ para métodos biológicos.

3.2.1. Verificación de la detección de los HAPs por CLAR-UV-DAD

El detector de UV de arreglo de diodos Polychrom 9065, realiza un barrido de absorción entre 190 y 360 nm de manera automática una vez que el analito entró al equipo, generando un espectro de absorción que nos permite identificar uno de los máximos de absorción dentro del intervalo mencionado.

- Empleando las mismas condiciones de fase móvil y fase estacionaria descritas en el apartado anterior se realizó el análisis para la obtención de los espectros.
- Se inyectó por triplicado un estándar de cada hidrocarburo a una concentración de 1 µg/mL, para obtener los espectros de absorción. Éstos se muestran en el anexo 2.

3.2.2. Revalidación del sistema cromatográfico

3.2.2.1. Precisión del sistema cromatográfico

Este parámetro se evaluó a través de la reproducibilidad y repetibilidad, empleando los datos generados de la respuesta del detector y calculando el coeficiente de variación (CV) para cada punto empleando la siguiente ecuación:

$$\%CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 22}$$

Donde \bar{x} es el promedio del área bajo la curva del pico y σ es la desviación estándar.

- La **precisión intermedia** del sistema cromatográfico se determinó en tres diferentes días; por triplicado se inyectó una disolución estándar de 1 µg/mL.
- Se determinó la **repetibilidad** del sistema inyectando por triplicado las mismas disoluciones estándar del punto anterior en un mismo día.
- Para métodos biológicos se acepta $CV \leq 5\%$, valores superiores deben ser justificados (Colegio Nacional de QFB de México A. C., 2002).

3.2.2.1.1. Preparación de disoluciones

Las disoluciones empleadas durante el proyecto se encuentran en la tabla 6, donde C_0 es la concentración de la disolución madre de la cual se prepararon los estándares a 40 µg/mL (C_T) empleadas para fortificar los medios durante la revalidación de sistema cromatográfico, revalidación de los dos métodos de preparación de muestras y los ensayos de exposición.

Tabla 6. Concentración de las disoluciones de trabajo

Compuesto	C_0 (µg/mL)	C_T (µg/mL)
BbF	100.4	40.2
kF	99.9	40.0
BaA	105.6	42.2
BaP	101.9	40.8

3.2.2.2. Intervalo lineal del sistema

Se preparó por triplicado 5 niveles de concentración, realizando diluciones a partir de una solución concentrada de cada hidrocarburo, por separado, empleado como disolvente acetonitrilo grado HPLC. De manera independiente se inyectó por triplicado disoluciones con diferentes niveles de concentración (0.4, 0.8, 2, 5.1 y 10.2 µg/mL), se registró la respuesta del detector en unidades de área bajo la curva de cada pico, con los datos obtenidos se realizaron graficas de área bajo la curva en función de la concentración de cada disolución para obtener una curva de calibración.

Se calculó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de correlación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$). El análisis estadístico del ajuste por mínimos cuadrados, así como las ecuaciones y el cálculo de los parámetros de regresión, se puede consultar en el anexo 3.

- $IC(b_1)$ se expresará como % de la concentración y debe ser como máximo ± 20 %.
- Otros criterios de aceptación considerados fueron: $r^2 \geq 0.98$ y el $IC(b_1)$ no incluye el cero (Colegio Nacional de QFB de México A. C., 2002).

3.2.2.3. Límite de detección y límite de cuantificación del sistema con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la regresión

Se prepararon por dilución cuatro niveles de concentración por debajo del $0.4 \mu\text{g/mL}$ (0.3 , 0.2 , 0.1 y $0.08 \mu\text{g/mL}$); realizando un ajuste de mínimos cuadrados se calcularon los parámetros: pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0) el coeficiente de correlación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) con la ecuación 23.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}} \quad \text{Ecuación 23}$$

El **límite de detección** se calculó con la ecuación 24:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \quad \text{Ecuación 24}$$

Por otro lado para el cálculo del **límite de cuantificación** se empleó la ecuación 25:

$$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \quad \text{Ecuación 25}$$

- Se aplicaron los mismos criterios de aceptación empleados en la determinación del intervalo lineal del sistema.

3.3. Preparación de muestras

Para extraer a los HAPs de las muestras se utilizaron la EFS para el tratamiento del medio líquido y la DMFS para la biomasa. A continuación se mencionan algunos pasos generales previos a la preparación:

- La separación de la biomasa y el medio de cultivo se logró centrifugando a 3600 rpm toda la muestra en tubos para centrifuga de 15 mL.
- Todas las disoluciones empleadas durante la elaboración de este proyecto se prepararon con ACN grado HPLC y H₂O tipo 1.
- El acondicionamiento del adsorbente, previo a su uso en la EFS y la DMFS, se realizó con metanol al 100 % en relación de 1 mL por 1 g de adsorbente, secándolo al vacío por 1 hora y media. Este paso tuvo como objetivo eliminar impurezas del material y favorecer la interacción con los analitos de interés al solvatar los grupos funcionales unidos en el adsorbente.

3.3.1. Metodología general de EFS

Se preparó un cartucho de 6 mL donde se colocó un filtro o "frit" en el fondo, después se empacó 300 mg de sílice C-18 y en la parte superior de la fase estacionaria se puso otro frit. El acondicionamiento previo del cartucho (ya empacado) se hizo agregando 3 mL de ACN y 10 mL H₂O, ambos disolventes pasaron a gravedad a través de la columna de extracción. La muestra se preparó con: 15 mL de medio de cultivo líquido más 0.2667 µg/mL de uno de los hidrocarburos y 20% de isopropanol, se dejó equilibrar 10 minutos. Posteriormente la muestra se pasó a través de la columna de extracción con ayuda de vacío. Posteriormente se realizó un lavado con 5 mL de H₂O seguido de 4 mL de una disolución ACN y H₂O 10:90, la fracción de este lavado es desechada. La tercera limpieza se realizó con 3 mL de una disolución de ACN y H₂O 55:45, esta fracción también se desecha, después se llevó a cabo la elución del HAP con 4 mL de ACN, esta fracción se recuperó para su análisis empleando CLAR-UV-DAD.

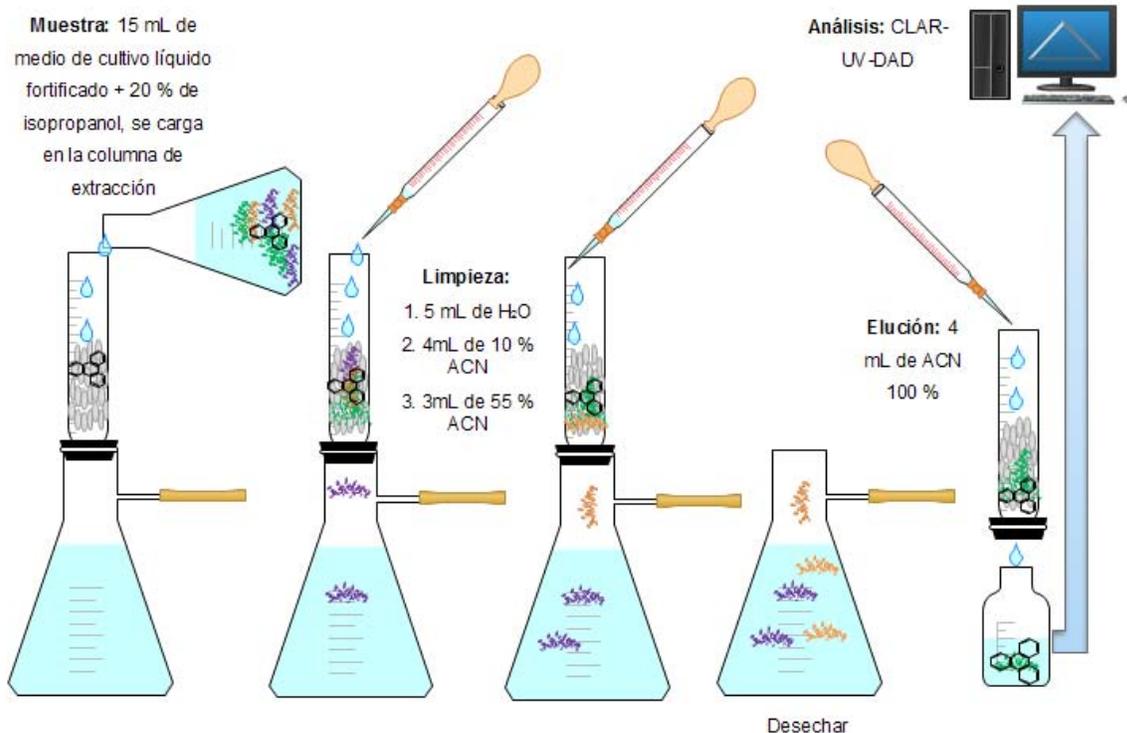


Figura 14. Esquema general de EFS

3.3.2. Metodología general de DMFS

La figura 15 muestra los pasos generales de esta técnica. El botón de biomasa obtenido después de centrifugar se pasó en su totalidad sobre un portaobjetos donde se dejó evaporar el medio líquido remanente durante un día. Trascurrido este tiempo se pesó 5 mg de biomasa seca que se mezcló con 100 mg de sílice C-18 para después fortificar con 0.8 µg/mg de HAP, ambas sustancias se homogenizaron y dispersaron en un mortero de ágata. Posteriormente se empacó un cartucho de 1 mL con dos frits al inicio y al final del empaque, con la mezcla del mortero. La secuencia de limpieza se realizó con 10 mL de H₂O, seguida de 5 mL de ACN y H₂O 20:80, 1.5 mL de ACN y H₂O 40:60, finalmente la elución y concentración del analito se realizó con 0.5 mL de ACN y H₂O 90:10. En este caso todas las disoluciones empleadas en la secuencia de limpieza pasaron a través de la columna de extracción empleando un sistema de vacío. La fracción obtenida en la elución se analizó con CLAR-UV-DAD.

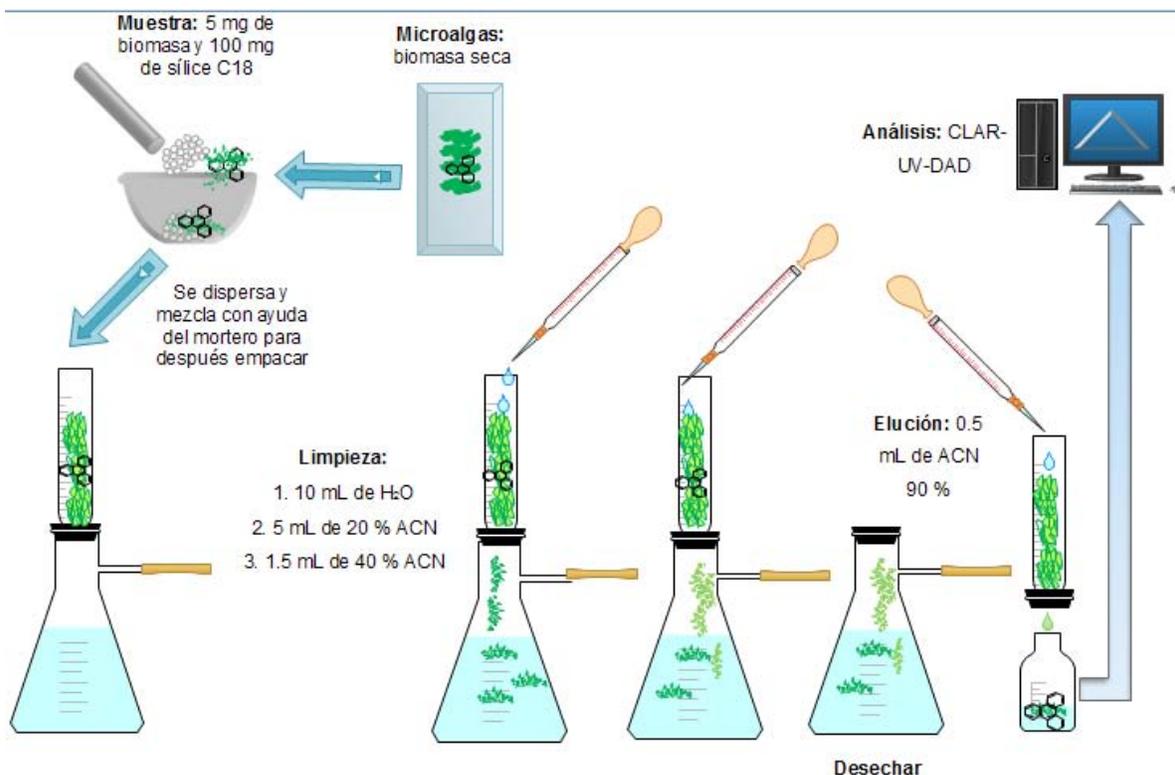


Figura 15. Esquema general de DMFS

3.3.3. Revalidación de los métodos

Los parámetros evaluados en este apartado son los mismos que en la revalidación del sistema cromatográfico, sin embargo, la metodología empleada fue diferente. Es importante mencionar que la validación de esta metodología se realizó por separado para cada uno de los compuestos aromáticos policíclicos (BaP, BaA, BbF y BkF).

3.3.3.1. Precisión intermedia y Repetibilidad de los métodos (EFS y DMFS con CLAR-UV)

Este parámetro se evaluó a través de la reproducibilidad y repetibilidad. Para el caso de la **EFS** se utilizó 15 mL de medio líquido centrifugado a 3 400 rpm, proveniente de cultivos jóvenes de la microalga *Selenastrum capricornutum*, el medio se fortificó con 0.266 o 0.288 µg/mL, dependiendo de la concentración inicial de las soluciones de trabajo, posteriormente se realizó la EFS en cada una de las muestras; este procedimiento se

realizó por triplicado en un mismo día para evaluar la **repetibilidad del método** y tres extracciones más en diferentes días para evaluar **la precisión intermedia** del método.

La biomasa asentada después de centrifugar el medio líquido se transfirió a un portaobjetos de vidrio, donde se dejó secar por un día, transcurrido este tiempo se raspó del portaobjetos y dentro del mortero de ágata se fortificó con 0.8 µg/mg de un poliaromático, una vez realizado este procedimiento se inició la **DMFS**. La precisión se evaluó de la misma manera que las EFS.

Tanto para la EFS como la DMFS se calculó el promedio (\bar{x}), la desviación estándar (σ), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media del porcentaje de recobro ($IC(\% \bar{R})$) con la ecuación 26:

$$IC(\% \bar{R}) = \% \bar{R} \pm t_{0.975, n-1} \times \frac{S}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 26}$$

El recobro nos ayuda a determinar la cantidad recuperada de analito después de haber realizado cualquiera de los dos procedimientos de preparación de muestras y constituye un factor de corrección en la cuantificación de los analitos, este se determinó empleando la fórmula:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{[\text{analito recuperado}]}{[\text{analito agregado}]} \times 100 \quad \text{Ecuación 27}$$

- El promedio aritmético del % Recobro para muestras biológicas debe estar entre 20 y 105 % (Colegio Nacional de QFB de México A. C., 2002).
- El CV del porcentaje de recobro no debe de ser mayor al 5 % si es microbiológico, cualquier otro criterio de aceptación debe ser justificado (Colegio Nacional de QFB de México A. C., 2002).

3.3.3.2. Intervalo lineal de los métodos (EFS y DMFS con CLAR-UV)

Este procedimiento se realizó por separado para cada uno de los hidrocarburos. La **linealidad del método EFS-CLAR-UV** se evaluó fortificando medio líquido proveniente de un cultivo, de manera que la concentración aproximada en los 15 mL de medio fuera (0.400, 0.350, 0.266, 0.210, 0.130 µg/mL), cada nivel se realizó por triplicado; después cada una de las muestras se sometió al proceso de EFS para finalmente inyectar el extracto de elución en el CLAR-UV-DAD.

La **linealidad del método DMFS-CLAR-UV** se evaluó fortificando 5 mg de biomasa seca a cinco diferentes niveles de concentración (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$), cada nivel se realizó por triplicado, una vez fortificada la biomasa con la sílice se realizó el proceso de DMFS, los extractos obtenidos de la elución se inyectaron en el CLAR-UV-DAD.

Una vez inyectados todos los extractos en el cromatógrafo y con ayuda del “software” se sacaron los datos de área bajo la curva en cada nivel de concentración para calcular los microgramos recuperados. Se realizaron gráficas de microgramos recuperados en función de los microgramos adicionados y a través de un ajuste por mínimos cuadrados, se calcularon los variables características de una línea recta (b_1 , b_0 , r^2), también se calculó el intervalo de confianza de la pendiente y de la ordenada la origen ($IC(b_1)$ y $IC(b_0)$), finalmente se calculó el coeficiente de la regresión lineal ($CV_{x/y}$).

Otro parámetro que se evaluó fue el porcentaje de recobro en cada muestra adicionada, se calculó el promedio (\bar{x}), la desviación estándar (σ), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media del porcentaje de recobro ($IC(\bar{x})$). Los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros son los mismos que se citaron en secciones anteriores.

3.4. Crecimiento y mantenimiento de cultivos de microalgas: optimización y estandarización del número de microalgas para alcanzar las cantidades deseadas

Todo el material de vidrio empleado en la manipulación de las microalgas, así como los medios de preservación y líquidos, se esterilizaron con calor húmedo, empleando una de las dos autoclaves disponibles en el laboratorio. Las condiciones de esterilización fueron 121 °C, 15 lb por 20 minutos.

Se trabajó en una zona desinfectada con una disolución de etanol al 10 %, para lograr un área estéril se emplearon dos mecheros Bunsen entre los que se llevó a cabo toda manipulación que involucrara el manejo de las microalgas.

Se prepararon medio sólidos con agar al 20 %, medio Bristol y proteosa peptona que se inocularon con la microalga *Selenastrum capricornutum*, después de 10 días este tipo de cultivos contó con la cantidad de biomasa suficiente para inocular medios líquidos de medio Bristol con proteosa peptona. Una vez sembrado cualquiera de los dos tipos de cultivos, se colocaron en una cámara de madera donde se reguló un ciclo de luz -

oscuridad en ciclos de 16 y 8 horas aproximadamente, los medios líquidos se mantuvieron en agitación durante mínimo 2 horas diarias.

Para monitorear el crecimiento de este microorganismo se inocularon tres matraces de 100 mL, cada uno 50 mL de medio Bristol. Durante 30 días se monitoreó su crecimiento tomando alícuotas de 5 mL; cada una de las alícuotas se les midió la absorbancia a 684.5 nm, longitud de máxima absorción de la clorofila tipo A, presente en la pared de la microalga. A una de las muestras se le contó el número de células totales empleando una cámara de Neubauer. Posteriormente las muestras se centrifugaron para separar la biomasa y pesarla una vez seca.

Al alcanzar una absorbancia de 1 ± 0.05 la concentración de células se encontraba entre 5×10^6 y 6×10^6 células/mL. Para obtener medios de cultivo con las diferentes cantidades de células se realizaron diluciones o concentraciones de medios empleando únicamente cultivos con una absorbancia de 1 ± 0.05 . Por ejemplo: partiendo de un cultivo con una concentración de 5×10^6 células/mL y obtener una concentración aproximada de 2.5×10^6 células/mL, se tomaron 7.5 mL del cultivo seleccionado y se completaba el volumen con medio limpio hasta 15 mL.

Para obtener una concentración de 1×10^7 células/mL fue necesario dejar dos cultivos de 100 mL sin agitar, de esta manera la biomasa se asentaba en la parte inferior de cada matraz, después de la parte superior se les quitaron 70 mL de medio, y el contenido final de ambos matraces con algas se juntaba, al final se tenía un cultivo de 60 mL con una absorbancia de 2 ± 0.5 .

Para corroborar la concentración de microorganismos en los medios diluidos o concentrados, se tomó una alícuota de 5 mL a la que se le medía la absorbancia y se contaba el número de células empleando la cámara de Neubauer.

3.5. Ensayos de exposición con diferentes concentraciones de microalgas

Como ya se mencionó en la sección anterior, los cultivos utilizados para los ensayos de exposición con uno de los HAP, en todos los casos fueron con una absorbancia de 1 ± 0.05 , dependiendo del experimento programado para ese día se realizaba la concentración o dilución de los medios con el microorganismo.

En matraces Erlenmeyer de 50 mL se tomaron 3 muestras de 15 mL de cultivo con la concentración de microalgas seleccionada (1×10^7 , 5×10^6 , 2.5×10^6 , 1.25×10^6 células/mL), a cada matraz se le adicionó 100 μ L de una disolución un hidrocarburo a 40 μ g/mL, la concentración aproximada en el medio fue de 0.2667 μ g/mL y en la biomasa de 0.8 μ g/mg. Se realizó un blanco de 15 mL con solo el medio sin microalgas y con el hidrocarburo que se estuviera trabajando.

Los cuatro matraces (3 muestras con microalgas con hidrocarburo y el blanco con hidrocarburo) se colocaron dentro de una cámara de exposición con luz amarilla en su interior y mantenidas en agitación constante por el tiempo de exposición definido. Los tiempos e exposición para cada hidrocarburo fueron 0.75, 1.5, 3 y 6 horas.

Al terminar el tiempo de exposición, el contenido de los cuatro matraces se transfirió a tubos de 15 mL para ser centrifugados a 3 600 rpm durante 15 minutos, de esta manera se separó el medio líquido y la biomasa. La EFS para el sobrenadante del centrifugado y el blanco se realizó en el mismo día; el procedimiento de extracción para el hidrocarburo se describe en la sección 3.3.1. Si era posible los extractos de elución se inyectaban ese mismo día o se refrigeraban para su análisis al día siguiente.

La biomasa, que se encontraba formando el botón del centrifugado, se dejó secar durante un día para posteriormente realizar la DMFS descrita en la sección 3.3.2. Los extractos obtenidos después de realizar la dispersión se inyectaron en el mismo día para evitar la evaporación del disolvente o la descomposición de la matriz, que podría interferir en la cuantificación y análisis del analito.

Capítulo 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. Análisis cromatográfico

Las condiciones de análisis cromatográfico utilizadas y descritas en la sección de metodología proporcionaron los parámetros reportados en la tabla 7, donde también se indican las longitudes de onda de los máximos de absorción en la región ultravioleta.

Tabla 7. Condiciones de trabajo (presión y $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción) para cada hidrocarburo

Hidrocarburo	Longitud máxima de absorción (nm)	Presión de trabajo (bars)	Tiempo de retención (minutos)
BaP	263	79-83	4.650
BaA	287	80-84	3.290
BbF	254	80-84	4.035
BkF	234	80-84	4.110

4.1.2. Revalidación del sistema cromatográfico

4.1.2.1. Precisión intermedia y repetibilidad del sistema cromatográfico

Lo datos obtenidos de las inyecciones de los estándares para cada hidrocarburo se resumen en la siguiente tabla 8.

Tabla 8. CV obtenidos con $n = 3$ para las inyecciones de las disoluciones de trabajo.

Compuesto	C_T ($\mu\text{g/mL}$)	%CV para C_T
BaP	40.8	1.0
BaA	42.2	1.0
BbF	40.2	0.5
BkF	40.0	0.1

Dónde: C_T : concentración de las disoluciones de las disoluciones de trabajo, %CV corresponde a las inyecciones por triplicado de las disoluciones de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Los datos (áreas) para el cálculo de los coeficientes de variación se obtuvieron al inyectar una disolución estándar de 1 $\mu\text{g/mL}$ preparadas a partir de la disoluciones de trabajo; la reproducibilidad y repetibilidad proporcionaron un $\text{CV} \leq 3\%$ en cada uno de los casos, al ser menor al 5 % podemos decir que tenemos una buena precisión intermedia en la inyección.

4.1.2.2. Linealidad del sistema

Bajo las condiciones establecidas en la sección 3.2.2.2 los resultados obtenidos se sintetizan en la tabla 9:

Tabla 9. Ecuaciones de las rectas obtenidas en el ajuste por mínimos cuadrados y coeficiente de correlación lineal

Compuesto	Ecuación $\text{área} = b_1 \cdot C \pm b_0$	Coficiente de correlación (r^2)	% CV Con $n = 5$
BaP	$21482x - 1220.5$	0.9984	1.7
BaA	$33259x - 7404.6$	0.9958	0.7
BbF	$12779x - 5592.7$	0.9977	1.1
BkF	$19121x + 49.584$	0.9993	2.4

El cálculo de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0) el coeficiente de correlación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($\text{IC}(b_1)$), se realizó empleando las ecuaciones del anexo 2. Con este ejercicio se verificó el valor de los parámetros obtenidos por Excel, sin embargo el cálculo manual se realizó por una razón más importante, obtener el la desviación estándar de la regresión lineal ($S_{y/x}$). Como se especificó en la sección 3.2.2.2 el intervalo de confianza de la pendiente debe ser menor o igual al 20 % del valor de la pendiente, en todos los casos se cumple con este parámetro, los resultados se pueden observar en la tabla 10. El error asociado al ajuste, la pendiente y el $\text{IC}(b_1)$ es mayor para el BaA, esto se debe a que fue uno de los primeros compuestos trabajados, el aumento del error se le asocia al analista.

Tabla 10. Desviaciones estándar de los parámetros de la línea recta

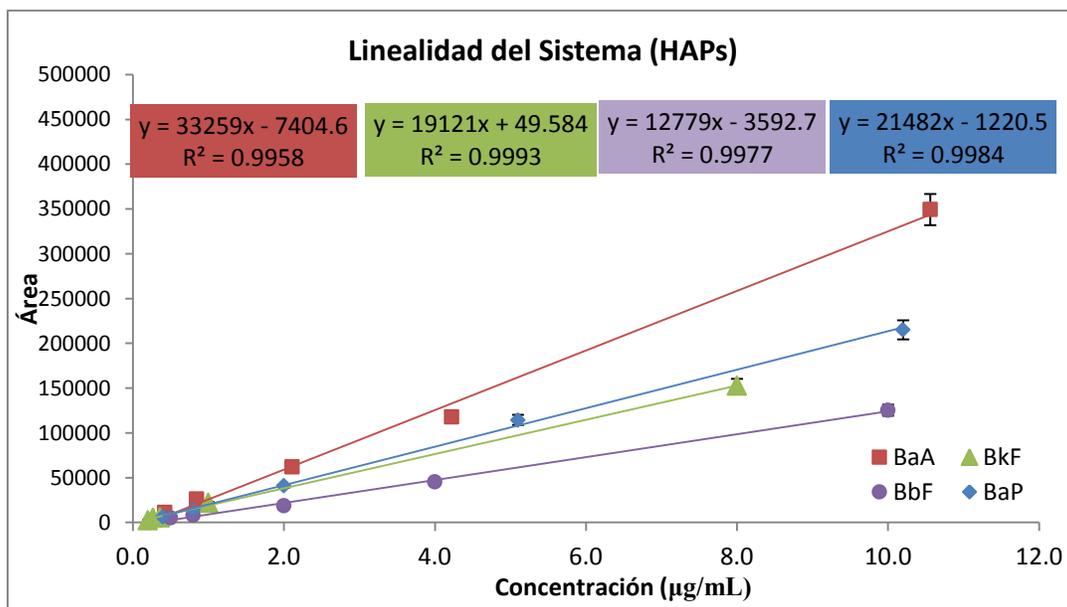
Compuesto	$(S_{y/x})$.	S_{b_1}	IC(b_1)
BaP	3 440.26	243.75	21 482 ± 528.70
BaA	8 578.05	597.39	33 259 ± 1295.73
BbF	2 772.10	204.87	12 779 ± 444.35
BkF	1 789.34	152.43	19 121 ± 330.63

El análisis estadístico realizado en el ajuste de mínimos cuadrados se puede ver a detalle en el anexo 2; en todos los casos se revisaron las gráficas de los residuos para descartar que los datos exhibieran alguna tendencia que indicara que el ajuste realizado no era el adecuado. En todos los casos las gráficas mencionadas muestran un comportamiento aleatorio por lo que se puede concluir que el tratamiento fue el adecuado. Además se realizó un análisis de bondad de ajuste, para todos los datos, en donde el lineal arroja el valor más alto de r^2 , por simplicidad nos quedamos con el ajuste lineal, que como lo muestran los resultados en la tabla 9, presentan una r^2 aceptable. El análisis de ANOVA sobre la regresión lineal, en todos los casos nos dió un valor de $P \leq 0.05$, indicando que existe una relación estadísticamente significativa entre área y concentración con un nivel de confianza del 95.0 %.

De manera automática el programa realiza el análisis estadístico de Durbin-Watson (DW) para examinar los residuos y verificar que la relación es correcta. El análisis de los residuos nos permite identificar datos atípicos.

En la gráfica 16 se pueden observar las líneas de ajuste sobre cada uno de los puntos inyectados para cada compuesto, las barras de error corresponden a la desviación estándar de cada punto.

Figura 16. Gráfica de linealidad del sistema para los cuatro hidrocarburos de trabajo



4.1.2.3. Límites de detección y cuantificación

Para la estimación de los límites de detección (LD) y cuantificación teóricos (LC), se realizaron las disoluciones pertinentes para obtener cuatro soluciones con concentraciones más pequeñas que las utilizadas en la linealidad del sistema, se siguió la metodología descrita en la sección 3.2.2.3., los resultados obtenidos de todos los compuestos se muestran en la tabla 12. Adicionalmente evaluó experimentalmente el límite de detección con la inyección de 4 disoluciones con concentraciones de 0.02, 0.03, 0.06 y 0.01 de cada hidrocarburo, los cuales se presentan también en la tabla 11.

Tabla 11. Datos obtenidos para los L.C. y L.D.

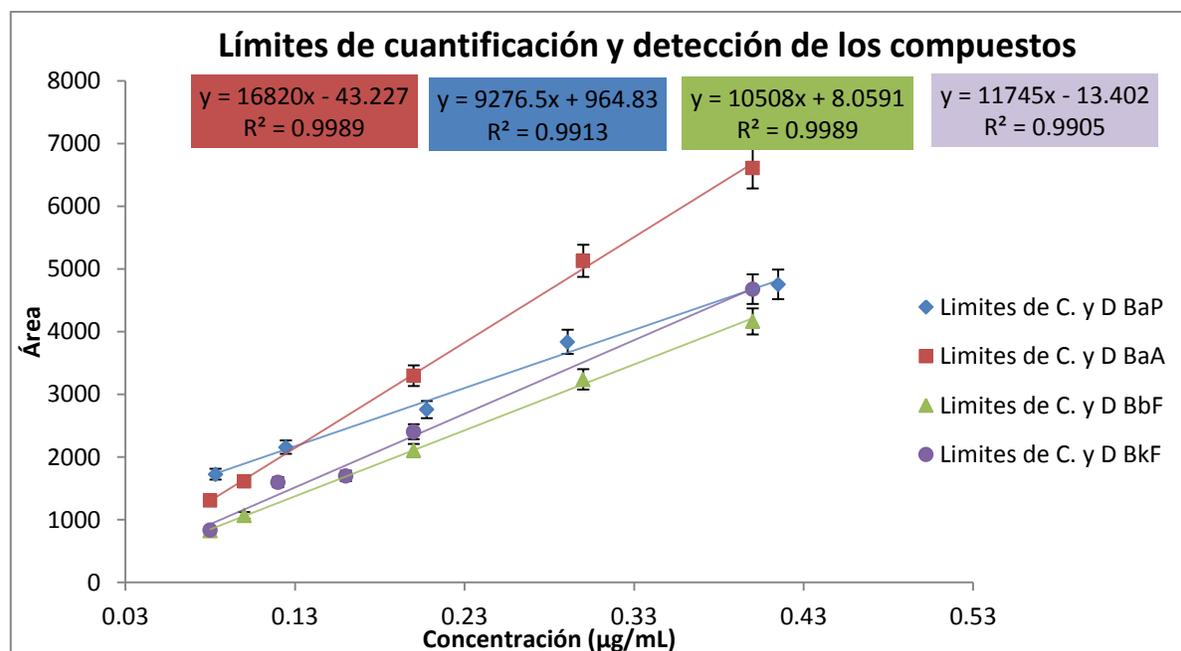
Compuesto	Teóricos		Experimentales	
	L.D. (µg/mL)	L.C. (µg/mL)	L.D. (µg/mL)	L.C. (µg/mL)
BaP	0.05	0.16	0.02	0.08
BaA	0.02	0.05	0.02	0.03
BbF	0.03	0.08	0.02	0.06
BkF	0.04	0.13	0.02	0.06

En la tabla 11 se puede observar que el compuesto con los límites más bajos es el BaA, mientras que el compuesto con los valores de límites más altos es el BaP. Estos valores y los obtenidos en la validación del método fueron importantes para la cuantificación más baja de los hidrocarburos después de los ensayos de bioexposición.

De manera experimental los límites en todos los compuestos resultaron menores que los teóricos. En cada uno de los casos se cumplió que el área bajo la curva de la disolución de 0.02 $\mu\text{g/mL}$ fuera diez veces mayor que la señal del ruido generada por el detector del cromatógrafo.

A continuación se muestran las gráficas de regresión lineal que se usaron para el cálculo estadístico de los límites de detección y cuantificación, con las correspondientes barras de error asociadas a la desviación estándar de cada punto.

Figura 17. Ajuste de mínimos cuadrados para los cálculos de los límites de cuantificación y detección de los compuestos



4.2. Revalidación del método

4.2.1. Precisión intermedia y Repetibilidad de los métodos (EFS y DMFS con CLAR-UV)

Se realizó el cálculo del porcentaje de recobro para cada HAP empleando la ecuación 27 de la página 62, con los datos obtenidos de las muestras reales (medio de cultivo en contacto con microalgas y biomasa) adicionadas, se evaluó la precisión intermedia de las metodologías empleando el CV de los triplicados realizados el mismo día y los de tres días diferentes. Los resultados para la EFS-CLAR-UV se muestran en la tabla 12 y para la DMFS-CLAR-UV se presentan en la tabla 13.

Tabla 12. Valores asociados al %R de los HAPs extraídos por EFS-CLAR-UV

Compuesto	%R (promedio)	IC (%R)	%CV Precisión Intermedia	%CV Repetibilidad
BaP	75.65	± 2.52	1.68	2.53
BaA	80.29	± 2.75	1.34	2.04
BbF	79.40	± 2.91	2.03	4.86
BkF	80.26	± 1.04	0.94	1.73

Dónde: IC (%R): es el intervalo de confianza del porcentaje de recobro, el %CV para ambos casos se calculó con una $n = 3$.

El promedio aritmético del % Recobro para muestras biológicas está dentro del intervalo del 20 y 105 % aceptado por el Colegio Nacional de QBF de México (2002). El %CV no supera al 5 % en las muestras, por lo que se puede decir que el método es preciso en las condiciones de operación dentro del laboratorio. Además el método de EFS cubre con las recomendaciones de la EPA (2003) para matrices acuosas con recobros entre el 70 % y el 130 %.

Por otra parte los resultados para la DMFS-CLAR-UV se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Valores asociados al %R de los HAPs extraídos por DMFS-CLAR-UV

Compuesto	%R (promedio)	IC (%R)	%CV	
			Precisión Intermedia	Repetibilidad
BaP	83.43	± 2.23	3.48	3.54
BaA	86.79	± 2.05	0.47	3.14
BbF	95.51	± 1.81	2.64	2.52
BkF	86.78	± 2.39	0.68	3.65

Donde IC (%R): es el intervalo de confianza del porcentaje de recobro, el %CV para ambos casos se calculó con una $n = 3$.

Los porcentajes de recobro obtenidos empleando la DMFS son ligeramente mayores en comparación con los de la EFS, una de las razones es la diferencia en el tipo de matriz que se trabajó; la biomasa además de ser compleja como el medio líquido, contiene componentes apolares, lo que permite que los hidrocarburos interacciones con mayor facilidad con esta matriz. En cuanto al volumen del extracto, éste es menor (0.5 mL) en comparación con el obtenido en la EFS (4 mL), lo que permite una mayor concentración de la muestra y mejor cuantificación. En el caso de la DMFS, el compuesto que presentó un %R más bajo fue el BaP, por ser uno de los compuestos más apolares, existieron más dificultades para su extracción También es el compuesto más hidrófobo del grupo, por lo que es más difícil separarlo de su matriz y desorberlo del cartucho de extracción.

Al igual que los resultados obtenidos en la primera técnica de extracción (EFS), los de la dispersión (DMFS) cumplieron con las especificaciones de la guía del el Colegio Nacional de QBF de México (2002) con $\%CV \leq 5 \%$ y porcentajes de recobro entre $20 \% \leq \%R \leq 105 \%$ y a pesar de que las muestras tienen una mayor cantidad de interferentes, el método tiene los parámetros aceptables que cumplen con las recomendaciones de la EPA (2008).

4.2.2. Linealidad de las metodologías (EFS y DMFS) acopladas a CLAR-UV-DAD

Debido a que se trabajó con los hidrocarburos por separado, también se realizó la elaboración de las curvas de calibración del método de manera individual siguiendo la metodología de la sección 3.3.3.2. Se realizó el mismo análisis estadístico sobre el ajuste de mínimos cuadrados realizado para el intervalo lineal del sistema cromatográfico, un ejemplo de este análisis se puede consultar en el anexo 3. En todos los casos se graficó los microgramos adicionados (x) en función de los microgramos recuperados (y). Los coeficientes de variación mostrados en las tablas 14 y 15, se calcularon contemplando todos los puntos con los que se realizó el intervalo de trabajo. Como se puede observar los coeficientes de variación son mayores que los obtenidos en las pruebas de precisión, una de las razones por las que aumentan se debe a la complejidad de las muestras trabajadas y el aumento en la variación de los porcentajes de recobro para cada punto, como era de esperar los puntos de concentraciones más bajas (equivalen a la adición de menos microgramos de cada hidrocarburo) presentaron porcentajes de recuperación menores. Los datos completos se pueden observar en el anexo 3. Hay que mencionar que el recobro global está representado por el valor de la pendiente.

Tabla 14. Valores obtenidos para la extracción de los HAPs con el método de EFS

Compuesto	Ecuación $\mu\text{g}_A = b_1 * \mu\text{g}_R \pm b_0$	Coefficiente de correlación	% CV _{y/x}
BaP	0.8676x - 0.2646	0.9923	5.69
BaA	0.7292x + 0.1765	0.9936	3.62
BbF	0.7485x + 0.1021	0.9963	3.23
BkF	0.7621x + 0.2705	0.9966	3.69

Tabla 15. Valores obtenidos para la extracción de los HAPs con el método de DMFS

Compuesto	Ecuación $\mu\text{g}_A = b_1 * \mu\text{g}_R \pm b_0$	Coefficiente de correlación	% CV _{y/x}
BaP	0.868x 00765	0.9936	5.43
BaA	0.8992x 00077	0.9994	2.95
BbF	0.8765x 01595	0.9924	3.52
BkF	0.9062 0.1601	0.9936	3.50

Dónde: μg_A : microgramos adicionados, μg_R : microgramos recuperados, b_0 : ordenada al origen, b_1 : pendiente

Como se puede observar en todos los casos los porcentajes de recobro se encuentran dentro del intervalo entre $20 \% \leq \%R \leq 105 \%$ establecido por el (Colegio Nacional de QFB de México A. C., 2002), sin embargo los coeficientes de variación para el caso del BaP en ambos métodos sobrepasa el 5 % aceptado por esta guía, sin embargo el criterio empleado por la (EPA, 1986) acepta valores de hasta el 10 % en el coeficiente de variación. Los porcentajes de recobro más bajos se reportan en el caso de la EFS, sin embargo siguen entrando dentro del intervalo ya mencionado. En el caso de las muestras tratadas con DMFS se pueden observar %R mayores al 80 %, a pesar de que la manipulación de la muestra es mayor, empleando esta técnica es posible extraer y concentrar con mayor eficacia a los hidrocarburos con los que se trabajó. Las gráficas de calibración se muestran en las figuras 18 y 19.

Figura 18. Linealidad del método de EFS seguido de su análisis con CLAR-UV-DAD

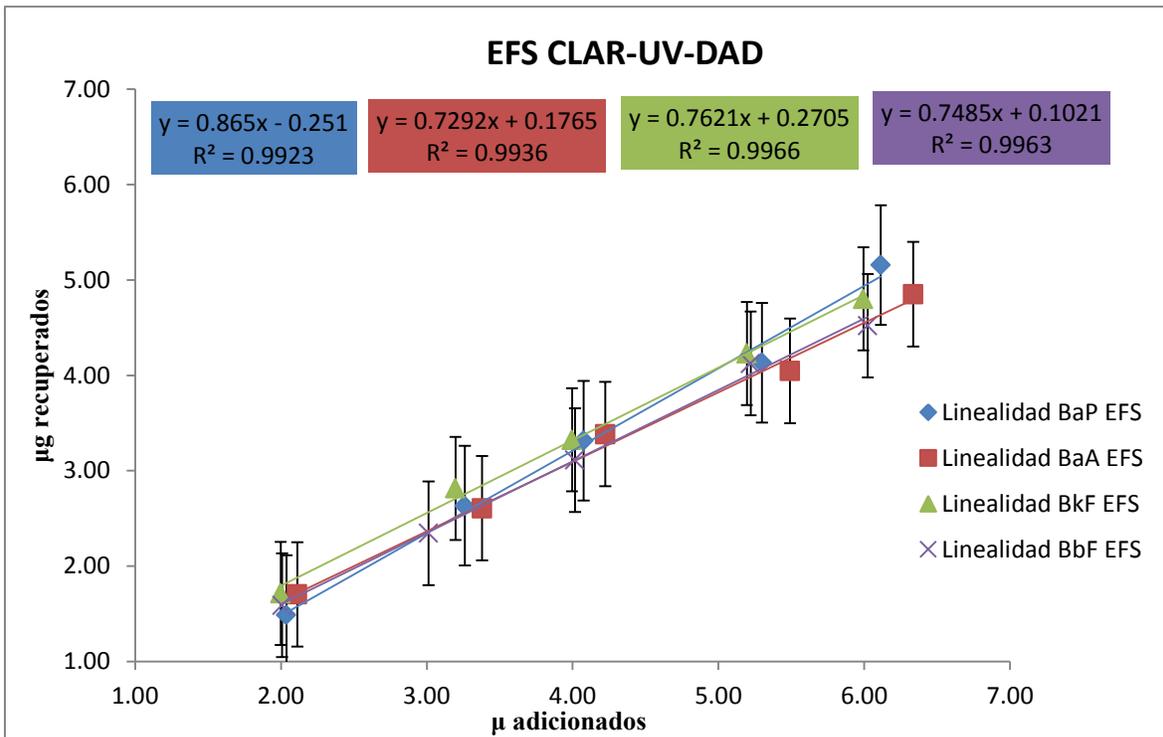
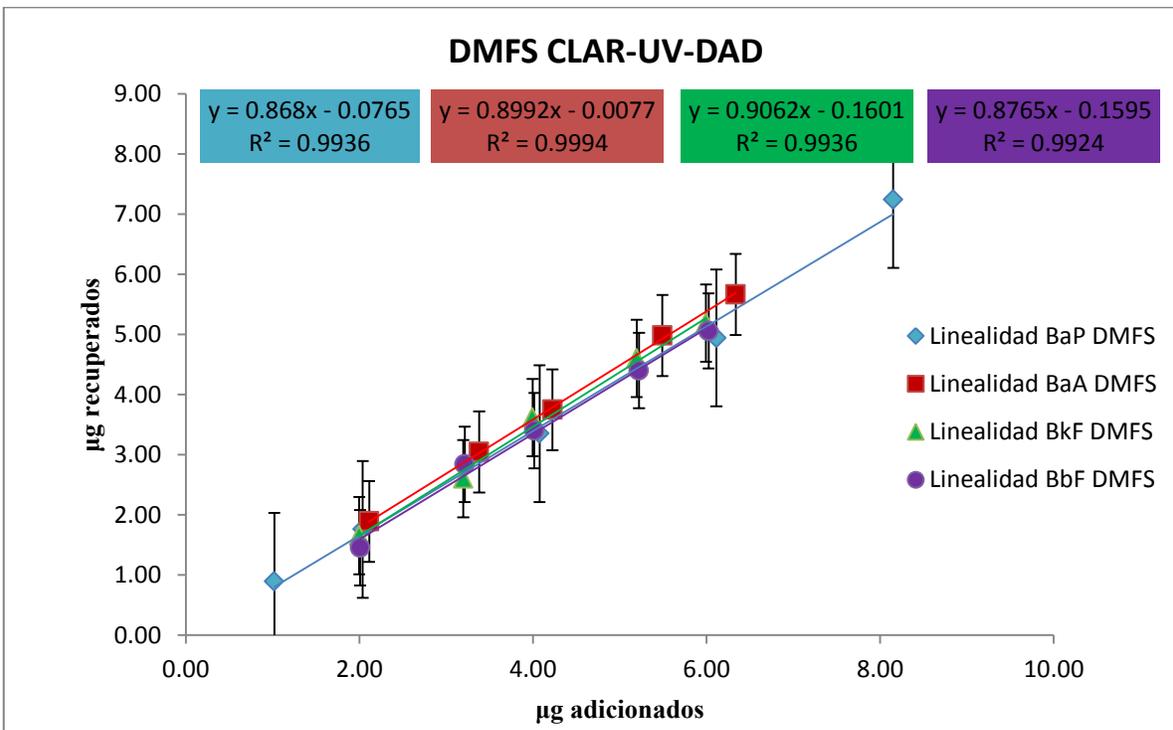


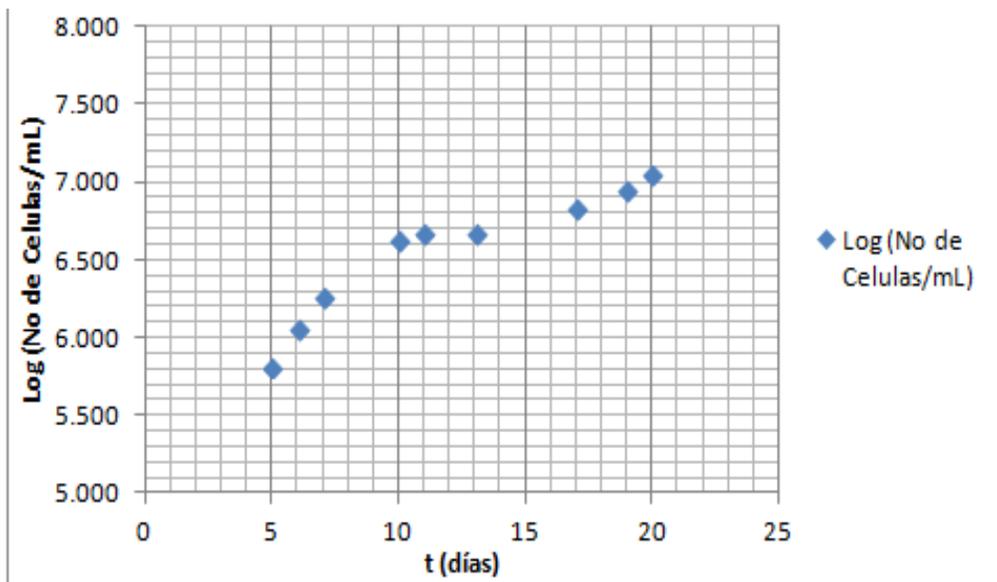
Figura 19. Linealidad del método de DMFS seguido de su análisis con CLAR-UV-DAD



4.3. Crecimiento y mantenimiento de cultivos de microalgas: optimización y estandarización del número de microalgas

Se realizó el monitoreo del crecimiento de las microalgas *Selenastrum capricornutum* por 20 días en medio líquido nutritivo, para poder identificar las fases de su desarrollo. Como se puede observar en la figura 20 se trata de un microorganismo que tiene dos fases de adaptación ya que presentó dos pendientes, este tipo de comportamiento se originó debido al medio en el que se encuentra. Como sabemos este tipo de microalgas son autótrofas, es decir utilizan como fuente de carbono para llevar a cabo su metabolismo el CO_2 . En el caso de la *Selenastrum capricornutum* de acuerdo con los resultados preliminares no se trata de una autótrofa total, es decir no sólo emplea como fuente de carbono el CO_2 , también es capaz de utilizar el carbono presente en los compuestos orgánicos de la proteosa peptona y los compuestos policíclicos.

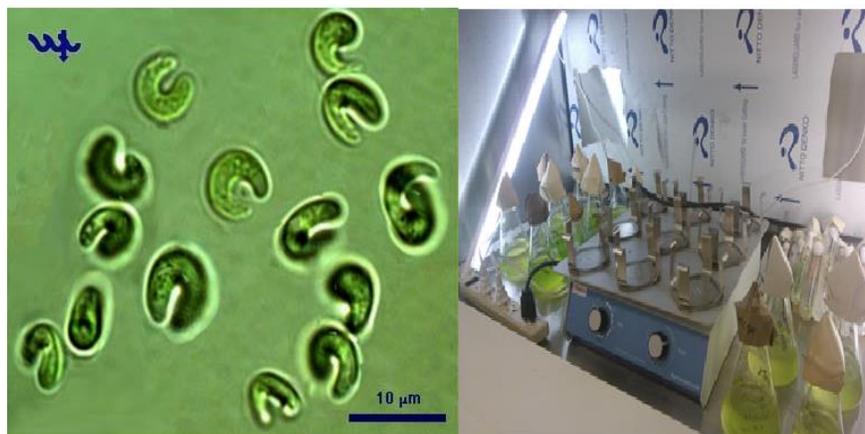
Figura 20. Curva de Crecimiento de la microalga



Las condiciones óptimas para que un microorganismo realice un proceso de biodegradación se presentan en la fase exponencial de la curva de crecimiento (Bitton, 2001); una vez adaptado al medio de cultivo cualquier microorganismo tendrá su metabolismo en las mejores condiciones para desarrollar diversos procesos metabólicos que en algunos casos tienen como objetivo la degradación de compuestos. En el caso de la microalga *Selenastrum capricornutum*, la fase exponencial se alcanza entre el día 15 y 20, esta variación de días se presenta por los cambios de temperatura y la cantidad de

CO₂ disuelto en el medio de cultivo. Después de este periodo de tiempo el número de células dejaba de aumentar, por lo que se asume que llegaba a la fase estacionaria de su crecimiento (Bitton, 2001). De acuerdo con la literatura, si somos capaces de proveer una fuente constante de aire rico en CO₂ la microalga llegará en menos tiempo a la fase de crecimiento deseada.

Figura 21. De izquierda a derecha se muestra: una fotografía de la microalga *Selenastrum capricornutum* (Griffiths, 2013), medios de cultivo empleados durante el proyecto



La concentración entre 5×10^6 y 6×10^6 células/mL se alcanzó entre el día 15 y 20 a una absorbancia de 1 ± 0.05 , a una longitud de máxima absorción de 684.5 nm correspondiente la clorofila tipo A presente en la pared de la microalga. En la mayoría de los casos los cultivos empleados en los bioensayos de exposición se manejaron con una concentración total de microorganismos de 5×10^6 células/mL, por cuestiones de tiempo se decidió emplear los cultivos con esta concentración inicial y realizar las diluciones pertinentes para llegar concentraciones de células más bajas.

4.4. Ensayos de exposición con diferentes concentraciones de microalgas

Como ya se ha mencionado se realizaron ensayos de exposición a una concentración fija de hidrocarburo ($0.2667 \mu\text{g/mL}$) empleando diferentes concentraciones de microalgas. Se calcularon las cantidades de hidrocarburo remanentes presentes en el medio y en las células a los diferentes tiempos de exposición para después calcular el porcentaje de degradación y el porcentaje de remoción empleando las siguientes ecuaciones (Hong et al., 2008):

$$\% \text{Degradación} = \frac{\mu \text{ HAP agregados} - \mu \text{ restantes en el medio} - \mu \text{ acumulados en la célula}}{\mu \text{ HAP agregados}} \times 100 \quad \text{Ecuación 28}$$

$$\% \text{Remoción} = \frac{\mu \text{ HAP agregados} - \mu \text{ restantes en el medio}}{\mu \text{ HAP agregados}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 29}$$

Para cada grupo de datos con tres repeticiones, se calculó el valor medio y la desviación estándar. Todas las variables empleadas durante los ensayos de bioexposición son continuas, para el análisis estadístico de los resultados empleando este tipo de variables se realizó un ajuste de mínimos cuadrados y posteriormente se compararon los valores de las pendientes para probar si existía una diferencia estadísticamente significativa. La importancia del análisis sobre las pendientes se debe, a que este parámetro es un reflejo directo del porcentaje de remoción global al emplear diferentes cantidades de células y tiempos de exposición. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statgraphics Centurion XVII.

Todas las tablas muestran los promedios de las de las repeticiones realizadas a diferente concentración de microorganismo y tiempos diferentes. Sin embargo, para el análisis estadístico se emplearon las réplicas de cada bioensayo. A continuación de manera individual se presentan los resultados para cada uno de los hidrocarburos trabajados.

4.4.1. BaP

Éste poliaromático fue el primer compuesto con el que se realizó los ensayos de exposición. De trabajos anteriores (Montaño, 2013; Velasco Cruz, 2011) se sabe que es difícil su degradación y los resultados obtenidos lo corroboran. Para lograr porcentajes de remoción mayores al 60% fue necesario realizar tiempos de exposición de 6 horas. Los resultados de la tabla 16 muestran %Degradación y % Remoción altos en 6 horas con una concentración de microorganismo en el medio de 5×10^6 células/mL. Como se puede observar en la tabla 16 los porcentajes de remoción y degradación disminuyen con el número de células en el cultivo.

Tabla 16. Resumen de datos para los ensayos de exposición del BaP

Concentración 5.00E+06 cél/mL (BbF)							
Tiempo (h)	%Degradación BbF	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	μg EFS (medio líquido)	μg DMFS (biomasa)	μg Totales (medio líquido + biomasa)
0.75	6.1	1.97	26.89	2.08	2.94	1.02	3.96
1.5	9.2	0.65	36.86	1.43	2.54	1.29	3.83
3	16.2	0.88	52.30	1.43	1.92	1.62	3.53
6	52.5	1.89	67.04	0.95	1.33	0.68	2.01
Concentración 2.50E+06 cél/mL (BbF)							
Tiempo (h)	%Degradación BbF	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	μg EFS (medio líquido)	μg DMFS (biomasa)	μg Totales (medio líquido + biomasa)
0.75	5.7	0.41	23.51	0.04	3.07	0.91	3.98
1.5	8.1	1.25	30.10	0.28	2.81	1.07	3.88
3	27.2	1.97	42.19	1.93	2.32	0.75	3.07
6	34.7	0.93	57.61	0.86	1.70	1.05	2.75
Concentración 1.250E+06 cél/mL (BbF)							
Tiempo (h)	%Degradación BbF	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	μg EFS (medio líquido)	μg DMFS (biomasa)	μg Totales (medio líquido + biomasa)
0.75	11.0	0.38	19.27	0.10	3.25	0.51	3.75
1.5	15.2	2.62	27.64	0.74	2.91	0.67	3.58
3	13.3	0.75	29.05	0.33	2.85	0.81	3.66
6	23.7	1.54	33.23	1.46	2.68	0.53	3.22

*S en cada una de las columnas es la desviación estándar de los datos

Los resultados mostrados en la tabla 17 son los obtenidos al analizar si existía una diferencia estadística significativa en la pendiente obtenida del modelo de regresión lineal sobre las gráficas de la figura 22, se evaluaron las diferencias entre las pendientes por

que este parámetro es un reflejo directo del porcentaje de remoción. Debido a que el valor-P para las pendientes es menor que 0.01, existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores de concentraciones de microorganismos y tiempos de exposición con un nivel de confianza del 99 %, al emplear diferentes cantidades de microorganismos y tiempos de exposición, las pendientes se hacen cada vez más pequeñas a media que estos dos parámetros aumentan. Un ejemplo de este análisis se encuentra en el anexo 4, donde se muestran las regresiones lineales sobre los datos empleados.

Tabla 17. Análisis sobre las pendientes al realizar regresiones lineales sobre las gráficas de la figura 22 para datos de BaP

ANOVA sobre la gráfica de μg totales = $f(\text{concentraciones})$						Pendientes obtenidas a cada tiempo empleando diferentes concentración de microalgas	
Fuente	Suma de Cuadrados	G L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Tiempos (h)	Pendiente
Concentración	5.565	1	5.565	475.07	0.0000	0.75	-1.6019E-7
Interceptos	7.19076	3	2.39692	204.62	0.0000	1.5	-1.78667E-7
Pendientes	1.6126	3	0.537534	45.89	0.0000	3	-1.83048E-7
Modelo	14.3684	7				6	-4.86857E-7
ANOVA sobre la gráfica de μg totales = $f(\text{tiempo})$						Pendientes obtenidas a cada concentración a diferentes tiempo de exposición	
Fuente	Suma de Cuadrados	G L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	C (cél/mL)	Pendiente
TIEMPO	6.86373	1	6.86373	317.19	0.0000	5×10^6	-0.335343
Interceptos	5.65096	2	2.82548	130.57	0.0000	2.50×10^6	-0.230995
Pendientes	1.53251	2	0.766253	35.41	0.0000	1.25×10^6	-0.0851401
Modelo	14.0472	5					

La tendencia en la disminución de los microgramos totales recuperados de hidrocarburo se observan en las gráficas de las figura 22 donde se representa la variación en el tiempo de la cantidad total recuperada de BaP a diferentes concentraciones y tiempos de exposición en ambas gráficas se observa que la variación más marcada se da a las 6

horas de exposición y en la figura 23 se presentan la variación de la cantidad de BaP recuperada en el medio de cultivo (EFS) y en la biomasa (DMFS) a los diferentes tiempos manejados, es posible corroborar la disminución de BaP del medio líquido en el tiempo y el aumento del BaP en la biomasa que después presenta una disminución después de 3 horas, también es posible observar que a concentraciones pequeñas de microalgas (1.25×10^6 cél/mL) la absorción de BaP no cambia de manera drástica, adsorbiendo y degradando poco hidrocarburo (22.52 %) en comparación con las demás concentraciones.

Figura 22. Gráficas de microgramos totales de BaP en función de los tiempos de exposición y concentración de microorganismos

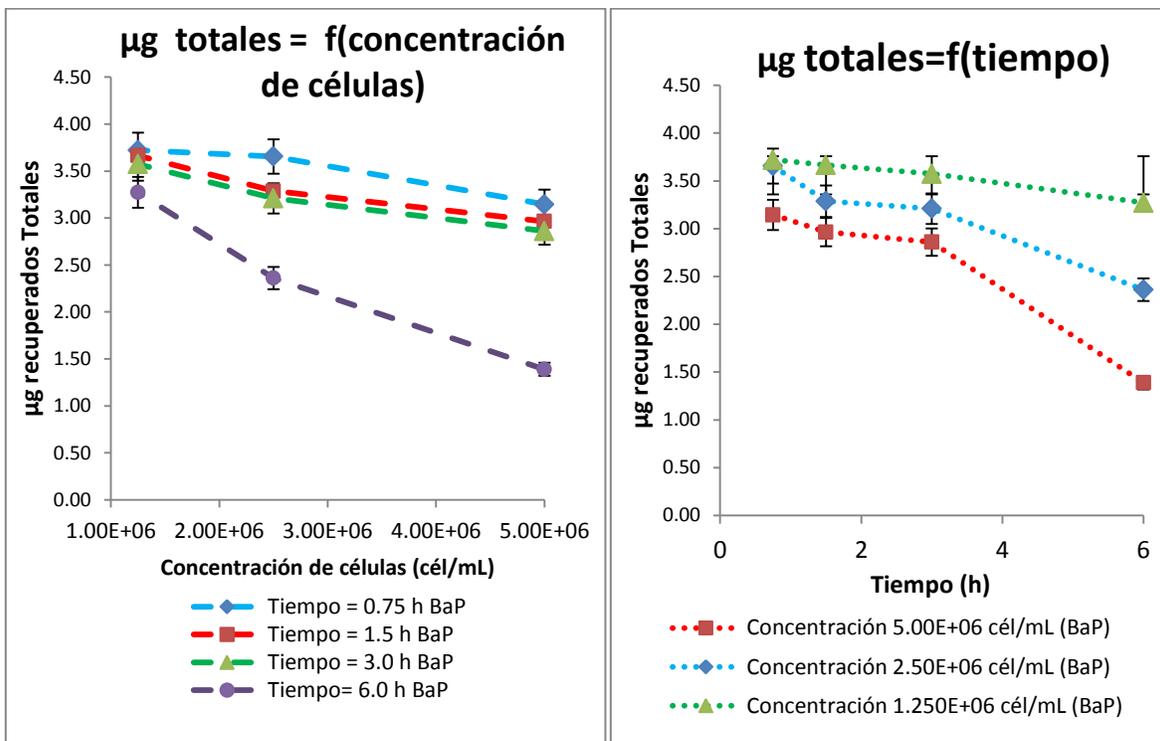


Figura 23. Gráficas de microgramos recuperados de BaP en EFS y DMFS en función del tiempo

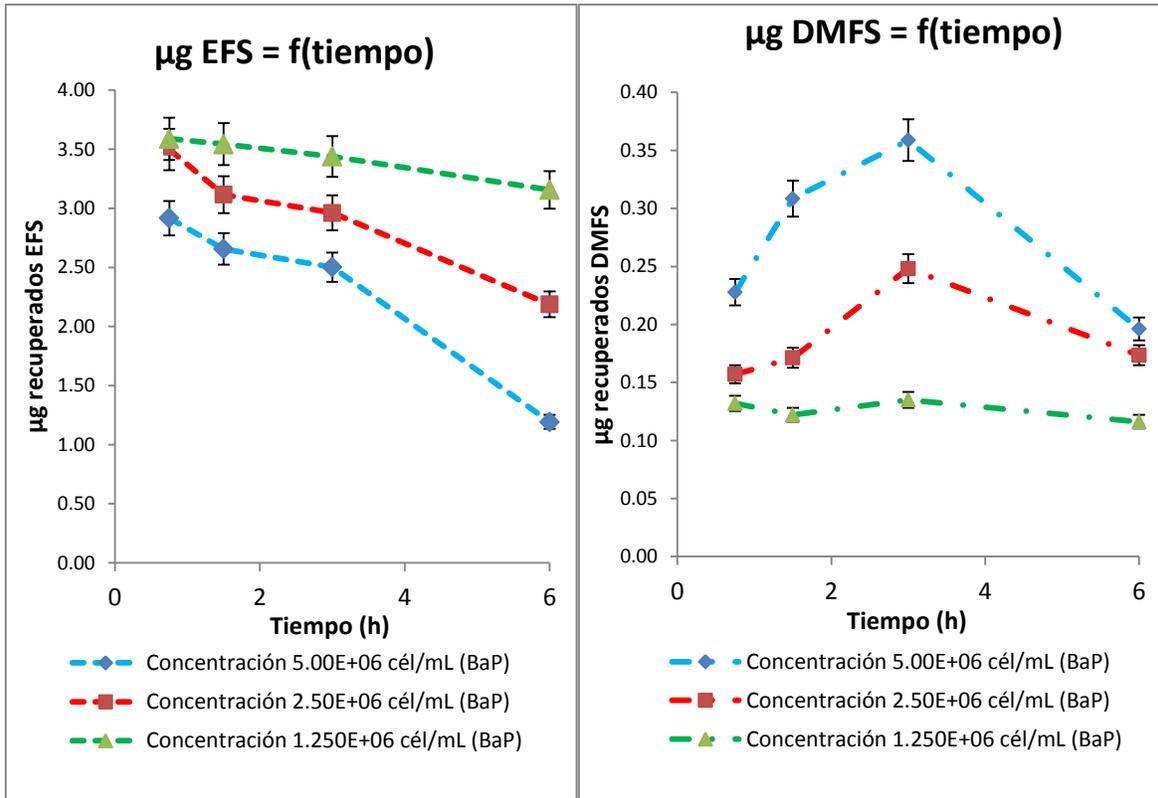
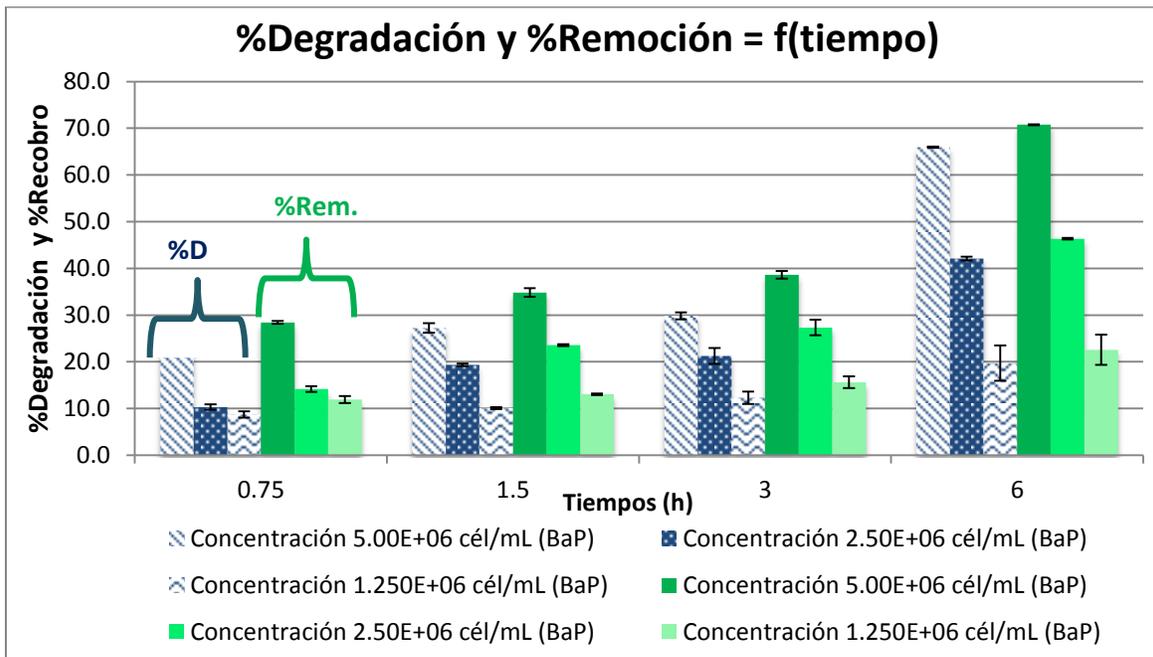
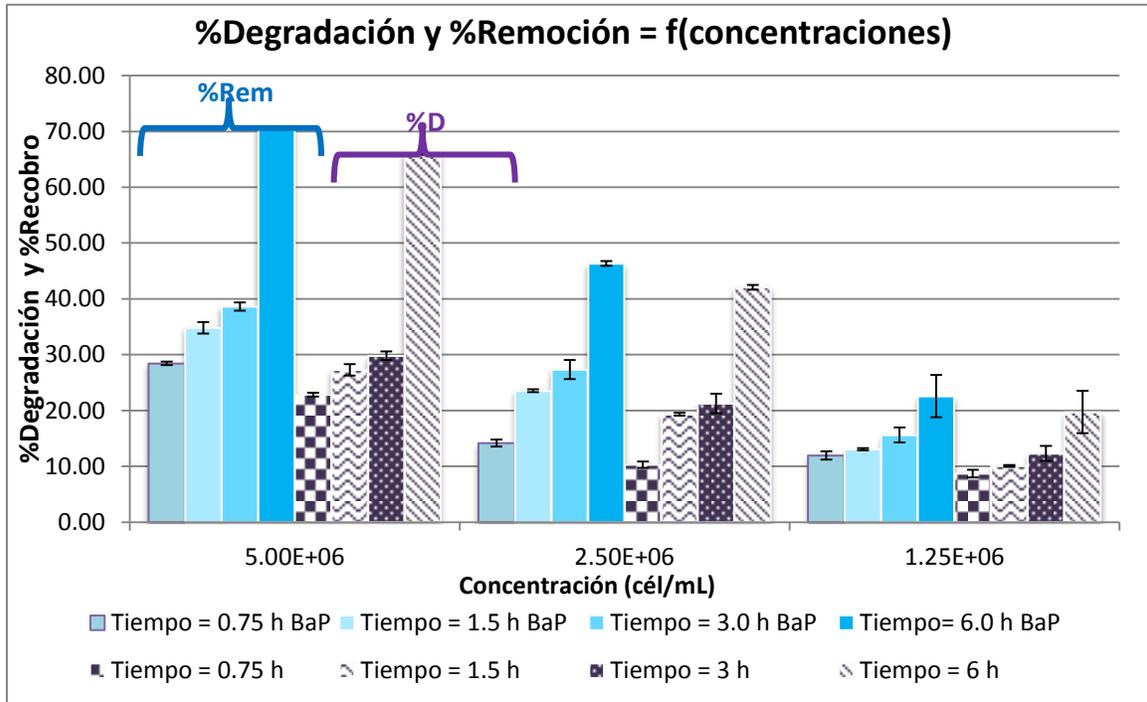


Figura 24. Comparación de %Degradación y %Remoción del BaP en distintos tiempos



Para las gráficas de las figuras 24 y 25: las barras con relleno de trama representan a los % Degradación, los %Remoción están representados con las barras sólidas.

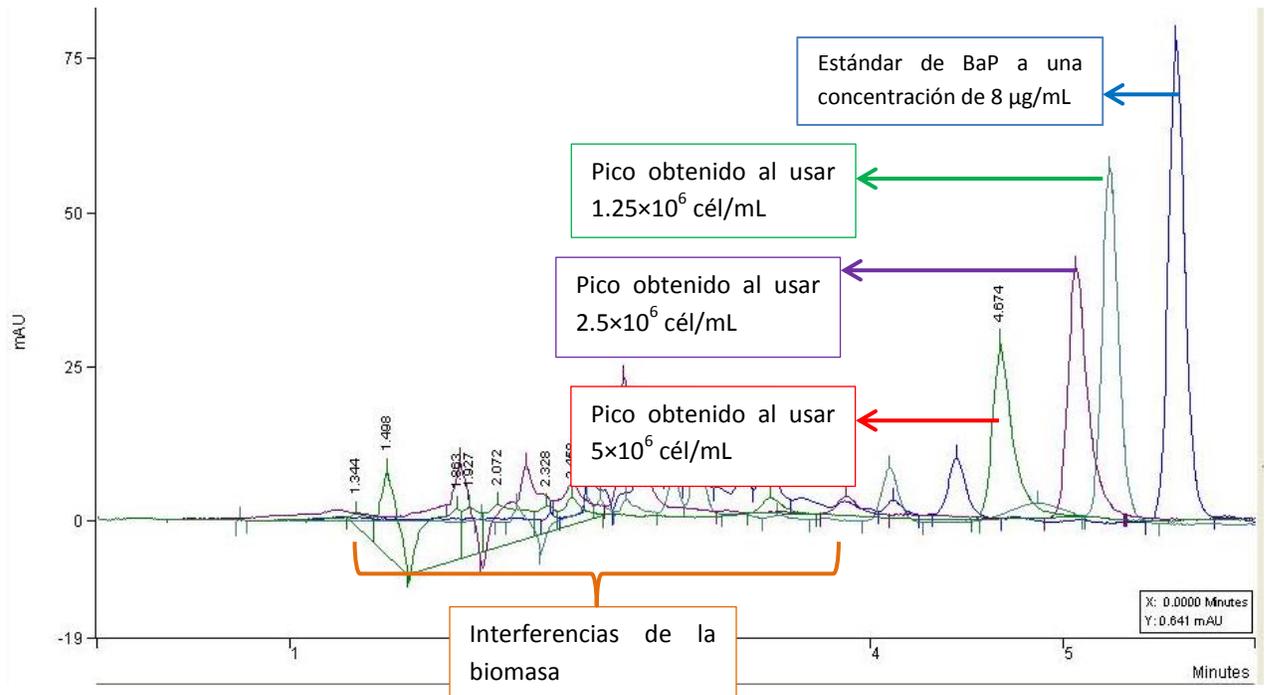
Figura 25. Comparación de %Degradación y %Remoción del BaP a distintas concentraciones de células



Al analizar las figuras 24 y 25 es posible observar que a medida que aumenta el tiempo de exposición y la concentración de microorganismos los porcentajes de remoción y degradación aumentan, en todos los casos el %Remoción es más alto en un 5% que el porcentaje de degradación, con estos resultados es posible afirmar que tanto la concentración como el tiempo de exposición tienen un papel muy importante en el proceso de degradación.

El cromatograma sobrepuesto de la figura 26 nos muestra la disminución del área bajo la curva al emplear diferentes concentraciones de microorganismo durante un ensayo de 6 horas, la disminución en el área bajo la curva de cada pico al emplear mayor concentración de microalgas es clara.

Figura 26. Cromatograma de las muestras de DMFS, bioensayo de 6 horas empleando BaP



4.4.2. BaA

De la misma manera que con el BaP con el monitoreo de las concentraciones residuales de BaA en los ensayos de exposición, se realizaron graficas del %Remoción y %Degradación en función del tiempo y las concentraciones de células en el cultivo. Los resultados de los ensayos para este compuesto se muestran en la tabla 18. Se puede observar que al igual que el BaP, los porcentajes de degradación y remoción más altos se encuentran a las 6 horas con el 69.8 % para degradación y el 89.47 % para la remoción, empleando la concentración más alta de microorganismos (5×10^6 células/mL). Sin embargo, al observar las gráficas de la figura 27 donde se comparan los microgramos totales remanentes del BaA se puede observar que la curva correspondiente al emplear 5×10^6 células/mL presenta un comportamiento similar a la curva obtenida al emplear 2.5×10^6 células/mL.

Tabla 18. Resumen de resultados obtenidos en los ensayos de exposición con BaA

Concentración 5.00E+06 cél/mL (BaA)							
Tiempo (h)	%Degradación BaA	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	µg EFS (medio líquido)	µg DMFS (biomasa)	µg Totales (medio líquido + biomasa)
0.75	26.0	0.75	79.18	1.90	0.88	2.24	3.12
1.5	37.7	2.89	85.65	0.04	0.61	2.03	2.63
3	57.0	4.44	88.22	0.05	0.50	1.32	1.82
6	69.8	0.13	89.47	0.04	0.44	0.83	1.28
Concentración 2.50E+06 cél/mL (BaA)							
Tiempo (h)	%Degradación BaA	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	µg EFS (medio líquido)	µg DMFS (biomasa)	µg Totales (medio líquido + biomasa)
0.75	22.0	3.94	59.48	0.53	1.71	1.58	3.29
1.5	28.4	1.28	74.64	0.18	1.07	1.95	3.02
3	54.0	1.46	69.89	0.40	1.27	0.67	1.94
6	63.4	1.19	83.28	0.20	0.71	0.84	1.55
Concentración 1.250E+06 cél/mL (BaA)							
Tiempo (h)	%Degradación BaA	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	µg EFS (medio líquido)	µg DMFS (biomasa)	µg Totales (medio líquido + biomasa)
0.75	2.7	1.06	22.44	0.06	3.27	0.83	4.10
1.5	4.6	1.02	27.39	0.04	3.06	0.96	4.02
3	12.8	1.98	30.20	2.02	2.95	0.73	3.68
6	26.5	1.43	39.30	0.14	2.56	0.54	3.10

*S en cada una de las columnas es la desviación estándar de los datos

En la tabla 19 se muestran los resultados del análisis estadístico sobre la regresión lineal (ajuste de cuadrados mínimos) de las gráficas de la figura 27. Al realizar el análisis sobre

la gráfica de microgramos recuperados en función de las concentraciones se encontró que el valor-P para las pendientes es mayor que 0.1, no existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores con un nivel de confianza del 90% o mayor. Pero al comparar las pendientes de las gráficas de microgramos totales en función de los diferentes tiempos de exposición el valor-P para las pendientes es menor que 0.01, existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los diferentes tiempos de exposición con un nivel de confianza del 99%. De este análisis podemos concluir que existen diferencias al emplear diferentes tiempos de bioexposición (la pendiente disminuye a medida que aumenta los tiempos), sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al emplear diferentes cantidades de células, este último resultado se ocasiono debido a la similitud en la remoción al emplear 2.5×10^6 y 1.25×10^6 células/mL.

Tabla 19. Análisis sobre las pendientes al realizar regresiones lineales sobre las gráficas de la figura 27 para datos de BaA

ANOVA sobre la gráfica de μg totales = $f(\text{concentraciones})$						Pendientes obtenidas a cada tiempo empleando diferentes concentración de microalgas	
Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Tiempos (h)	Pendiente
Concentración	11.361	1	11.361	59.41	0.0000	0.75	-2.34476E-7
Interceptos	13.126	3	4.37533	22.88	0.0000	1.5	-3.40762E-7
Pendientes	0.586202	3	0.195401	1.02	0.3979	3	-4.33143E-7
Modelo	25.0732	7				6	-4.32952E-7
ANOVA sobre la gráfica de μg totales = $f(\text{tiempo})$						Pendientes obtenidas a cada concentración a diferentes tiempo de exposición	
Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	C (cél/mL)	Pendiente
TIEMPO	12.2827	1	12.2827	240.76	0.0000	5×10^6	-0.338667
Interceptos	15.9579	2	7.97897	156.40	0.0000	2.50×10^6	-0.337314
Pendientes	0.65658	2	0.32829	6.44	0.0047	1.25×10^6	-0.195517
Modelo	28.8972	5					

En las gráficas de las figuras 27 y 28 se observa que a medida que los tiempos de exposición aumentan el los microgramos totales, los microgramos del medio líquido y la biomasa disminuyen. A concentraciones bajas de microalgas (1.25×10^6 cél/mL) los microgramos recuperados en la biomasa permanecen casi constantes no se está degradando ni removiendo mucho BaP y en el medio líquido se recupera casi por completo los microgramos adicionados inicialmente. Del análisis de la gráfica en la figura 29 podemos concluir que los porcentajes de remoción y degradación más bajos se presentaron con los tiempos más largos de exposición. Esta misma tendencia se observa en la gráfica de la figura 30, donde se comparan los porcentajes de remoción y degradación a diferentes concentraciones, a diferencia del BaP, el BaA comienza a removerse con mayor rapidez en tiempos cortos de exposición.

Figura 27. Gráficas de microgramos totales de BaA recuperados en función del tiempo y concentración de células

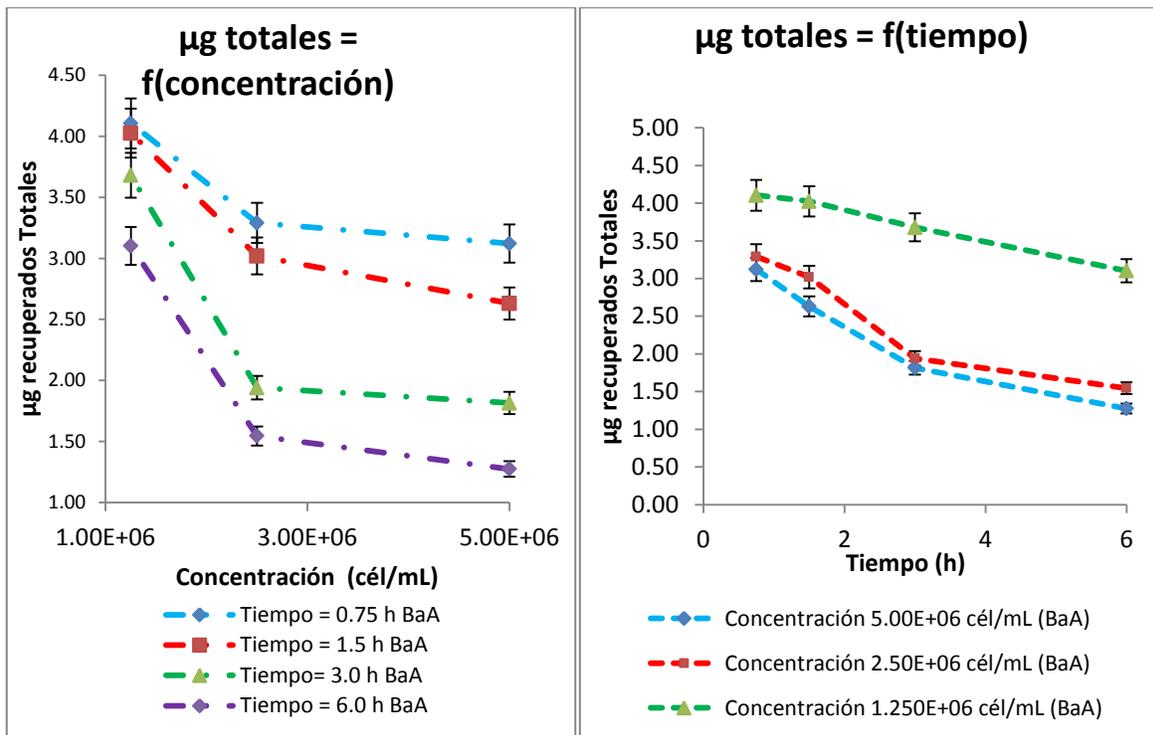


Figura 28. Gráficas de microgramos recuperados de BaA en la EFS y DMFS en función de los tiempos de exposición

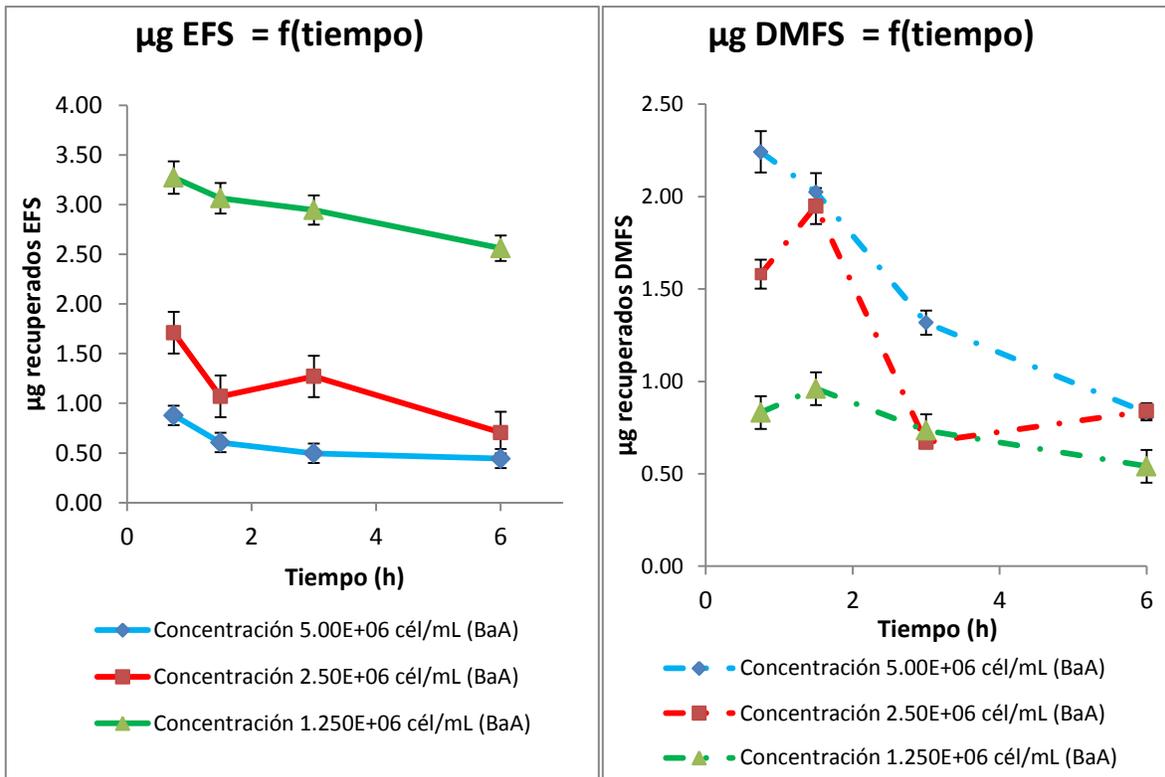
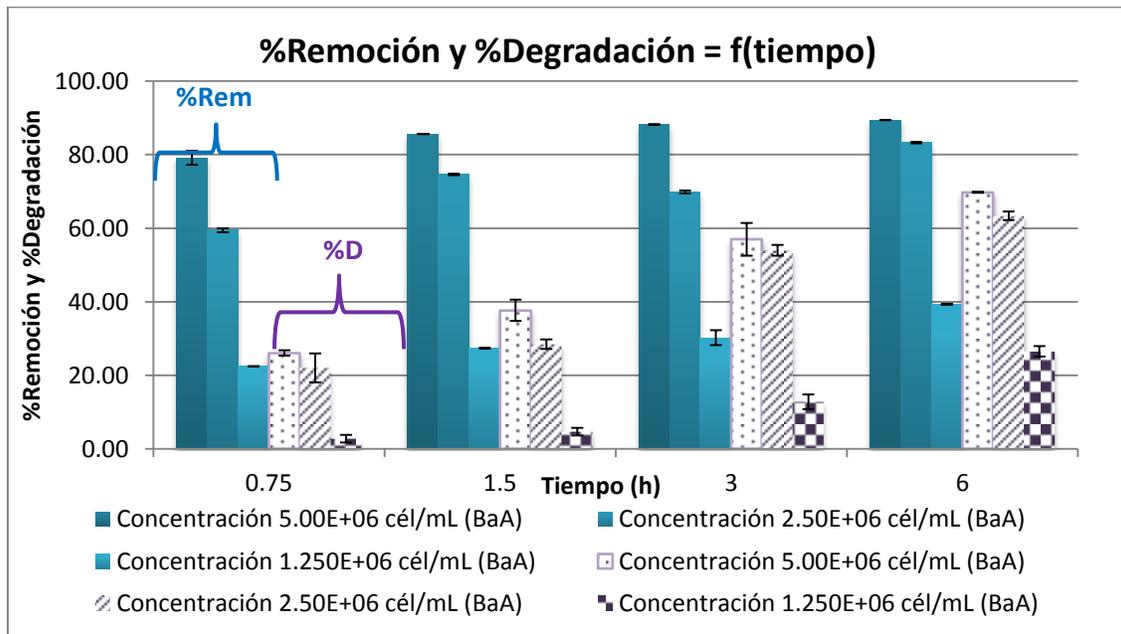
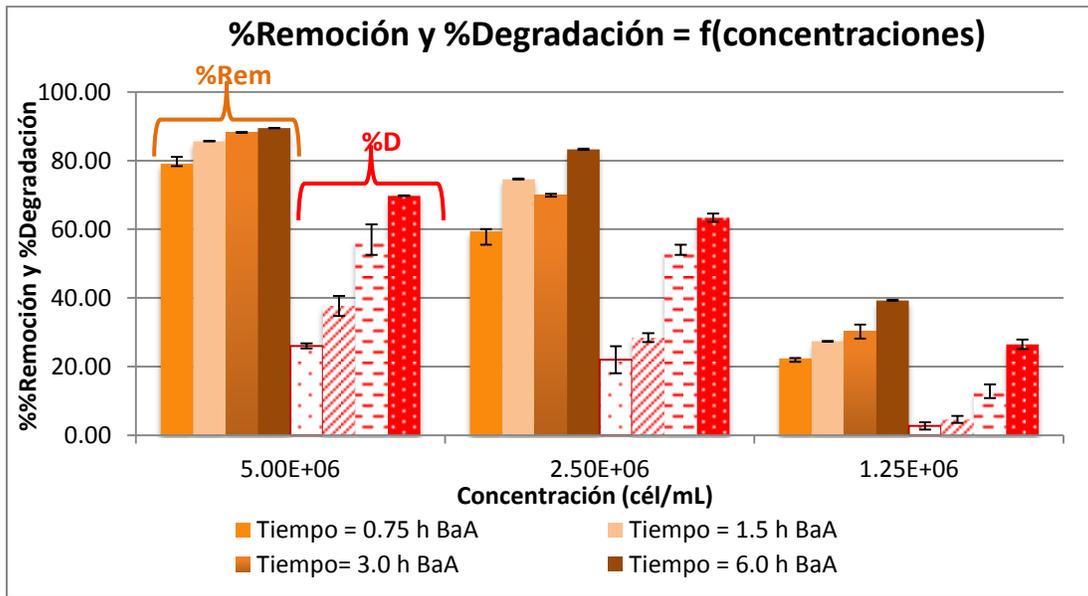


Figura 29. Comparación del %Remoción y %Degradación a diferentes tiempos con BaA



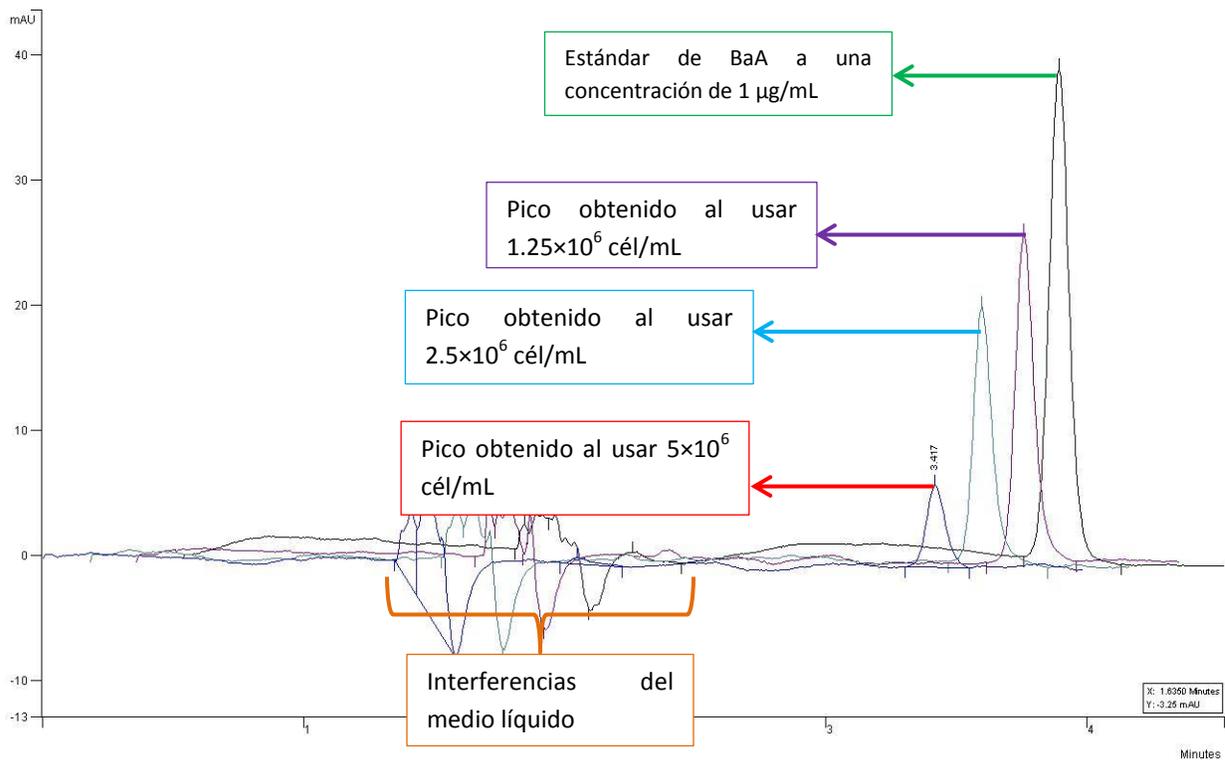
Para las gráficas de las figuras 29 y 30 las barras con relleno de trama representan a los % Degradación, los %Remoción están representados con las barras sólidas.

Figura 30. Comparación del %Remoción y %Degradación empleando BaA a diferentes concentraciones



En el cromatograma mostrado en la figura 31 se observan los picos obtenidos al inyectar muestras de EFS después de un tiempo de exposición de 6 horas, el área de los picos disminuyó a media que la concentración de microorganismos aumentó.

Figura 31. Cromatograma de las muestras de EFS, bioensayo de BaA a 6 horas



4.4.3. BbF

El resumen de los resultados obtenidos después de los ensayos de exposición empleando este compuesto se muestra en la tabla 20.

Tabla 20. Resumen de datos obtenidos en los ensayos de exposición con BbF

Concentración 5.00E+06 cél/mL (BbF)							
Tiempo (h)	%Degradación BbF	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	µg EFS (medio líquido)	µg DMFS (biomasa)	µg Totales (medio líquido + biomasa)
0.75	6.1	1.97	26.89	2.08	2.94	1.02	3.96
1.5	9.2	0.65	36.86	1.43	2.54	1.29	3.83
3	16.2	0.88	52.30	1.43	1.92	1.62	3.53
6	52.5	1.89	67.04	0.95	1.33	0.68	2.01
Concentración 2.50E+06 cél/mL (BbF)							
Tiempo (h)	%Degradación BbF	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	µg EFS (medio líquido)	µg DMFS (biomasa)	µg Totales (medio líquido + biomasa)
0.75	5.7	0.41	23.51	0.04	3.07	0.91	3.98
1.5	8.1	1.25	30.10	0.28	2.81	1.07	3.88
3	27.2	1.97	42.19	1.93	2.32	0.75	3.07
6	34.7	0.93	57.61	0.86	1.70	1.05	2.75
Concentración 1.250E+06 cél/mL (BbF)							
Tiempo (h)	%Degradación BbF	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	µg EFS (medio líquido)	µg DMFS (biomasa)	µg Totales (medio líquido + biomasa)
0.75	11.0	0.38	19.27	0.10	3.25	0.51	3.75
1.5	15.2	2.62	27.64	0.74	2.91	0.67	3.58
3	13.3	0.75	29.05	0.33	2.85	0.81	3.66
6	23.7	1.54	33.23	1.46	2.68	0.53	3.22

*S en cada una de las columnas es la desviación estándar de los datos

Los porcentajes de degradación y remoción para el BbF después de tiempos de exposición más altos y concentraciones altas de microorganismos (6 horas y 5×10^6 células/mL) son de 52.5 % y 67.04 %, teniendo los valores más bajos en comparación con los porcentajes de degradación del BaP y el BaA. Para éste hidrocarburo el %Remoción es 15 % más alto que el porcentaje de degradación indicando que los microorganismos remueven más por absorción que por degradación. De la misma manera que con los dos compuestos anteriores tanto el tiempo de exposición como la concentración de

microorganismos tienen una relevancia estadísticamente significativa en el proceso de degradación y remoción. En la tabla 21 se resumen del análisis estadístico que permitió evaluar la significancia estadística de las pendientes obtenidas en el modelo de regresión lineal, el valor-P para las pendientes es menor que 0.01, existen diferencias con un nivel de confianza del 99 % para ambas gráficas de la figura 32. A medida que aumenta la concentración de microorganismos en el medio y los tiempos de exposición la pendiente se hace cada vez más pequeña, por lo tanto este compuesto sigue la misma tendencia de degradación que el BaP y el BaA. Se presentan las gráficas de los microgramos recuperados totales en función de los diferentes tiempos de exposición y concentraciones de células en la figura 32, en estas gráficas es posible observar la disminución de los microgramos recuperados a lo largo del tiempo, las cantidades de BbF más bajas se presentaron a concentraciones altas de células y tiempos de exposición largos, igual que los compuestos anteriores.

Tabla 21. Resumen del análisis estadístico para BbF, comparación en los valores de las pendientes

ANOVA sobre la gráfica de μg totales = $f(\text{concentraciones})$						Pendientes obtenidas a cada tiempo empleando diferentes concentración de microalgas	
Fuente	Suma de Cuadrados	G L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Tiempos (h)	Pendiente
Concentración	0.267906	1	0.267906	9.40	0.0048	0.75	4.53333E-8
Interceptos	8.27677	3	2.75892	96.81	0.0000	1.5	5.44762E-8
Pendientes	2.07139	3	0.690464	24.23	0.0000	3	-3.19238E-7
Modelo	10.6161	7				6	-1.90476E-9
ANOVA sobre la gráfica de μg totales = $f(\text{tiempo})$						Pendientes obtenidas a cada concentración a diferentes tiempo de exposición	
Fuente	Suma de Cuadrados	G L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	C (cél/mL)	Pendiente
TIEMPO	8.25797	1	8.25797	283.50	0.0000	5×10^6	-0.378744
Interceptos	0.294156	2	0.147078	5.05	0.0129	2.50×10^6	-0.243246
Pendientes	1.98806	2	0.99403	34.13	0.0000	1.25×10^6	-0.092599
Modelo	10.5402	5					

La primera gráfica de la figura 33 presenta los microgramos recuperados en el medio líquido donde podemos observar la disminución gradual del BbF al emplear 5×10^6 y 2.5×10^6 cél/mL, con una concentración de 1.25×10^6 cél/mL se recupera casi todo el BbF agregado al inicio.

En la segunda gráfica de la figura 33 donde se grafican los microgramos recuperados en la biomasa en función de tiempo se puede ver que en tiempos cortos de exposición los microgramos de BbF aumentan debido a la adsorción, pero después de 3 horas comienzan a disminuir y a concentraciones bajas de microorganismos (1.25×10^6 cél/mL) la adsorción es poca y permanece casi constante a los largo del tiempo. Al observar las gráficas de las figuras 34 y 35 es posible ver que los porcentajes de remoción y degradación más altos se presentan con las concentraciones más altas de microorganismos y tiempos prolongados de exposición.

En la figura 36 se presenta un cromatograma de las muestras de DMFS después de un bioensayo de BbF a 3 horas, el pico con el área más pequeña se obtuvo al emplear la concentración más grande de microorganismos (5×10^6 células/mL). Después de los ensayos de 3 horas el pico de cada muestra venía acompañado de otro pico de menor área, como se muestra en la figura 36, no se presentaba en el estándar y no correspondía a ninguno de los otros hidrocarburos de trabajo, esto se verifico comparando los espectros de absorción de cada compuesto y su tiempo de retención, no fue posible determinar la identidad de dicho pico.

Figura 32. Gráficas de microgramos totales de BbF recuperados en función de los diferentes tiempos de exposición y concentración de células

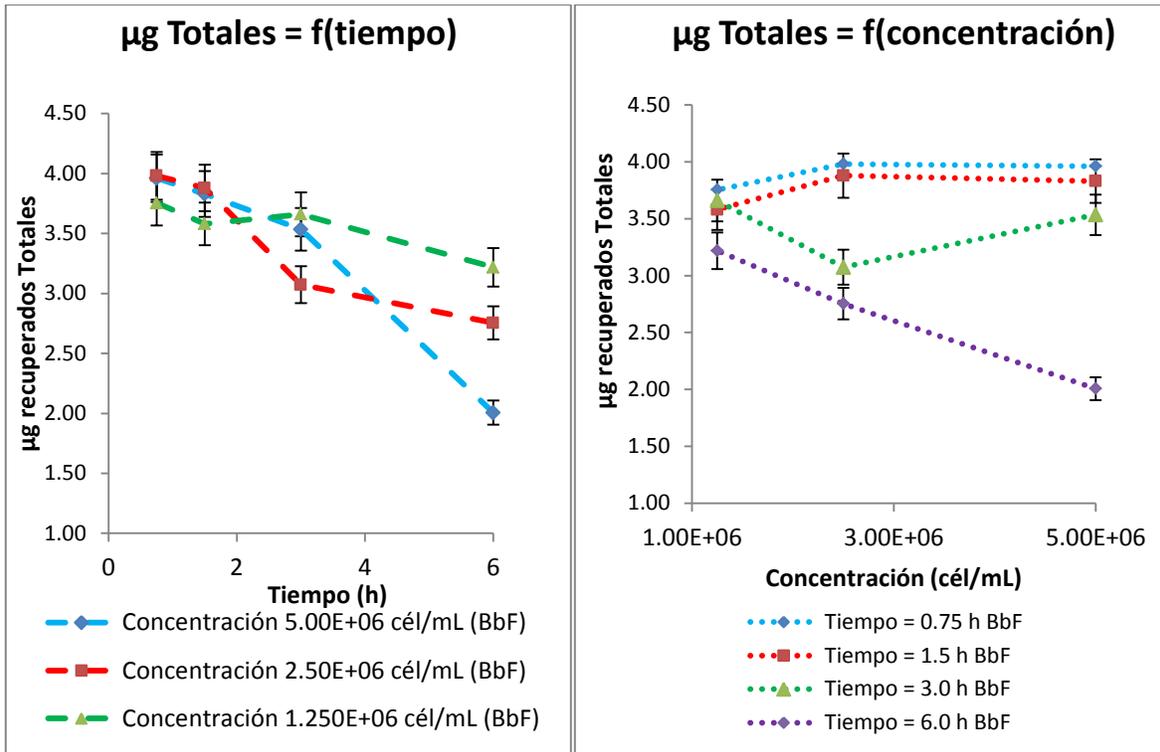


Figura 33. Gráficas de microgramos recuperados de BbF en EFS y DMFS en función de los diferentes tiempos de exposición

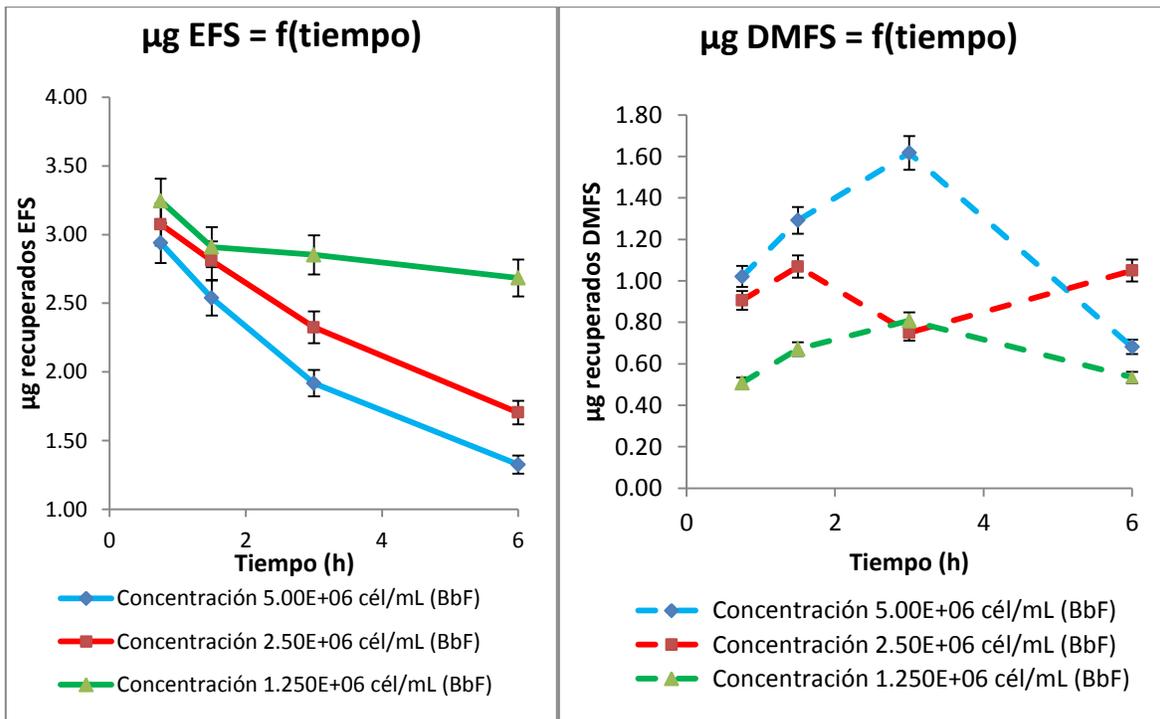
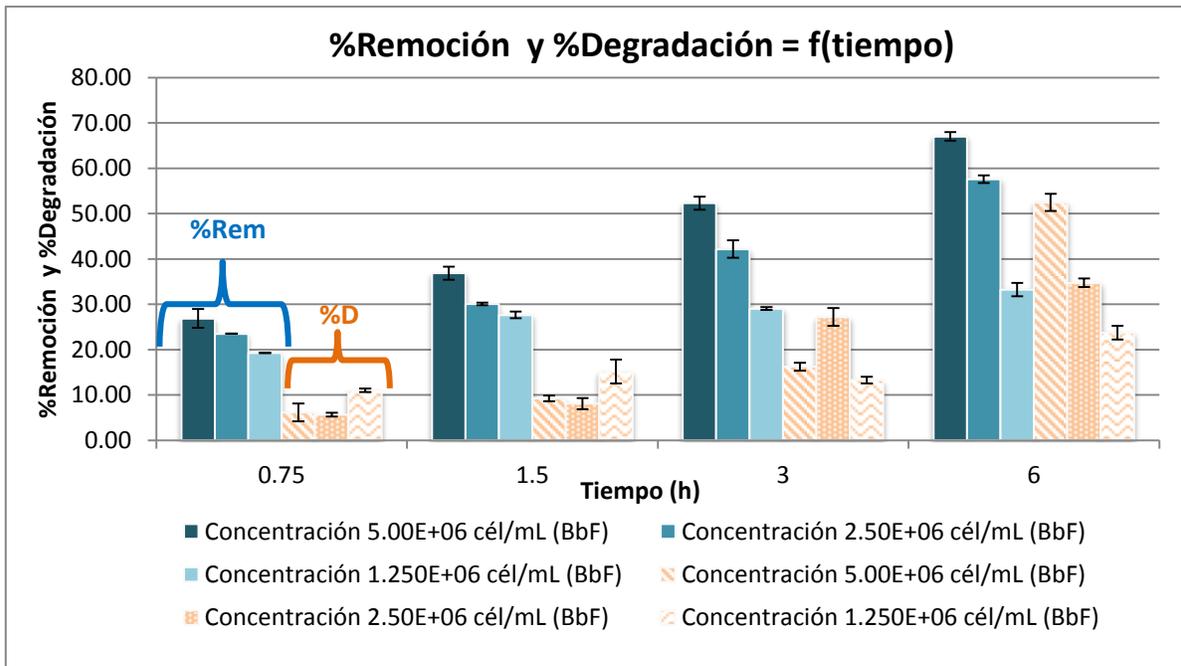


Figura 34. Comparación de %Remoción y %Degradación en tiempos diferentes



Para las gráficas de las figuras 34 y 35 las barras con relleno de trama representan a los %Degradación, los %Remoción están representados con las barras sólidas. Las barras más altas son los porcentajes que se relacionan con los tiempos de exposición más largos (6 H) y la mayor concentración de células (5×10^6 cél/mL)

Figura 35. Comparación de %Remoción y %Degradación en concentraciones diferentes

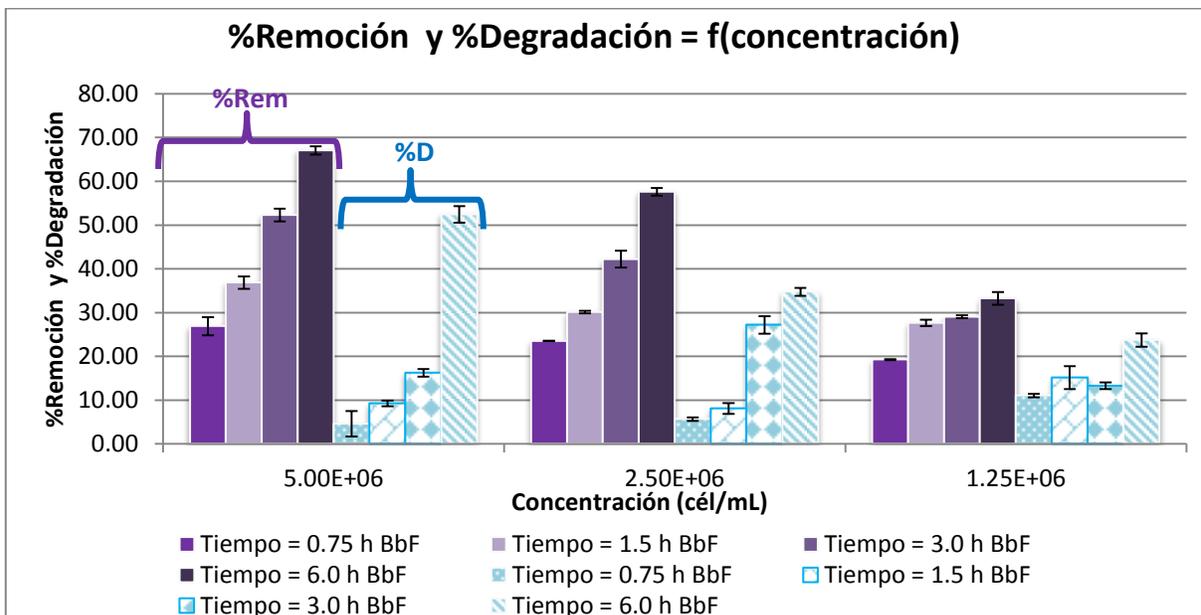
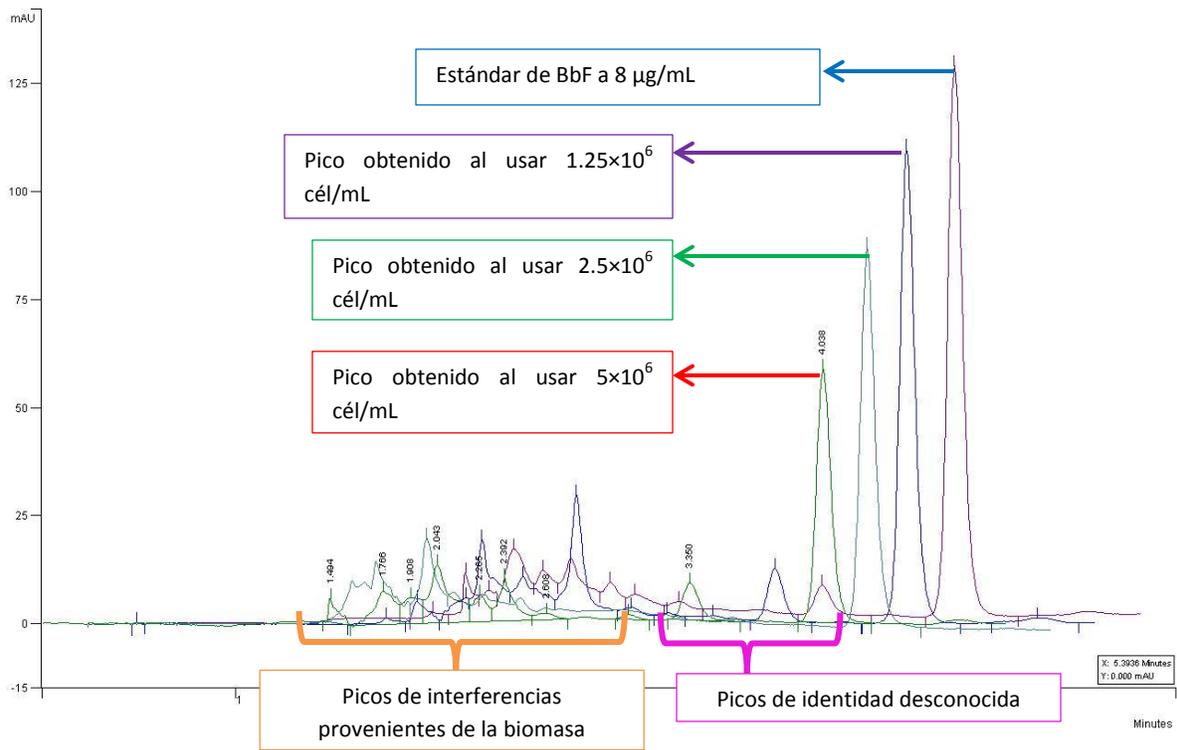


Figura 36. Cromatograma de las muestras de DMFS, ensayo de BbF a 3 horas



4.4.4. BkF

Este compuesto presenta los valores más altos de degradación (81.2 %) y remoción (88.11 %). Los resultados de los ensayos de bioexposición se muestran en la tabla 22. A diferencia del comportamiento de los compuestos anteriores el BkF muestra claras diferencias en los porcentajes de remoción y degradación en los distintos tiempos y a las diferentes concentraciones de microorganismos. El análisis estadístico sobre todos los datos se muestra en la tabla 23, donde podemos observar que existe una diferencia significativa entre las pendientes al usar diferentes concentraciones de células y en tiempos diferentes.

Tabla 22. Resumen de datos obtenidos en los ensayos de exposición empleando BkF

Concentración 5.00E+06 cél/mL (BkF)							
Tiempo (h)	%Degradación BkF	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	µg recuperados EFS	µg recuperados DMFS	µg recuperados Totales
0.75	13.1	1.08	18.36	1.65	3.27	0.40	3.67
1.5	13.9	0.21	52.99	0.27	1.88	1.75	3.63
3	37.5	0.53	59.36	1.01	1.63	1.01	2.64
6	81.2	1.28	88.11	0.86	0.48	0.32	0.79
Concentración 2.50E+06 cél/mL (BkF)							
Tiempo (h)	%Degradación BkF	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	µg recuperados EFS	µg recuperados DMFS	µg recuperados Totales
0.75	12.2	1.34	16.27	3.36	3.35	0.35	3.70
1.5	20.7	0.59	39.77	1.11	2.41	0.94	3.35
3	12.0	0.80	51.64	3.61	1.93	1.78	4.03
6	38.9	4.37	58.28	4.31	1.67	0.91	2.58
Concentración 1.250E+06 cél/mL (BkF)							
Tiempo (h)	%Degradación BkF	S %Degradación	%Remoción	S %Remoción	µg recuperados EFS	µg recuperados DMFS	µg recuperados Totales
0.75	16.0	0.82	17.16	1.24	3.31	0.23	3.54
1.5	9.0	1.46	21.08	1.04	3.16	0.68	3.84
3	4.5	0.88	54.39	0.45	1.82	2.21	3.71
6	5.7	3.22	52.50	2.77	1.90	2.08	3.98

*S es la desviación estándar de los datos

Tabla 23. Resumen del análisis estadístico para los datos de BbF

ANOVA sobre la gráfica de μg totales = $f(\text{tiempo})$						Pendientes obtenidas a cada tiempo empleando diferentes concentración de microalgas	
Fuente	Suma de Cuadrados	G L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Tiempos (h)	Pendiente
Concentración	7.3902	1	7.3902	127.60	0.0000	0.75	2.60952E-8
Interceptos	8.62463	3	2.87488	49.64	0.0000	1.5	-3.1619E-8
Pendientes	10.082	3	3.36065	58.03	0.0000	3	-3.25714E-7
Modelo	26.0968	7				6	-8.31238E-7
ANOVA sobre la gráfica de μg totales = $f(\text{tiempo})$						Pendientes obtenidas a cada concentración a diferentes tiempo de exposición	
Fuente	Suma de Cuadrados	G L	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	C (cél/mL)	Pendiente
TIEMPO	7.96671	1	7.96671	104.70	0.0000	5×10^6	-0.576232
Interceptos	7.39057	2	3.69529	48.57	0.0000	2.50×10^6	-0.189333
Pendientes	10.0785	2	5.03926	66.23	0.0000	1.25×10^6	0.0636908
Modelo	25.4358	5					

En la figura 37 al analizar las gráficas se pudo observar una disminución evidente en los microgramos totales recuperados después de 6 horas y una concentración de 5×10^6 cél/mL. Por otra parte las gráficas de la figura 38 presentan los microgramos recuperados en la biomasa (DMFS) y el medio líquido (EFS) después de los bioensayos, en el medio líquido los microgramos van disminuyendo de manera gradual, pero en la biomasa primero se adsorben y después de 3 horas se empiezan a degradar, menos al emplear la concentración más baja de microorganismos (1.25×10^6 cél/mL) donde permanece adsorbida pero no se observa una disminución. En las gráficas 39 y 40, se puede observar que los porcentajes de remoción y degradación más altos, se dan a tiempos largos y con la concentración más alta de microorganismos, al igual que los compuestos anteriores.

Figura 37. Gráficas de microgramos totales de BkF en función del tiempo

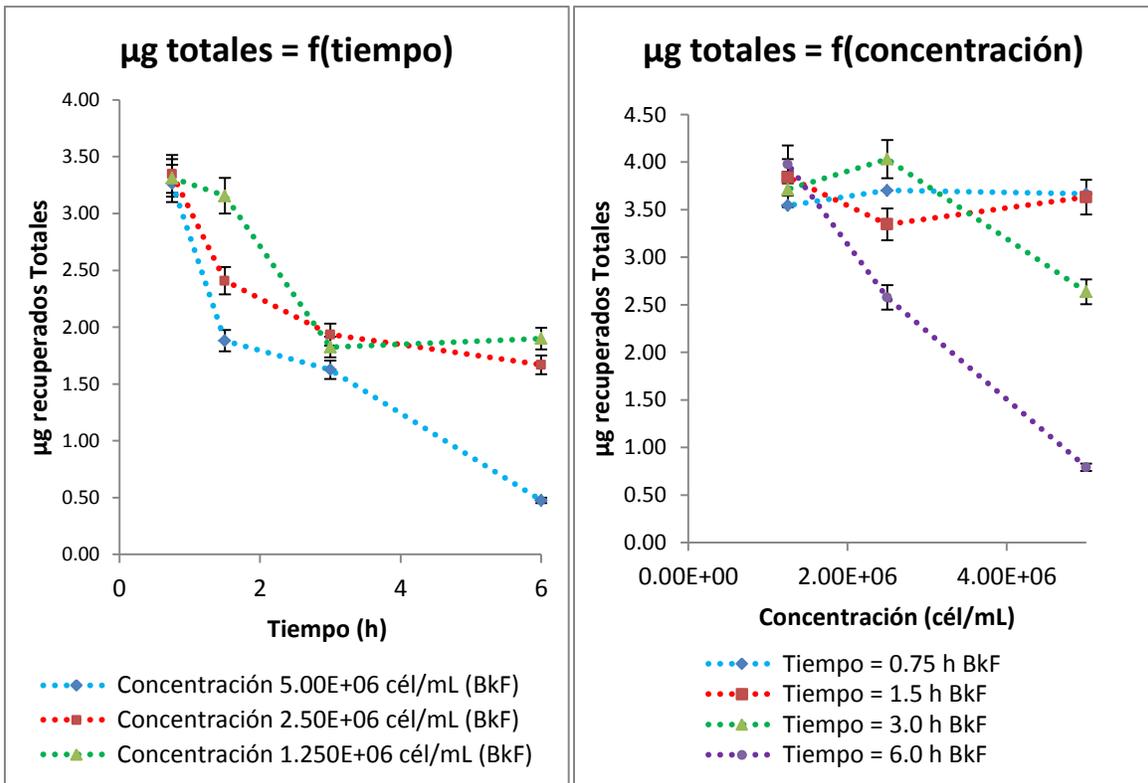


Figura 38. Gráficas de microgramos recuperados de BkF en EFS y DMFS en función de los diferentes tiempos de exposición

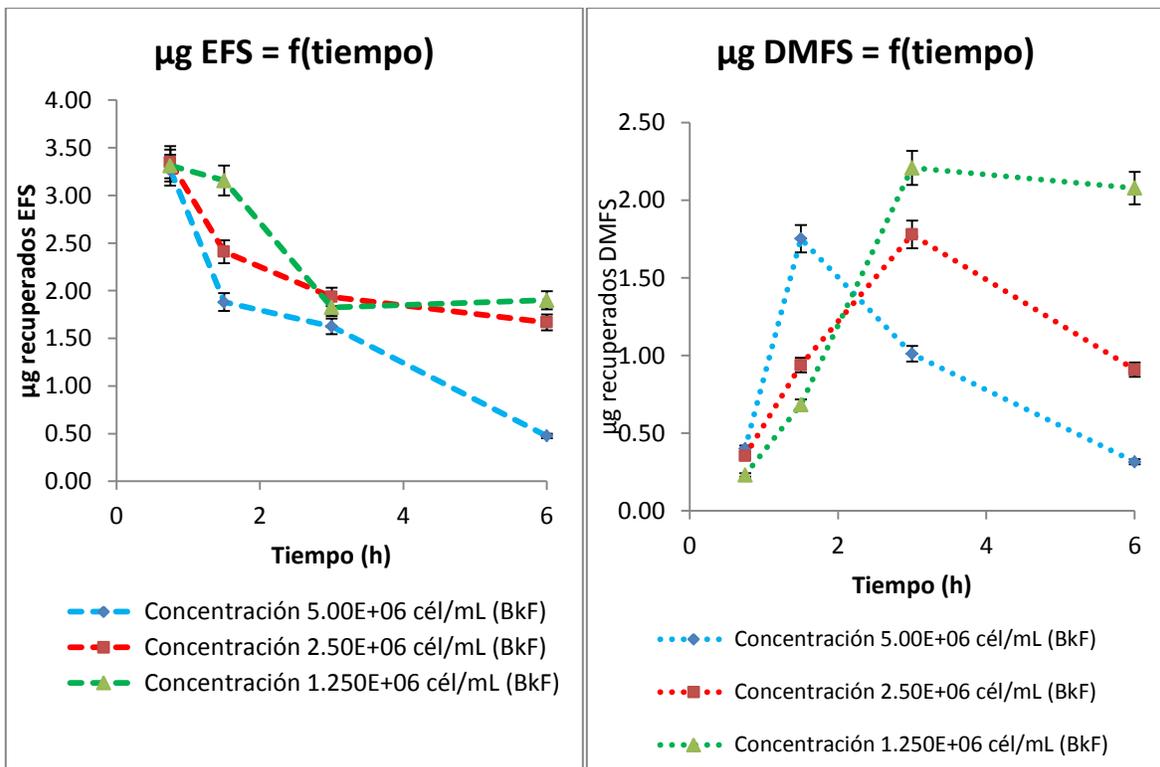
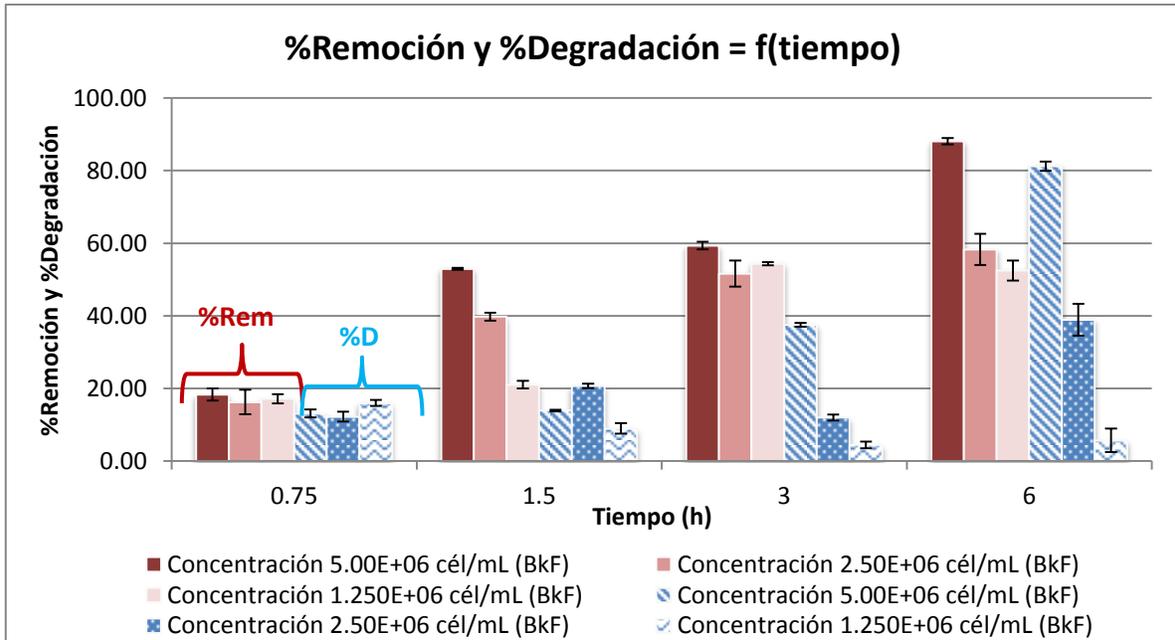
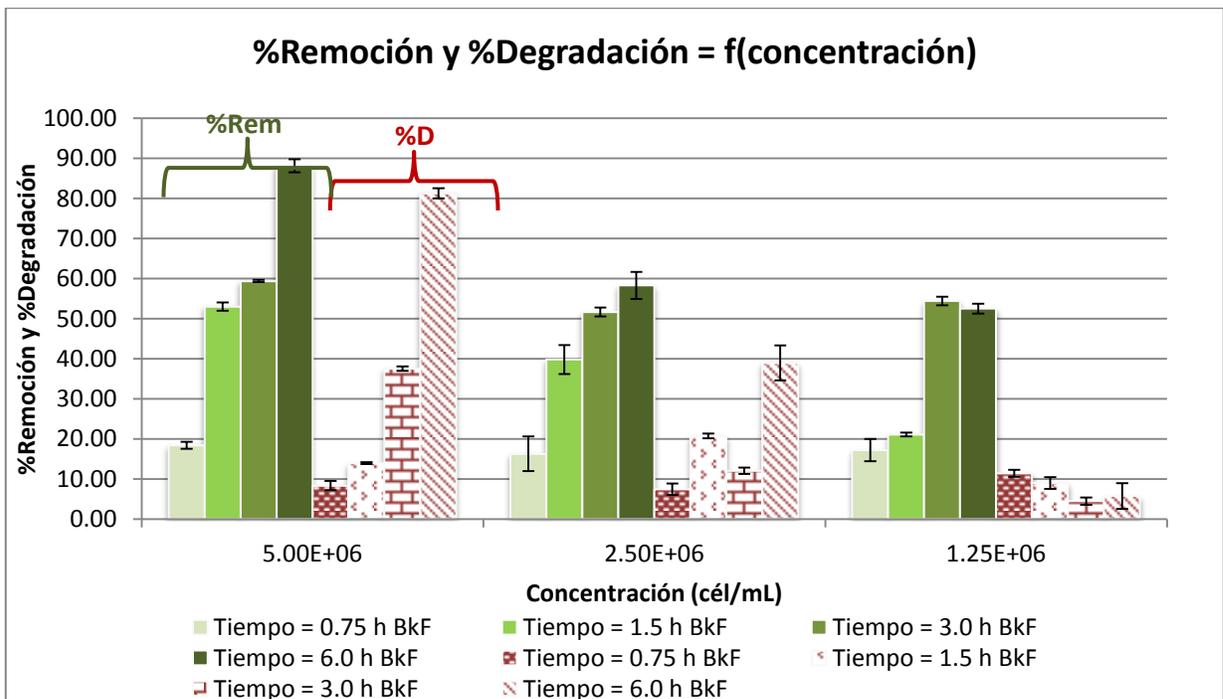


Figura 39. Comparación de %Remoción y %Degradación en función del tiempo



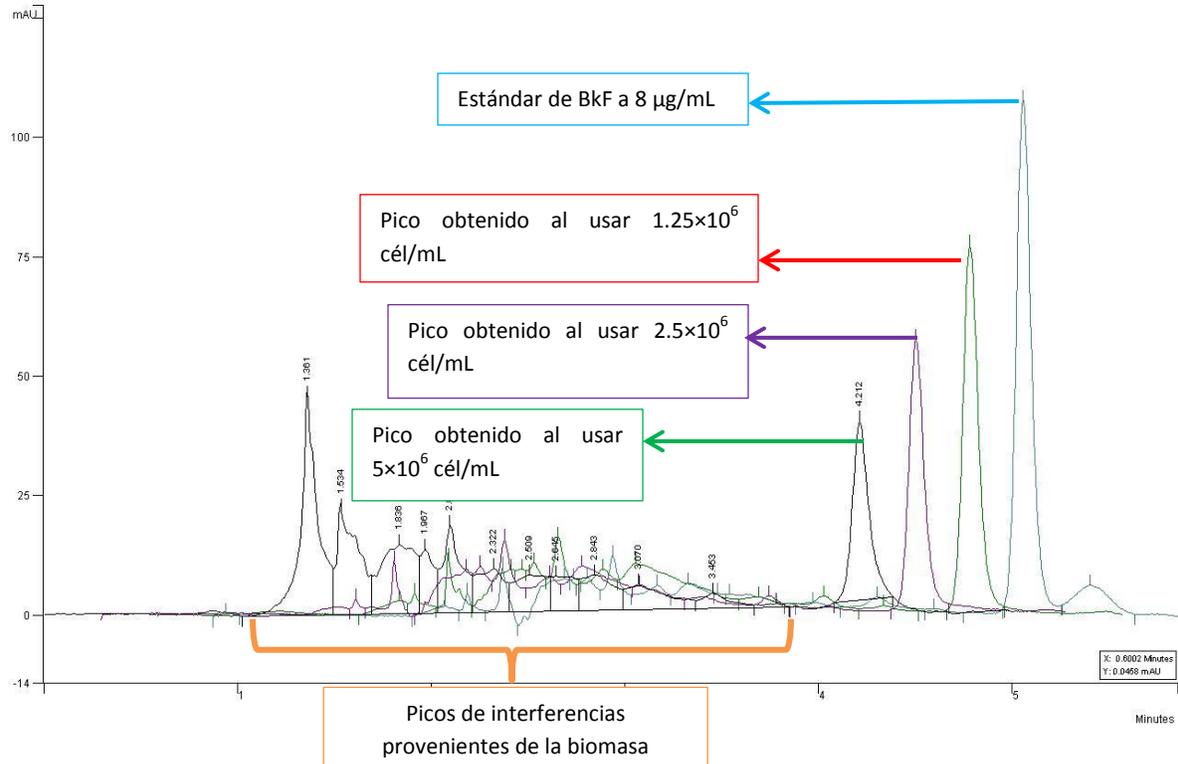
Para las gráficas de las figuras 40 y 41 las barras con relleno de trama representan a los % Degradación, los %Remoción están representados con las barras sólidas.

Figura 40. Comparación del %Remoción y %Degradación en función de la concentración células



En el cromatograma de la figura 41 podemos ver la misma tendencia en la disminución de los microgramos recuperados al emplear concentraciones altas de microorganismos.

Figura 41. Cromatograma de las muestras de DMFS, ensayo de BkF a horas



Un ejemplo de los cálculos realizados para la realización de estas gráficas y el ejemplo del análisis estadístico para uno de los compuestos se puede encontrar en el Anexo 4.

Los resultados de las pruebas estadísticas mostraron que los porcentajes de degradación y recuperación son diferentes entre los ensayos realizados con diferentes concentraciones de células, los resultados arrojaron que tanto el número de células como el tiempo de exposición son relevantes para la remoción del BkF.

4.4.4. Comparación puntual a un solo tiempo (1.5 h) empleando diferente cantidad de células en medio líquido con BaP

En estos ensayos se pretendió utilizar un mayor número de células que en las anteriores, para lo cual se manejaron dos concentraciones de células más: 1×10^7 y 1.5×10^7 células/mL, para poder alcanzar estas concentraciones se siguió la metodología de la sección 3.4. Los resultados obtenidos se sintetizan en la tabla 24.

Tabla 24. Datos obtenidos de la comparación puntual a 1.5 h empleando concentraciones mayores a 5×10^6 células/mL

Concentración (cél/mL)	Tiempo (h)	µg recuperados EFS	µg recuperados DMFS	µg recuperados TOTALES	%Degradación	%Remoción
2.50E+06	1.5	0.370	3.102	3.231	23.12	31.20
5.00E+06	1.5	0.209	3.437	3.576	14.91	25.03
1.00E+07	1.5	0.139	2.634	2.843	32.35	46.69
1.50E+07	1.5	0.129	1.877	2.247	46.54	56.93

Como se puede observar en los datos anteriores, los porcentajes de degradación y remoción aumentan de manera considerable empleado una cantidad mayor de celular correspondiente a 1.5×10^7 células/mL, sin embargo esta disminución no es tan evidente como la que se observó en ensayos anteriores en el tiempo más largo de exposición (6 horas). Al realizar una regresión lineal sobre las gráficas de la figura 42 y comparar las pendientes, los resultados demostraron que si existe una diferencia significativa entre las pendientes, por lo que podemos decir que el porcentaje de para cada grupo expuesto al hidrocarburo con diferentes concentraciones de microorganismos, es estadísticamente diferente.

Al analizar los resultados de la tabla 24 vemos que el porcentaje de remoción podemos ver que este aumenta de manera proporcional a la concentración de células en el medio.

De manera gráfica es posible observar la disminución de los microgramos de BaP a medida que se aumenta la concentración de microorganismos en el medio. Las gráficas de la figura 42 permiten ver con mayor detalle la disminución del hidrocarburo en la

biomasa de la microalga así como en el medio líquido. También podemos ver que el porcentaje de remoción es más alto que el de degradación, lo que indica que las células remueven al hidrocarburo aunque lo degraden en menor cantidad (figura 44), esta misma tendencia se observó en los ensayos de exposición con los demás compuestos. Con un nivel de confianza del 95.0 % es posible afirmar que la remoción de este tipo de compuestos poliaromáticos es dependiente del número de microorganismos en el medio

Figura 42. Gráfica de microgramos recuperados en el medio, en la biomasa y los totales en función de la concentración de células

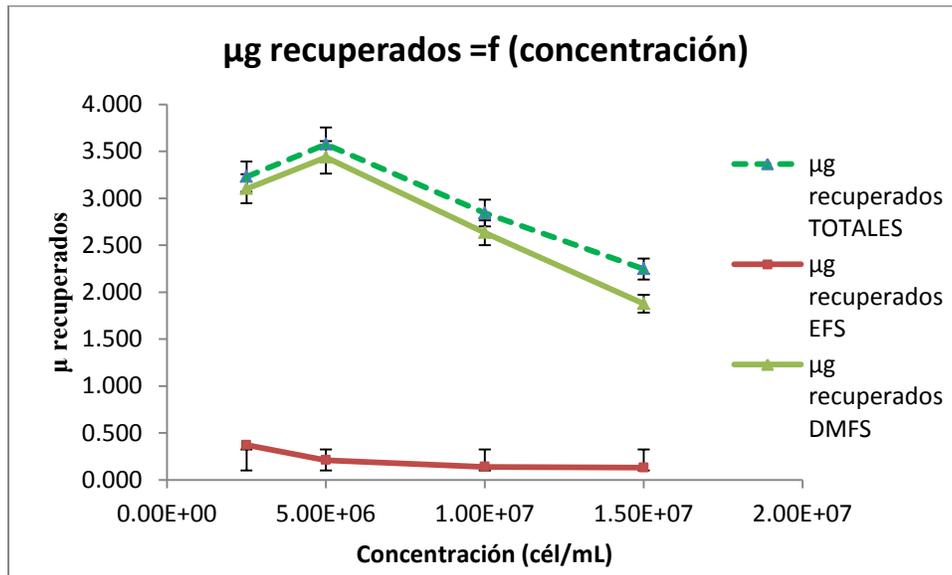


Figura 43. Gráfica de porcentajes de degradación y remoción en función de la concentración de células

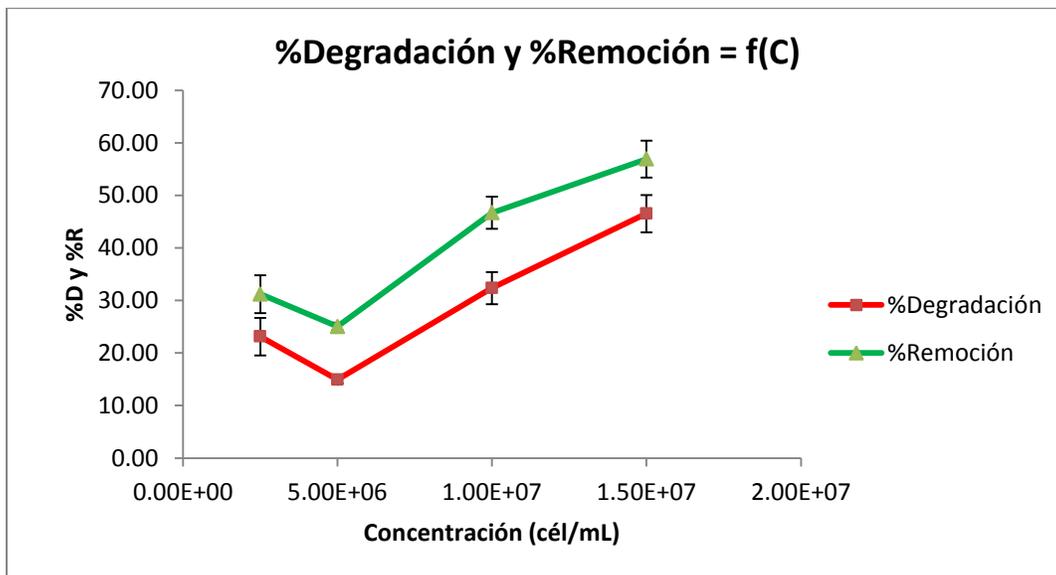


Figura 44. Comparación entre el porcentaje de remoción y degradación a distintas concentraciones

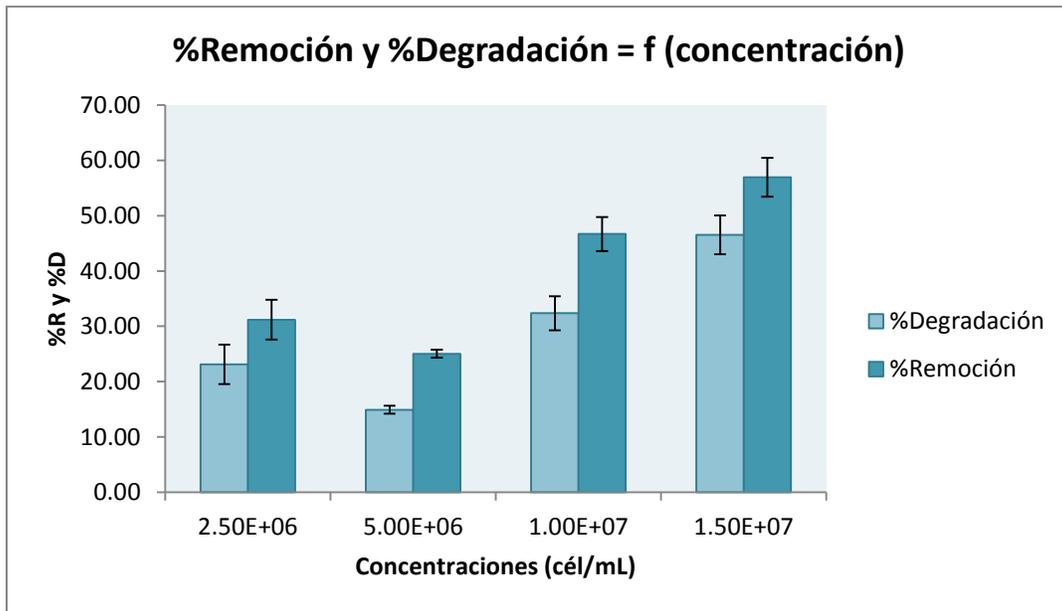
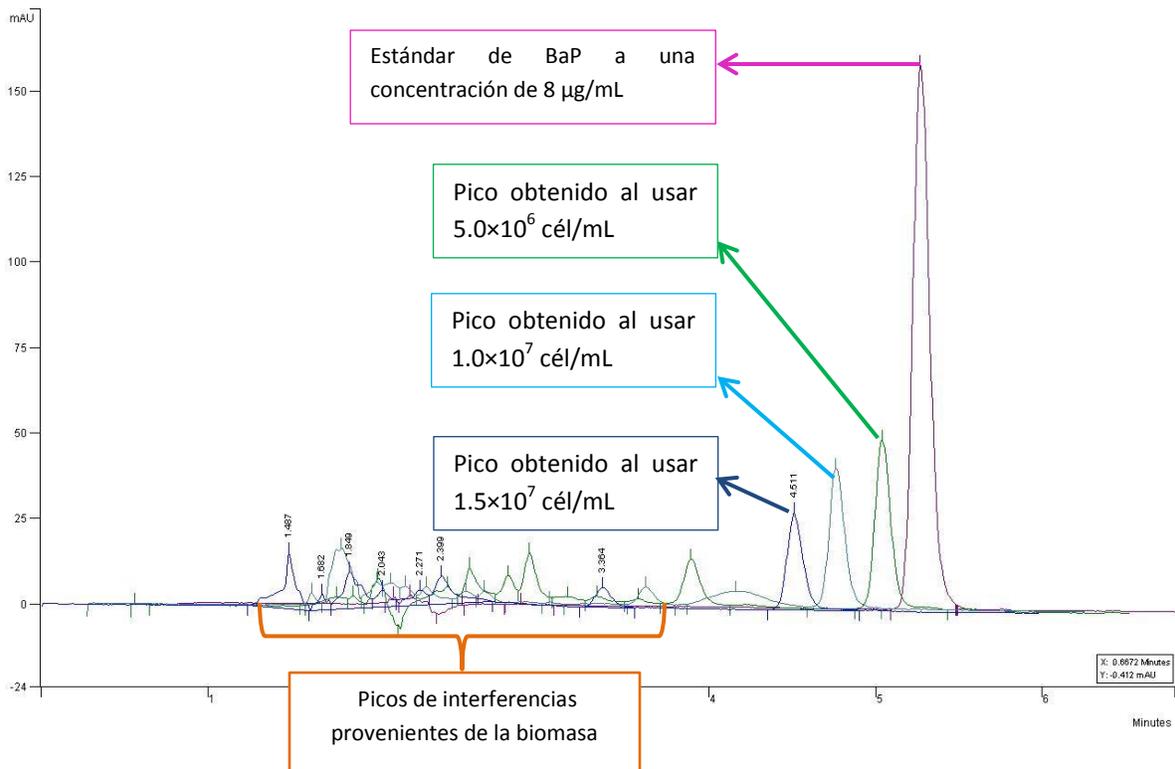


Figura 45. Cromatograma de las muestras de DMFS, ensayo de BaP a 1.5 horas: estándar pico morado, 5×10^6 células/mL (pico verde), 1×10^7 células/mL (pico azul cielo), 1.5×10^7 células/mL (pico azul marino)



Capítulo 5. CONCLUSIONES

De manera general se logró la revalidación de la metodología analítica para la extracción de BaP, BaA, BkF y BbF de los componentes del cultivo de *Selenastrum capricornutum*. Dentro del proceso de revalidación se calcularon los límites de cuantificación y detección para el sistema cromatográfico CLAR-UV-DAD, siempre cuidando que los datos obtenidos entraran dentro de los intervalos de trabajo y los límites calculados.

Con los datos obtenidos y el posterior análisis estadístico de los mismos fue posible evaluar la relevancia de la concentración de la microalga en el proceso de remoción de los compuestos poliaromáticos estudiados.

Los cuatro compuestos estudiados, presentaron porcentajes de degradación mayores al 40 %, sin embargo, el que presentó el mayor porcentaje de degradación fue el BkF con un 81.2 % y de remoción de 88.11 % a las 6 h de exposición. Los coeficientes de variación y las desviaciones estándar de los parámetros calculados se mantuvieron por debajo de los valores establecidos por las guías de validación consultadas, de esta manera se puede confiar de manera plena en la interpretación y análisis de los resultados.

En todos los casos se puede afirmar que los porcentajes de recuperación más altos se logran a tiempos de exposición largos y concentraciones altas de microorganismos.

También se realizaron las pruebas de ANOVA sobre las regresiones lineales de las gráficas de microgramos recuperados totales en función de la concentración de microorganismos y tiempos de bioexposición, los resultados arrojaron que tanto el número de células y el tiempo de exposición son estadísticamente relevantes.

REFERENCIAS

- Alcalá, (2012). Universidad de Alcalá. Retrieved from http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/
- Baek, S. O., Field, R. A., Goldstone, M. E., Kirk, P. W., Lester, J. N., & Perry, R. (1991). A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior. *Water, Air, and Soil Pollution*, 60 (3-4), 279–300. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/BF00282628>
- Baird, C., & Cann, M. (2014). Otros compuestos orgánicos tóxicos preocupantes para el medio ambiente. *Química Ambiental*, 663–738. Barcelona: Reverté.
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 151–162.
- Beltran, F., & Ovejero, G. (1995). Oxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in water. 1. Ozonation. *Industrial & engineering*, 34, 1596–1606. Retrieved November 14, 2014, from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie00044a012>
- Berkeley, L., & Hazen, T. (2010). *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. (K. N. Timmis, Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved July 9, 2014, from <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-77587-4>
- BIPM. (2009). *Vocabulario Internacional de Metrología*.
- Birgül, A., Tasdemir, Y. & Cindoruk, S. S. (2011). Atmospheric wet and dry deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) determined using a modified sampler. *Atmospheric Research*, 101 (1-2), 341–353. Elsevier B.V. Retrieved November 14, 2014, from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169809511000962>
- Bitton, G. (2001). *Wastewater Microbiology* (Third Edit., Vol. 40). Gainesville, Florida.
- Bouloubassi, I., Roussiez, V., Azzoug, M., & Lorre, A. (2012). Sources, dispersal pathways and mass budget of sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the NW Mediterranean margin, Gulf of Lions. *Marine Chemistry*, 142-144, 18–28. Elsevier B.V.
- Capriotti, A., Cavaliere, C., Laganà, A., Piovesana, S., & Samperi, R. (2013). Recent trends in matrix solid-phase dispersion. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 43, 53–66.
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2521–2532.
- Centro Nacional de Metrología. (2008). *Trazabilidad e Incertidumbre que emplean las técnicas de Cromatografía De Gases (Cg) y Cromatografía De Líquidos*.

- Cerniglia, C. E., & Sutherland, J. B. (2001). Bioremediation of PAH by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. *Fungi in Bioremediation*, 136–146. New York: Published for the British Mycological Society.
- Chan, S., Luan, T., Hung, M., & Fung, N. (2006). Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (7), 1772–1779.
- Chen, B., Xuan, X., Zhu, L., Wang, J., Gao, Y., Yang, K., Shen, X. (2004). Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters, sediments and soils of Hangzhou City, China. *Water research*, 38 (16), 3558–68. Retrieved November 13, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325182>
- Colegio Nacional de QFB de México A. C. (2002). *Métodos Analíticos Guía de Validación*. México D. F.
- Dean, J. (2013). Preparation of Environmental Solid Samples for Organic. *Environmental Trace Analysis: Techniques and Applications*, Editorial Elsevier, 4 Ed., (pag. 254).
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A. M., & Clipson, N. (2008). *Microbial PAH degradation. Advances in applied microbiology* (Vol. 65). Elsevier Masson SAS. Retrieved November 11, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026861>
- Echols, B. S., Smith, a J., Gardinali, P. R., & Rand, G. M. (2014). Acute aquatic toxicity studies of Gulf of Mexico water samples collected following the Deepwater Horizon incident (May 12, 2010 to December 11, 2010). *Chemosphere*, 120C, 131–137. Elsevier Ltd. Retrieved October 30, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25016336>
- Environmental Protection Agency. (2004). Bioremediation. Retrieved from <http://clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/Bioremediation/cat/Overview/>
- Environmental Protection Agency. (2006). *In Situ and Ex Situ Biodegradation Technologies for Remediation of Contaminated Sites*.
- Environmental Protection Agency. (2008). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Washington, DC.
- Environmental Protection Agency. (2014). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the Gulf Coastline. Retrieved from <http://www.epa.gov/bpspill/pahs.html>
- EPA. (1986). EPA Method- 8310 PAH, (September), 1–13.
- Eurachem. (2005). *Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito*.
- Fernández, R., Carolina, A., Sprovieri, M., Piazza, R., Frignani, M., Sanchez-Cabeza, J.-A., Feo, M. L.,I. (2012). 210Pb-derived history of PAH and PCB accumulation in sediments of a tropical inner lagoon (Las Matas, Gulf of Mexico) near a major oil refinery. *Geochimica et*

- Cosmochimica Acta*, 82, 136–153. Retrieved November 13, 2014, from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016703711001360>
- Fuentes, R. (2012). *Microbiología General. Algas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García, R., Peralta M. (2008). Co-metabolismo en la degradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 24 (1), 1-12.
- Gauthier, P. T., Norwood, W. P., Prepas, E. E., & Pyle, G. G. (2014). Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: a review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 154, 253–69. Elsevier B.V. Retrieved November 13, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929353>
- Gomez-Bertel, S. (2008). Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. *Revista internacional de Contaminación Ambiental*, 24 (3), 93–106. Retrieved November 26, 2014, from: <http://www.scielo.org.mx>
- Guo, W., He, M., Yang, Z., Lin, C., Quan, X., & Wang, H. (2007). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. *Chemosphere*, 68 (1), 93–104. Retrieved November 14, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17280707>
- Gupta, R. (2014). Biomarkers of petroleum products toxicity. *Biomarkers in toxicology*, 647–650. San Diego: Academic Press.
- Guschina, I. a, & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, 45 (2), 160–86. Retrieved July 16, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16492482>
- Haritash, K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, 169 (1-3), 1–15. Retrieved July 10, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442441>
- Harris, D. C. (2012). *Análisis químico cuantitativo*. Barcelona: Reverté.
- Hennion, M. C. (2000). Graphitized carbons for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885 (1-2), 73–95.
- Homem, V., Dias, Z., Santos, L., & Alves, A. (2009). Preliminary feasibility study of benzo(a)pyrene oxidative degradation by Fenton treatment. *Journal of environmental and public health*, 2009, 149034.
- Hong, Y.-W., Yuan, D.-X., & Lin, Q.-M. (2008). Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the 2008.pdf. *Marine Pollution Bulletin journal*, 56, 1400–1405.

- Inamuddin, & Mohammad, A. (2014). *Green Chromatographic Techniques Separation and Purification of Organic and Inorganic Analytes*. Editorial Elsevier, 6 ed.
- Juhasz, A. L., & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45 (1-2), 57–88. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830500000524>
- Lananan, F., Abdul Hamid, S. H., Din, W. N. S., Ali, N., Khatoon, H., Jusoh, A., & Endut, A. (2014). Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella sp.*). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 127–134. Elsevier Ltd. Retrieved October 15, 2014, from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830514001930>
- Laskin, A., Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A., & Clipson, N. (2008). *Advances in Applied Microbiology*. Londres: Elsevier Inc.
- Lea-Langton, a. R., Ross, a. B., Bartle, K. D., Andrews, G. E., Jones, J. M., Li, H., Pourkashanian, M., et al. (2013). Low temperature PAH formation in diesel combustion. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 103, 119–125. Retrieved November 13, 2014, from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165237012001908>
- Lei, A., Wong, Y., & Tam, N. (2002). Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Science & Technology*, (2), 195–201. Retrieved December 2, 2014, from <http://www.iwaponline.com/wst/04611/wst046110195.htm>
- Lei, A.-P., Hu, Z.-L., Wong, Y.-S., & Tam, N. F.-Y. (2007). Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource technology*, 98 (2), 273–80. Retrieved October 30, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517155>
- Luo, L., Wang, P., Lin, L., Luan, T., Ke, L., & Tam, N. F. Y. (2014). Removal and transformation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in water by live and dead microalgae. *Process Biochemistry*, 49 (10), 1723–1732. Elsevier Ltd. Retrieved November 14, 2014, from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511314003900>
- Mallick, N., & Raj, L. C. (1993). Influence of culture density, pH, organic acids and divalent cations on the removal of nutrients and metals by immobilized *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 9 (2), 196–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24419946>
- Manoli, E., & Samara, C. (2008). The removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the wastewater treatment process: experimental calculations and model predictions. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 151 (3), 477–85. Retrieved November 14, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548140>
- McLarnon-Riches, C., & Rolph, C. (1998). Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. *Phytochemistry*. Retrieved December 2, 2014, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942298000958>

- Montaño, A. (2013). *Remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio acuoso por Scenedesmus acutus*.
- Nickerson, B. (2011). *Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms. Technology*. New York.
- Nickerson, B., & Colón, I. (2011). Liquid-Liquid and Solid-Phase Extraction Techniques. *Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms: Challenges and Stratiefies for Sample Preparation and Extraction* (pp. 63–92).
- Observatorio de Salud y Medio Ambiente de Andalucía. (1997). Co-metabolismo. *Programa Internacional de Seguridad de Sustancias Químicas. Seguridad química; principios básicos de toxicología aplicada. La naturaleza de los peligros químicos*. Retrieved from <http://www.osman.es/ficha/11955>
- Olmos-Espejel, J. J., García de Llasera, M. P., & Velasco-Cruz, M. (2012). Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1262, 138–47. Elsevier B.V.
- Pernot, A., Ouvrard, S., Leglize, P., Watteau, F., Derrien, D., Lorgeoux, C., Mansuy-Huault, L., et al. (2014). Impact of fresh organic matter incorporation on PAH fate in a contaminated industrial soil. *The Science of the total environment*, 497-498, 345–52. Elsevier B.V. Retrieved October 18, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25137382>
- Qin, N., He, W., Kong, X.-Z., Liu, W.-X., He, Q.-S., Yang, B., Wang, Q.-M., et al. (2014). Distribution, partitioning and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the water-SPM-sediment system of Lake Chaohu, China. *The Science of the total environment*, 496, 414–23. Elsevier B.V. Retrieved November 13, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103197>
- Rubio, A., Torres, R., & Peñuela, G. (2014). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: a review. *The Science of the total environment*, 478, 201–25. Elsevier B.V.
- Schoeny, R., Cody, T., & Warshawsky, D. (1988). Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species. *Mutation Research*, 197, 289–302.
- Simpson, N. J. K., & Wells, M. J. M. (2000). *Solid-Phase Extaction: Principles, Techniques and Applications*, New York: Marcel Dekker AG.
- Snyder, L., & Kirkland, J. (1979). *Introduction to Modern Liquid Chromatography Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Editorial: Wiley Interscience, 2 Ed.
- Snyder, L., Kirkland, J., & Dolan, J. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography* (Third Edit.). Wiley.

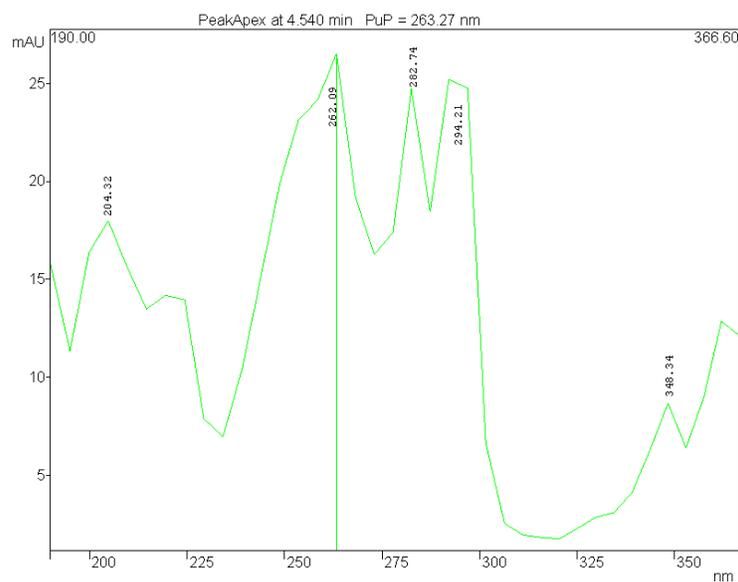
- Tang, J., Hoaglang, K., & Siegfried, B. (1998). Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (6), 1085–1090. Retrieved November 30, 2014, from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620170614/full>
- Techer, D., Martinez-Chois, C., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bennasroune, A., D’Innocenzo, M., & Falla, J. (2012). Assessment of *Miscanthus×giganteus* for rhizoremediation of long term PAH contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 62, 42–49. Retrieved November 13, 2014, from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092913931200162X>
- Velasco Cruz, M. (2011). *Metodología analítica cromatográfica para la determinación de metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microalgas*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM.
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, K., & Schneider, J. (1995). Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-Biological Interactions*, 97 (2), 131–148. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000927979503610X>
- Warshawsky, D., Ladow, K., & Schneider, J. (2007). Enhanced degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium sp.* in conjunction with green alga. *Chemosphere*, 69(3), 500–6. Retrieved November 14, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555789>
- Yan, Z., Jiang, H., Li, X., & Shi, Y. (2014). Accelerated removal of pyrene and benzo[a]pyrene in freshwater sediments with amendment of cyanobacteria-derived organic matter. *Journal of hazardous materials*, 272, 66–74. Elsevier B.V. Retrieved November 27, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681443>
- Zang, S., Li, P., Li, W., Zhang, D., & Hamilton, A. (2007). Degradation mechanisms of benzo[a]pyrene and its accumulated metabolites by biodegradation combined with chemical oxidation. *Chemosphere*, 67(7), 1368–74. Retrieved November 13, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126885>

ANEXOS

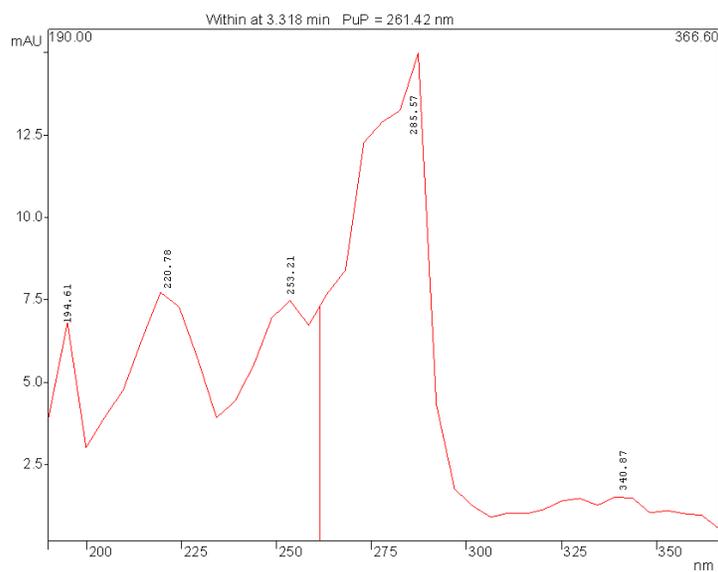
Anexo 1

Espectros de absorción de los poliaromáticos trabajados, obtenidos con el programa PolyView 2000.

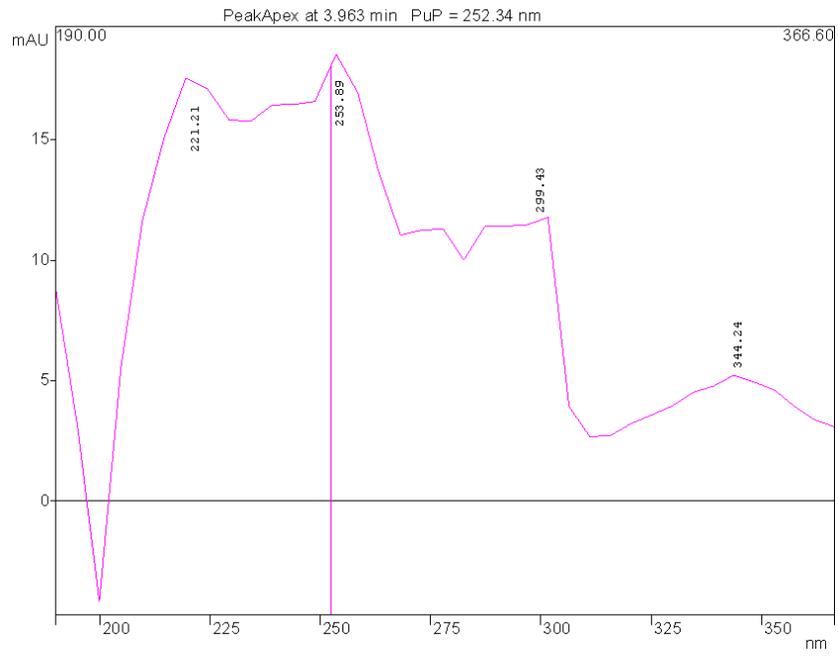
Espectro de absorción BaP



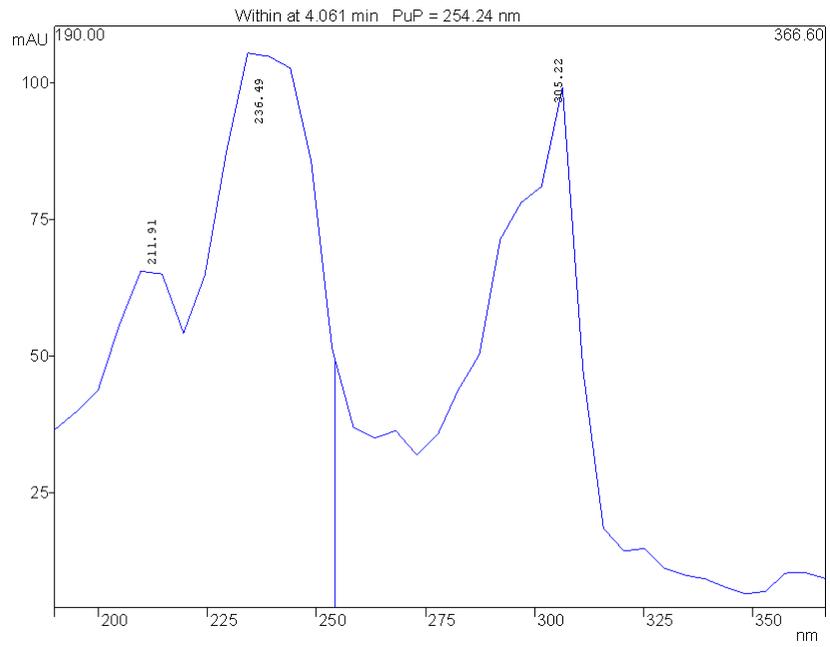
Espectro de absorción BaA



Espectro de absorción BbF



Espectro de absorción BkF



Anexo 2

Ecuaciones empleadas para obtener los parámetros del ajuste por mínimos cuadrados, donde n para todos los caso es igual al número de mediciones.

Pendiente:

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Ordenada al origen:

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

Coefficiente de correlación:

$$r^2 = \frac{(n \sum xy - \sum x \sum y)^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2 \times n \sum y^2 - (\sum y)^2}$$

Desviación estándar del ajuste por mínimos cuadrados:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

Desviación estándar de la pendiente:

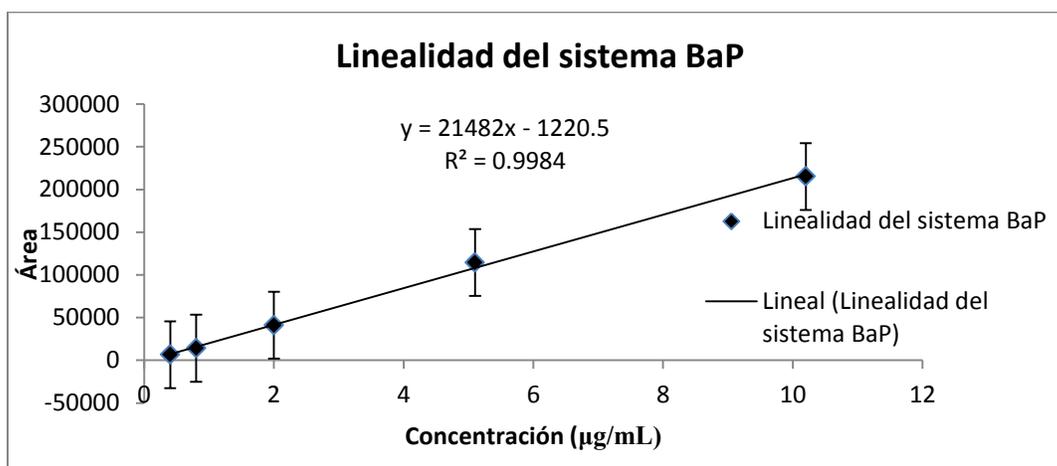
$$S_{b_1} = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Intervalo de confianza para la pendiente:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} \times S_{b_1}$$

A continuación se muestra un ejemplo de los cálculos y la aplicación de ecuaciones de uno de los hidrocarburos.

Resumen			
Concentración (x)	Área promedio (y)	σ (área)	CV
0.4	6523	212	3.3
0.8	14133	353	2.5
2	41038	637	1.6
5.1	114481	723	0.6
10.2	215139	975	0.5
		CV reproducibilidad	1.7



Análisis estadístico: se realizó empleando el programa StatgraphicsCenturion.

Regresión Simple - área promedio vs. Concentración

Variable dependiente: área promedio ((y))

Variable independiente: Concentración ((x) ug/mL)

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
Parámetro	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-1220.48	1265.86	-0.96415	0.3526
Pendiente	21482.0	243.751	88.1309	0.0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	9.19258E10	1	9.19258E10	7767.05	0.0000
Residuo	1.5386E8	13	1.18354E7		
Total (Corr.)	9.20797E10	14			

Coefficiente de Correlación = **0.999164**

R-cuadrada = 99.8329 por ciento

R-cuadrado (ajustado para G.I.) = 99.8201 por ciento

Error estándar del est. = 3 440.26

Error absoluto medio = 2 457.51

Estadístico Durbin-Watson = 0.806064 (P=0.0014)

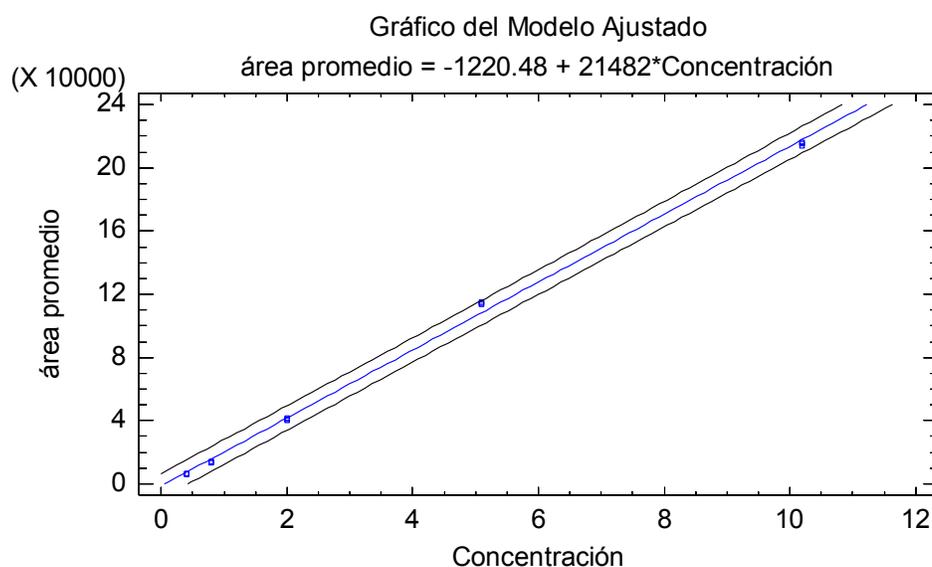
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.572696

La ecuación del modelo ajustado es:

Área promedio = -1220.48 + 21482*Concentración ($\mu\text{g/mL}$)

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre área promedio y concentración con un nivel de confianza del 95.0 %. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.8329% de la variabilidad en área promedio. El coeficiente de correlación es igual a 0.999164, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 3 440.26.

El error absoluto medio (MAE) de 2 457.51 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0.05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95.0 %. Se graficó los residuos versus el número de fila para ver si había algún patrón. Al observar la gráfica no se aprecia ningún patrón, por lo tanto se puede decir que existe una relación lineal entre ambos parámetros. En la gráfica de modelo ajustado se pueden observar los intervalos de confianza trazados con las líneas negras, a un nivel de confianza del 95 %.



Nota: la concentración se encuentra en unidades de µg/mL

Anexo 3

Análisis estadístico de las curvas de calibración para la validación de los métodos de preparación de muestras. Se emplearon las mismas ecuaciones mostradas en el anexo 2 para calcular los parámetros de la línea recta, adicionalmente se emplearon las siguientes ecuaciones para el cálculo del intervalo de confianza del valor medio del %R:

Media aritmética del %R (y):

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Intervalo de confianza para la media del %R:

$$IC(\bar{y}) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \times \frac{S_y}{\sqrt{n}}$$

Además se calculó la desviación estándar de la ordenada al origen, su intervalo de confianza y el coeficiente de variación de la regresión.

Desviación estándar de la ordenada al origen:

$$S_{b_0} = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Donde x representa la cantidad adicionada, por lo tanto:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Intervalo de confianza de b_0 es:

$$IC(b_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} \times S_{b_0}$$

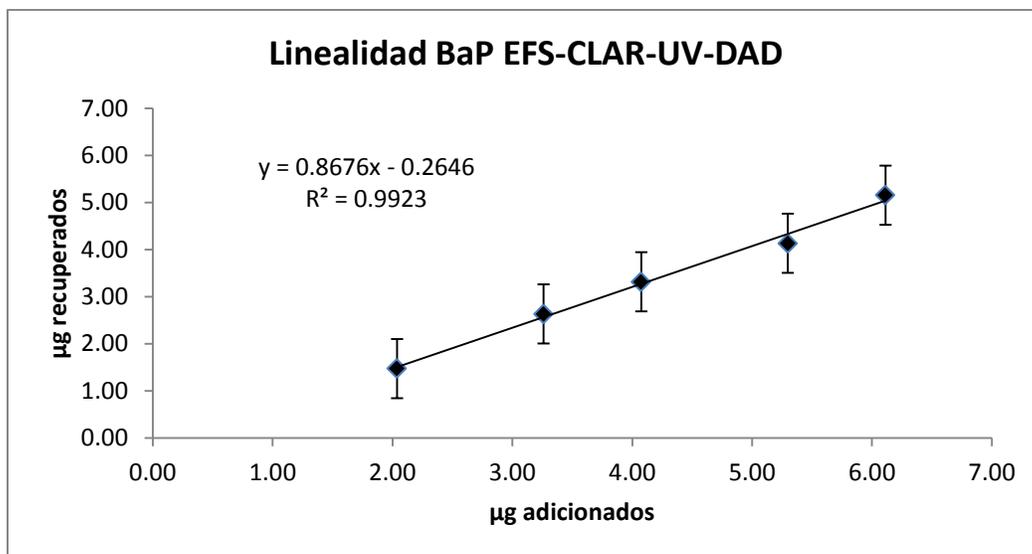
Coficiente de variación de la regresión:

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$$

Cálculo del intervalo lineal para la metodología EFS-CLAR-UV-DAD

Resumen					
V de HAP(μL)	C medio ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	μg adicionados	A Estándar	μg recuperados	%R
50	0.1359	2.04	5238	1.47	72.33
80	0.2174	3.26	7610	2.63	80.74
100	0.2717	4.08	17323	3.31	81.33
130	0.3532	5.30	19333	4.13	78.00
150	0.4076	6.11	22352	5.16	84.35

Parámetros calculados con las fórmulas	
S_{b_1}	0.03
$S_{y/x}$	0.19
$IC(b_1)$	0.8676 ± 0.07
S_{b_0}	0.15
$IC(b_0)$	-0.2646 ± 0.32
$CV_{y/x}$	5.70
Para %R de todo el intervalo	
%R promedio	79.35
S %R	4.94
CV %R	6.23
$IC(\%R)$	79.35 ± 2.74



Análisis estadístico

Regresión Simple - µg recuperados vs. µg adicionados

Variable dependiente: µg recuperados

Variable independiente: µg adicionados

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coefficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0.268744	0.149927	-1.7925	0.0963
Pendiente	0.868385	0.0340641	25.4927	0.0000

Análisis de Varianza

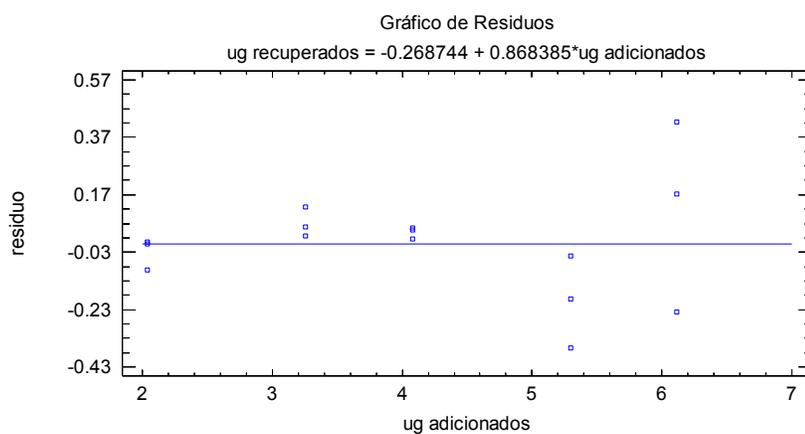
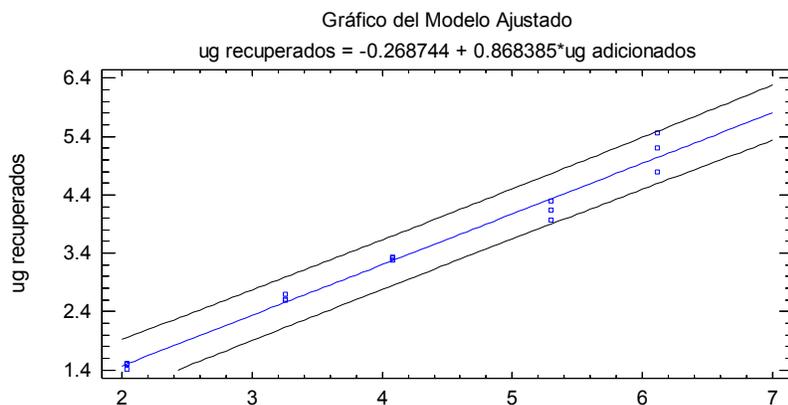
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	23.5568	1	23.5568	649.88	0.0000
Residuo	0.471227	13	0.0362482		
Total (Corr.)	24.028	14			

Coeficiente de Correlación = 0.990146
R-cuadrada = 98.0388 por ciento
R-cuadrado (ajustado para G.I.) = 97.888 por ciento
Error estándar del est. = 0.19039
Error absoluto medio = 0.124493
Estadístico Durbin-Watson = 1.65074 (P=0.1554)
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.114931

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\mu\text{g recuperados} = -0.268744 + 0.868385 \cdot \mu\text{g adicionados}$$

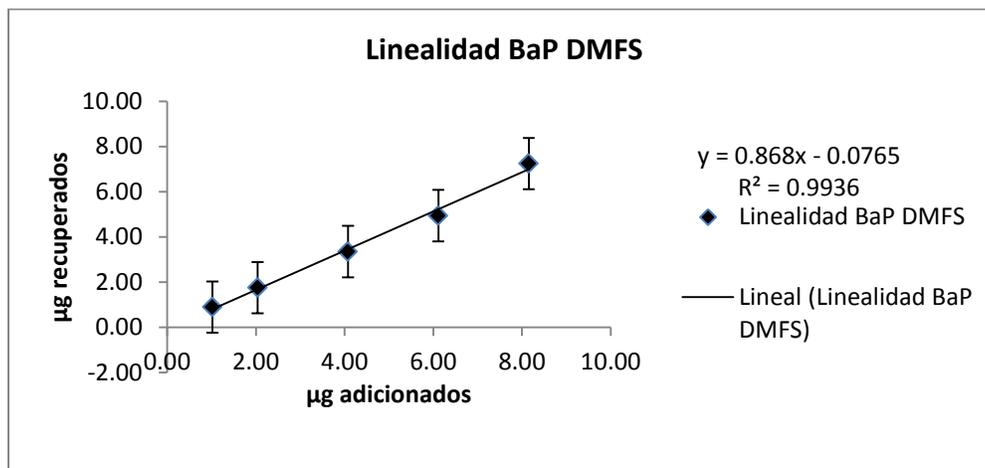
Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre μg recuperados y μg adicionados con un nivel de confianza del 95.0 %. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 98.0388 % de la variabilidad en μg recuperados. El coeficiente de correlación es igual a 0.990146, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.19039. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones, seleccionando la opción de Pronósticos del menú de texto. El error absoluto medio (MAE) de 0.124493 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es mayor que 0.05, no hay indicación de una autocorrelación serial en los residuos con un nivel de confianza del 95.0%.



Cálculo del intervalo lineal para la metodología DMFS-CLAR-UV-DAD

Resumen					
V de HAP(μL)	μg adicionados	C biomasa($\mu\text{g}/\text{mg}$)	A Estándar	μg recuperados	%R
25	1.02	0.20	60357	0.90	87.92
50	2.04	0.41	111126	1.76	86.31
100	4.08	0.82	217269	3.35	82.23
150	6.11	1.22	363388	4.94	80.84
200	8.15	1.63	387264	7.24	88.84

Para %R de todo el intervalo	
%R promedio	85.18
S %R	3.30
CV %R	3.87
IC(%R p)	85.18 ± 1.83
Parámetros calculados con las fórmulas	
S _{b1}	0.02
S _{y/x}	0.20
IC(b1)	0.868 ± 0.04
S _{b0}	0.10
IC(b0)	0.0765 ± 0.21
CV y/x	5.43



Regresión Simple - µg recuperados vs. µg adicionados

Variable dependiente: µg recuperados

Variable independiente: µg adicionados

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Coeficientes

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
Parámetro	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-0.0797605	0.0979404	-0.814378	0.4301
Pendiente	0.868636	0.019541	44.452	0.0000

Análisis de Varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	76.9867	1	76.9867	1975.98	0.0000
Residuo	0.506498	13	0.0389614		
Total (Corr.)	77.4932	14			

Coeficiente de Correlación = 0.996727

R-cuadrada = 99.3464 por ciento

R-cuadrado (ajustado para G.I.) = 99.2961 por ciento

Error estándar del est. = 0.197386

Error absoluto medio = 0.159417

Estadístico Durbin-Watson = 0.652695 (P=0.0003)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.619334

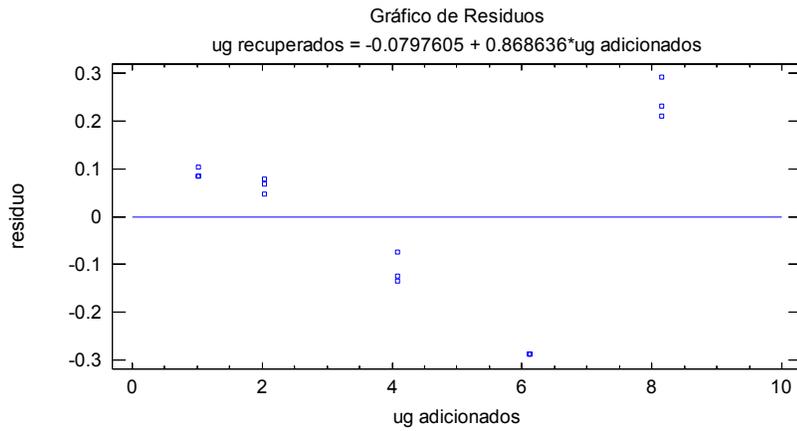
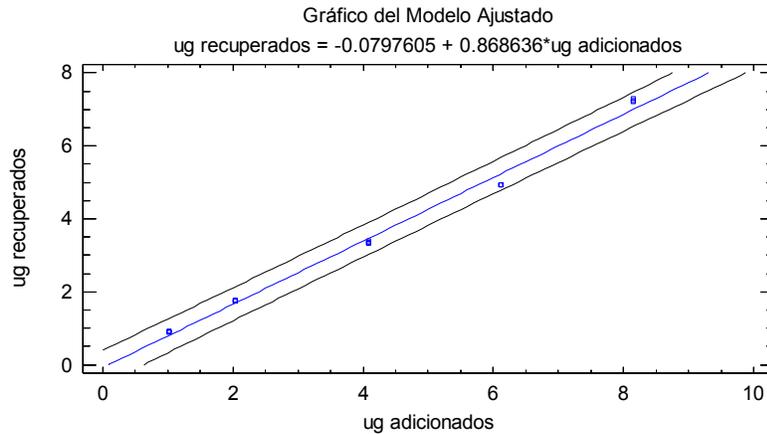
La ecuación del modelo ajustado es:

$$\mu\text{g recuperados} = -0.0797605 + 0.868636 \cdot \mu\text{g adicionales}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre μg recuperados y μg adicionados con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.3464 % de la variabilidad en μg recuperados. El coeficiente de correlación es igual a

0.996727, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0.197386.

El error absoluto medio (MAE) de 0.159417 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que se presentan en el archivo de datos. Puesto que el valor-P es menor que 0.05, hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95.0 %. Grafique los residuos versus el número de fila para ver si hay algún patrón que pueda detectarse.



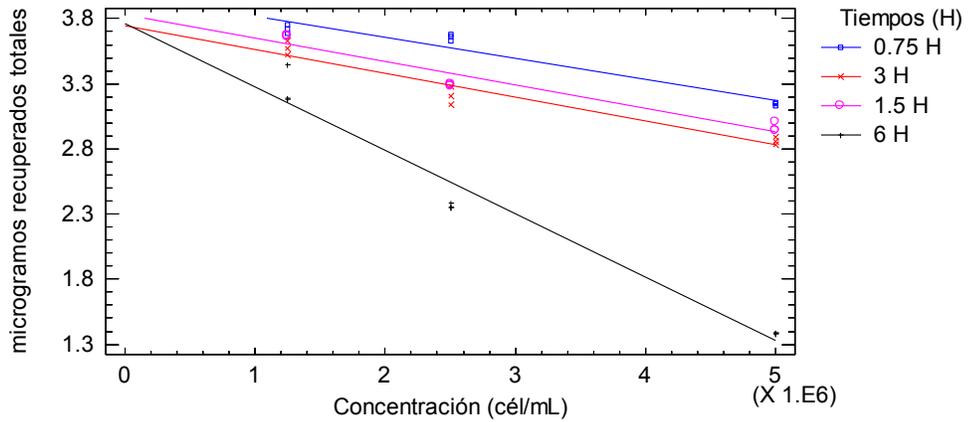
Anexo 4

Ejemplo del análisis estadístico para los datos de BaP:

Pendientes y ordenadas al origen o interceptos obtenidas mediante la regresión lineal de los microgramos recuperados en función de la concentración:

Tiempo (H)	Intercepto	Pendiente
0.75	3.975	-1.6019E-7
3	3.74833	-1.83048E-7
1.5	3.82667	-1.78667E-7
6	3.76	-4.86857E-7

Gráfica del Modelo Ajustado



Pendientes y ordenadas al origen o interceptos obtenidas mediante la regresión lineal de los microgramos recuperados en función del tiempo:

Concentración (cél/mL)	Intercepto	Pendiente
5.00E+06	3.53232	-0.335343
2.50E+06	3.77884	-0.230995
1.25E+06	3.79696	-0.0851401

Gráfica del Modelo Ajustado

