



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**ESTUDIO DE LA BIODEGRADACIÓN POR  
*CHLORELLA VULGARIS* DE AMINAS ALIFÁTICAS USADAS  
COMO AGENTES DE FLOTACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUIMICA**

**PRESENTA**

**Leiny Karla López Hernández**



**MÉXICO, D.F. 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Irma Cruz Gavilán García**

**VOCAL:**               **Profesor: José de Jesús García Valdés**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Norma Ruth López Santiago**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: Nuria EsturauEscofet**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Luis Gerardo Martínez Jardines**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE BIOGEOQUÍMICA AMBIENTAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

**NORMA RUTH LÓPEZ SANTIAGO**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**LUIS GERARDO MARTÍNEZ JARDINES**

**SUSTENTANTE:**

**LEINY KARLA LÓPEZ HERNÁNDEZ**

# Tabla de contenido

Listado de Tablas .....	vi
Listado de Figuras .....	vii
RESUMEN .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
OBJETIVO GENERAL .....	13
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES .....	14
1. EL PROCESO DE FLOTACIÓN .....	14
1.1 Espumantes.....	15
1.2 Reguladores o modificadores .....	15
1.3 Colectores .....	16
1.3.1 Colectores aniónicos .....	17
1.3.2 Colectores catiónicos .....	17
2. CARACTERÍSTICAS DE LAS AMINAS .....	19
2.1 Propiedades físicas de las aminas .....	19
2.2 Propiedades químicas de las aminas .....	19
2.3 Basicidad de las aminas .....	20
2.4 Reacciones generales de las aminas primarias .....	21
2.5 Reacción de aminas con aldehídos y cetonas.....	21
2.5.1 Alquilación de aminas con haluros de alquilo .....	21
2.5.2 Acilación de aminas con cloruros de ácido.....	22
2.5.3 Diazotación de aminas .....	22
2.5.4 Oxidación de aminas .....	23
2.6 Toxicología de las aminas alifáticas primarias.....	24
2.7 Aplicación de las aminas en la industria .....	27
3. BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS .....	27

3.1	Microalgas .....	29
3.1.1	Bioremediación y biodegradación por microalgas .....	29
3.1.2	<i>Chlorella vulgaris</i> .....	30
3.2	Curvas de crecimiento .....	32
3.2.1	Fase lag .....	33
3.2.2	Fase log o exponencial .....	34
3.2.3	Fase estacionaria .....	34
3.2.4	Fase de muerte o declinación .....	34
4.	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS .....	35
	CAPÍTULO 2. EXPERIMENTACIÓN .....	37
5.	REACTIVOS, DISOLVENTES, MATERIALES Y EQUIPOS .....	37
5.1	Reactivos y disolventes .....	37
5.2	Materiales, accesorios y consumibles de equipos .....	37
5.3	Equipos .....	38
6.	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES Y REACTIVOS .....	39
7.	EXPERIMENTACIÓN .....	41
7.1	Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	42
7.1.1	..... Curva de crecimiento del testigo	42
7.1.2	..... Curva de crecimiento para los bioensayos	43
7.2	Bioensayos simples de degradación de aminas .....	43
7.3	Bioensayos mixtos de degradación de aminas .....	44
7.4	Bioensayos para caracterización .....	44
7.5	Análisis por cromatografía de líquidos de alto rendimiento .....	45
7.5.1	Formación de derivados .....	45
7.5.2	Cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución .....	46

7.6	Caracterización de los productos de biodegradación .....	46
7.6.1	Confirmación de identidad de los productos.....	46
7.6.1.1	Oxidación de las aminas primarias con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	46
7.6.1.2	Extracción del nitro derivado .....	47
7.6.2	Caracterización por espectroscopia de infrarroja con transformada de Fourier	48
7.6.3	Caracterización mediante espectrometría de masas por inducción directa (MS-ESI) .....	48
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		49
8.	ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE <i>Chlorella vulgaris</i> .....	50
8.1	Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	50
8.1.1	Parámetros de crecimiento para el cultivo testigo .....	52
8.2	Crecimiento en ensayos simples con aminas.....	53
8.2.1	Efecto de la adición de ácido acético a <i>Chlorella vulgaris</i> .....	53
8.2.2	Bioensayos con acetato de dodecilamina(A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> ) .....	55
8.2.3	Bioensayos con acetato de octilamina (A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> ) .....	57
8.2.4	Bioensayos con acetato de tetradecilamina (A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub> ).....	59
8.3	Crecimiento en ensayos mixtos con aminas.....	61
8.3.1	Bioensayos con acetato de octil y dodecilamina (A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> y A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> )	61
8.3.2	Bioensayos con acetato de dodecil y tetradecilamina(A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> y A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> )	62
8.4	Resumen de ensayos simples y mixtos.....	63
9.	BIODEGRADACIÓN DE AMINAS POR <i>Chlorella Vulgaris</i> .....	67
9.1	Ensayos simples de biodegradación por <i>Chlorella vulgaris</i> .....	67
9.1.1	Bioensayos con acetato de dodecilamina (A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> ) .....	67
9.1.2	Bioensayos con acetato de octilamina (A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> ) .....	70

9.1.3 Bioensayos con acetato de tetradecilamina (A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub> ).....	72
9.2 Ensayos mixtos de biodegradación por <i>Chlorella vulgaris</i> .....	74
9.2.1 Bioensayos con acetato de octilamina y dodecilamina(A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> y A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> )74	
9.2.2 Bioensayos con acetato de dodecilamina y tetradecilamina (A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> y A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub> ) .....	76
9.3 Adsorción de aminas en pared celular de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	77
9.4 Resumen de biodegradación por <i>Chlorella vulgaris</i> .....	78
10. CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO DE DEGRADACIÓN .....	79
10.1 Análisis por espectroscopia UV-Visible .....	79
10.2 Análisis por espectroscopia infrarroja .....	81
10.2.1 Análisis de los productos de oxidación de las aminas .....	81
10.2.2 Análisis de los bioensayos simples con aminas primarias.....	83
10.3 Análisis por espectrometría de masas (MS-ESI).....	85
10.3.1 Espectrometría de masas de las aminas.....	85
10.3.2 Espectrometría de masas de los productos de degradación .....	87
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....	92
BIBLIOGRAFÍA .....	94
ANEXO I CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	102
ANEXO II. TASA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE GENERACIÓN .....	110
ANEXO III. MEMORIA FOTOGRÁFICA DE LOS BIOENSAYOS .....	113

## Listado de Tablas

Tabla 1. Propiedades físicas de algunas aminas .....	19
Tabla 2. Toxicidad de algunas aminas(Sosa, 2014).....	26
Tabla 3. Agentes de derivatización .....	36
Tabla 4. Sales empleadas en la elaboración del medio Bristol .....	40
Tabla 5. Relación de concentración y tiempo de exposición para los ensayos simples .....	43
Tabla 6. Relación de concentración y tiempo de exposición para los ensayos mixtos .....	44
Tabla 7. Cantidad de amina empleada en la oxidación .....	47
Tabla 8. Etapas de crecimiento para los cultivos expuestos a A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> .....	56
Tabla 9. Parámetros de crecimiento del testigo y los cultivos expuestos a A- C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> .....	56
Tabla 10. Parámetros de crecimiento del testigo y los cultivos expuestos a A- C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub> .....	60
Tabla 11. Parámetros de crecimiento del testigo y los cultivos expuestos aA-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> y A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> .....	63
Tabla 12. Tasa de crecimiento y tiempo de generación del testigo y los bioensayos .....	64
Tabla 13. Resumen de las señales en los espectros de masas de las aminas.....	87
Tabla 14. Aductos formados en grupos nitro mediante ESI .....	90
Tabla 15. Parámetros de desempeño de la técnica .....	109
Tabla 16. Absorbancia promedio del cultivo control en función del tiempo .....	111
Tabla 17. Relación de biomasa y tiempo de exposición para los ensayos simples .....	112



## Listado de Figuras

Figura 1. Columna de flotación.....	14
Figura 2. Clasificación de los modificadores(Bulantovic, 2007).....	16
Figura 3. Reacción general de una amina primaria con agua .....	20
Figura 4. Reacción general de cetonas y aldehídos con aminas .....	21
Figura 6. Reacción de acilación de aminas con cloruros de ácido .....	22
Figura 5. Reacción general de alquilación de aminas con haluros de alquilo .....	22
Figura 7. Reacción general de diazotación de aminas.....	22
Figura 8. Oxidación de aminas primarias(Wade, 2004) .....	23
Figura 9. Algunas reacciones de oxidación de aminas primarias(Sosa, 2014) .....	24
Figura 10. Esquema de reacción de la degradación anaerobia .....	28
Figura 11. Esquema de reacción de la degradación anaeróbica.....	29
Figura 12. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	31
Figura 13. Curva de crecimiento microbiano.....	33
Figura 14. Reacción de derivatización de una amina alifática con Cl-NBD .....	45
Figura 15. Reacción de oxidación con agua oxigenada de aminas primarias .....	46
Figura 16. Diagrama de purificación del nitroderivado .....	48
Figura 17. Curvas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en a) ausencia y b) presencia de proteosa peptona .....	50
Figura 18. Biomasa de un cultivo sin exponer en función del tiempo.....	52
Figura 23. Cambio en la biomasa en los ensayos con ácido acético en función del tiempo .....	54
Figura 19. Cambio de biomasa para los testigos y los cultivos expuestos a A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> 2.1 mg/L y 5 mg/L en función del tiempo .....	55
Figura 20. Ensayo visual de exposición a octilamina .....	58
Figura 21. Biomasa promedio del cultivo en función del tiempo tras la adición de acetato de octilamina 2.1 mg/L.....	58
Figura 22. Patrón del cambio de biomasa para el blanco microalgas y los cultivos expuestos a A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub> 2.1 mg/L.....	60

Figura 24. Cambio en la biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> para el blanco de microalgas y el promedio de los bioensayos con acetato de octil y dodecilamina	62
Figura 25. Patrón de cambio en la biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> para el blanco microalgas y el promedio del ensayo con acetato de dodecil y tetradecilamina....	63
Figura 26. Tasa de crecimiento del testigo (sección 8.1.1) y los bioensayos .....	66
Figura 27. Cromatogramas. Bioensayo, testigo de ácido acético, blanco de microalgas, blanco de A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> y testigo de A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> .....	68
Figura 28. Cambio en la concentración de A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> 2.1 mg/L y 5 mg/L .....	69
Figura 29. Cromatogramas de a) bioensayo a 4 horas; blanco adicionado 1; blanco adicionado 2 y b) Zoom del bioensayo a 4 horas .....	71
Figura 30. Cambio en la concentración de A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> 2.1 mg/L en función del tiempo .....	71
Figura 31. Cromatograma del derivado de acetato de tetradecilamina .....	72
Figura 32. Cambio en la concentración de A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub> 2.1 mg/L en función del tiempo .....	73
Figura 33. Cambio en la concentración de A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> y A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> en función del tiempo .....	75
Figura 34. Cambio en la concentración de A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> y A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub> en función del tiempo .....	76
Figura 35. Superposición de los espectros de la biomasa del blanco microalgas y del bioensayo con A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> .....	77
Figura 36. Análisis completo de degradación y cambio en la biomasa para el ensayo con A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> 5 mg/L.....	79
Figura 37. Barrido de onda del estándar de acetato de dodecilamina y el bioensayo; a) antes y b) después de la derivatización .....	80
Figura 38. Espectros infrarrojo de los productos de oxidación de a) octilamina, b) dodecilamina y c) tetradecilamina .....	82
Figura 39. Espectros infrarrojo de los bioensayos simples de a) octilamina b) dodecilamina c) tetradecilamina .....	84
Figura 40. Espectros de masas por ESI de a) octilamina b) dodecilamina y c) tetradecilamina .....	86

Figura 41. Espectros de masa por ESI del bioensayo con acetato de dodecilamina a 24 horas de exposición .....	87
Figura 42. Espectros de masa de los bioensayos con A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> por ESI. a) Espectro en positivo y b) Espectro en negativo.....	88
Figura 43. Espectros de masa de los bioensayos con A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> por ESI. a) Espectro en positivo y b) Espectro en negativo.....	88
Figura 44. Espectros de masa de los bioensayos con A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub> por ESI. a) Espectro en positivo y b) Espectro en negativo.....	89
Figura 45. Espectro de masa de MetOH por ESI .....	89
Figura 46. Degradación de dimetilamina bajo condiciones ambientales .....	91
Figura 47. Cromatograma .....	103
Figura 48. Diagrama de un cromatógrafo de líquidos .....	106
Figura 49. Memoria fotográfica del bioensayo con acetato de dodecilamina 2.1 mg/L .....	113
Figura 50. Memoria fotográfica del bioensayo con acetato de dodecilamina 5.0 mg/L .....	114
Figura 51. Memoria fotográfica del bioensayo con acetato de octilamina 2.1 mg/L .....	115
Figura 52. Memoria fotográfica del bioensayo con acetato de tetradecilamina 2.1 mg/L .....	116

# Estudio de la biodegradación por *Chlorellavulgaris* de aminas alifáticas usadas como agentes de flotación

## RESUMEN

En la industria minera del hierro es frecuente el uso de aminas como agentes de flotación, sin embargo, su disposición final representa un problema industrial. El presente trabajo examina la viabilidad de degradación, por *Chlorella vulgaris*, de las sales de tres aminas de alifáticas comúnmente empleadas como agentes de flotación. Dado su fácil cultivo, esta especie se encuentra en una amplia gama de hábitats acuáticos y terrestres, por lo que ofrece una alternativa de remediación viable y de bajo costo.

El estudio de degradación se realizó mediante la siguiente estrategia analítica:

1. Efecto de la adición de aminas en el crecimiento de *Chlorella vulgaris*.
2. Análisis por cromatografía de alto rendimiento de la amina remanente en el bioensayo.
3. Caracterización de los productos de degradación mediante espectroscopia UV-Visible, infrarrojo y espectrometría de masas por inducción directa.

Los resultados muestran la capacidad de *Chlorella vulgaris* para crecer en presencia de contaminantes y degradar cerca del 95% de las aminas añadidas. Así mismo se observa una correlación inversamente proporcional entre la concentración del agente añadido y la velocidad de degradación del mismo. Además de la influencia del número de carbonos en la asimilación de la sal de amina, siendo menor para la amina de ocho carbonos comparado con la amina de doce.

Finalmente, la caracterización muestra como posibles productos compuestos con grupo nitro que posteriormente pueden ser aprovechados para la generación de proteínas.

# INTRODUCCIÓN

La composición de un mineral es un factor importante en la calidad del mismo, en el caso de los minerales de hierro una de las impurezas más importantes es el silicio, cuyo contenido, de acuerdo a los estándares internacionales, no debe exceder el 2% para su comercialización (Houot, 1983). Debido a lo anterior, la industria de hierro utiliza una etapa de eliminación de silicio que acompaña al mineral a través de un sistema de flotación que utiliza mezclas de aminas alifáticas, como agente colector.

Las aminas comercialmente disponibles para emplearse en los procesos de flotación se obtienen principalmente de productos naturales, por lo que comúnmente contienen una mezcla de aminas alifáticas con longitudes de entre 6 y 18 carbonos. Un análisis reciente a un agente de flotación reveló que la mezcla posee en mayor proporción cadenas alifáticas de longitud  $C_{12}$  con 85.57%, seguido por  $C_{10}$  con 8.18% (Sosa, 2014).

Si bien durante el proceso de flotación las aminas se agregan en una pequeña porción (250 g de agente de flotación/1 Ton de mineral), su liberación y acumulación es capaz de causar un efecto negativo en agua y suelos. El uso de *Chlorella vulgaris* ofrece un alternativa versátil, de bajo costo y amable al medio ambiente para el tratamiento de estos agentes, normalmente tratados con procesos de oxidación química.

La especie *Chlorella vulgaris* es una microalga unicelular de color verde, de forma esférica, con un diámetro entre 2 y 10 micras (Grooth, *et al.* 1985), la cual se destaca por poseer múltiples aplicaciones entre las que se encuentran el uso de la biomasa como combustible (Jeon, 2012), suplemento alimenticio (Morris, 1999) y como materia para bioremediación de suelos con metales pesados (Manab, 2012), sin embargo, dado las características de este organismo se examina la posibilidad de extender su aplicación al proceso de remediación de agua y suelos contaminados por efluentes orgánicos.

Ante esto se evalúa la capacidad de la especie *Chlorellavulgaris* para responder de manera positiva al contacto con la amina alifática de doce carbonos en principio y posteriormente a aminas de longitudes cercanas. La bioexposición de los cultivos líquidos permite examinar su resistencia en función del tipo y concentración de amina cuyo resultado puede ser usado como base para la estrategia de remediación de agua y suelo.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la biodegradación por *Chlorella vulgaris* de aminas alifáticas usadas como agentes de flotación.

## OBJETIVOS PARTICULARES

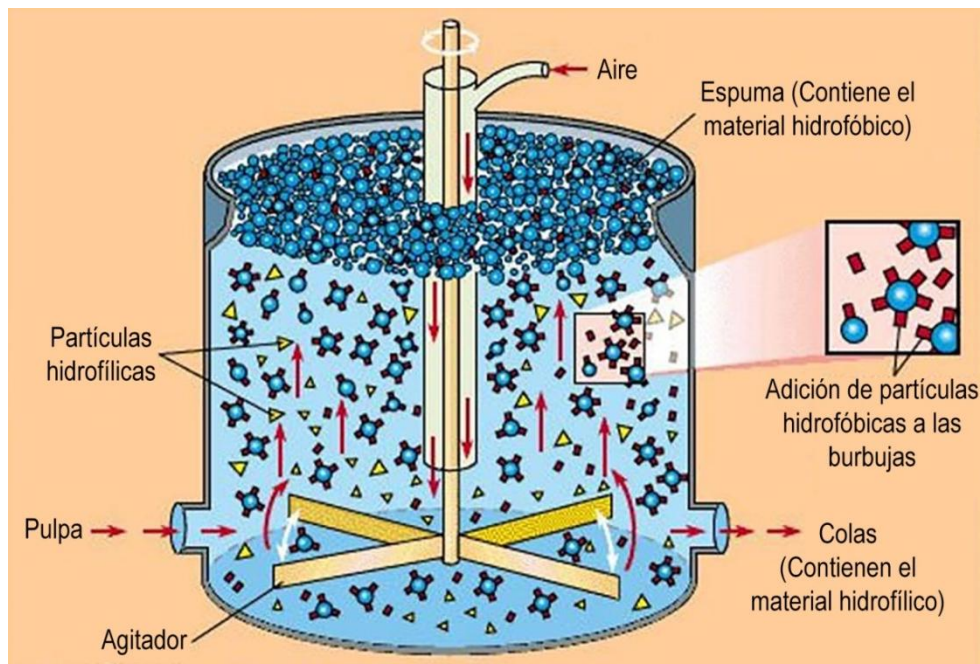
- Evaluar el efecto de la adición de aminas alifáticas, empleadas como agentes de flotación, en el crecimiento de cultivos líquidos de *Chlorella vulgaris*.
- Analizar la biodegradación por *Chlorella vulgaris* de aminas alifáticas, usadas como colectores, en ensayos simples y mixtos.
- Caracterizar el producto de degradación de aminas alifáticas
- Establecer el potencial del uso de *Chlorella vulgaris* como tratamiento y/o alternativa de remediación de sitios mineros que emplean agentes de flotación.

# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## 1. EL PROCESO DE FLOTACIÓN

La flotación es el principal proceso para la concentración de especies minerales útiles en una mena, se trata de un método versátil para la separación física de sólidos, basado en la diferencia de densidades cuando burbujas finas de gas, normalmente aire, son introducidas en una suspensión mineral/agua. Las burbujas se adhieren a las partículas, reduciendo la densidad de las mismas y permitiendo su ascenso hasta la superficie del líquido donde son recolectadas.

El primer paso en el proceso de flotación es la molienda del mineral cuyo resultado es un polvo de partículas finas y ganga. La diferencia entre las superficies del mineral y las partículas de ganga permite que al adicionar una disolución acuosa de sustancias hidrofobantes, las partículas del mineral queden cubiertas por éstas, mientras que la ganga permanece en contacto con el agua (Salager & Forgiarini, 2007). La Figura 1 muestra una columna de flotación.



**Figura 1. Columna de flotación**  
(Fuente: <http://procesaminerales.blogspot.mx/2012/09/flotacion-minerales.html>)



Dicho proceso de separación puede adaptarse a una amplia gama de separaciones minerales empleando agentes químicos denominados agentes de flotación para alterar selectivamente las partículas indeseables de manera que sean apropiadas para la separación.

La adhesión del mineral a las burbujas de aire dependerá de las propiedades hidrofílicas y aerofílicas de cada especie que se quiera separar de las partículas de ganga (Coldeca, 2012), por lo que los agentes son la parte más importante del proceso.

El trabajo de adhesión entre la superficie de la partícula y la burbuja aumenta proporcionalmente al ángulo de contacto en la interfaz superficie-aire lo que implica una mejoría en la flotabilidad del mineral a medida que la superficie se hace más hidrófoba. Sin embargo, la mayoría de las superficies minerales son polares y poseen una alta energía de Gibbs, por lo que es necesario añadir un reactivo para reducirla (Somasundaran, *et al.* 2007) y modificar su condición de hidrofílica a hidrofóbica.

Los agentes de flotación se dividen de acuerdo a su función particular en espumantes, reguladores y colectores (Bulantovic, 2007), siendo el último tipo de vital importancia para el presente trabajo.

## **1.1 Espumantes**

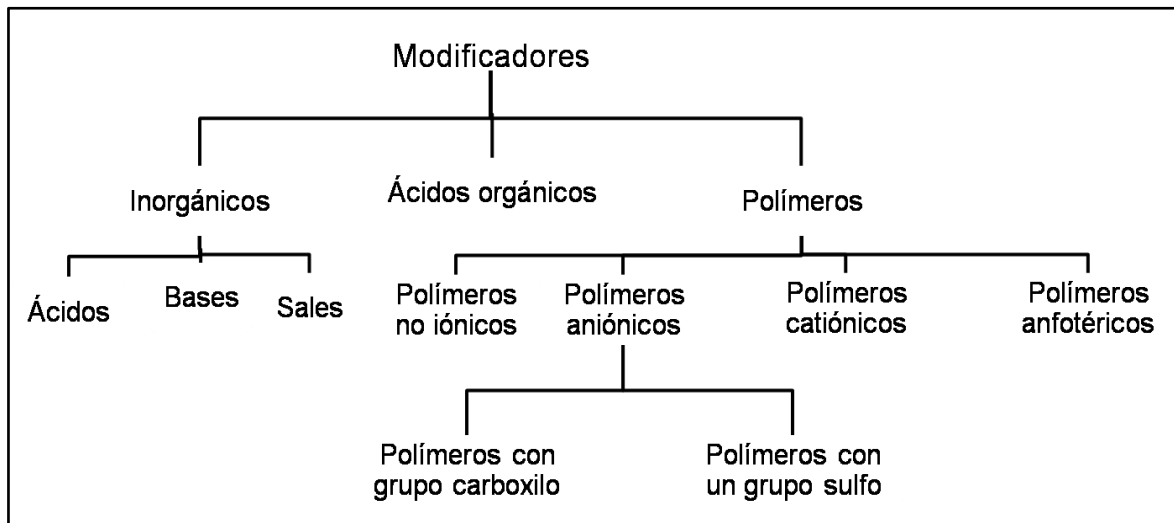
Los espumantes son agentes neutros que tienen como propósito la creación de una espuma capaz de mantener las burbujas cargadas de mineral hasta su extracción de las celdas de flotación. Estos compuestos contienen un grupo polar (OH, COOH, CO=O, OSO<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>OH) y un radical hidrocarburo capaz de adsorberse en la interfaz agua-aire (Bulantovic, 2007).

## **1.2 Reguladores o modificadores**

El propósito principal de un regulador es preparar el área externa de los minerales para la adsorción o desorción de un cierto reactivo sobre ellos y generar

las condiciones adecuadas para una flotación satisfactoria. En otras palabras, un modificador cambia la superficie de los sulfuros o de la ganga para favorecer (activadores) o impedir (depresores) que los agentes de flotación actúen sobre ellos.

Existen modificadores que cambian la superficie de la ganga, formando una capa alrededor de los gramos de roca que impide que estas partículas entren en contacto con el agente de flotación. Por otra parte, hay reguladores que únicamente modifican el área externa de ciertos sulfuros, permitiendo una flotación selectiva en minerales de sulfuro complejos. Una clasificación general de los mismos puede observarse en la Figura 2.



**Figura 2. Clasificación de los modificadores(Bulantovic, 2007)**

### 1.3 Colectores

Los colectores son sustancias químicas orgánicas en las que la estructura molecular posee una parte no polar y un grupo polar. De acuerdo a las propiedades de disociación del mineral y el grupo solidofílico (radical hidrocarburo) se han clasificado a los colectores en dos grupos (Bulantovic, 2007):

- i. Compuestos ionizables, capaces de disociarse en iones en contacto con agua. A su vez, los colectores ionizables pueden dividirse en dos grupos:
  - Colector aniónico, cuando el anión produce la hidrofobicidad.
  - Colector catiónico, cuando el catión hace la superficie mineral repelente al agua.
- ii. Colectores no ionizables, principalmente hidrocarburos que actúan cubriendo la superficie del mineral con una capa.

### **1.3.1 Colectores aniónicos**

Los colectores aniónicos son el grupo más usado en la flotación de minerales. Con base en la estructura del grupo solidofílico pueden dividirse en colectores tipo oxhidrilo cuando posee ácidos grasos, jabones y sulfo-ácidos, y en colectores de tipo sulfhídrido cuando contiene sulfuros bivalentes o se trata de xantatos, ditiofosfatos, entre otros (Bulantovic, 2007). La mayoría de los grupos de surfactantes aniónicos usados como colectores son carboxilatos, sulfatos, sulfonatos, fosfatos e hidroximatos.

### **1.3.2 Colectores catiónicos**

Este grupo de reactivos poseen una carga positiva cuando se encuentran en medio acuoso y poseen un átomo de nitrógeno como elemento común. Las aminas empleadas en el proyecto pertenecen a este grupo por lo que se expone más información del mismo.

En los colectores catiónicos, el átomo de nitrógeno usualmente se enlaza con átomos de hidrógeno o grupos hidrocarburo. Un cambio en el número de carbonos en la cadena hidrocarbonada conectada al nitrógeno determina las características de flotación de las aminas en general.

Este conjunto de reactivos se caracteriza por su fácil adsorción y desorción debido a un mecanismo de atracción electrostática. Generalmente los colectores

catiónicos son menos selectivos que los aniónicos, no obstante, son ampliamente utilizados en la flotación de cuarzo, silicatos y algunos minerales oxidados.

La tendencia de las partículas de un colector catiónico para adsorberse en la superficie del mineral depende de los siguientes parámetros:

- i. Tipo de mineral considerado (óxido, sulfuro, tipo sal, etc...).
- ii. La etapa de concentración del mineral (lavado y temperatura).
- iii. Cantidad y tipo de agentes presentes, como depresores y activadores, presencia de contaminantes o derivados de varios minerales presentes en la disolución.
- iv. El pH de la pulpa (incluido el de flotación y el de suspensión).
- v. Concentración del colector.
- vi. Presencia de espumantes, con probable influencia en la adsorción.
- vii. Existencia de cadenas largas no iónicas, adicionadas al sistema para permitir la menor concentración del colector.

El uso de diversas especies de aminas como colectores catiónicos ha sido estudiado por Somasundaran y Bleier (Somasundaran & Moudgil, 1998) cuyas conclusiones son las siguientes:

- i. Las propiedades de los colectores de cadenas de 12 carbonos de monoaminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias están directamente relacionadas con sus propiedades ácido-base.
- ii. La ramificación del grupo alquilo resulta en un poder pobre como colector.
- iii. La función de las diaminas como colectores es más fuerte que las monoaminas en una flotación equivalente entre pH 8 y pH 10 por lo que se requiere menos colectores diaminas que monoaminas.

Comúnmente los colectores comerciales de aminas se encuentran en forma de sales, usualmente como acetatos. Finalmente, los colectores catiónicos poseen la ventaja de no ser sensibles a la presencia de iones extraños en la pulpa, por lo que pueden emplearse en tratamientos con aguas excesivamente duras, además

de no presentar demasiada sensibilidad a las variaciones de pH (Salager & Forgiarini, 2007). La siguiente sección amplía la información sobre las aminas, sustancias empleadas como colectores catiónicos en la industria minera del hierro.

## 2. CARACTERÍSTICAS DE LAS AMINAS

### 2.1 Propiedades físicas de las aminas

Las aminas son compuestos donde momento dipolar del par de electrones solitario se suma a los momentos dipolares de los enlaces C ↔ N y H ↔ N. Las aminas primarias y secundarias son solubles en disolventes hidroxilados debido a su capacidad para formar puentes de hidrógeno por la presencia del enlace N-H (Wade, 2004). La Tabla 1 presenta un listado de las propiedades físicas de algunas aminas de interés en el estudio.

**Tabla 1. Propiedades físicas de algunas aminas**  
(McMurry, 2001; Morrison & Boyd, 1998)

Nombre	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad g/100 g H <sub>2</sub> O	pK <sub>b</sub>
<b>Metilamina</b>	-92	-7.5	Muy soluble	3.35
<b>Dimetilamina</b>	-96	7.5	Muy soluble	3.27
<b>Trimetilamina</b>	-117	3	91	4.20
<b>Octilamina</b>	0	179.6	Muy soluble	3.25
<b>Dodecilamina</b>	28.3	259	Insoluble	3.31
<b>Tetradecilamina</b>	83.1	291.2	Insoluble	3.33

Las aminas de cadena corta son líquidas o gaseosas mientras que aquellas de mayor masa molecular son sólidas (Lawrence, 2004). Todas las alquilaminas poseen presiones de vapor altas y pueden formar mezclas explosivas con el aire. El umbral de olor de las aminas es de 0.1 ppm y a menudo se describe como un olor a pescado podrido, las diaminas tienen un olor particularmente desagradable.

### 2.2 Propiedades químicas de las aminas

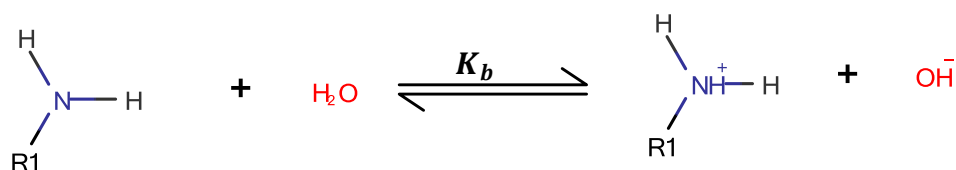
Las aminas son derivados orgánicos del amoníaco por lo que poseen un átomo de nitrógeno con un par solitario de electrones responsable del comportamiento básico y nucleofílico (McMurry, 2001). El átomo de hidrógeno tiene

hibridación  $sp^3$  con los tres sustituyentes ocupando tres vértices de un tetraedro y el par de electrones no enlazado ocupando el cuarto.

El par solitario de electrones atraen protones del agua, reaccionan con los ácidos de Lewis y atacan los sitios electrofílicos como el carbono carbonílico (Meislich, *et al.* 2001). Aunado a lo anterior, una amina puede actuar como Brönsted-Lowry, aceptando un protón de un ácido.

### 2.3 Basicidad de las aminas

En disolución acuosa las aminas son bases ligeramente fuertes. Una amina puede abstraer un protón del agua, dando lugar a un ión amonio y un hidróxido, esto es:



$$K_b = \frac{[\text{RNH}_3^+][\text{OH}^-]}{[\text{RNH}_2]}$$

$$pK_b = -\log_{10} K_b$$

**Figura 3. Reacción general de una amina primaria con agua**

La constante de equilibrio para esta reacción se denomina constante de hidrólisis de la amina y se simboliza como  $K_b$ . Generalmente el equilibrio presentado en la reacción anterior está desplazado hacia la izquierda, no obstante cualquier hecho estructural que estabilice el ión amonio (respecto a la amina libre) hace que el equilibrio se desplace hacia la derecha y que en consecuencia sea una base más fuerte (Wade, 2004). Siguiendo lo anterior, las alquilaminas son más básicas que el amoniaco debido al efecto electrodonador de los grupos alquilo que ayuda a estabilizar la carga positiva del nitrógeno y desplaza el equilibrio a la derecha.

Puede esperarse que el orden de mayor a menor basicidad en las aminas sea terciarias, secundarias y primarias, no obstante, sus diferencias radican en la

combinación de factores polares y de solvatación. Un ión amonio solvatado contribuye a la estabilización del catión, sin embargo, este efecto es complicado cuando existe impedimento estérico. Así, en átomos de nitrógeno con varios sustituyentes, si bien los grupos alquilo estabilizan la carga por electrodonación, también impiden que las moléculas de agua lo solvaten.

Por su parte las aminas aromáticas son bases mucho más débiles que las aminas alifáticas debido a la deslocalización por resonancia de los electrones no enlazantes de la amina. Además de su comportamiento como bases, las aminas primarias y secundarias también actúan como ácidos débiles debido a un protón N-H que puede suprimir una base con fuerza suficiente.

## 2.4 Reacciones generales de las aminas primarias

Debido a los pares de electrones no compartidos del átomo de nitrógeno las aminas son capaces de actuar como nucleófilos. Las siguientes secciones presentan algunas de las reacciones más importantes de las aminas.

## 2.5 Reacción de aminas con aldehídos y cetonas

En condiciones adecuadas el amoníaco o una amina primaria reacciona con una cetona o un aldehído para formar una imina.

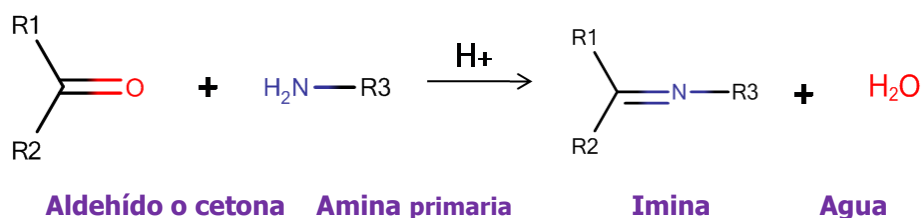


Figura 4. Reacción general de cetonas y aldehídos con aminas

### 2.5.1 Alquilación de aminas con haluros de alquilo

Las aminas reaccionan con haluros de alquilo para dar lugar a haluros de amonio polialquilados. La alquilación transcurre mediante un mecanismo S<sub>N</sub>2, en

un inicio se forma una sal capaz de desprotonarse dando lugar a una amina secundaria que reacciona con otra molécula de haluro.



Figura 5. Reacción general de alquilación de aminas con haluros de alquilo

### 2.5.2 Acilación de aminas con cloruros de ácido

Las aminas primarias y secundarias reaccionan con haluros de ácido para formar amidas. Se trata de una sustitución nucleofílica en el grupo acilo.

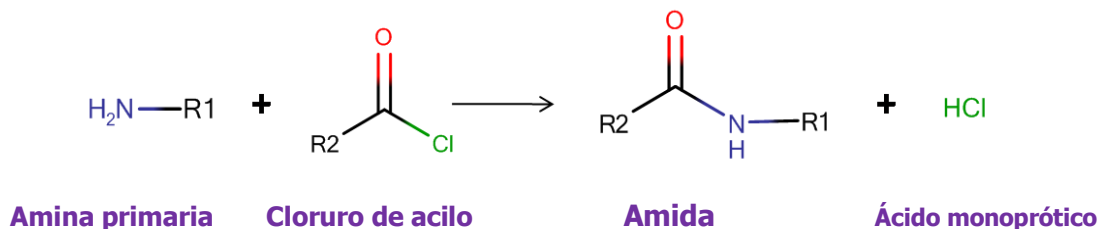


Figura 6. Reacción de acilación de aminas con cloruros de ácido

### 2.5.3 Diazotación de aminas

Las aminas primarias reaccionan con el ion nitrosonio, para formar cationes diazonio. Las sales de diazonio son los productos más importantes que se obtienen de la reacción. El ión se produce a partir del ácido nitroso generado *in situ* mezclando nitrito de sodio con ácido clorhídrico diluido en frío.

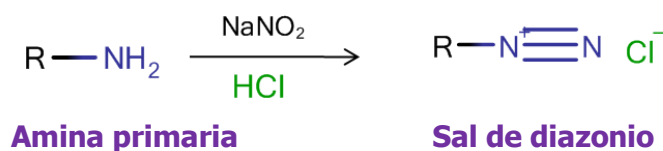


Figura 7. Reacción general de diazotación de aminas

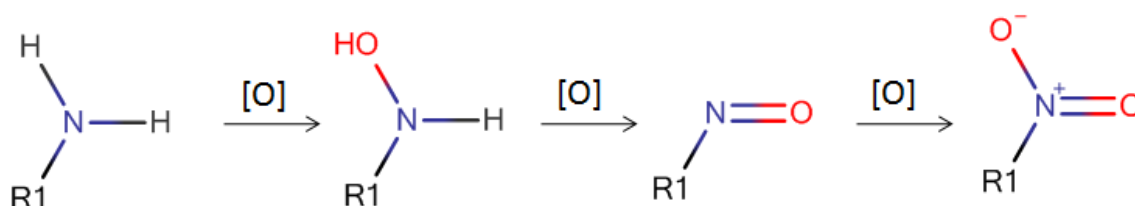


## 2.5.4 Oxidación de aminas

En general, bajo condiciones leves las aminas alifáticas son oxidadas por el oxígeno en el aire mediante un mecanismo de cadena, mientras que en síntesis, la mayoría de las aminas se oxidan empleando oxidantes comunes como  $\text{H}_2\text{O}_2$ , permanganato y peroxiácidos.

En las aminas alifáticas el enlace C-H más débil es el adyacente al grupo  $\text{NH}_2$ , no obstante, la energía de disociación del mismo en alquilaminas depende de los sustituyentes alquil en los átomos de N y O. Entre mayor sea el número de sustituyentes en el átomo, menor será la energía de disociación. Por otro lado, si se compara la energía de disociación del  $\alpha\text{C-H}$  en los hidrocarburos y las aminas, las segundas poseen menor energía de disociación debido a la interacción de la valencia libre del sustituyente aminoalquil con el par libre del átomo de nitrógeno (Denisov & Afanas'ev, 2005).

Por su parte, las aminas primarias se oxidan fácilmente pero se obtienen mezclas complejas de productos. El siguiente esquema presenta el aumento del grado de oxidación de una amina primaria donde [O] representa un agente oxidante genérico.



**Figura 8. Oxidación de aminas primarias(Wade, 2004)**

Así, en función del agente oxidante pueden formarse grupos nitro, nitrilos e incluso carbonilos, la Figura 9 muestra algunas reacciones de oxidación de aminas primarias.

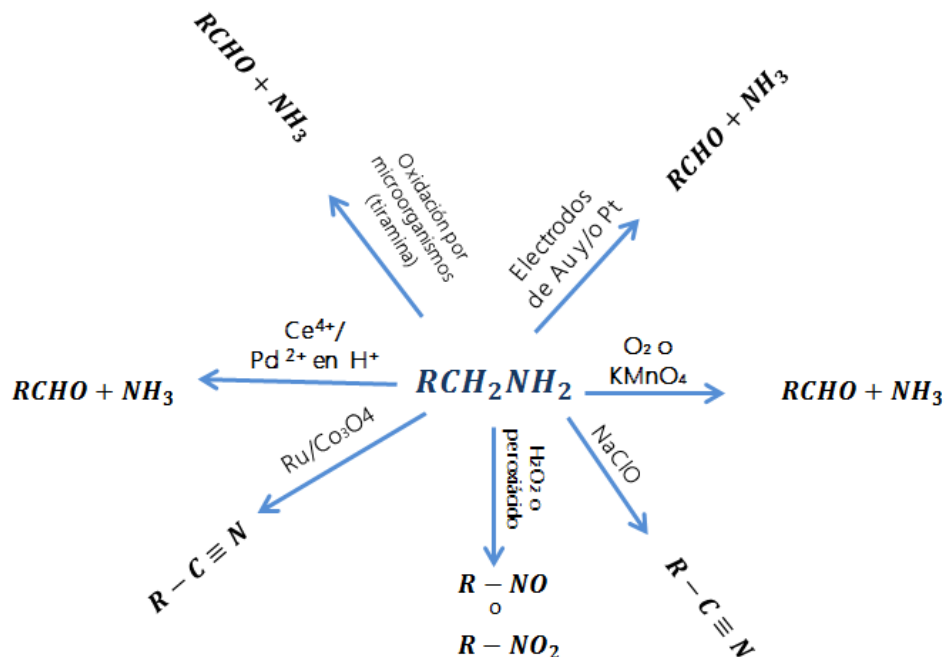


Figura 9. Algunas reacciones de oxidación de aminas primarias(Sosa, 2014)

## 2.6 Toxicología de las aminas alifáticas primarias

**Metabolismo.** Las aminas primarias de cadena  $\geq C_6$  se absorben por la piel; sin embargo, la absorción dérmica disminuye conforme aumenta el tamaño de la cadena. En pruebas en animales, las aminas administradas vía intravenosa fueron posteriormente detectadas en pulmón, hígado, riñón, corazón, bazo y cerebro. El pulmón fue el único órgano en el que una proporción creciente fue encontrada cuando la longitud de la cadena alquímica fue aumentando. Se ha observado que la biotransformación de las aminas alifáticas, inyectadas a ratas, ocurre por la oxidación a aldehídos y liberando  $NH_3$ . Los aldehídos son metabolizados a su ácido carboxílico correspondiente y posteriormente a  $CO_2$  a través de una  $\beta$ -oxidación. El metabolismo a  $CO_2$  es dependiente de la longitud de cadena, encontrado una mayor eliminación de  $CO_2$  con  $C_6$  y ahí empieza decrecer conforme aumenta la longitud de la cadena (metabolismo a  $CO_2$   $C_1 \ll C_6 \gg C_n$ ). En el caso de algunas aminas como la etilamina se ha encontrado que la fracción no metabolizada se excreta por la orina (Greim, *et al.* 1998).

**Toxicidad aguda.** Las aminas alifáticas primarias presentan un efecto corrosivo en la piel y son irritantes para los ojos. Su toxicidad es causada principalmente por su basicidad que da lugar a compuestos irritantes, no obstante, la misma disminuye cuando las aminas se encuentran en su forma ionizada. Respecto a lo anterior, se ha encontrado que la toxicidad de aminas primarias en *Artemia salina*<sup>1</sup>, se incrementa conforme aumenta el pH (Finlay & Callow, 2009). Un efecto similar es observado con aminas de diez a doce carbonos en la especie *Amphoracoffeaeformis*<sup>2</sup>, sin embargo, aquellas de cadena alquílica más corta no se ven afectadas de forma tan marcada. En general, aminas primarias con una longitud de cadena alquil muy larga, e.g. coco alquil aminas y octadecilamina, mostraron toxicidad moderada (LD<sub>50</sub> oral rata: > 2.000 mg/kg) (Greim, *et al.* 1998).

**Toxicidad crónica, subaguda, subcrónica.** Después de un uso repetido, las aminas primarias causan irritación en tracto respiratorio, piel y estómago sin provocar efectos tóxicos pronunciados. Los valores de irritación sensorial (RD<sub>50</sub>) para ratones (en los que se ha reportado una disminución en la tasa de respiración de alrededor del 50%) son de 0.28 mg/L para sec-butilamina y un RD<sub>50</sub> de 0.151 mL/L para etilamina, estos valores son empleados para estimar un grado umbral de irritación en las vías respiratorias (Greim, *et al.* 1998).

**Sensibilización de la piel.** Un estudio sobre el potencial de sensibilización de la piel con butilamina dio resultados negativos; sin embargo, una exposición prolongada puede causar irritación.

**Genotoxicidad/Carcinogenicidad.** La gran mayoría de las pruebas de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* no dieron ninguna indicación de un potencial genotóxico para las aminas alifáticas primarias (Greim, *et al.* 1998).

**Toxicidad reproductiva.** Las pruebas existentes (con metilamina y sec-butilamina) revelaron que no hay riesgo potencial de efectos reproductivos tóxicos/teratogénicos.

---

<sup>1</sup>*Artemiasalina* es una especie de crustáceo branquiópodo del orden Anostraca propia de aguas continentales.

<sup>2</sup>Diatomea marina que se suele ocupar para bioensayos.

**Otros efectos.** Las aminas alifáticas grasas poseen un efecto liberador de histamina, que aumenta con el aumento de longitud de la cadena (Greim, *et al.* 1998).

En la Tabla 2 se exponen datos toxicológicos de algunas aminas primarias alifáticas (Greim, *et al.* 1998; Sigma-Aldrich, 2012; Sigma-Aldrich, 2013).

**Tabla 2. Toxicidad de algunas aminas(Sosa, 2014)**

Amina	Toxicidad			
	Aguda LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Irritación y sensibilidad	GenotoxicidadCarc inogecidad	Toxicidad Reproductiva
Metilamina	Oral-rata: 689 (molecular) Oral-rata: 1600-3200 (clorhidrato)	Irritante a losojos y corrosiva con la piel	No mutagénico	No teratógico, no fetotóxico
Etilamina	Oral-rata: 400 (molecular) Ora-rata: >3200 (clorhidrato)	Irritante a los ojos y corrosiva con la piel	Pruebas <i>in vitro</i> predominantemente negativas. Pruebas <i>in vivo</i> negativas	S/I
Propilamina	Oral-rata: 370-570	Irritante a los ojos y corrosiva con la piel	Pruebas <i>in vitro</i> predominantemente negativas.	S/I
Butilamina	Oral-rata: 336-720	Irritante a los ojos y corrosiva con la piel	Pruebas <i>in vitro</i> negativas. Pruebas <i>in vivo</i> negativas	S/I
Octilamina	Oral-rata: 200-500 Intraperitoneal: 100 Intravenoso: 18	Muy corrosivo para la piel	Negativas	S/I
Decilamina	Oral-rata: 280 Cutáneo-conejo: 277	Muy corrosivo para la piel	S/I	S/I
Dodecilamina	Oral-rata: 1020	Corrosivo para la piel	S/I	S/I
Tetradecilamina	Oral-rata: 200-2000	Muy alta para piel y ojos	S/I	S/I
Octadecilamina	Oral - rata: 2,395	Piel y ojos	No mutagénico	S/I

S/I: sin información

## 2.7 Aplicación de las aminas en la industria

A nivel industrial, las aminas y sus respectivas sales han sido empleadas como inhibidores de corrosión, reactivos de desulfurización, agentes emulsificantes, reactivos en refinerías de petróleo, germicidas, antisépticos, antioxidantes, aceleradores en el proceso de vulcanización, plastificantes, productos farmacéuticos, detergentes, colorantes, textiles, pesticidas, agentes de superficie, catalizadores en procesos de deshidrohalogenación y como agentes de flotación en la industria minera del hierro (Araujo, *et al.* 2010; Woei-Long, *et al.* 2004).

Específicamente en la industria minera las aminas poseen múltiples aplicaciones entre las que destacan el uso de sus cationes como:

- Colectores de flotación en una región de pH de 1.5 a 11.0.
- Agentes emulsificantes para ácidos grasos que mejoran el rendimiento de la flotación.
- Materia prima para la preparación de algunos colectores aniónicos.
- Depresores.

Las aminas y sus sales comerciales utilizadas para los procesos de flotación provienen de productos naturales como aceites vegetales o grasas animales, que resulta en una mezcla de aminas alifáticas con cadenas de carbono variantes entre 6 y 18 carbonos, C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> (Combs, 1985). Además, las sales de amina son los colectores catiónicos más importantes utilizados en la flotación del mineral de hierro.

## 3. BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS

La técnica más importante para remover contaminantes del ambiente es la biodegradación por lo que a menudo se incluye en la remediación de sitios contaminados. El término bioremediación describe el proceso de usar agentes biológicos para remover residuos tóxicos del ambiente a través de la degradación

de los contaminantes a productos menos peligrosos o no peligrosos (Singh, *et al.* 2014). La Agencia de Protección al Ambiente (Environmental Protection Agency, EPA por sus siglas en inglés) define biodegradación como “*un proceso en donde los microorganismos transforman o alteran (mediante acción metabólica o enzimática) la estructura de los químicos introducidos en el ambiente*”. Por lo que resulta una técnica efectiva para remover contaminantes en matrices como agua y suelo. Frecuentemente, aunque no necesariamente la biodegradación conduce a la conversión completa de moléculas complejas en productos inorgánicos como el caso de la mineralización de dimetilamina por bacterias (por ejemplo *Sporopachydermiacereana*) que usan oxígeno para realizar una conversión catalítica de dimetilamina a amoníaco (Agteren, *et al.* 1998).

Arqueobacterias, procariontes y eucariontes son capaces de actuar como agentes de biodegradación. Los compuestos de origen natural son rápidamente degradados y mineralizados por estos organismos, mientras que los xenobióticos requieren de tratamientos biológicos para su eliminación del ambiente. Los contaminantes orgánicos pueden clasificarse en biodegradables, persistente o recalcitrante.

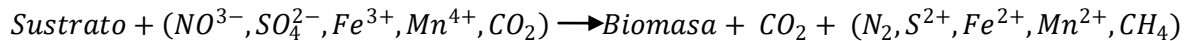
La degradación de los contaminantes puede suceder por dos tipos de vías:

- i. Degradación aerobia, por esta vía los microorganismos crecen en el medio mediante la generación de energía desde la oxidación de los compuestos orgánicos para la producción de CO<sub>2</sub>. Parte del carbono es asimilado como materia prima para la célula. Estos organismos usan el oxígeno como el aceptor final de electrones y en algunos casos también como reactivo para algunos pasos de conversión. Para que esto suceda la especie debe ser capaz de producir enzimas que degraden el compuesto a otros no tóxicos o bien, menos tóxicos. El esquema de degradación aerobia se presenta en la Figura 10.



**Figura 10. Esquema de reacción de la degradación anaerobia**

- ii. Degradación anaerobia, esta degradación ocurre donde el oxígeno no es el aceptor final de electrones y en su lugar iones de manganeso y hierro, y sustancias como sulfuros, nitratos, dióxido de carbono y algunos intermediarios orgánicos son reducidos por los electrones derivados de la oxidación de los compuestos orgánicos. La reacción de degradación anaerobia se muestra en la Figura 11.



**Figura 11. Esquema de reacción de la degradación anaeróbica**

### **3.1 Microalgas**

Las microalgas pertenecen a un grupo heterogéneo de organismos microscópicos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos (ficobilinas, carotenos y xantofilas) capaces de realizar la fotosíntesis. Estos organismos son predominantemente acuáticos y filogenéticamente están compuestos de especies procariotas y eucariotas (Martínez, 2009). Las microalgas forman parte de algunos de los organismos más antiguos del planeta y debido a la amplia variedad de especies, se han establecido subdivisiones para su clasificación basadas en la estructura de las microalgas y sus pigmentos característicos (Pozo Pérez, 2010). Dado su fácil cultivo estos microorganismos se han empleado en diversas actividades como la producción de complementos alimenticios, cosméticos, tratamiento de aguas residuales, generación de energía y acuicultura (Spolaore, *et al.* 2006; Hernández, 1998; Richmond, 2004).

#### **3.1.1 Bioremediación y biodegradación por microalgas**

En comparación con otros microorganismos como hongos y bacterias, el cultivo a gran escala de microalgas es más sencillo y económico debido entre otras cosas al empleo de una fuente barata, abundante y renovable de energía: la luz solar, así como a su fácil cultivo. Algunas especies de microalgas pueden crecer en presencia de contaminantes orgánicos debido a su capacidad para biodegradarlos (El-Sheekh, *et al.* 2013) y crecer en ambientes mixotróficos, es decir, bajo condiciones de fotoautotrofia y heterotrofia (Tikko, *et al.* 1997). Algunos

de los componentes orgánicos que pueden remover son compuestos fenólicos, surfactantes, biocidas, hidrocarburos aromáticos, entre otros (Matamoros *et al.* 2016).

### **3.1.2 *Chlorella vulgaris***

*Chlorella vulgaris* (Figura 12) es una microalga unicelular de color verde, de forma generalmente esférica, con un diámetro de entre 2 y 10 micras (Grooth, 1985). Presenta una pared celular lisa y un cloroplasto en forma de copa. La reproducción es asexual mediante autósporas que se liberan por una abertura de la pared celular materna (Fanés, 2008). Cada célula de la especie puede dividirse en cuatro células hijas en un plazo de 16-20 h utilizando la luz solar para la fotosíntesis (Hasegawa & Kumamoto, 2005). Este tipo de reproducción permite un aumento rápido de la densidad poblacional cuando el contenido de sales minerales y las condiciones son adecuadas. Por lo anterior, dicha microalga puede encontrarse en una amplia gama de hábitats acuáticos y terrestres pero es esencialmente cosmopolita en hábitats de agua dulce y marinos (Coria, 2014) donde puede encontrarse incluso en simbiosis con ciliados, esponjas, hidras y otros organismos (Jiménez, 2015).

#### **TAXONOMÍA** (Algae base, 2015)

**División:** Eukaryota

**Reino:** Planta

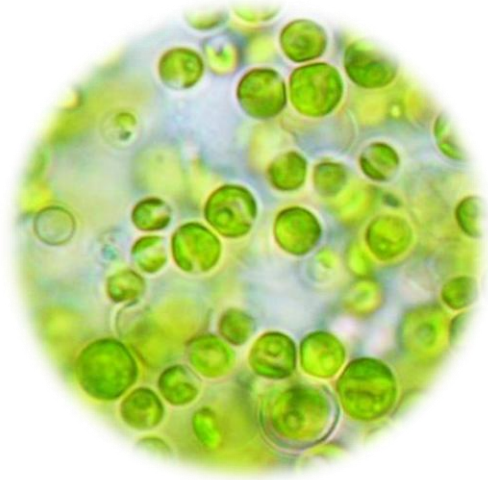
**Filo:** Chlorophyta

**Orden:** Chlorellales

**Familia:** Chlorellaceae

**Género:** *Chlorella*





**Figura 12. *Chlorella vulgaris***

(Fuente: <https://harmonicarts.ca/2013/04/chlorella-chlorella-vulgaris/>)

### **Usos de *Chlorella vulgaris***

Dada la facilidad de cultivo y el rápido aumento poblacional, la microalga *Chlorella vulgaris* se destaca por poseer múltiples aplicaciones entre las que destacan:

**Suplemento nutricional.** La biomasa de esta especie de microalga posee todos los aminoácidos esenciales así como un contenido de proteína superior al 40% que unido a una composición balanceada y niveles aceptables de ácidos nucleico constituye una opción viable como suplemento nutricional (Morris, *et al.* 1999; Syed, *et al.* 2015).

**Biocombustible.** Debido a su capacidad de adaptarse a las condiciones de cultivo heterotróficas y fototróficas así como al contenido de lípidos y la capacidad de reproducción, *Chlorella vulgaris* es considerada una candidata ideal para su producción como biocombustible (Suali & Sarbatly, 2012).

**Remoción de metales pesados.** Diversas especies de microalgas son capaces de tolerar metales pesados, especialmente *Chlorella vulgaris* se han utilizado para la eliminación de metales pesados tales como cobre, níquel, zinc, plomo, mercurio, entre otros (Tahri, *et al.* 2013).

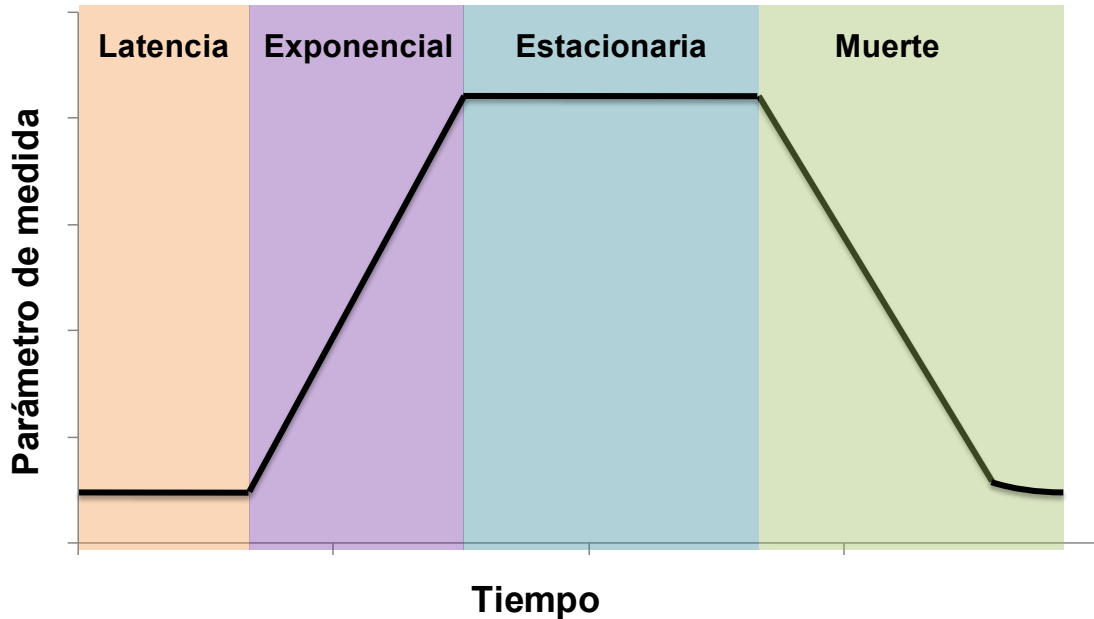
**Degradación de compuestos orgánicos.** Debido a la capacidad de asimilar tanto fuentes orgánicas como inorgánicas de carbono, diversas especies de microalgas pueden crecer en presencia de contaminantes orgánicos y en consecuencia degradarlos. Se han reportado la capacidad de *Chlorella vulgaris* para degradar p-nitrofenol, p-clorofenol, pentaclorofenol, bifenole incluso petróleo crudo (El-Sheekh, *et al.* 2009; Tikko, *et al.* 1997; Ghasemi, *et al.* 2011). Además de la degradación de más de 30 compuestos azoicos por *Chlorella vulgaris* para dar lugar una amina aromática más simple (Yan & Pan, 2004).

Lim y colaboradores han señalado la capacidad de *Chlorella vulgaris* para la bioremediación de aguas residuales textiles con un porcentaje promedio de remoción del colorante rojo supranol 3BW del 60% a la par que la producción de biomasa aumenta (Lim, *et al.* 2010). Este estudio además presenta a la biosorción como el primer mecanismo de remoción de color. Una investigación similar fue desarrollada por Zumriye y Tezer al someter la especie *Chlorella vulgaris* a tres tipos de colorantes con la finalidad de analizar la biosorción de estos reactivos (Zumriye & Tezer, 2005).

Por su parte, experimentos de bioexposición realizados con tributilestaño también plantea la adsorción del reactivo en la pared celular del reactivo así como su asimilación mediante un mecanismo iónico para posteriormente degradarlo (Tsang, *et al.* 1999).

### **3.2 Curvas de crecimiento**

Muchos de los estudios de biodegradación se basan en la respuesta del crecimiento de los microorganismos expuestos a los agentes tóxicos, dado que diversas especies son capaces de transformar los compuestos orgánicos para obtener carbono o energía para su crecimiento (Ghasemi, *et al.* 2011), por lo que es necesario conocer los procesos que ocurren en una curva de crecimiento, como se observa en la Figura 13.



**Figura 13. Curva de crecimiento microbiano**

En un cultivo homogéneo y cerrado, donde los nutrientes y las condiciones ambientales son óptimos y controlados, la curva de crecimiento del microorganismo presenta cuatro etapas fundamentales. Cada una de ellas asociada a los cambios fisiológicos típicos del cultivo celular, por lo que la velocidad de crecimiento es distinta (Pepper, *et al.* 2015).

### **3.2.1 Fase lag**

Durante la fase latencia o lag, la velocidad de crecimiento es esencialmente cero. Esta fase es la adaptación fisiológica de las células a las condiciones del cultivo. Esto implica el tiempo requerido para la introducción del ARN mensajero y la síntesis subsecuente de las proteínas para cumplir sus funciones en el nuevo cultivo. Mientras este proceso de adaptación sucede las células son más sensibles a la temperatura u otros cambios ambientales que aquellas células en otra etapa de desarrollo. El lento crecimiento también se explica debido a la dilución de las exoenzimas y los nutrientes que se liberan de las células en crecimiento debido a que en condiciones donde la densidad celular es alta, estos materiales se encuentran en la proximidad de las células. Generalmente la fase lag usualmente

se extiende por minutos o incluso horas, la extensión depende del tipo de medio y la medida de la inoculación inicial.

### **3.2.2 Fase log o exponencial**

Esta fase se caracteriza por la división de las células para entrar en un período de crecimiento o de incremento logarítmico. En este periodo la reproducción celular alcanza su máximo y el tiempo de generación (tiempo necesario para que una célula se divida y su población se duplique) llega a un mínimo constante (Tortora, *et al.* 2007). Se ha señalado la existencia de una etapa de crecimiento acelerado, previa a la fase log, donde el tiempo de generación disminuye gradualmente y la velocidad de división alcanza un máximo (Pumarola, *et al.* 1999). Cuando el microorganismo se multiplica a velocidad constante y exponencial se alcanza la fase log.

### **3.2.3 Fase estacionaria**

En la fase estacionaria la tasa de crecimiento disminuye, el número de muertes microbianas compensa el de células nuevas y como consecuencia la población se estabiliza. Existen diversas razones por las que un cultivo llega a la fase estacionaria. Una de ellas es el agotamiento de la fuente de carbono, energía o bien de los nutrimentos esenciales. No obstante cuando la fuente de carbono ha sido consumida en su totalidad no significa necesariamente el cese del crecimiento, puesto que las células muertas proveen una nueva fuente de alimentación. El crecimiento resultado del aprovechamiento de las células muertas se conoce como metabolismo endógeno (Pepper, *et al.* 2015), lo que explica el nacimiento de nuevas células que se equilibra con el número de muertes. Otra causa aparente de la fase estacionaria es la generación de residuos tóxicos que inhiben el crecimiento del microorganismo, un efecto secundario de la alta densidad celular.

### **3.2.4 Fase de muerte o declinación**

Cuando el número de decesos sobrepasa el número de células formadas el cultivo entra en la fase de declinación. En algunos casos este proceso se

acompaña de una lisis celular real. Esta fase también es exponencial, sin embargo, en la mayoría de los casos la velocidad de muerte celular es mucho más lenta que la de crecimiento exponencial (Brock, Madigan, Martinko, & Parker, 2004). Muchas células a menudo involucionan durante esta fase lo que dificulta su identificación.

#### **4. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS**

Debido a la toxicidad que presentan las aminas su análisis en fuentes ambientales es de vital importancia. El análisis de aminas alifáticas en medio acuoso es complicado debido a la alta polaridad de estos compuestos por lo que la extracción líquido-líquido o en fase sólida no es viable a niveles de trazas (Sacher, *et al.* 1997).

Los métodos comúnmente usados para la cuantificación de aminas están basados en la cromatografía siendo los más importantes la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (CLAR). Otros métodos incluyen la cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico, usualmente limitado debido a la baja sensibilidad (You, *et al.* 2010). La cromatografía de gases presenta algunos problemas con el manejo de aminas de bajo peso molecular debido a su alta solubilidad en agua y volatilidad, además las aminas tienden a ser adsorbidas y descomponerse en las columnas dando lugar a picos con cola o picos fantasmas que aunado a la baja sensibilidad del detector no permite su cuantificación ni reproducibilidad (Kataoka, 1996).

Por su parte, la cromatografía de líquidos también presenta inconvenientes debido a la baja absorptividad de las aminas alifáticas en el intervalo del espectro UV-Visible y la nula fluorescencia (Llop, *et al.* 2010). Ante esto, se emplean procedimientos de derivatización previos al análisis cromatográfico, este proceso reduce la polaridad del grupo amino y es a menudo selectiva para el tipo de amina por lo que la separación y la detección de las aminas mejora.

Las reacciones de derivatización deben producir derivados estables y ocurrir de dos modos (Coppex, 2000):

- i. En modo de pre-columna, se efectúa generalmente de manera manual en viales antes de la inyección cromatográfica. La estabilidad del derivado es necesaria por este modo.
- ii. En modo post-columna, la reacción se realiza mediante la adición automática de un agente de derivatización después de la separación y antes de la detección por medio de una segunda bomba.

Existen diversas reacciones de derivatización, estas son acilación, silylación, dinitrofenilación, permetilación y la formación de diferentes productos de condensación (bases de Schiff), carbamatos y sulfonamidas (Kataoka, 1996).

La Tabla 3 muestra algunos agentes de derivatización usados en cromatografía para la determinación de aminas.

**Tabla 3. Agentes de derivatización**

Agente	Uso	Método	Referencia
<b>4-cloro-7-nitrobenzofurazan</b>	Análisis de aminas en agentes colectores empleados en sistemas de flotación	CLAR - UV	(Hao, <i>et al.</i> 2004)
<b>2-[2-(dibenzocarbazol)-etil]cloroformiato de etilo (DBCEC-Cl)</b>	Aminas alifáticas (C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )	CLAR - EM	(You, <i>et al.</i> 2010)
<b>Naftaleno-2-3-dicarboxaldehído (NDA)</b>	Determinación de neurotransmisores amínicos	CLAR - Fluorescencia	(He, <i>et al.</i> 2009)
<b>2,4-dinitrofluorobenzeno</b>	Determinación de aminas alifáticas primarias y secundarias en aguas residuales	CG-EM	(Sacher, <i>et al.</i> 1997)

## **CAPÍTULO 2. EXPERIMENTACIÓN**

### **5. REACTIVOS, DISOLVENTES, MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **5.1 Reactivos y disolventes**

Estándares de aminas alifáticas Sigma Aldrich con una pureza igual o mayor de 98%: Octilamina (C8), Dodecilamina (C12) y Tetradecilamina (C14).

4-cloro-7-nitrobenzofurazan Sigma Aldrich con una pureza del 98% (Cloro-NBD).

Ácido acético glacial de J.T. Baker con una pureza del 99.7%.

Tetraborato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) comercial.

Metanol (MetOH) J.T. Baker grado cromatográfico.

Acetonitrilo (ACN) J.T. Baker grado cromatográfico.

Agua nanopura (tipo I) con una resistividad de 18 M $\Omega$ .

Agua oxigenada Meyer al 35 %.

Nitrato de sodio grado técnico ( $\text{NaNO}_3$ ).

Cloruro de sodio Reason ( $\text{NaCl}$ ) pureza del 99.5%.

Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) J.T. Baker, pureza de 74.8 %

Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) J.T. Baker, pureza del 99.9 %

Fosfato de potasio monoácido ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) J.T. Baker con una pureza de 100.1 %

Fosfato de potasio diácido ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) J.T. Baker con una pureza de 99.8 %

Agar bacteriológico BD Bioxion

Proteosa- Peptona No. 3 MCD LAB

Sulfato de sodio anhidro J.T. Baker pureza de 99 %

#### **5.2 Materiales, accesorios y consumibles de equipos**

Micropipetas Pippet-Lite XLS de capacidad variable (20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , 500-5000  $\mu\text{L}$ ).

Viales de vidrio Supelco (4, 8, 12 y 28mL).

Vasos de precipitados Pyrex (10, 25 y 100 mL).

Matraces volumétricos Pyrex (10, 25, 50 y 100 mL).

Frascos de vidrio (20, 100, 250 y 500 mL).

Pizeta.

Bureta de vidrio Pyrex de 25 mL.

Matraz Erlenmeyer Pyrex de 250 mL.

Agitadores magnéticos (distintos tamaños).

Microjeringa Hamilton (100  $\mu$ L).

Espátulas.

Varilla de vidrio.

Columna Hypersil Gold C18 de 150x4.6 mm.

Electrodo para mediciones de pH Hanna

Algodón.

Gasas.

### **5.3 Equipos**

Autoclave marca Presto.

Espectrofotómetro Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de Thermo-Nicolet, modelo 1510, celda de ATR.

Espectrofotómetro UV-VisVarian, Modelo CARY3E.

Sistema de bombeo Waters 410.

Controlador Water Automated Gradient Controller Modelo 680.

Detector de Ultravioleta-Visible, SpectraFocus de ThermoseparationProducts.



Balanza analítica Sartorius modelo 1416MP8 capacidad de 220 g con resolución de 0.0001 g.

Sistema de agua NANOpure modelo D4741.

Potenciómetro Hanna Instruments HI 2211

Parrilla de agitación convencional.

Calentador de multi-bloques Barnstead International modelo 2052.

Espectrómetro de masas Advion Expresion S.

## 6. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES Y REACTIVOS

**Preparación del medio bristol.** La elaboración del medio se realizó de acuerdo a lo indicado en el sitio UTEX The Culture Collection of Algae de la Universidad de Austin (Texas). Se prepararon dos disoluciones patrón de macronutrientes de la siguiente manera:

*Solución Stock 1.* En 100 mL de agua destilada se disolvieron las cantidades de  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  expuestas en la Tabla 4, cada sal fue adicionada una vez disuelta la anterior, con agitación constante y en el orden presentado. Posteriormente se llevaron al aforo en un matraz volumétrico de 250 mL.

*Solución Stock 2.* Se disolvieron las cantidades de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  presentadas en la Tabla 4, en 100 mL de agua destilada, ambas sales se agregaron por separado y con agitación para evitar su precipitación. Posteriormente se llevaron al aforo en un matraz volumétrico de 250 mL.

Las soluciones stock se almacenan por separado en frascos cerrados en refrigeración hasta por 2 meses.

*Medio Bristol.* La elaboración de 1 L de medio Bristol se realizó por la adición a 900 mL de agua destilada de 10 mL de cada una de las soluciones stock llevando posteriormente a 1 L con agua tipo I. El medio se homogeniza por agitación.

**Tabla 4. Sales empleadas en la elaboración del medio Bristol**

Sal	Masa (g)
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	6.27
<b>CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O</b>	0.62
<b>MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O</b>	1.87
<b>NaCl</b>	0.62
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1.87
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	4.36

Los medios de cultivos se esterilizan en autoclave a una temperatura y presión de 121°C y 15 psi respectivamente. El tiempo requerido para la esterilización es de 30 minutos.

**Preparación del medio proteosa-peptona.** Se agregaron 0.5 g de proteosa peptona a un litro de medio Bristol e inmediatamente se sometió a un proceso de esterilización.

**Disolución y neutralización del estándar de octilamina.** Se añadieron 70  $\mu$ L del estándar de octilamina a aproximadamente 50 mL de agua nanopura para posteriormente ajustar a pH 5 con la adición de ácido acético 1 M. El acetato de octilamina se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 250 mL. La concentración final de la disolución del estándar es de 218.1 mg/L (0.0016 M)

**Dilución de acetato de octilamina.** De la disolución estándar de octilamina se tomaron 10 mL y se llevó al aforo con agua nanopura en un matraz de 100 mL para una concentración final de 21.81 mg/L (0.00016 M)

**Disolución y neutralización del estándar de dodecilamina.** Se disolvieron 0.05361 g del estándar de dodecilamina a 50 mL de agua nanopura y se ajustó a pH 5.5 con la adición de ácido acético 1 M. Posteriormente se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 250 mL. La concentración final la disolución del estándar es de 214.4 mg/L (0.0012 M).

**Dilución de acetato de dodecilamina.** De la disolución estándar de dodecilamina se tomaron 10 mL y se llevó al aforo con agua nanopura en un matraz de 100 mL para una concentración final de 21.44 mg/L (0.00012 M).

**Disolución y neutralización del estándar de tetradecilamina.** Se disolvieron 0.05711 g del estándar de tetradecilamina en 50 mL de agua nanopura para su posterior ajuste a pH 5 con la adición de ácido acético 1 M. Finalmente se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 250 mL. La concentración final del estándar es de 228.4 mg/L (0.0010 M).

**Dilución de acetato de tetradecilamina.** De la disolución estándar de tetradecilamina se tomaron 10 mL y se llevó al aforo con agua nanopura en un matraz de 100 mL para una concentración final de 22.84 mg/L (0.00010 M).

**Preparación del reactivo derivatizante.** Se disolvieron 0.4 g de 4-cloro-7-nitrobenzofurazan en 25 mL de MetOH (grado CLAR) para después llevar al aforo en un matraz volumétrico de 100 mL con el mismo disolvente. La concentración del derivatizante es de 0.020 M. Esta disolución se conserva en refrigeración. El tiempo máximo de almacenamiento es de diez días.

**Preparación de la fase móvil.** Se adicionó la cantidad necesaria de ácido acético en concentración 40 mM a 500 mL de agua nanopura para un pH= 4.5. Posteriormente, se preparó la mezcla acetonitrilo:agua (pH=4.5) en proporción 85:15.

## 7. EXPERIMENTACIÓN

Los bioensayos son empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre *Chlorella vulgaris*. Con este fin, se examinan dos parámetros independientes. El primero analiza el efecto del acetato de amina sobre el crecimiento de la especie, mostrado por el cambio en la biomasa, mientras que el segundo presenta la variación de la concentración del agente añadido en función del tiempo. Ambos efectos son analizados por separado.

En el presente apartado se explica el procedimiento para obtener la curva de crecimiento de un cultivo líquido testigo de *Chlorella vulgaris*, cuyo análisis permite escoger el intervalo adecuado en el tiempo de vida de la microalga para realizar los bioensayos. Posterior al tiempo de ensayo, el sobrenadante con la amina remanente es sometido a derivatización con Cloro-NBD para su análisis con CLAR mientras que la fracción sólida o biomasa es pesada para la construcción de la curva de crecimiento en presencia de acetato de aminas.

Además, con base en estudios previos de oxidación de agentes flotación se presenta el procedimiento para la síntesis de los nitroderivados cuyo análisis es un punto de comparación con los posibles productos de degradación por *Chlorella vulgaris*.

## **7.1 Crecimiento de *Chlorella vulgaris***

El crecimiento de los cultivos testigo y bioensayos se realizó a temperatura ambiente y bajo iluminación artificial (luz fría). Los ensayos se realizan por duplicado.

### **7.1.1 Curva de crecimiento del testigo**

La construcción de la curva de crecimiento testigo inicia con la inoculación de la especie en medio Bristol en condiciones estériles a partir de un cultivo sólido de *Chlorella vulgaris*. El crecimiento de la microalga se realizó mediante el monitoreo de los parámetros biomasa y absorbancia. En ambos métodos el cultivo fue previamente homogenizado por agitación.

**Determinación de absorbancia.** La absorbancia de cada cultivo fue medida mediante un espectrofotómetro UV-Visible Varian, Modelo CARY3E a una longitud de onda de 670 nm, máximo para las células que tienen clorofila.

**Determinación de biomasa.** La cantidad total de biomasa se obtuvo mediante el análisis gravimétrico de peso seco por unidad de volumen. Previo a la

determinación son centrifugados 10 mL del medio y el exceso de agua es retirado mediante decantación y evaporación.

### 7.1.2 Curva de crecimiento para los bioensayos

La curva de crecimiento de los bioensayos se construyó mediante la determinación de la biomasa de cada uno de los experimentos con microalgas a partir de la adición del acetato de amina. Todos los ensayos son independientes.

## 7.2 Bioensayos simples de degradación de aminas

La Tabla 5 presenta la relación de concentraciones y tiempo de exposición para cada uno de los estándares (acetatos de aminas) empleados en el estudio. En todos los casos, el volumen de alícuota del cultivo de partida es de 1.5 mL para un volumen final de 10 mL.

**Tabla 5. Relación de concentración y tiempo de exposición para los ensayos simples**

Ensayos simples		
Sustancia	Concentración (mg/L)	Tiempo (horas)
A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	1, 2, 3, 4
A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	5, 10, 15, 20, 25, 30
	5.0	6, 12, 24, 36, 48
A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	5, 10, 15, 20, 25, 30

Para cada nivel de concentración y tiempo de exposición se colocan los siguientes ensayos:

- a. **Blanco microalgas.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris*
- b. **Testigo de ácido acético.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y ácido acético en la misma concentración que el bioensayo.
- c. **Blanco de acetato de amina.** Disolución de acetato de amina en la misma concentración que el bioensayo que NO es sometida a las condiciones experimentales.
- d. **Testigo de acetato de amina.** Medio de cultivo estéril y acetato de amina bajo las mismas condiciones experimentales que el bioensayo.

- e. **Bioensayo.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y acetato de amina.
- f. **Duplicado (bioensayo).** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y acetato de amina.

### 7.3 Bioensayos mixtos de degradación de aminas

Las disoluciones de cada uno de los acetatos de amina fueron añadidas al medio para una concentración final de 2.1 mg/L (por amina), como lo presenta la Tabla 6. En cada uno de los ensayos el volumen de la alícuota del medio es de 1 mL mientras que el volumen final es de 10 mL

**Tabla 6. Relación de concentración y tiempo de exposición para los ensayos mixtos**

Ensayos mixtos		
Amina	Concentración (mg/L)	Tiempo (horas)
A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> - A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub>	2.1*	2, 4, 6, 8
A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> - A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub>	2.1*	3, 6, 9, 12

\*Concentración por acetato de amina

Cada tiempo de exposición consta de un lote con los siguientes experimentos:

- a. **Blanco microalgas.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris*
- b. **Testigo de ácido acético.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y ácido acético en la misma concentración que el bioensayo.
- c. **Blanco de acetato de amina.** Disolución de los acetatos de amina en la misma concentración que el bioensayo que NO es sometida a las condiciones experimentales.
- d. **Testigo de acetato de amina.** Medio de cultivo estéril y acetatos de amina bajo las mismas condiciones experimentales que el bioensayo.
- e. **Bioensayo.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y acetato de amina.
- f. **Duplicado (bioensayo).** Cultivo de *Chlorella vulgaris* y acetato de amina.

### 7.4 Bioensayos para caracterización

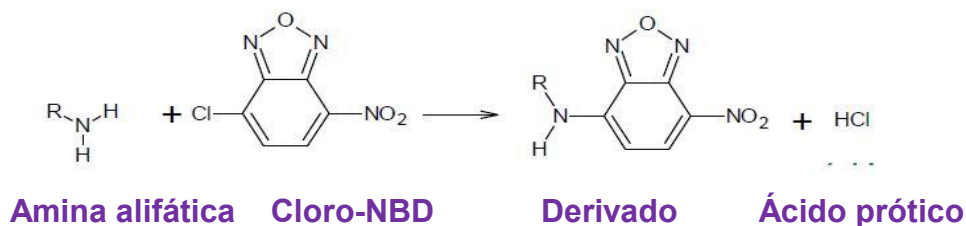
De los ensayos descritos en 7.3 se seleccionaron para cada amina el ensayo a mayor tiempo de exposición para su análisis mediante espectrometría de

masas por inducción directa. Además, cada uno de ellos se caracterizó mediante espectroscopia UV-Visible e infrarrojo.

## 7.5 Análisis por cromatografía de líquidos de alto rendimiento

### 7.5.1 Formación de derivados

El método empleado para la cuantificación de las aminas implica la formación de un derivado con 4-cloro-7-nitrobenzofurazan (Hao, Lwin, Buckard, & Woodcock, 2004). Esta reacción es necesaria debido a la baja absorptividad de las aminas en el espectro ultravioleta-visible. Para esta investigación y su precedente, el método expuesto por Hao ha sido modificado (Sosa, 2014). La reacción observada se presenta en la Figura 14.



**Figura 14. Reacción de derivatización de una amina alifática con Cl-NBD**

El procedimiento para la reacción de derivatización se presenta a continuación:

- Se calentó el dispositivo multibloques a 70°C por aproximadamente 10 minutos.
- En cada vial de 8 mL se depositaron 2 mL de los ensayos o estándares para luego adicionar 1.5 mL de una mezcla metanol-agua (50:50), 1 mL de derivatizante y 1.5 mL de una disolución de tetraborato de sodio a pH= 9.5 para un total de 6 mL.
- Posteriormente los viales se colocaron en el calentador multibloques y se calentaron a 70°C durante 60 minutos.
- Luego del tiempo determinado se retiraron las muestras de la fuente de calentamiento y se enfriaron a temperatura ambiente.
- Finalmente se ajustó el volumen a 6 mL con la mezcla MetOH-H<sub>2</sub>O.

## 7.5.2 Cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución

El análisis por cromatografía de líquidos de alto rendimiento se realizó bajo condiciones isocráticas, con una Columna Hypersil Gold C18 de 150x4.6 mm y un sistema de bombeo Waters 410 con un controlador Water Automated Gradient Controller acoplados a un detector de Ultravioleta-Visible, SpectraFocus de ThermoSeparationProducts, se detectó a 470 nm. La fase móvil es una mezcla ACN-H<sub>2</sub>O en proporción 85:15 a un pH=4.5. Se inyectó un volumen de 200µL.

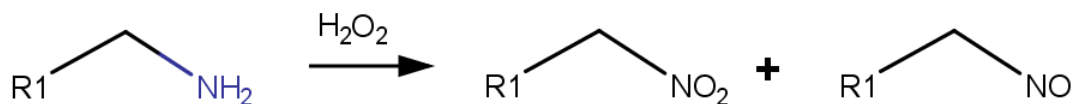
## 7.6 Caracterización de los productos de biodegradación

### 7.6.1 Confirmación de identidad de los productos

Un análisis previo (Sosa, 2014) propone como productos de oxidación un compuesto con un grupo carbonilo, posiblemente un aldehído, y otro con funcionalidad nitro. Con base en lo anterior, se realizó la síntesis de los derivados nitro cuya finalidad es ofrecer un punto de comparación entre éstos y el producto de degradación en los bioensayos.

#### 7.6.1.1 Oxidación de las aminas primarias con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La síntesis de los derivados nitro a partir de los estándares de aminas se basa en el método propuesto por Hoh y colaboradores (Hoh & D. O. Barlow, 1963) que ha sido modificado para fines de la investigación contemplando que en las aminas primarias el aminóxido sufre una posterior oxidación al compuesto nitro. La reacción observada es la siguiente:



**Figura 15. Reacción de oxidación con agua oxigenada de aminas primarias**



Mientras que el procedimiento se describe a continuación:

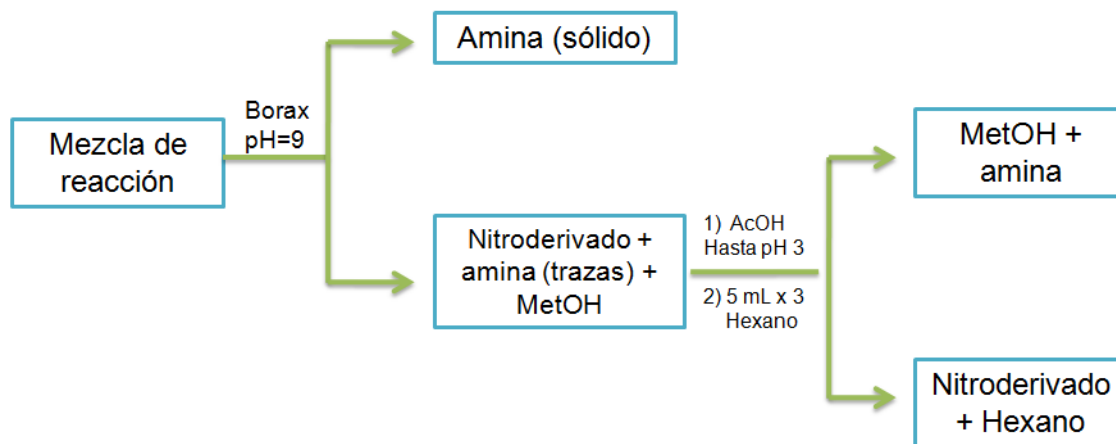
- a. Se pesaron las cantidades presentadas en la Tabla 7 y se disolvieron en 50 mL de metanol.
- b. La disolución se llevó a 60°C en una parrilla con agitación magnética. Al llegar a esta temperatura se añadieron gota a gota 10 mL de agua oxigenada al 35 % en un intervalo de una hora.
- c. Al terminar, la mezcla se calentó a 70°C durante una hora, procurando mantener el volumen constante con la adición de MetOH.
- d. Posterior al tiempo de reacción, la mezcla se retiró de la fuente de calentamiento para dejar enfriar a temperatura ambiente.

**Tabla 7. Cantidad de amina empleada en la oxidación**

<b>Amina</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Octilamina</b>	5.00mL
<b>Dodecilamina</b>	5.82 g
<b>Tetradecilamina</b>	1.48 g

#### **7.6.1.2 Extracción del nitro derivado**

De acuerdo a la literatura, dos de los derivados son líquidos con excepción del nitrooctano, no obstante, este compuesto presenta una temperatura de fusión a 15°C por lo que a temperatura ambiente se presenta como un líquido. La separación de los mismos de la mezcla de reacción se realiza de acuerdo a lo mostrado en la Figura 16. Al finalizar el proceso de extracción se elimina el excedente de agua con sulfato de sodio anhidro.



**Figura 16. Diagrama de purificación del nitroderivado**

### **7.6.2 Caracterización por espectroscopia de infrarroja con transformada de Fourier**

Los espectros de estándares, muestras y productos de oxidación con agua oxigenada se obtuvieron mediante un equipo de Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) de Thermo-Nicolet Modelo 1510. Película sobre celda de ATR.

Los bioensayos utilizados con este fin poseen un tiempo de exposición de 48 horas, cuya finalidad es obtener la mayor cantidad posible de producto. Ninguno de estos experimentos se analizó mediante CLAR.

### **7.6.3 Caracterización mediante espectrometría de masas por inducción directa (MS-ESI)**

Los espectros de masas de los productos de degradación en los bioensayos se obtuvieron en un equipo AdvionExpresion S, por introducción directa a una fuente de ionización ESI. Flujo de disolvente (acetonitrilo o metanol) de 0.2 mL/min.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensayo exploratorio de bioexposición al agente flotación *Flotasil* sugiere que *Chlorella vulgaris* es capaz de asimilarlo de manera positiva. La caracterización del agente muestra que cerca del 50% del mismo corresponde a una mezcla de eteraminas, en cuya composición destacan isómeros de dodecilamina (85.57%) seguido de isómeros de decilamina (8.18%), octilamina (3.00%) y tetradecilamina (2.55%)(Sosa, 2014). A partir de la información anterior se seleccionaron las aminas de ocho, doce y catorce carbonos para los ensayos en *Chlorella vulgaris*. Antes de la adición los estándares son neutralizados al 50% con ácido acético 1 M.

Las aminas son agregadas al medio de cultivo como un sustituto de proteosa-peptona, una fuente de nitrógeno importante. En un ensayo exploratorio, el agente de flotación fue adicionado en una concentración final de 5 mg/L de donde 2.1 mg/L corresponden a la amina de doce carbonos. Con base en lo anterior se establecieron dos concentraciones para los bioensayos con acetato de dodecilamina; 2.1 mg/L y 5 mg/L, mientras que los ensayos con octil y tetradecilamina se realizaron a una sola concentración de 2.1 mg/L. Todos los bioensayos en función del tiempo son individuales.

El presente apartado analiza los bioensayos desde dos perspectivas: La primera de ella presenta el efecto de la amina sobre la microalga determinado por la alteración de los parámetros de crecimiento. Mientras que la segunda examina el cambio en la concentración de la amina cuando la microalga actúa sobre ella. Por su parte, se muestra la caracterización de los posibles productos de degradación y la comparación con sus derivados nitro.

## 8. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO DE *Chlorella vulgaris*

### 8.1 Crecimiento de *Chlorella vulgaris*

La Figura 17 muestra las curvas de crecimiento del cultivo control en ausencia (arriba) y presencia (abajo) de proteosa-peptona, fuente de nitrógeno para algas de la especie *Chlorella vulgaris*.

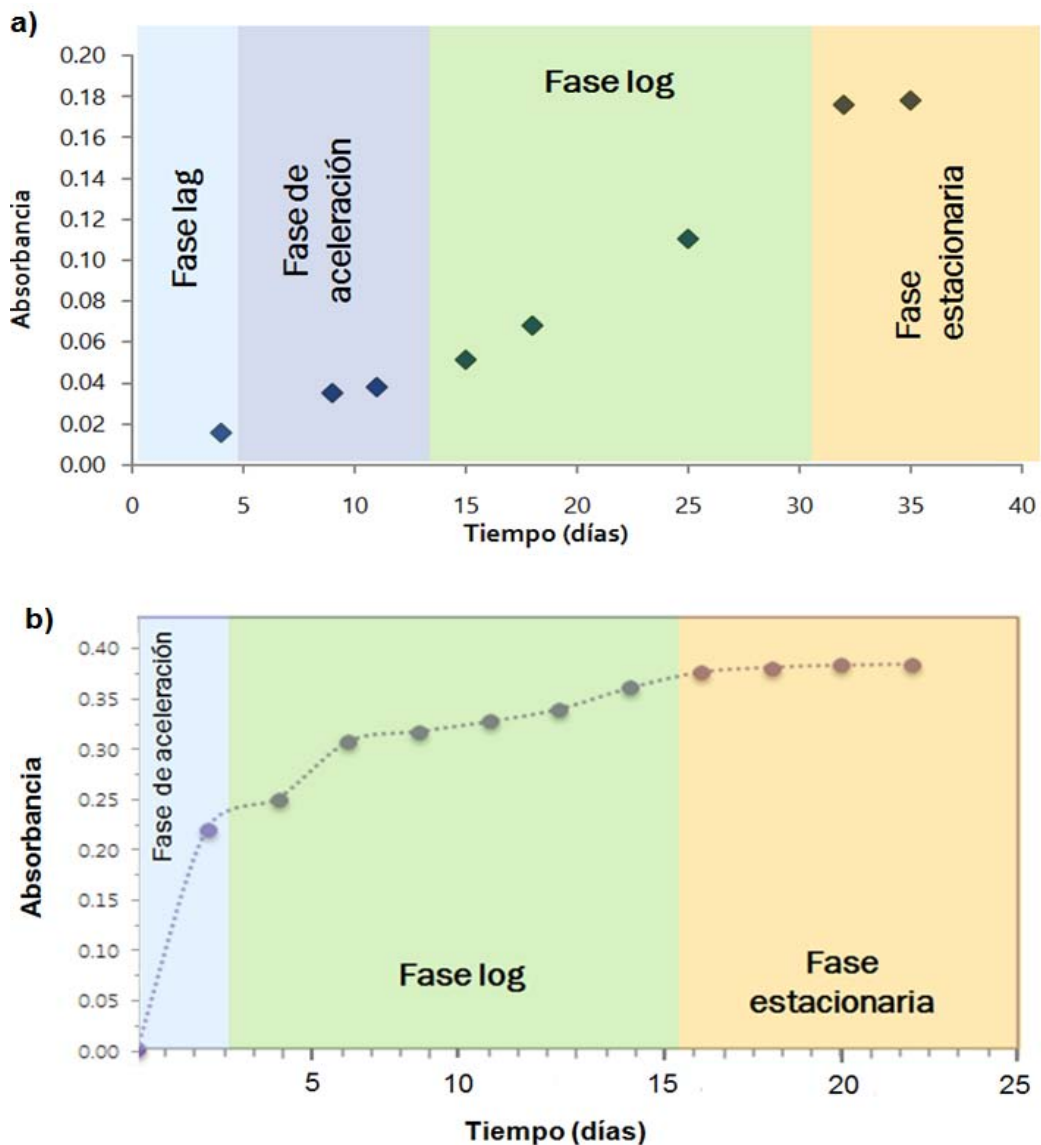


Figura 17. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en a) ausencia y b) presencia de proteosa peptona

Bajo un régimen típico, un cultivo homogéneo en un sistema cerrado, el suministro de alimentos es limitado y el crecimiento de las algas presenta diferentes fases en función de la reacción de la población de algas a los cambios de las condiciones del ambiente y dependen de la inoculación, la concentración de nutrimentos, intensidad de luz y temperatura (Becker, 1995).

Respecto a lo anterior, el crecimiento en ausencia de proteosa peptona muestra un avance lento en función del tiempo comparado con el cultivo que cuenta con dicha fuente. Sin embargo, en ambos cultivos, que se siguen a partir de la inoculación de la especie, se observan las principales fases de crecimiento descritas a continuación.

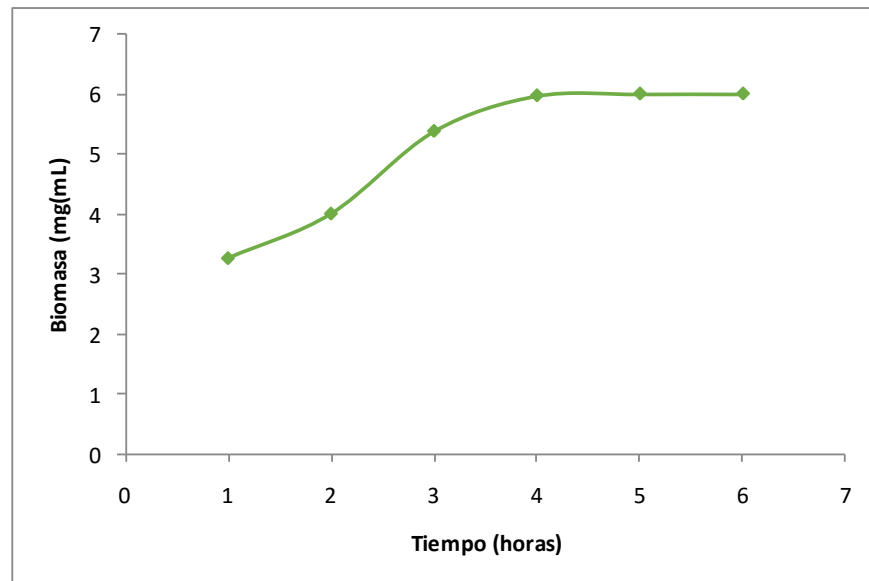
Tras la inoculación, las células requieren de una fase de adaptación a las nuevas condiciones del sistema, dicho intervalo es conocido como *fase lag*. En la figura anterior se aprecia que en ambos cultivos, *Chlorella vulgaris* posee una fase de adaptación inferior a 5 días. Durante este tiempo la microalga se ajusta a la composición del nuevo medio y en consecuencia la velocidad de crecimiento es significativamente baja comparada a las fases posteriores. Las siguientes dos fases corresponden al aumento exponencial de la densidad poblacional de la microalga que avanza hasta aproximadamente a los treinta días para el primer cultivo (sin proteosa) y cerca de los quince días para el segundo. Durante la *fase de aceleración de crecimiento* las células comienzan a dividirse en función de la cantidad de nutrimentos en el medio, mientras que en la *fase log* las células se dividen a una velocidad determinada por la naturaleza de la microalga y el cultivo.

Finalmente la *fase estacionaria* se presenta a los 32 días para el primero y a partir de los 15 para el segundo. Durante esta etapa el número de células que se han dividido en el cultivo impide que todas reciban la misma cantidad de luz, por lo que aunado a la limitación de los nutrimentos del cultivo y la acumulación de residuos tóxicos la velocidad de crecimiento se reduce. En esta fase la respiración celular juega un papel importante (Brock, et al. 2004) puesto que la degradación

oxidativa de las sustancias sintetizadas evita el incremento celular y se establece un equilibrio entre el proceso de división y de muerte debido a la degradación. En consecuencia, la biomasa permanece constante en función del tiempo. **Todos los cultivos** empleados en los bioensayos **se encuentran en fase estacionaria** por lo que el cambio en la biomasa de *Chlorella vulgaris* depende únicamente del efecto de la adición de los agentes externos.

### 8.1.1 Parámetros de crecimiento para el cultivo testigo

La fase logarítmica permite, mediante un ajuste matemático (Anexo II), determinar la tasa de crecimiento del cultivo, parámetro que se expresa como el incremento del número de células en un determinado tiempo con unidades de  $h^{-1}$ , (Pumarola, *et al.* 1999). La Figura 18 muestra la **fase logarítmica y estacionaria** de la curva de crecimiento de un cultivo libre de proteasa monitoreado por horas.



**Figura 18. Biomasa de un cultivo sin exponer en función del tiempo**

Para el **cultivo líquido testigo** analizado se encuentra una tasa de crecimiento de 0.070 células por hora ( $h^{-1}$ ) y un tiempo de generación (tiempo necesario para que una célula se divida y su población se duplique (Tortora, *et al.* 2007) de 9.90 horas. Estos parámetros son comparados posteriormente con los obtenidos en los ensayos de exposición de aminos. Con este fin, **todos los**

**experimentos son monitoreados mediante** la determinación de la **biomasa** del cultivo en función del tiempo.

## **8.2 Crecimiento en ensayos simples con aminos**

Antes de estudiar la variación de biomasa debido a la adición de los acetatos de aminos es importante identificar si el ácido acético por sí sólo es capaz de alterar el número de células en el medio. Los resultados se muestran a continuación.

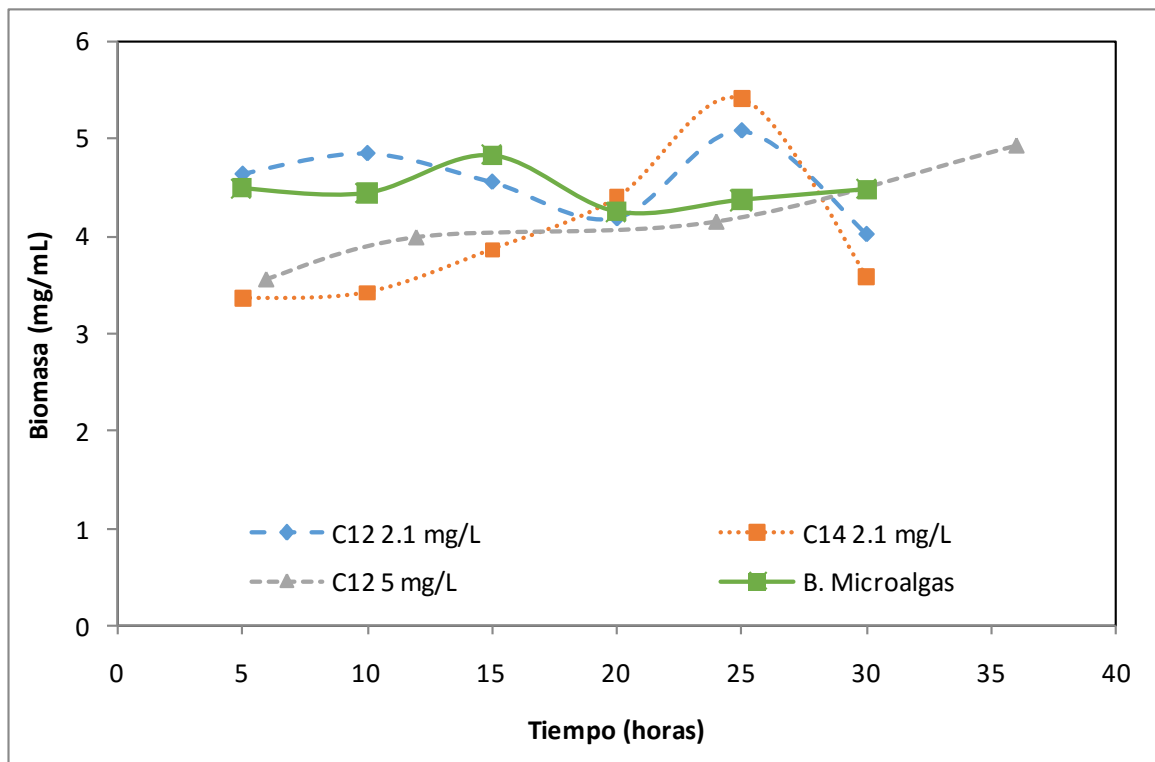
### **8.2.1 Efecto de la adición de ácido acético a *Chlorella vulgaris***

La acidez o basicidad del medio es un parámetro importante para el crecimiento celular por lo que su variación en los ensayos de biodegradación debe ser monitoreado (Gulnaz & Dincer, 2009). Mientras las aminos poseen un carácter básico, que resulta tóxico para la microalga, los estándares neutralizados al 50% presentan valores cercanos a pH 5.0. Cuando los acetatos son agregados y a lo largo del experimento el valor se mantiene alrededor de 6.5, como consecuencia del sistema amortiguado (fosfatos) del medio de cultivo. Con base a lo anterior, se añade ácido acético, en la misma proporción que en los bioensayos, con el objetivo de verificar si el cambio de biomasa se debe a las variaciones de pH que éste provoca o bien al acetato de amina que se añade.

La Figura 19 detalla el cambio de la biomasa en función del tiempo del control y los blancos con ácido acético en la misma concentración que el bioensayo, se omite el ensayo de octilamina debido al corto periodo de exposición.

Comparado con el blanco de microalgas, no se aprecian diferencias significativas debidas a la adición de ácido acético a excepción de aquellas debidas al número desigual de células depositadas en los ensayos. Por lo anterior, se deduce que todos los cambios de biomasa en los bioensayos se deben únicamente a la acción de la amina.

Por otro lado, en la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* como suplemento alimenticio, es común el uso de ácido acético como fuente de carbono (Becker, 1995). Este comportamiento no se observa debido a la baja concentración en que se añadió, sin embargo, plantea la posibilidad de usar dicha sustancia como suministro de nutrientes cuando en los bioensayos el número de células decrece. La adición a este tiempo y el posterior aprovechamiento del ácido permitiría a la población mantenerse constante aún en presencia de las sales de aminas.



**Figura 19. Cambio en la biomasa en los ensayos con ácido acético en función del tiempo**

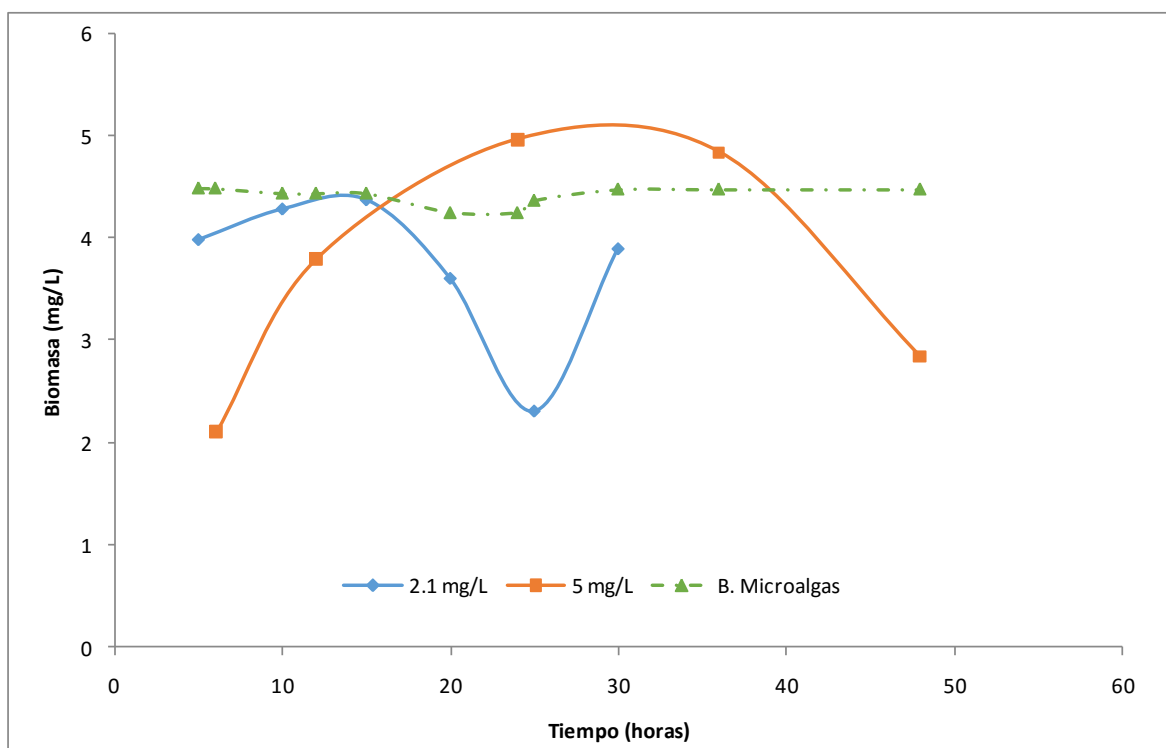
De este experimento se obtiene que a la concentración de los bioensayos, el ácido acético no interviene en los procesos de crecimiento.



## 8.2.2 Bioensayos con acetato de dodecilamina(A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>)

Dado el interés en conocer el efecto del componente en mayor proporción en el agente de flotación, se examinan dos niveles de concentración para la amina de doce carbonos. La

Figura 20 muestra el cambio en la biomasa del blanco de microalgas en fase estacionaria (**B. Microalgas**) y el promedio de los cultivos expuestos (bioensayo y duplicado) para los dos niveles de concentración; **2.1 y 5 mg/L**.



**Figura 20. Cambio de biomasa para los testigos y los cultivos expuestos a A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/L y 5 mg/L en función del tiempo**

Si bien el volumen de alícuota del cultivo de partida es el mismo para todos los casos, las condiciones experimentales no aseguran una distribución uniforme del número de células depositadas por lo que la biomasa inicial es distinta para cada experimento. Por otro lado, las etapas de crecimiento para los cultivos expuestos a A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> se observan a los periodos de tiempo presentados en la Tabla 8.

**Tabla 8. Etapas de crecimiento para los cultivos expuestos a A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>**

Fase	Tiempo (horas)	
	2.1 mg/L	5 mg/L
Lag	< 5	< 6
Exponencial	5 - 15	6 - 24
Muerte	>15	>24

De acuerdo a los datos anteriores, ambos cultivos (originalmente en **fase estacionaria**) muestran un corto periodo de adaptación seguido de un aumento importante de biomasa, efecto que difiere con el blanco de microalgas cuya biomasa se mantiene constante a lo largo del tiempo. Dado que en fase estacionaria la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte celular, el valor obtenido indica que el aumento de células es capaz de superar las pérdidas por degradación. Este comportamiento concuerda con la capacidad algunas especies de algas para captar fuentes de carbono orgánico (El-Sheekh, *et al.* 2013).

La Tabla 9 muestra los parámetros de crecimiento para los cultivos expuestos y el testigo de microalgas (sección 8.1.1).

**Tabla 9. Parámetros de crecimiento del testigo y los cultivos expuestos a A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>**

Cultivo	Concentración de amina (mg/L)	Tasa de crecimiento (horas <sup>-1</sup> )	Tiempo de generación (horas)
Testigo	0.0	0.070	9.90
A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	0.020	34.66
A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub>	5.0	0.043	16.12

Comparado con el testigo en ausencia de proteosa (sección 8.1.1), es evidente una diferencia en el crecimiento de la microalga. Dicho efecto ha sido observado en diversas especies de microalgas (Blanck, 1985) y se explica mediante la inhibición de fotosíntesis y fijación del nitrógeno tras la adición de

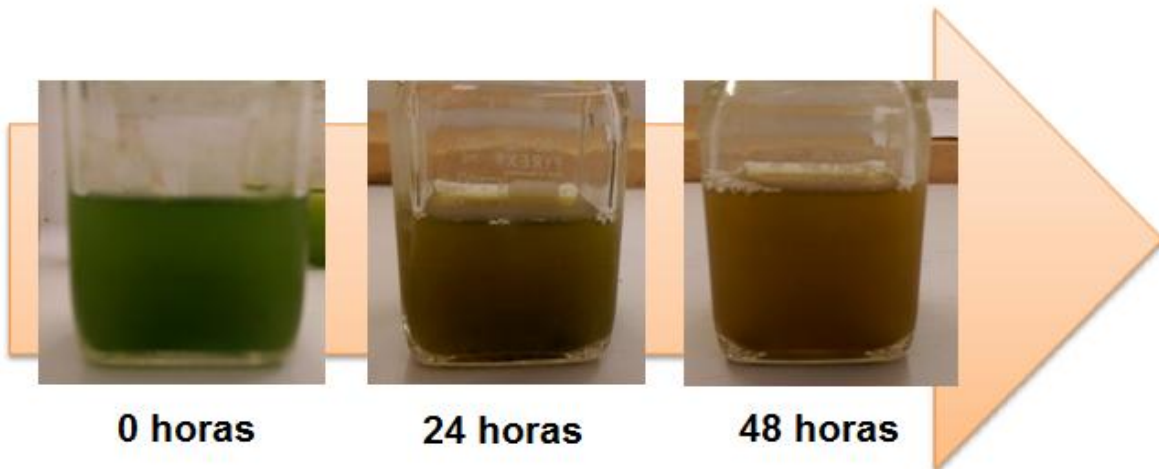
aminas empleadas en procesos de extracción (Crist, *et al.* 1992). Estudios con la bacteria *Bacillus polymyxa* (Chockalingam, *et al.* 2003) han mostrado una respuesta positiva a la adición de acetato de dodecilamina con una fase lag de 3 horas, similar a lo encontrado en el experimento, y una fase estacionaria establecida después de 6 horas de exposición. Por otro lado, se observa una relación en la tasa de crecimiento de ambos bioensayos cuyo detalle se aborda en la sección 8.3.

Posterior a 15 horas de exposición para el cultivo a 2.1 mg/L y a 24 horas para el cultivo con 5.0 mg/L de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>, la biomasa de los cultivos disminuye, comportamiento que es interpretado como un proceso de muerte celular debido a la probable intoxicación de la microalga o incluso del probable producto de degradación. Sin embargo, en el caso del cultivo expuesto a 2.1 mg/L muestra un aumento repentino tras 30 horas de exposición que indica una posible recuperación después de la adición del agente, este patrón ha sido observado en la exposición de *Chlorella vulgaris* al pesticida isoproturon, que en concentraciones altas inhibe del crecimiento seguido de un leve aumento de células (Rioboo, *et al.* 2003).

Los datos anteriores establecen la capacidad de *Chlorella vulgaris* para asimilar el A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>, sin embargo, comparado con el testigo (sección 8.1.1), el crecimiento en presencia de este agente muestra un inhibición importante además de una fase de muerte temprana.

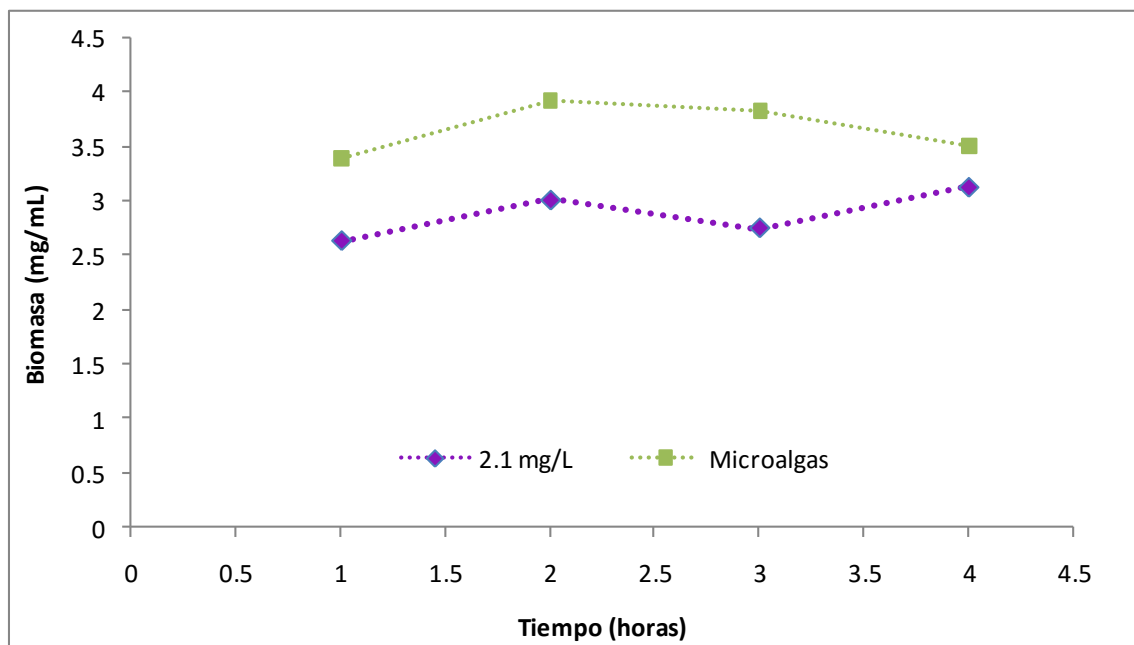
### **8.2.3 Bioensayos con acetato de octilamina (A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub>)**

El ensayo **visual** con octilamina mostró una baja capacidad de *Chlorella vulgaris* para responder ante la toxicidad de la amina. Dicho experimento de exposición únicamente consistió en observar el cambio de color de la microalga tras la adición de la amina. El cultivo sano y luego de 24 y 48 horas de exposición a octilamina se observa en la Figura 21.



**Figura 21. Ensayo visual de exposición a octilamina**

Ante lo anterior y debido a la baja concentración de octilamina en el agente de flotación, se planteó un ensayo de tan sólo cuatro horas de exposición con un sólo nivel de concentración de acetato de octilamina ( $A-C_8NH_2$ ). La Figura 22 expone la biomasa en función del tiempo para el ensayo (por duplicado) con  $A-C_8NH_2$  y el blanco microalgas.



**Figura 22. Biomasa promedio del cultivo en función del tiempo tras la adición de acetato de octilamina 2.1 mg/L**

De nueva cuenta, aunque el volumen de alícuota es la misma, el número de células depositadas en cada experimento es diferente. Dada la brevedad del bioensayo lo ilustrado corresponde a la fase lag o de adaptación a la nueva composición del medio de cultivo (no observado en los bioensayos anteriores) donde la tasa de crecimiento es mínima y la biomasa permanece relativamente constante, limitada únicamente por la cantidad de células preexistentes a la adición de acetato de octilamina. Sin embargo, en los tres últimos puntos se observa un leve aumento de biomasa, conducta que también es observada en el blanco por lo que no se considera como fase exponencial. Por lo anterior, no es posible determinar los parámetros de tasa de crecimiento y tiempo de generación.

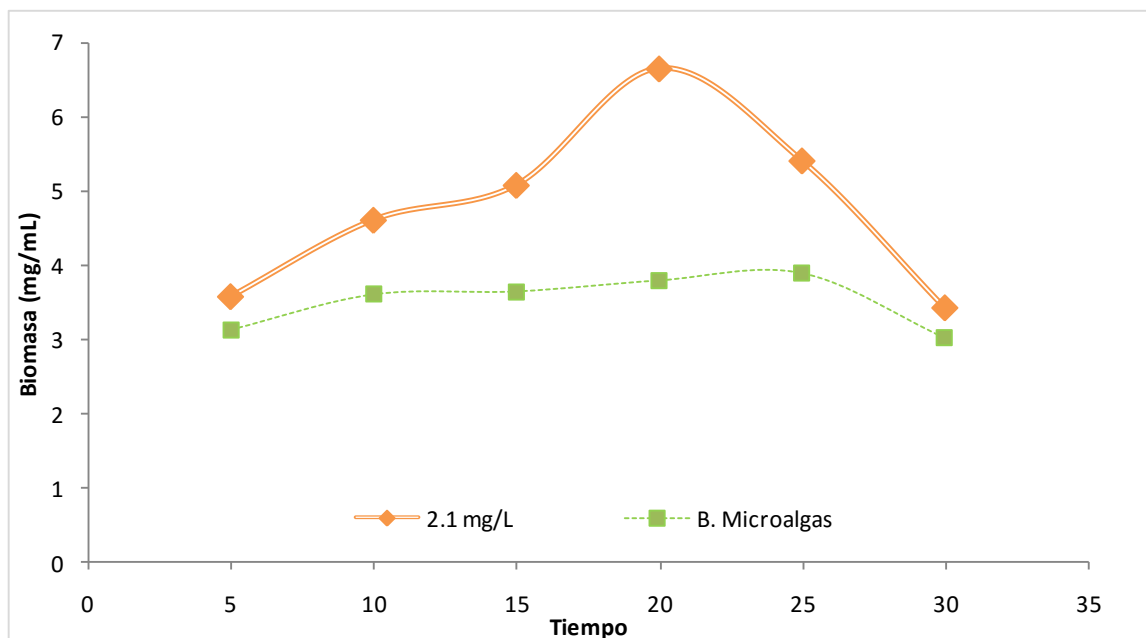
Aunque la amina de ocho carbonos resultanociva para la microalga, su sal presenta un menor daño. En general, las aminas alifáticas tienen valores de LD<sub>50</sub> perjudiciales para la salud (oral rata 200mg/kg para C<sub>8</sub>) no obstante, después de su neutralización la toxicidad disminuye notablemente (LD<sub>50</sub> oral rata 1600 mg/kg para A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub>), esto supone que la toxicidad de las aminas se debe principalmente a la basicidad de las mismas (Greim,*et al.* 1998).

Además, comparado con dodecilamina, la amina de ocho carbonos presenta una mayor toxicidad, con valores de LD<sub>50</sub> de 1020 mg/kg para la primera y de 200 mg/kg para la segunda.

De lo anterior, se deduce que la microalga únicamente responde de manera favorable a los agentes menos nocivos, sin embargo, la toxicidad de los mismos puede modificarse mediante su neutralización (cambio a pH ligeramente ácido).

#### **8.2.4 Bioensayos con acetato de tetradecilamina (A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>)**

Dada la baja concentración de tetradecilamina en el agente de flotación únicamente se estableció una concentración de 2.1 mg/L para los ensayos con *Chlorella vulgaris*. El cambio de la biomasa para el blanco de microalgas del experimento y el promedio de los cultivos tras la adición de acetato de tetradecilamina (A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>) se expone la Figura 23.



**Figura 23. Patrón del cambio de biomasa para el blanco microalgas y los cultivos expuestos a A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/L**

Similar a lo observado en los ensayos con acetato de dodecilamina, los cultivos expuestos a la sal de la amina de catorce carbonos muestran un aumento significativo en la biomasa luego de una breve fase de adaptación. Los parámetros de crecimiento del promedio de los bioensayos y el testigo (sección 8.1.1) se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Parámetros de crecimiento del testigo y los cultivos expuestos a A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>**

Cultivo	Concentración de amina (mg/L)	Tasa de crecimiento (horas <sup>-1</sup> )	Tiempo de generación (horas)
Testigo	0.0	0.070	9.90
A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	0.039	17.77

Aunque existe un aumento en la biomasa tras las primeras horas de exposición, comparado con el testigo en ausencia de proteosa (sección 8.1.1), el cultivo expone la inhibición del crecimiento de *Chlorella vulgaris*, por lo que este agente también resulta perjudicial para su desarrollo. Además, se observa una fase de muerte temprana a partir del cuarto ensayo (tras 20 horas de exposición).

Por otro lado, si bien el A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> inhibe el crecimiento, los parámetros de crecimiento, comparados con los obtenidos con el acetato de dodecilamina, muestran una respuesta favorable al cambio de amina, este tema se aborda en la sección 8.4.

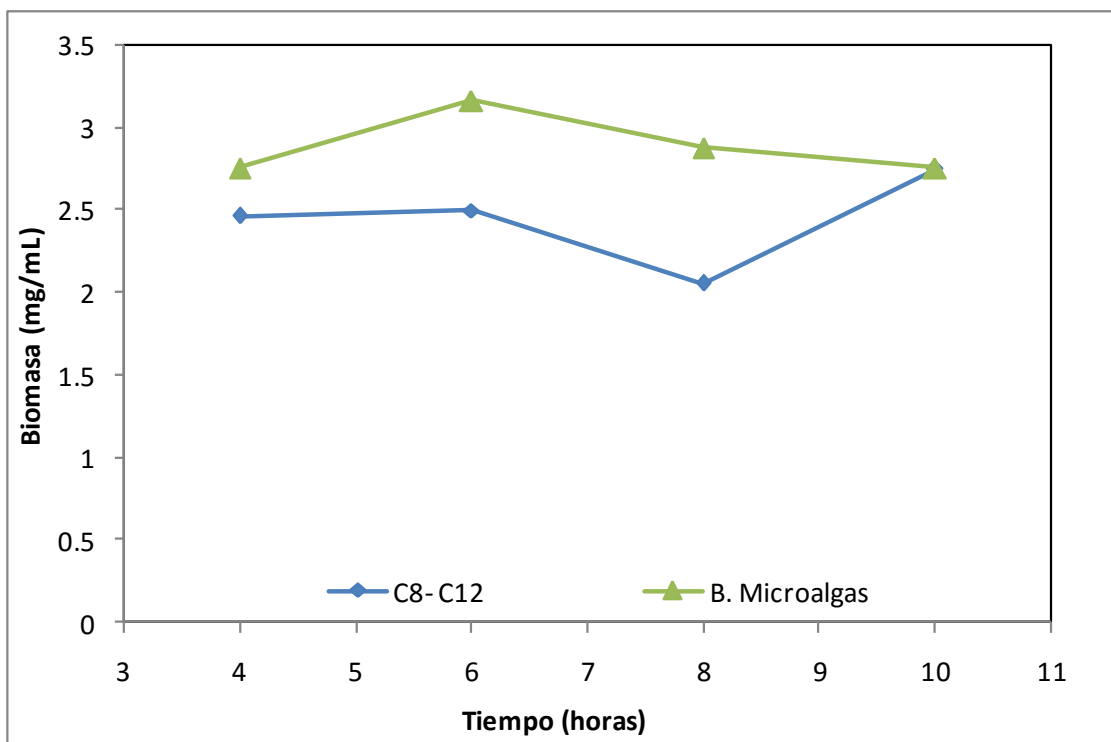
### **8.3 Crecimiento en ensayos mixtos con aminas**

Con base en los resultados obtenidos de los ensayos simples, se efectúan dos experimentos de selectividad con C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub>-C<sub>12</sub>. Los anteriores se realizan con la finalidad de identificar cambios en el comportamiento de *Chlorella vulgaris* cuando los acetatos de amina son parte de una mezcla. En todos los casos, cada una de las sales de amina se encuentran en una **concentración de 2.1 mg/L**. Los bioensayos se realizaron por un corto periodo de tiempo dictado por los experimentos exploratorios y los datos anteriores.

#### **8.3.1 Bioensayos con acetato de octil y dodecilamina (A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>)**

Algunos estudios sugieren que las mezclas de aminas pueden ser más tóxicas que los ensayos individuales (Blanck, 1985), por lo anterior y debido a la baja capacidad de *Chlorella vulgaris* para responder a la adición de octilamina se plantea un ensayo a pocas horas. La Figura 24 presenta el cambio en la biomasa en función del tiempo para el promedio de los ensayos, el control de microalgas y el testigo de ácido acético.

Si bien la amina de doce carbonos ha demostrado ser un agente que promueve el crecimiento, el ensayo no muestra cambios significativos de biomasa en función del tiempo. La constancia del número de células a lo largo del experimento, se muestra como una extensión de la fase de aclimatación a las condiciones del nuevo medio, cuya composición ralentiza su adaptación, comparado con ensayos simples donde la fase lag dura abarca sólo las primeras 5 horas, debido a la toxicidad de las aminas aún neutralizadas.



**Figura 24. Cambio en la biomasa de *Chlorella vulgaris* para el blanco de microalgas y el promedio de los bioensayos de selectividad con acetato de octil y dodecilamina**

### **8.3.2 Bioensayos con acetato de dodecil y tetradecilamina(A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>)**

La Figura 25 expone el cambio en la biomasa para el blanco de microalgas (del experimento) y el promedio de los bioensayos en contacto con acetato de dodecil y tetradecilamina.

La adición de A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> produce una disminución repentina de la biomasa, efecto que respalda el aumento de toxicidad cuando las aminas se encuentran en una mezcla. No obstante, a partir las 6 horas de exposición se observa un aumento de biomasa, traducida como fase exponencial, de donde se obtienen los parámetros de crecimiento presentados en la Tabla 11.



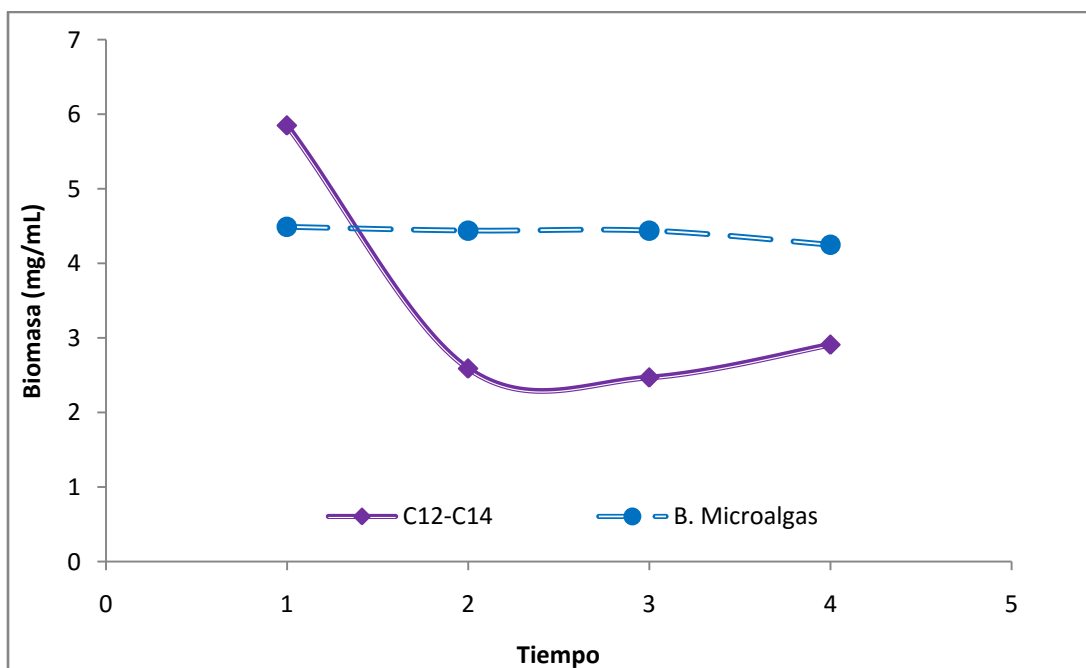


Figura 25. Patrón de cambio en la biomasa de *Chlorella vulgaris* para el blanco microalgas y el promedio del ensayo de selectividad con acetato de dodecil y tetradecilamina

**Tabla 11. Parámetros de crecimiento del testigo y los cultivos expuestos a A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>**

Cultivo	Concentración de amina (mg/L)	Tasa de crecimiento (horas <sup>-1</sup> )	Tiempo de generación (horas)
Testigo	0.0	0.070	9.90
A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> + A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub>	2.1*	0.053	13.07

\* Concentración por amina

Los valores del bioensayo aún muestran una inhibición del crecimiento de la microalga, sin embargo, se acercan a los obtenidos en el testigo. Este detalle se discute en una sección posterior.

## 8.4 Resumen de ensayos simples y mixtos

La Tabla 12 expone los valores de tasa de crecimiento y tiempos de generación para el testigo y los bioensayos simples y mixtos con acetato de

dodecil y tetradecilamina. Debido al corto tiempo de exposición, consecuencia de su alta toxicidad, no se incluyen datos de los ensayos con acetato de octilamina.

**Tabla 12. Tasa de crecimiento y tiempo de generación del testigo y los bioensayos**

Cultivo	Concentración de amina (mg/L)	Tasa de crecimiento (horas <sup>-1</sup> )	Tiempo de generación (horas)
<b>Testigo (sección 8.1.1)</b>	0.0	0.070	9.90
<b>A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub></b>	2.1	0.020	34.66
	5.0	0.043	16.12
<b>A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub></b>	2.1	0.039	17.77
<b>A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>+ A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub></b>	2.1*	0.053	13.07

\* Concentración por amina

De los datos anteriores, se observa que el tiempo de generación del testigo es inferior a los obtenidos en presencia del acetato de amina, por lo que el microorganismo requiere mayor tiempo para duplicar su población. Además, la *tasa de crecimiento* del testigo es superior a todos los bioensayos, dicho efecto se traduce como una inhibición del desarrollo de la microalga. Sin embargo, aún bajo las condiciones de exposición, *Chlorella vulgaris* es capaz de reproducirse, aunque a un ritmo más lento, puesto que todos los cultivos, originalmente fase estacionaria, muestran un incremento en el número de células tras la adición de los acetatos correspondientes.

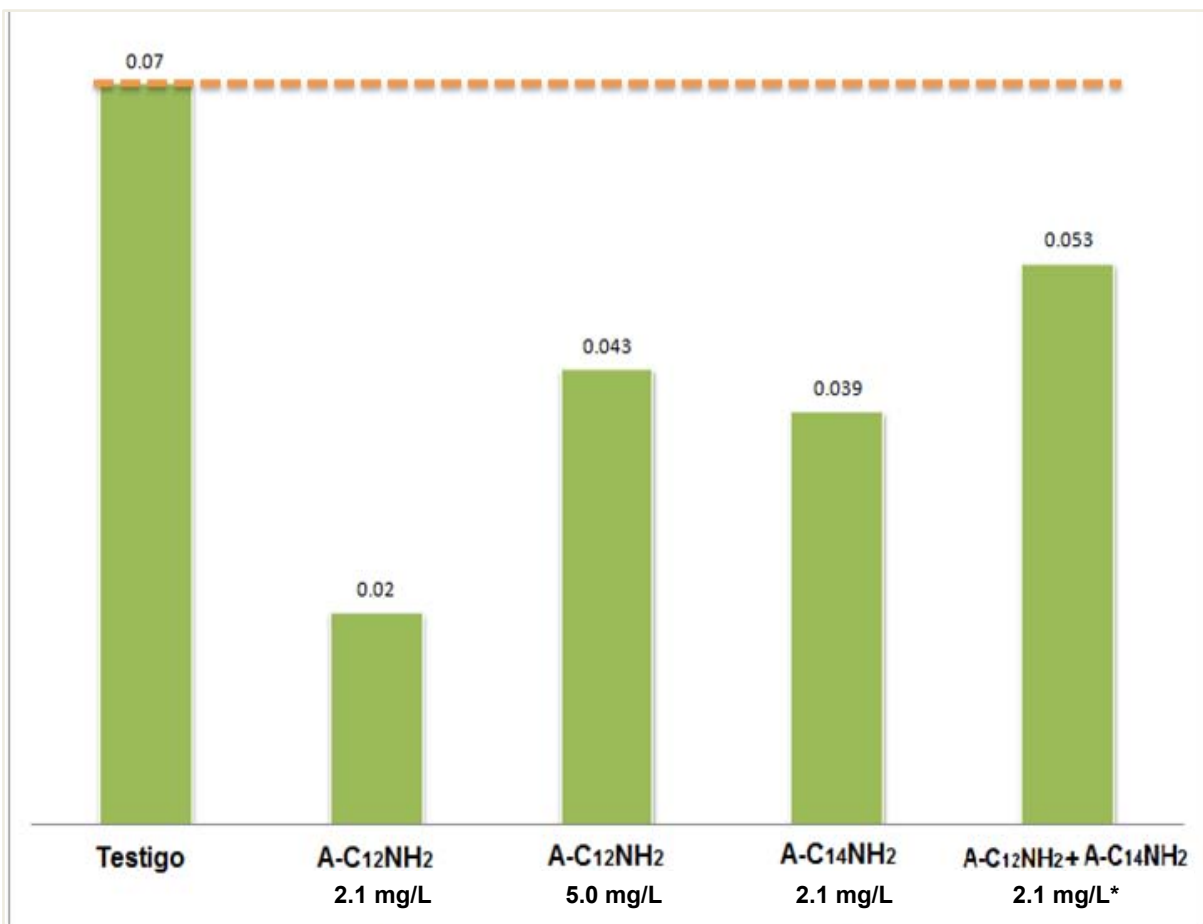
Lo anterior es consecuencia de la ausencia de proteosa-peptona en el medio, condición que obliga a la especie a consumir las sales de aminas como fuente de carbono y nitrógeno. Estudios similares con bacterias, bajo la ausencia de sacarosa (fuente de carbono), muestran que éstas optan por consumir agentes de flotación como sustitutos para su nutrición (Deo & Natarajan, 1998). Por su parte, las microalgas poseen la habilidad para producir biomasa mediante dos tipos de mecanismo; autótrofo, *absorción de luz y carbono inorgánico disuelto* y heterotrófico, *absorción de carbono orgánico disuelto* (Lika & Papadakis, 2009).

Esta característica permite el aumento de células como respuesta a la suma de los nutrientes en el medio de cultivo y las sales añadidas, aun cuando éstas causen un efecto negativo a través del tiempo.

Pérez y colaboradores han informado que *Chlorella vulgaris* bajo un régimen heterótrofo desarrolla poblaciones más grandes y tasas de crecimiento más altas que bajo el régimen autótrofo (Perez, *et al.* 2010). En ausencia de proteosa el régimen es autótrofo, sin embargo, cuando se adicionan las sales de aminas, ocurren los dos procesos pero en mayor medida el heterótrofo. No obstante, debido a la toxicidad de los agentes añadidos no es posible observar una población más grande.

Adicionalmente, en la degradación de compuestos fenólicos por microalgas se ha observado que los productos de biodegradación también contribuyen al crecimiento (Papazi & Kotzabasis, 2007), así la fase de declinación observada en la mayoría de los ensayos es resultado de los desechos acumulados debido al proceso natural de crecimiento y probablemente los productos de degradación.

Por otro lado, los datos de tasa de crecimiento, ilustrados para una mejor comprensión en la Figura 26, muestran que la velocidad de reproducción en el ensayo de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>a 2.1 mg/L es prácticamente la mitad de la tasa del cultivo a 5.0 mg/L. Este hecho es consecuencia de la cantidad de amina añadida, puesto que una disponibilidad superior de fuente de carbono en el medio permite al microorganismo crecer a un mayor ritmo. Una reacción similar es observada al comparar los ensayos simples A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>a la misma concentración de 2.1 mg/L, ya que el aumento del carbonos en el compuesto permite favorece el crecimiento del microorganismo.



**Figura 26. Tasa de crecimiento del testigo (sección 8.1.1) y los bioensayos**

Por su parte, la tasa de crecimiento del ensayo mixto A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>, A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> es similar a la presentada por el acetato de dodecilamina cuando su concentración es de 5.0 mg/L. De nueva cuenta, como consecuencia de la disponibilidad de carbono y nitrógeno en el medio cuando ambas sales son añadidas, cuya composición es similar al segundo nivel de concentración de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>. Un mayor tiempo de exposición nos permitiría discernir si la combinación de aminas inhibe el crecimiento de la misma forma que en ensayos simples.

## 9. BIODEGRADACIÓN DE AMINAS POR *Chlorella Vulgaris*

### 9.1 Ensayos simples de biodegradación por *Chlorella vulgaris*

#### 9.1.1 Bioensayos con acetato de dodecilamina (A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>)

Los bioensayos de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/L se realizaron por un periodo de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 horas, mientras que el ensayo a concentración 5.0 mg/L se monitoreó durante las 6, 12, 24, 36 y 48 horas de exposición. La

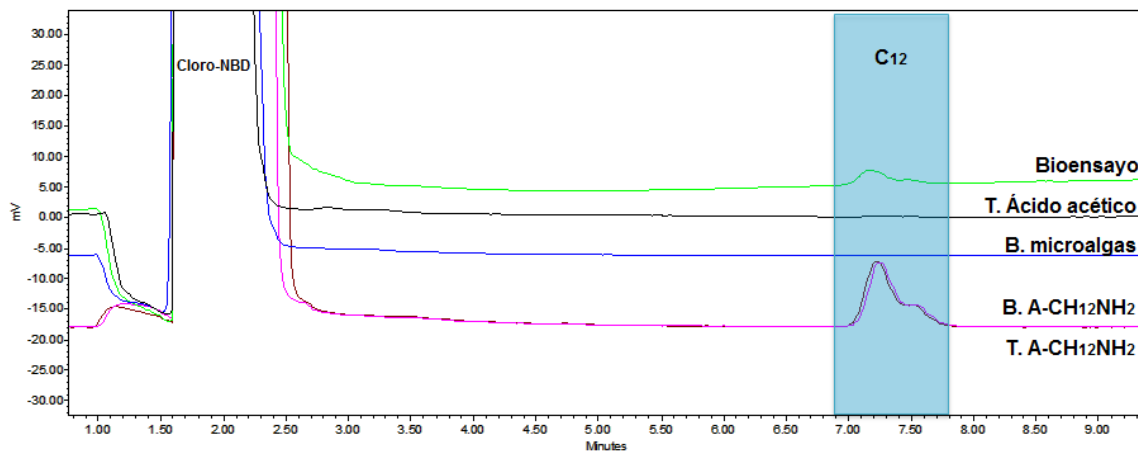
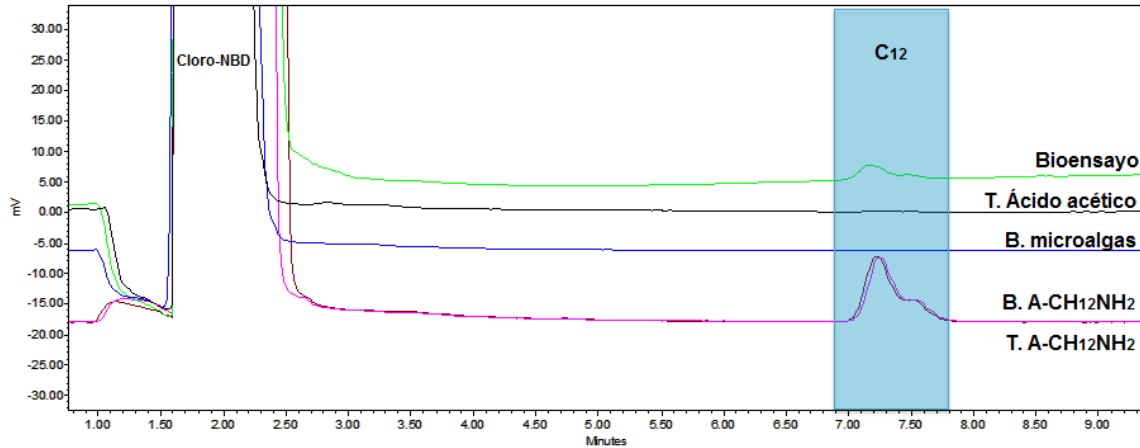


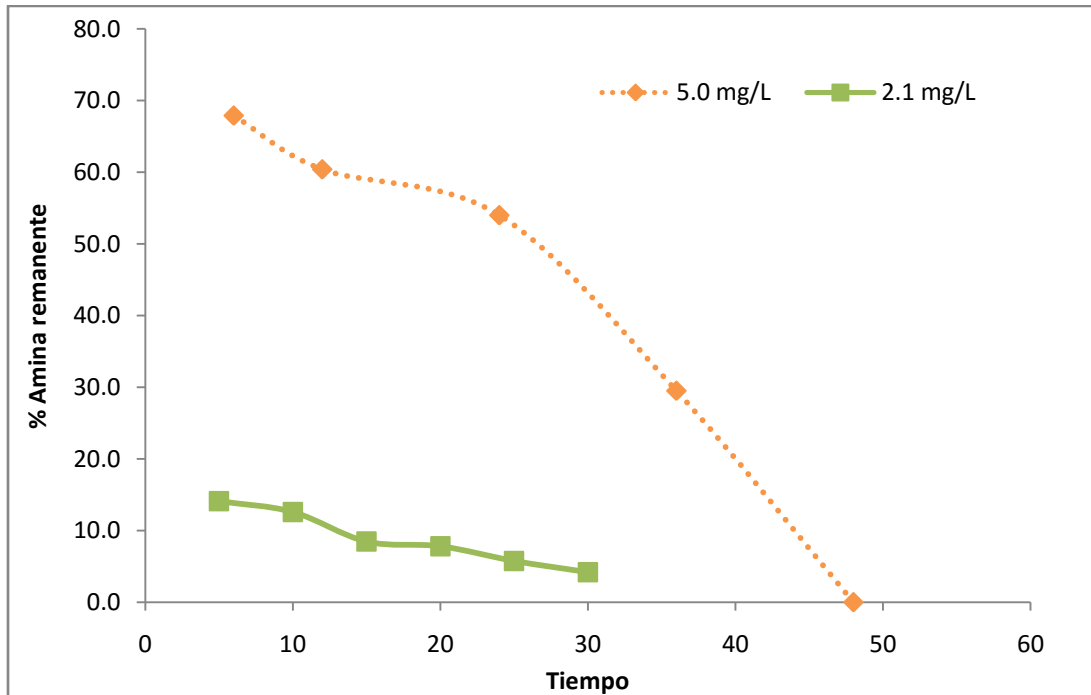
Figura 27 muestra los cromatogramas obtenidos del ensayo a 15 horas, el testigo de ácido acético (medio y ácido acético), el blanco de microalgas, el blanco de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> (colocado con el bioensayo) y testigo de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> (no sometido a condiciones experimentales).



**Figura 27. Cromatogramas. Bioensayo (verde), testigo de ácido acético (negro), blanco de microalgas (azul), blanco de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> (rosa) y testigo de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> (rojo)**

La señal correspondiente al derivado de acetato de dodecilamina se observa entre los **7 y 8 minutos**, mientras que el exceso de derivatizante presenta un pico alrededor de los dos minutos. No existen señales asociadas a posibles productos por degradación fotoquímica. Aunado a lo anterior, el testigo de ácido acético y el blanco de microalgas únicamente muestran el derivatizante.

El cambio en la concentración de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> para los ensayos con 2.1 mg/L y 5.0 mg/L en función del tiempo, .



**Figura 28. Cambio en la concentración de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/L y 5 mg/L**

En el bioensayo con 2.1 mg/L se muestra una disminución drástica del 75% de amina tras las primeras horas de exposición, contrario a lo observado cuando la concentración inicial es de 5 mg/L con una reducción de apenas el 35% de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> a las seis horas de exposición.

Luego de 30 horas, el A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> (concentración inicial 2 mg/L) se encuentra en un porcentaje de 4% mientras que en el otro, después de 48 horas, el ensayo se encuentra por debajo del límite de detección (para fines de construcción de la gráfica se considera como cero).

En ambos casos, la disminución de amina se explica mediante el aprovechamiento del compuesto como fuente de carbono y nitrógeno como se planteó en el apartado de crecimiento. Sobre lo anterior, se ha observado en bacterias capaces de satisfacer sus requisitos completos de nitrógeno y carbono mediante el empleo de amoníaco y aminas (Deo & Natarajan, 1998).

Por su parte, los datos obtenidos para el valor de 5 mg/L exponen que la especie *Chlorella vulgaris* es capaz de asimilar el acetato de dodecilamina aún a valores altos aunque a una menor velocidad comparado al bioensayo con 2.1 mg/L. Estudios con agentes de flotación y *Bacillus polymyxa*, muestran que la tasa de degradación depende de la concentración inicial del reactivo en la solución. En general, ante concentraciones grandes, los cultivos requieren un mayor periodo de adaptación inicial antes de comenzar la remoción del agente. Así, las tasas de eliminación más altas se observan a concentraciones más bajas de los agentes de flotación (Deo & Natarajan, 1998). No obstante, aunque a concentraciones altas la asimilación es lenta, de acuerdo a lo obtenido en el apartado 8.4, la mayor disponibilidad de carbono produce un mayor crecimiento.

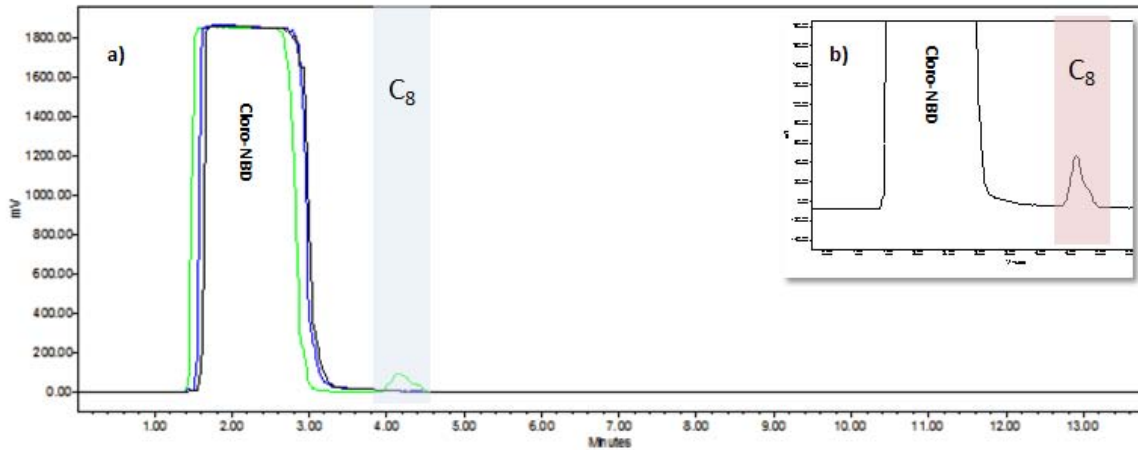
Un estudio de biodegradación de tributilestaño por *Chlorella vulgaris* realizado por Tsang y colaboradores sugiere que la reducción drástica del agente externo se debe a la adsorción de este compuesto en la pared celular de la microalga, efecto que sucede inmediatamente al añadir tributilestaño (Tsang, Lau, Tam, & Wong, 1999). Este punto es discutido en la sección 9.3.

Finalmente el porcentaje de recobro promedio del blanco de acetato de dodecilamina (medio de cultivo + A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>), sometido a las mismas condiciones ambientales que los bioensayos, es de 93.42%. Este análisis revela que la concentración de acetato de dodecilamina se mantiene relativamente constante durante el periodo de ensayo y no se generan productos en el medio debido a las condiciones experimentales. Por lo tanto, el acetato de dodecilamina es estable frente a la degradación fotoquímica en el medio y no hay pérdidas por adsorción a los viales.

### **9.1.2 Bioensayos con acetato de octilamina (A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub>)**

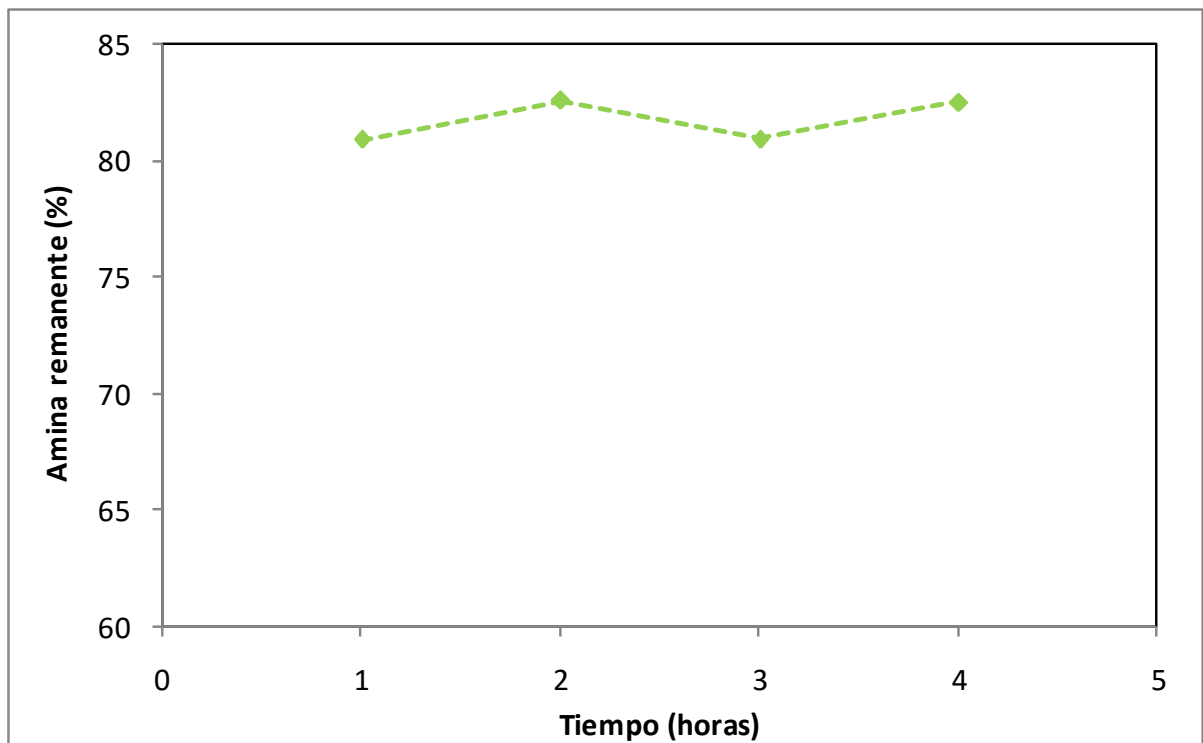
El acetato de octilamina se observa como una señal entre **4 y 5 minutos**, como se muestra en la Figura 29 que también presenta los cromatogramas obtenidos del testigo de ácido acético y el blanco de microalgas, donde es evidente la inexistencia de señales debido a interferencias propias del medio.





**Figura 29.** Cromatogramas de a) bioensayo a 4 horas (verde); blanco adicionado 1 (azul); blanco adicionado 2 (negro) y b) Zoom del bioensayo a 4 horas

Por su parte, la Figura 30 expone el cambio en la concentración de acetato de octilamina en función del tiempo. A lo largo del bioensayo la concentración se mantiene relativamente constante con un promedio del 82%.



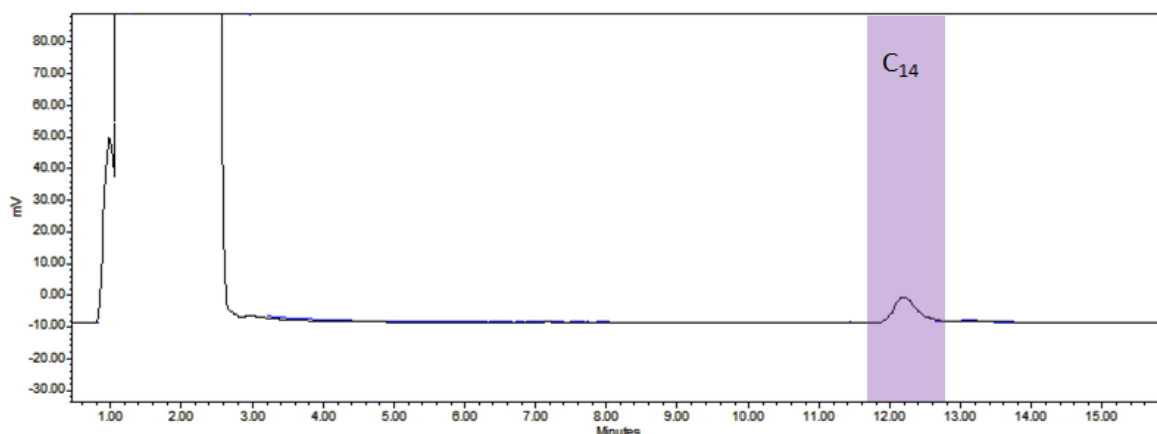
**Figura 30.** Cambio en la concentración de A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/L en función del tiempo

Considerando el bajo tiempo de exposición (debido a la toxicidad de la amina), la poca variación de la concentración de acetato es reflejo de la etapa de adaptación que requiere la microalga dada la nueva composición del medio. Aunado a lo anterior y basado en la reducción drástica que presenta el acetato de doce carbonos, aún a pocas horas, también muestra la incapacidad de *Chlorella vulgaris* para asimilar el acetato de la amina de ocho carbonos.

La diferencia entre la asimilación de acetato de octilamina y dodecilaminase explica en la sección 9.2.1 en función del logaritmo del coeficiente octanol-agua ( $\log Pow$ ) de las aminas.

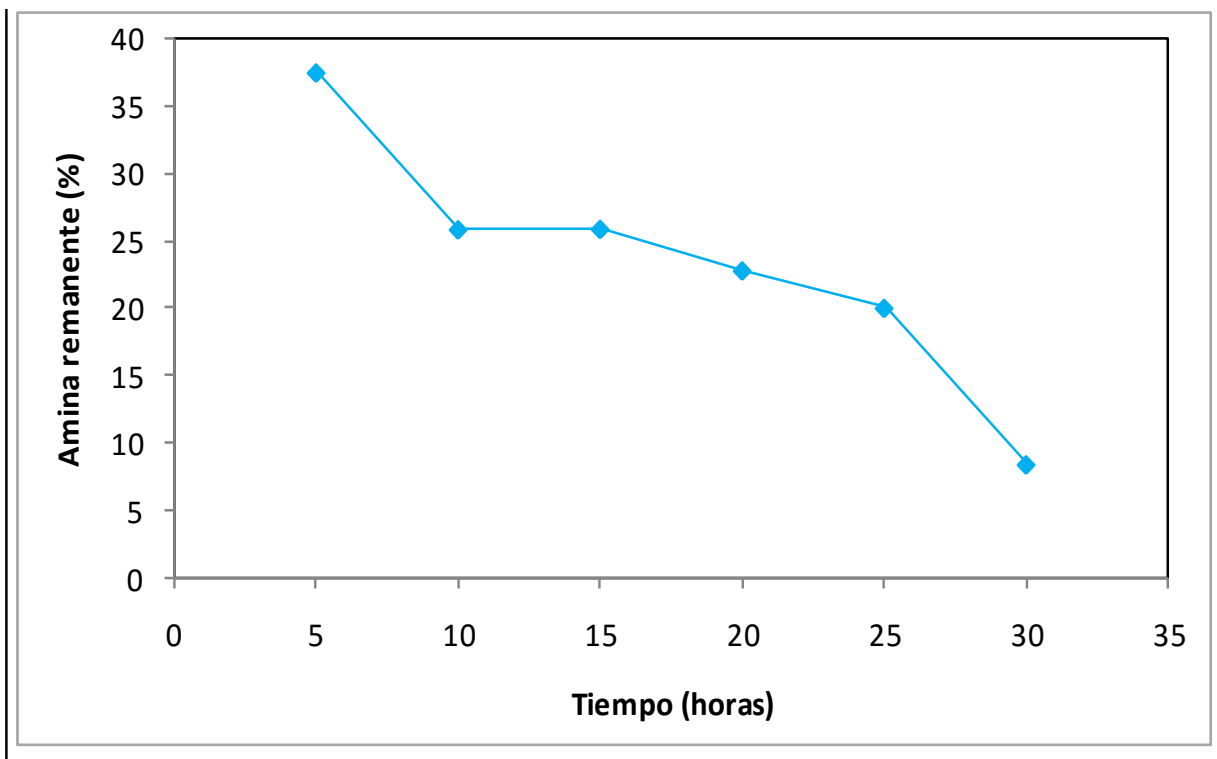
### 9.1.3 Bioensayos con acetato de tetradecilamina (A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>)

En el cromatograma ilustrado en la Figura 31, el derivado de A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> se traduce en una señal entre **12 y 13 minutos**. El blanco microalgas y el testigo de ácido acético, no mostrados en la imagen, sólo presentan señal del exceso de derivatizante.



**Figura 31. Cromatograma del derivado de acetato de tetradecilamina**

La Figura 32 exhibe la variación en la concentración del acetato de tetradecilamina cuando se añadió a un cultivo líquido de *Chlorella vulgaris*. Al igual que el bioensayo con acetato de dodecilamina, existe una reducción importante en la concentración inicial tras las primeras 5 horas de exposición.



**Figura 32. Cambio en la concentración de A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/L en función del tiempo**

Muchos tipos de microalgas han mostrado su eficacia en la degradación de compuestos nitrogenados, especialmente colorantes azoícos, entre ellas *Chlorella vulgaris* (El-Sheekh, *et al.* 2009). Algunas de estas algas son capaces de eliminarlos de una solución mediante bioacumulación o biotransformación (Lei, *et al.* 2002), explicando así el cambio en la concentración de amina, además de su probable adsorción en la pared celular de la microalga.

Comparado con el acetato de dodecilamina, a la misma concentración, el consumo de amina es menor tras las primeras horas de exposición lo que supone una correlación entre el número de carbonos y la velocidad de degradación o bioacumulación. Este punto es tratado con detalle en los ensayos de selectividad de acetato de dodecil y tetradecilamina. Sin embargo, aunque la velocidad inicial es distinta en ambos casos, la concentración inicial de amina llega a un valor del 4% después de las 30 horas de exposición. Lo anterior demuestra que la velocidad de degradación no es proporcional a lo largo del ensayo, este comportamiento ha sido observado estudios de biodegradación de compuestos

orgánicos como fenoles, colorantes, entre otros (El-Sheekh, *et al.* 2009; Papazi & Kotzabasis, 2007; Baldev, *et al.* 2013).

## **9.2 Ensayos mixtos de biodegradación por *Chlorella vulgaris***

Los ensayos simples muestran la capacidad de *Chlorella vulgaris* para consumir las sales de aminas de doce y catorce carbonos contrario a lo observado con octilamina. Con base en lo anterior y con la finalidad de analizar el efecto cuando dos aminas son añadidas, se plantearon dos ensayos mixtos A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub>- A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>- A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>.

### **9.2.1 Bioensayos con acetato de octilamina y dodecilamina(A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>)**

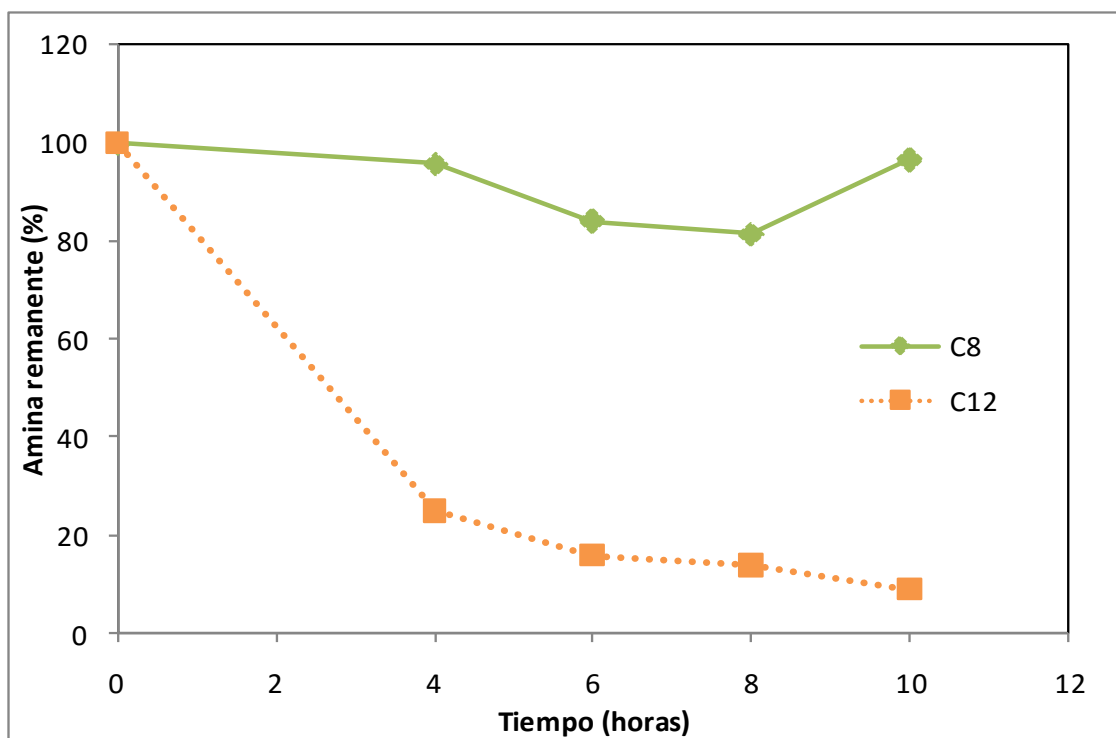
Dada la toxicidad de la amina de ocho carbonos, el ensayo mixto se realizó a un corto periodo de tiempo de exposición, monitoreado a 3, 6, 9 y 12 horas. La concentración inicial para cada amina es de 2.1 mg/L.

La variación de la concentración para cada una de las sales se muestra en la Figura 33. Los valores obtenidos concuerdan con lo presentado en los ensayos simples. Mientras el acetato de octilamina presenta poca variación tras ser añadido, la sal de doce carbonos muestra una disminución drástica apenas a las primeras cuatro horas de exposición.

El comportamiento observado se explica en términos del logaritmo del coeficiente octanol-agua (*logPow*), medida de la hidrofobicidad de los compuestos y directamente relacionado con la facilidad con que éstos pueden acumularse o ser asimilados por la pared celular de los microorganismos. En consecuencia, este parámetro ha sido empleado para calcular el impacto ambiental de diversos compuestos orgánicos como los pesticidas (Noble, 1993).

Con base en lo anterior, Geyer y colaboradores desarrollaron un modelo de predicción ecotoxicológico que establece una correlación lineal entre el *logPow* y el factor de bioacumulación de compuestos orgánicos en un alga de la especie *Chlorella* (Geyer, *et al.* 1984). Esto indica que compuestos con un valor alto de

( $\log Pow > 4$ ), presentan un mayor efecto de bioacumulación (o asimilación, para fines de este estudio) en la pared celular del alga.

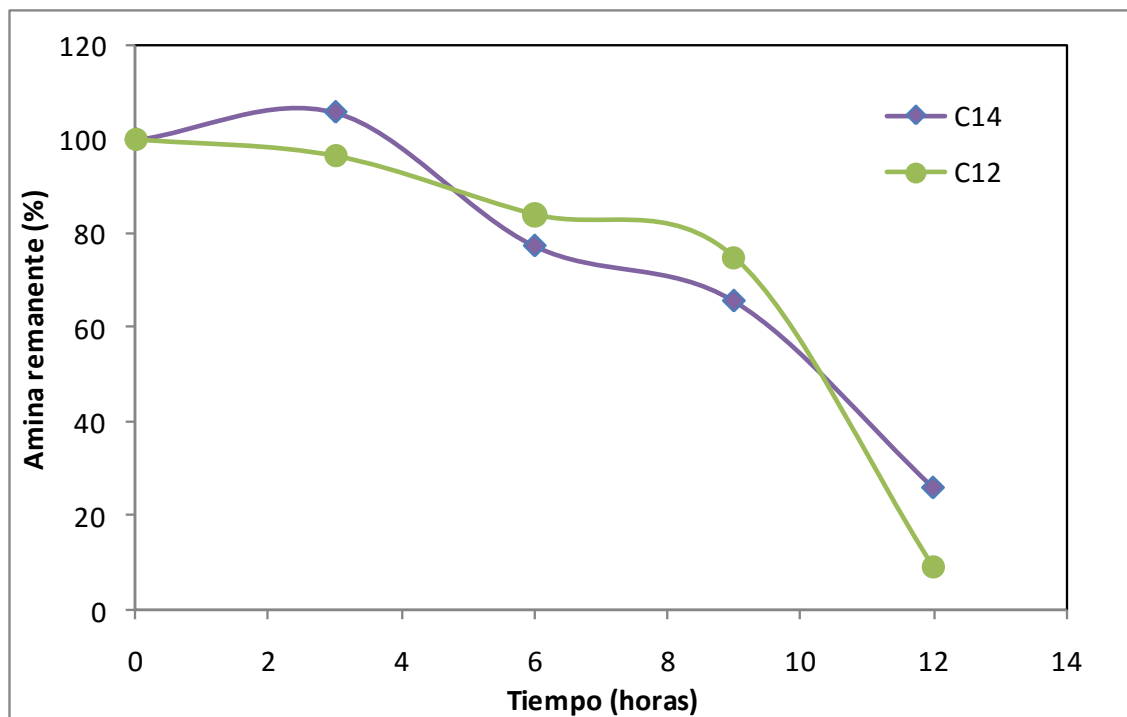


**Figura 33.** Cambio en la concentración de  $A-C_8NH_2$  y  $A-C_{12}NH_2$  en función del tiempo

En el caso de las aminas empleadas, el  $\log Pow$  de octil y dodecilamina son 3.094 y 5.132 respectivamente (Thewalim, *et al.* 2011), basado en estos valores y la relación trazada por Geyer y colaboradores, se espera que la microalga sea capaz de asimilar en mayor medida la amina de doce carbonos sobre la de ocho. Lo anterior explica que tras las primeras horas de exposición únicamente la concentración de  $A-C_{12}NH_2$  disminuye de manera importante. Un estudio a un tiempo mayor de exposición probablemente mostraría una disminución de la concentración de octilamina con una velocidad de degradación menor que la esperada para cadenas más grandes, aunque si bien, causando un efecto desfavorable en el desarrollo de la microalga.

### 9.2.2 Bioensayos con acetato de dodecilamina y tetradecilamina (A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>)

Por su parte, el cambio en la concentración de las sales de dodecil y tetradecilamina en el ensayo de selectividad se observa en la Figura 34.



**Figura 34.** Cambio en la concentración de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> en función del tiempo

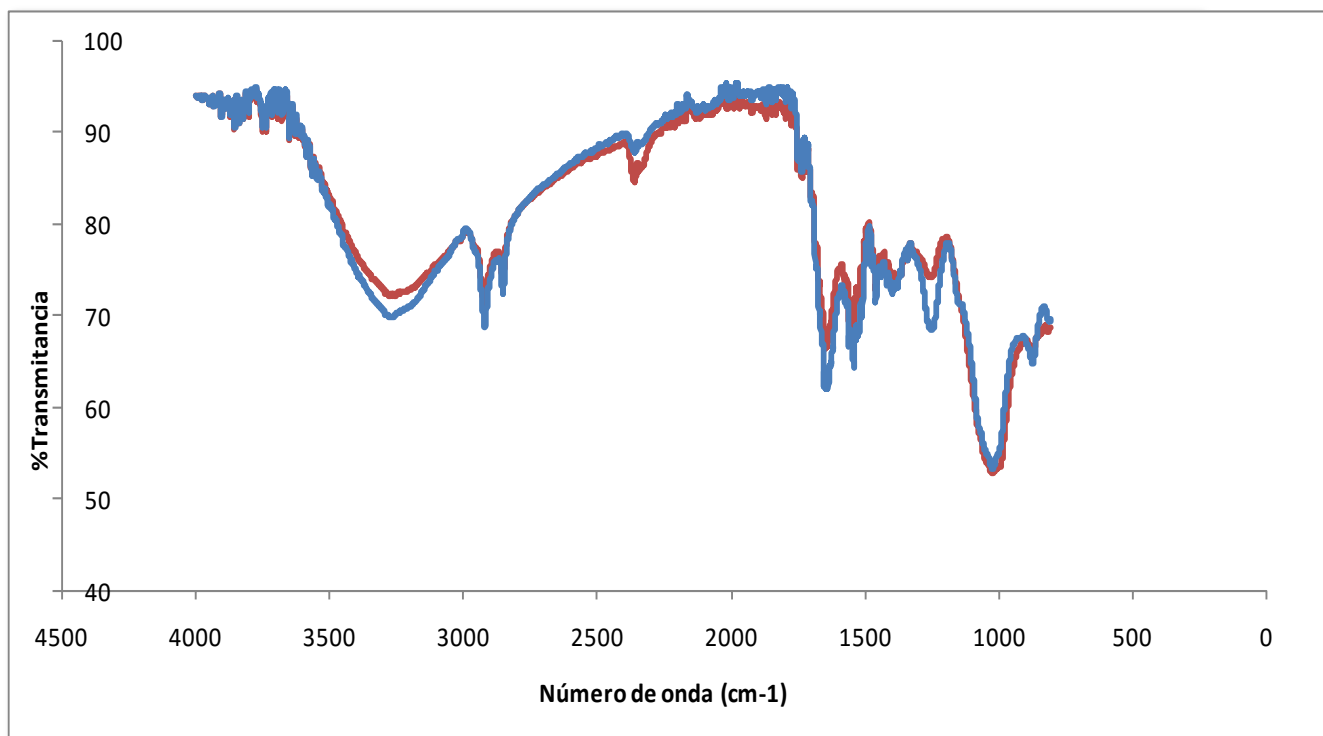
En los ensayos simples se observó que el acetato de tetradecilamina presentaba una reducción ligeramente más lenta comparada con la del acetato de dodecilamina a la misma concentración. Este efecto no se observa en el ensayo mixto ya que ambas aminas presentan una disminución similar, lo anterior indica que la velocidad de degradación está limitado únicamente por la cantidad de biomasa depositada en el bioensayo, única diferencia entre el ensayo simple y mixto. Mostrando de esta forma que la cantidad de biomasa es un factor importante en la asimilación e incluso podría modificar la sensibilidad de las algas hacia las aminas.

Por otro lado, el  $\log P_{ow}$  de dodecil y tetradecilamina son 5.132 y 6.151 respectivamente (Thewalim, *et al.* 2011), estos valores no son muy diferentes

entre sí por lo que se espera que ambas aminas sean asimiladas por algas de la especie *Chlorella*. Aunado a lo anterior, al encontrarse en forma iónica, las sales de aminas están disponibles en mayor medida comparada a su forma molecular lo que favorece su aprovechamiento.

### 9.3 Adsorción de aminas en pared celular de *Chlorella vulgaris*

En la investigación realizada por Tsang y colaboradores sobre la biodegradación de tributil estaño (TBT) por microalgas de la especie *Chlorella*, expone que cerca del 10.6% de TBT es adsorbido instantáneamente en la superficie celular de la microalga (Tsang, *et al.* 1999). Con el objetivo de verificar si el mecanismo anterior describe el cambio drástico de la concentración de amina en los ensayos de exposición se obtuvieron los espectros de infrarrojo de la biomasa de la microalga sana y de aquella expuesta a las aminas, la superposición de los espectros se presentan en la Figura 35.



**Figura 35. Superposición de los espectros de la biomasa del blanco microalgas(rojo) y del bioensayo con A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> (azul)**

Aunque la superposición de los espectros no muestra diferencias significativas, no es posible descartar la acumulación de la amina en la pared celular debido a las interferencias presentadas en la cercanía de  $3200\text{ cm}^{-1}$  y en  $1560\text{ cm}^{-1}$  donde se observan bandas del grupo amino y que podrían permanecer ocultas dadas las características de la matriz. El mismo espectro se muestra también para los ensayos con acetato de octil y tetradecilamina.

#### **9.4 Resumen de biodegradación por *Chlorella vulgaris***

Los resultados anteriores muestran la capacidad de *Chlorella vulgaris* para degradar más del 95% de los acetatos de dodecil y tetradecilamina. La velocidad de dicho proceso depende de la concentración inicial del agente externo, la disponibilidad de fuentes de carbono en el medio y la biomasa depositada en cada experimento. En el caso de los dos primeros, un aumento en la concentración o en el número de carbonos se traduce en una menor velocidad debido al proceso de adaptación de la microalga. Mientras que en la última, una cantidad superior de células supone una mayor asimilación.

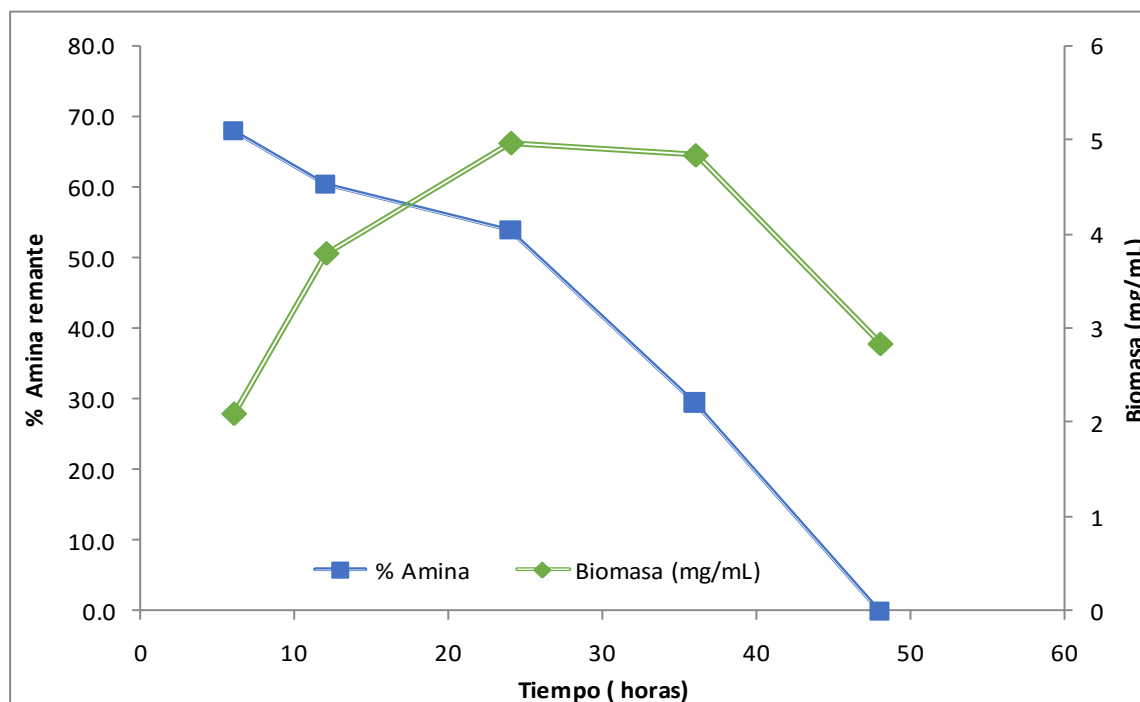
Por su parte, dada su alta toxicidad y baja hifrofobicidad, comparada con sus similares, la sal de la amina de ocho carbonos no puede ser asimilada en el corto periodo de exposición.

Respecto al mecanismo de disminución no se ha encontrado evidencia concluyente que exponga la adsorción de la amina, sin embargo, se ha demostrado que en medio ácido la sorción de aminas ocurre, similar a la los metales, mediante un proceso de intercambio iónico y un posible puente hidrógeno (Wong, *et al.* 1992). Lo anterior explica la drástica reducción de la concentración al poco tiempo de exposición. Posteriormente la amina absorbida es aprovechada para la generación de biomasa.

Por último, la Figura 36 muestra el cambio en la concentración de amina y biomasa para el ensayo de A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> 5 mg/L. En el gráfico se observa un inmediato crecimiento cuando la amina es asimilada, sin embargo, el efecto más importante se produce a las 24 horas cuando la concentración ha descendido a la



mitad y la biomasa comienza a disminuir, comportamiento que abre dos posibilidades. La primera establece que la capacidad de la microalga para sobrevivir se ve sobrepasada cuando ha consumido la mitad amina mientras que la segunda supone la presencia de un agente tóxico adicional en el medio, desecho de la propia microalga o bien un producto de degradación, cuyo aumento resulta desfavorable para el desarrollo de *Chlorella vulgaris*.



**Figura 36. Análisis completo de degradación y cambio en la biomasa para el ensayo con A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> 5 mg/L**

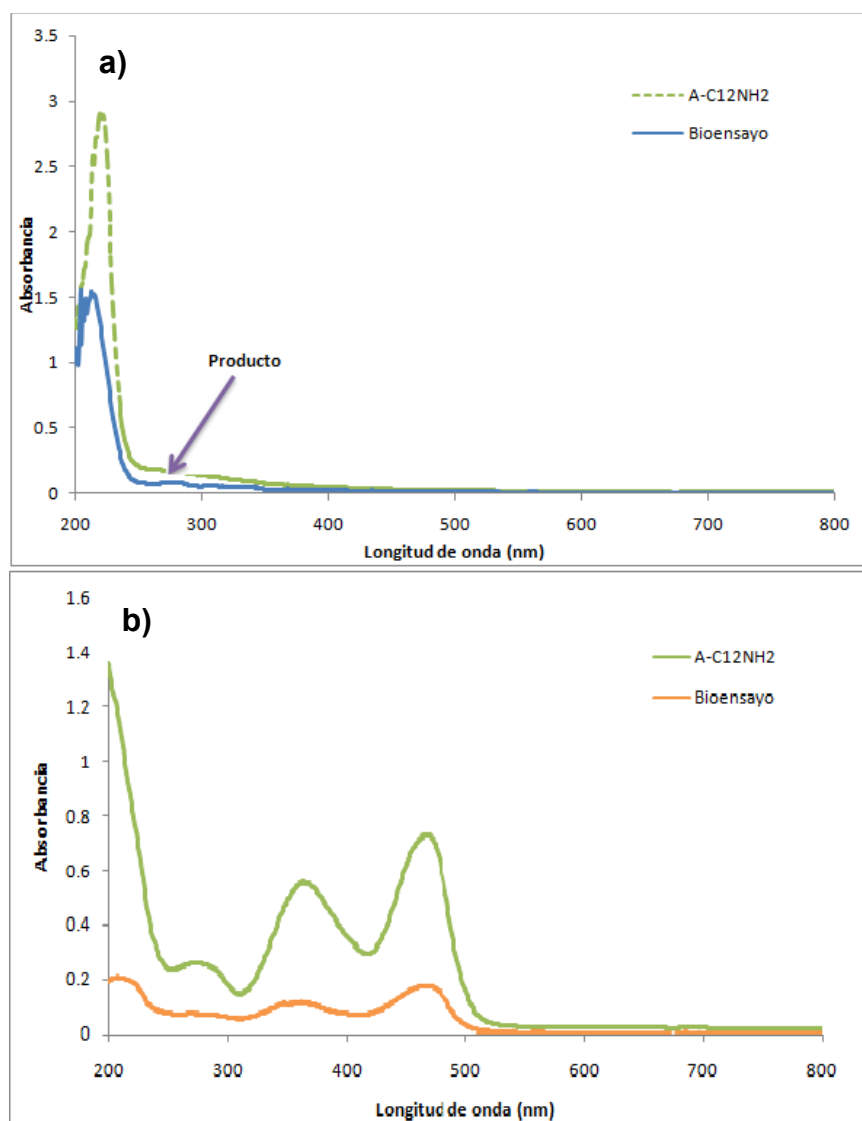
## 10. CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO DE DEGRADACIÓN

### 10.1 Análisis por espectroscopia UV-Visible

La Figura 37 presenta el barrido de onda del estándar de acetato de dodecilamina [2.1 mg/L] y el bioensayo a 5 horas antes y después de la derivatización.

Previo a la derivatización, tanto el acetato de dodecilamina como el bioensayo presentan un máximo de absorbancia en una longitud de onda cercana

a 200 nm tal como se muestra en la Figura 37 (inciso a) que corresponde a la amina. El bioensayo además, se observa una señal débil cerca de 300 nm.



**Figura 37. Barrido de onda del estándar de acetato de dodecilamina y el bioensayo; a) antes y b) después de la derivatización**

La respuesta a esa longitud de onda (300 nm) es similar a lo reportado por Deo y colaboradores en la biodegradación de algunos agentes de flotación, entre ellos acetato de dodecilamina, por *Bacillus polymyxa* (Deo & Natarajan, 2008). En dicho estudio se determinó que en presencia de bacterias emplea a la amina para la generación de polisacáridos, ácidos orgánicos, proteínas y ácidos nucleicos. De los anteriores, usualmente las proteínas se presentan en un máximo de absorción

entre 275 nm y 280 nm, causadas por la absorbancia del triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y en menor medida por la absorbancia de citisina (Cys) (Schmid, 2001). La existencia de estos productos en el medio explicaría la señal débil observada en el barrido de onda del bioensayo. No obstante, tras cinco horas de exposición se esperaría un señal pronunciada de la proteína, puesto que el 75% de acetato de dodecilamina ha sido consumido, esto sugiere la presencia de otros productos de degradación que probablemente también son aprovechados y transformados en proteínas. Por otro lado, en el espectro b) se observan los barridos de onda correspondientes al bioensayo y el acetato de dodecilamina después la derivatización, en ambos casos se presenta un máximo de absorbancia en aproximadamente 460 nm, longitud de onda en la que se realiza la cuantificación de amina remanente.

## 10.2 Análisis por espectroscopia infrarroja

Se ha observado que los microorganismos son capaces de transformar aminas, mediante reacciones oxidativas, en aldehídos o compuestos nitro (Araujo, *et al.* 2010). Con base en esto, se sintetizaron los productos de oxidación correspondientes para su posterior comparación con los bioensayos.

### 10.2.1 Análisis de los productos de oxidación de las aminas

Un estudio previo óxido-reducción del agente de flotación *Flotasil* (Sosa, 2014), propone como productos de oxidación aldehídos y derivados nitro. De acuerdo a lo anterior se obtuvieron los productos de oxidación con agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) de las aminas primarias empleadas en el ensayo. La caracterización por espectroscopia infrarroja se presentan en la Figura 38. Las bandas características en los espectros son:

**Banda A.**  $3200-3400\text{ cm}^{-1}$  (débil) estas señales indican la presencia de un grupo amino debida al estiramiento asimétrico del enlace N-H.

**Banda a.**  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  (intensa), estiramiento asimétrico y simétrico del enlace C-H señala la existencia de carbonos saturados en la molécula.

**Banda b.**  $725 - 720\text{ cm}^{-1}$  debida a la torsión de balanceo de  $-(CH_2)_n-$  donde  $n \geq 4$

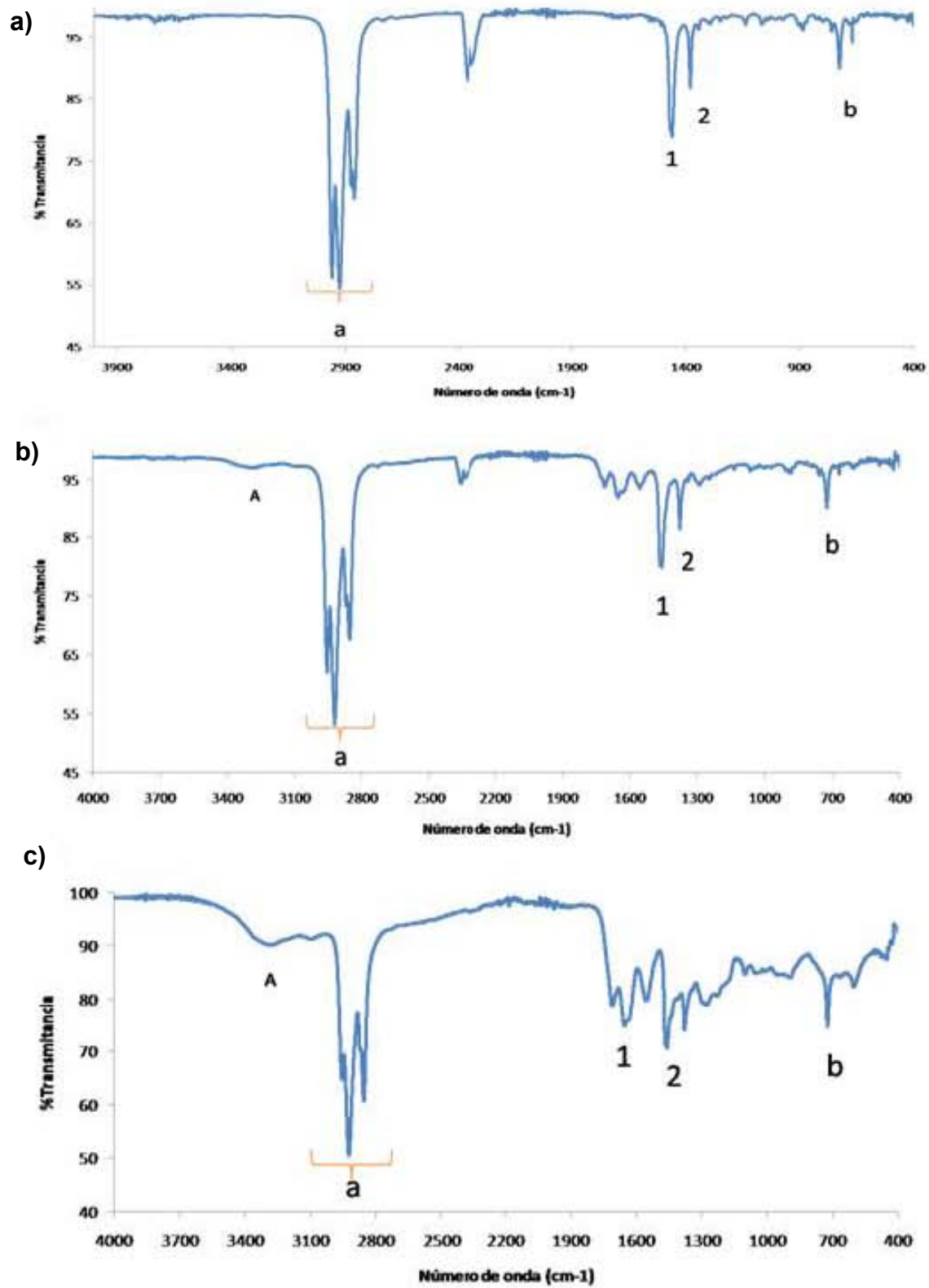


Figura 38. Espectros infrarrojo de los productos de oxidación de a) octilamina, b) dodecilamina y c) tetradecilamina

**Banda 1.**  $1550\text{ cm}^{-1}$  (intensidad media) se trata de una banda característica de un grupo nitro alifático, la literatura la describe como una señal intensa.

**Banda 2.**  $1370\text{ cm}^{-1}$  (intensidad media-baja) al igual que la anterior indica la presencia de un grupo nitro alifático, se describe como una señal intensa. (University of Colorado at Boulder, 2013)

De acuerdo a la información anterior todos los productos de oxidación presentan una cadena alifática con bandas características en  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ , señal de carbonos saturados, así como también una señal en  $720\text{ cm}^{-1}$  consecuencia de la unión de más de 4 metilenos. Los espectros además muestran señales asociadas a un grupo nitro en  $1550\text{ cm}^{-1}$  y  $1370\text{ cm}^{-1}$ .

Las aminas primarias son oxidadas fácilmente con agentes comunes tal como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  obteniéndose mezclas complejas de productos, entre ellos el grupo nitro, estructura final en la oxidación de las aminas primarias (Martínez & Gragera, 2008), esto explica la intensidad mediana de las bandas asociadas al grupo nitro consecuencia de la oxidación incompleta de las aminas.

### 10.2.2 Análisis de los bioensayos simples con aminas primarias

La Figura 39 muestra los espectros IR de los bioensayos simples con acetato de octil, dodecil y tetradecilamina a 48 horas de exposición, ensayos que se realizaron únicamente para la caracterización con la finalidad de obtener la mayor cantidad posible de producto. Ninguno de estos ensayos fue analizado por CLAR. De las señales observadas sobresalen las siguientes:

**Banda A.**  $3200\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  estas señales indican la presencia de agua en el medio así como la existencia del grupo amino debida al estiramiento asimétrico del enlace N-H.

**Banda B.**  $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$  la banda presente en esta frecuencia que en el caso de dodecilamina se obtiene como la suma de dos señales denota la presencia de más de una funcionalidad, posiblemente carbonilo.

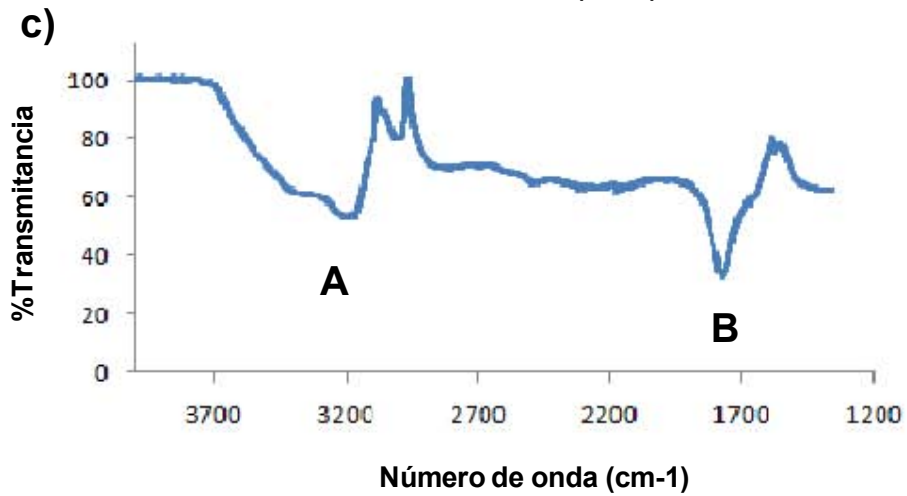
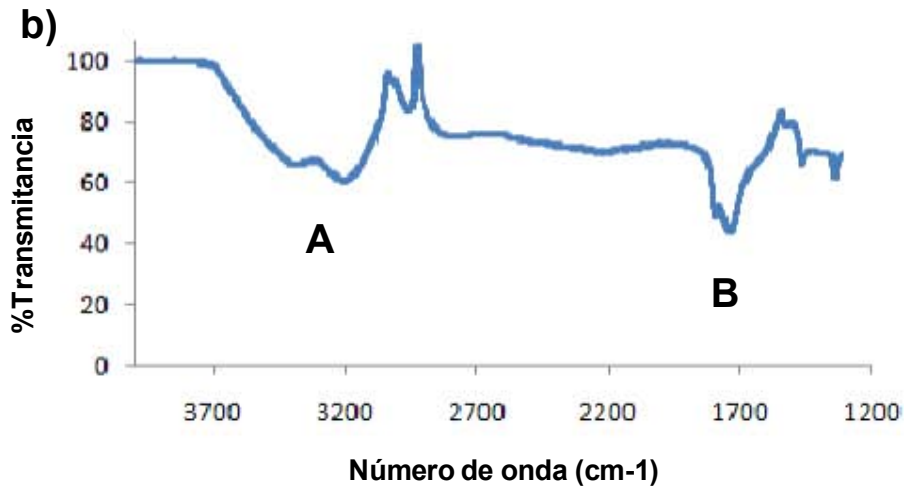
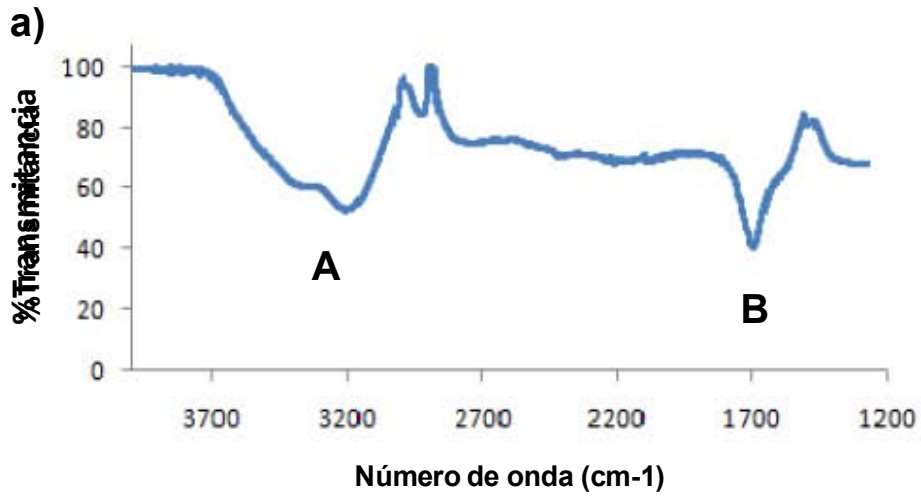


Figura 39. Espectros infrarrojo de los bioensayos simples de a) octilamina b) dodecilamina c) tetradecilamina

Las bandas anteriores sugieren la existencia de un compuesto con un grupo funcional carbonilo en el sobrenadante. En relación con lo observado en estudios biológicos con proteínas se han observado señales cercanas a  $3300\text{ cm}^{-1}$  debido a la tensión del enlace N-H, así como un desplazamiento del carbonilo a un número de onda de  $1660$  y  $1630\text{ cm}^{-1}$  por la tensión del enlace C-O (Barraza, *et al.*2013). Lo anterior sugiere la existencia de este tipo de compuesto en el medio.

Aunque por los valores de número de onda no existe evidencia clara del grupo nitro en el sobrenadante no se descarta el grupo funcional en el producto de degradación de las aminas.

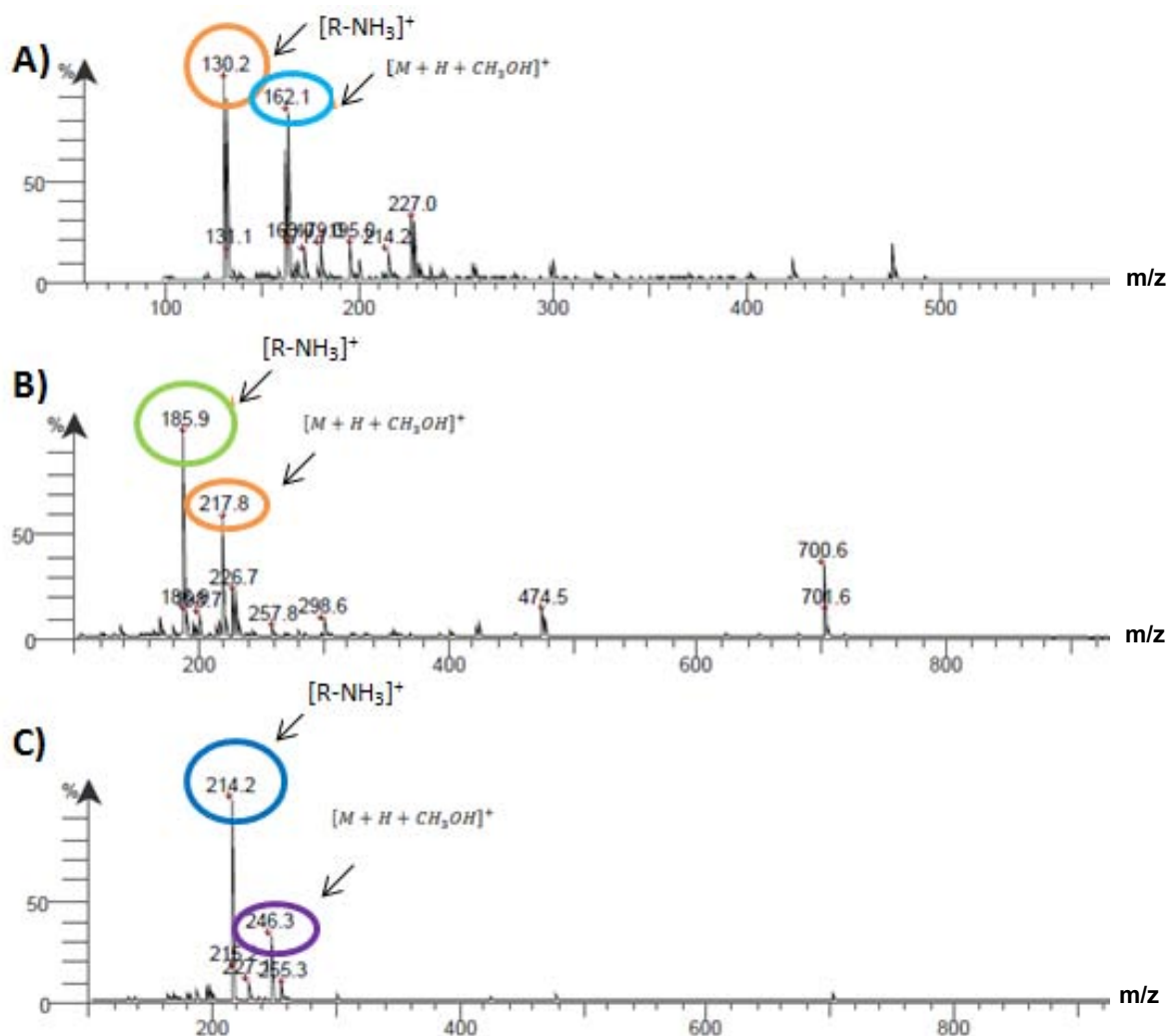
Por otro lado, comparado con los espectros de los productos de oxidación, los productos de degradación no se observan señales similares a las obtenidas a excepción de las debidas a la tensión del enlace N-H.

### **10.3 Análisis por espectrometría de masas (MS-ESI)**

Investigaciones de degradación con bacterias de agentes de flotación, muestran la capacidad de los microorganismos para suplir sus requerimientos de nitrógeno y carbono con este tipo de compuestos. En este proceso ocurren diferentes reacciones secuenciales que incluyen descarboxilación, desaminación, hidrólisis y finalmente la oxidación de las aminas, relacionados, a su vez, con las condiciones ambientales. Si bien, el paso esencial es la generación de un aminoácido y otras reacciones metabólicas típicas de los productos formados a partir del mismo (Deo & Natarajan, 1998), no se descarta la presencia de derivados nitro o aldehído en el bioensayo. Por lo anterior, se obtienen los espectros de masas (por inducción directa) de las aminas y los bioensayos de acetato de octil, dodecil y tetradecilamina a 48 horas de exposición.

#### **10.3.1 Espectrometría de masas de las aminas**

El espectro de masas de las aminas, obtenido por ionización química (ESI) con metanol, se muestra en la Figura 40.



**Figura 40. Espectros de masas por ESI de a) octilamina b) dodecilamina y c) tetradecilamina**

Generalmente el análisis por ESI (en inglés *Electrospray ionization*, ESI) únicamente permite observar iones moleculares, aductos y ocasionalmente algunos fragmentos, consideración importante en la interpretación del espectro.

Por este tipo de ionización, las aminas primarias suelen generar el ión [R-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (pico base) como consecuencia de la adición de un protón a cada molécula de amina. Además del ión [M + H + CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>, donde M es el compuesto molecular, como producto del acoplamiento de una molécula de disolvente al compuesto protonado (García, 2015). Todos los espectros anteriores presentan



las dos señales descritas anteriormente. La Tabla 13 expone el resumen de los picos presentados en los espectros.

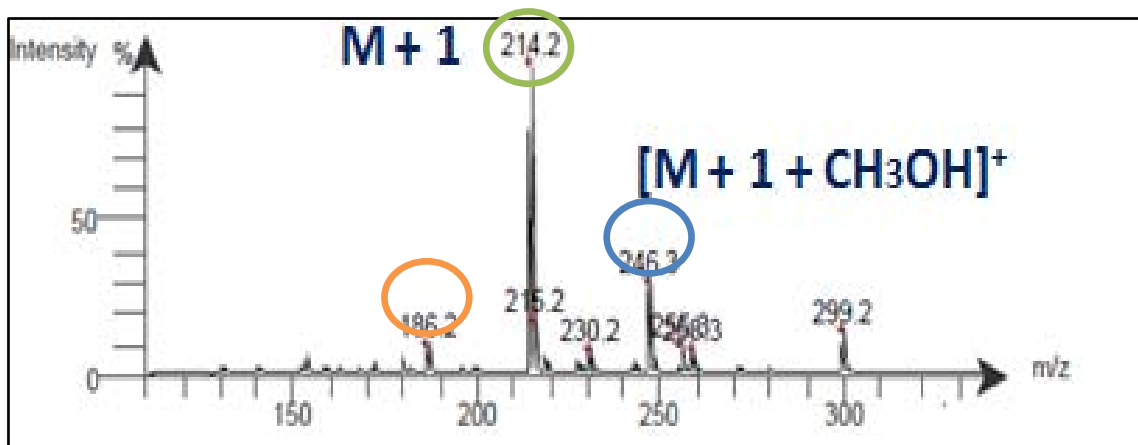
**Tabla 13. Resumen de las señales en los espectros de masas de las aminas**

Amina	Masa molecular (uma)	Iones formados	
		$[R-NH_3]^+$ (pico base)	$[M + H + CH_3OH]^+$
Octilamina	129.5	130.2 m/z	162.1 m/z
Dodecilamina	185.4	185.9 m/z	217.8 m/z
Tetradecilamina	213.4	214.2 m/z	246.3 m/z

Adicionalmente, en los espectros de la amina de ocho y doce carbonos se observan señales débiles en 227, 298.6 y 226.7 m/z, que pertenecen a los clusters de metanol formados al contacto con la fuente de ionización, puesto que no existe una separación previa de los mismos.

### 10.3.2 Espectrometría de masas de los productos de degradación

La Figura 41 muestra un ensayo a 24 horas de acetato de dodecilamina.



**Figura 41. Espectros de masa por ESI del bioensayo con acetato de dodecilamina a 24 horas de exposición**

En el espectro aún se observa una pequeña cantidad de amina (ion  $[R-NH_3]^+$ ), sin embargo, el pico base está ubicado en una relación carga/masa de 214.2. Esta señal corresponde al ion M+1, donde M es el probable compuesto de

degradación, consecuencia de la adición de un protón a la molécula. Así, la masa molecular del producto debe ser 213 uma, masa impar que indica la presencia de un átomo de nitrógeno en la molécula. El siguiente aducto importante es aquel producido por la adición del disolvente al compuesto protonado en una  $m/z$  de 246.3.

Por su parte, los espectros de los bioensayos a 48 horas, se observan en las figuras 42, 43 y 44.

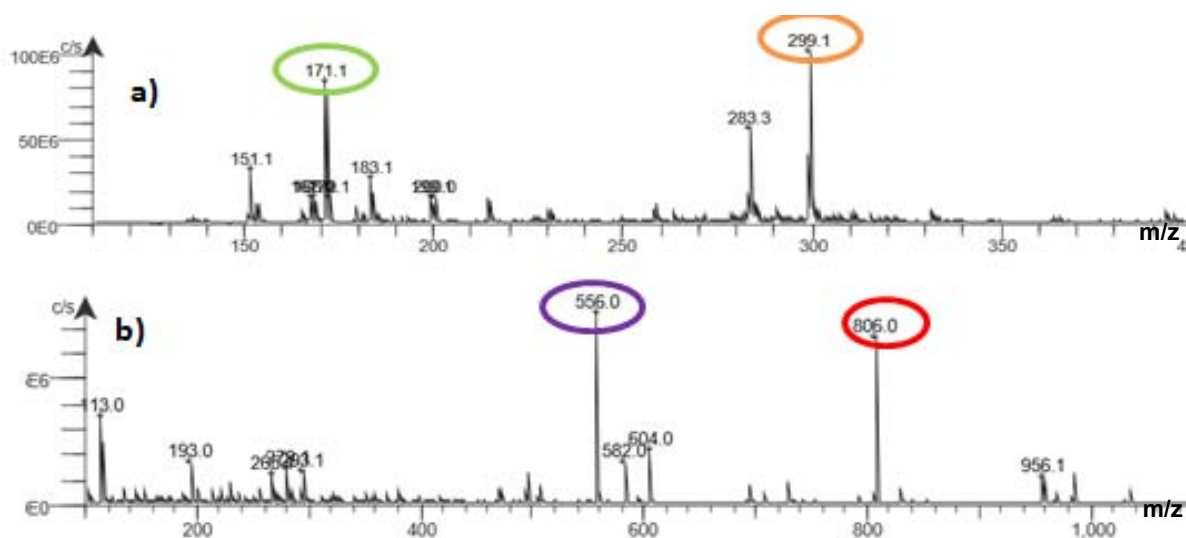


Figura 42. Espectros de masa de los bioensayos con A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> por ESI. a) Espectro en positivo y b) Espectro en negativo.

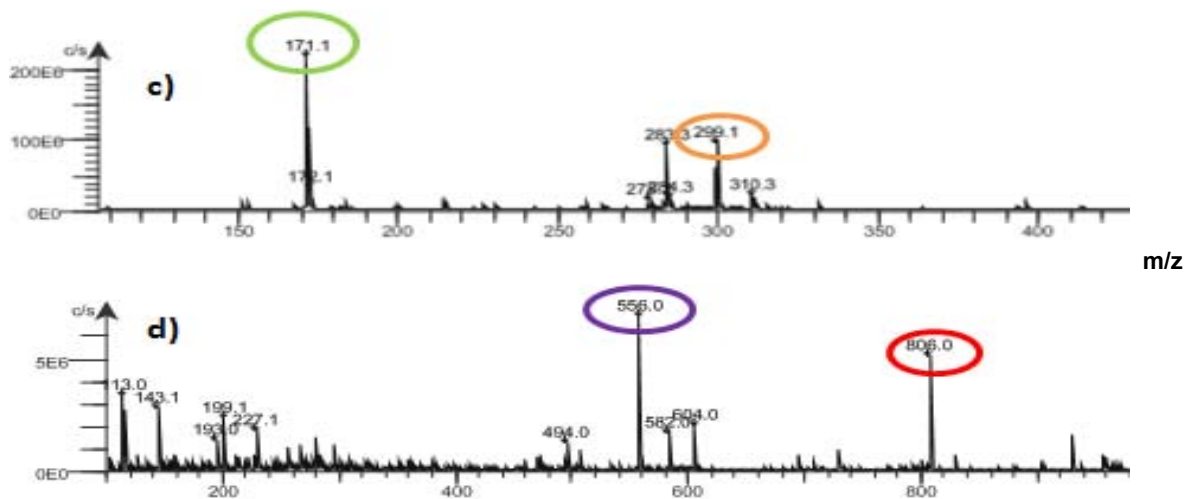
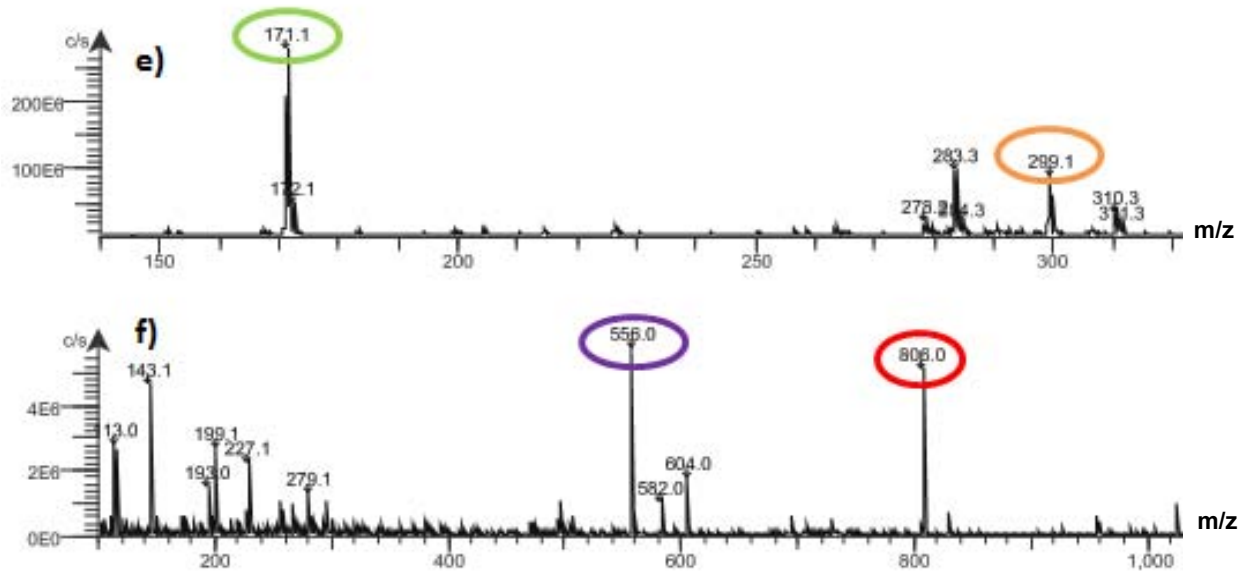
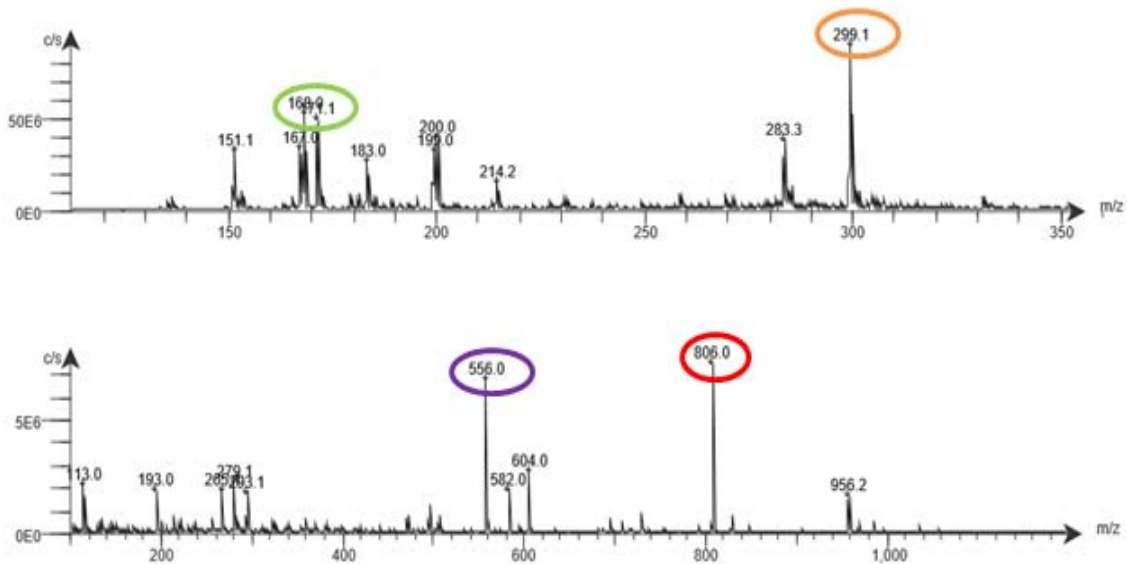


Figura 43. Espectros de masa de los bioensayos con A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> por ESI. a) Espectro en positivo y b) Espectro en negativo.



**Figura 44. Espectros de masa de los bioensayos con A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> por ESI. a) Espectro en positivo y b) Espectro en negativo.**

Los anteriores muestran la ausencia de las aminas y dos picos intensos en 171.1 y 299.1 en positivo y en 556.0 y 806.0 en negativo. Estas señales son asociadas a los cluster de metanol tal y como lo demuestra la Figura 45 que presenta el espectro de masas de MetOH.



**Figura 45. Espectro de masa de MetOH por ESI**

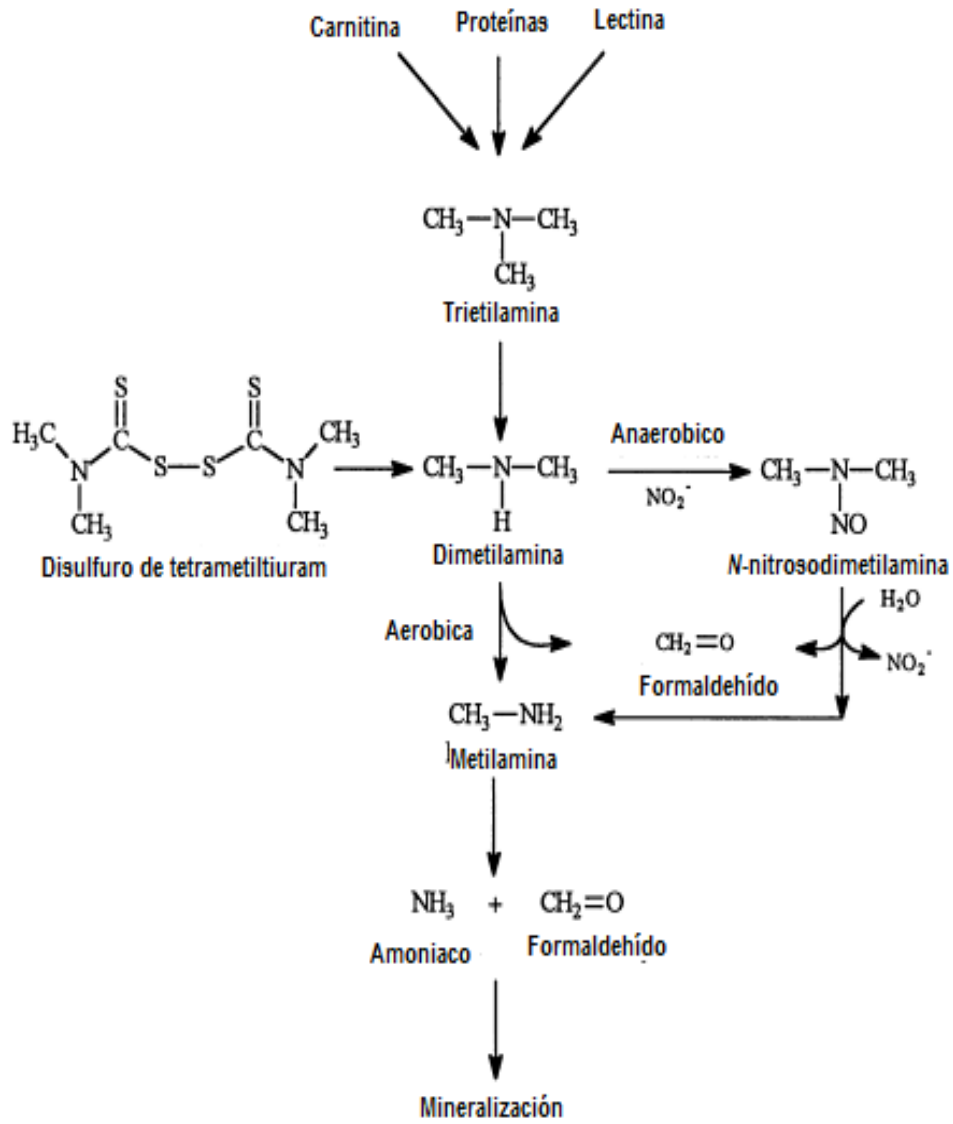
La Tabla 14 expone los posibles los aductos formados con grupos nitro mediante ionización química con metanol, especies que no se observan en los espectros anteriores.

**Tabla 14. Aductos formados en grupos nitro mediante ESI**

Aductos por grupos nitro	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>
[M+H-OH] <sup>+</sup> •	199	227	143
[M-OH] <sup>-</sup>	198	226	142
[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	198	226	142
[M+H-NO] <sup>+</sup> •	186	214	130
[M+H-NO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> •	170	198	114
[M-NO] <sup>-</sup>	185	213	129
[M-H-NO] <sup>-</sup> •	184	212	128
[M-H-OH] <sup>-</sup> •	197	225	141
[M-H-HNO] <sup>-</sup>	185	213	129
[M-NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	169	197	113
[M-H-NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> •	168	196	112
[M-H-HNO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	167	195	111
[NO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	46	46	46

Lo anterior abre dos posibilidades; la primera hipótesis sugiere una conversión directa a la mineralización de la amina que posteriormente es aprovechada en la síntesis de aminoácidos, no sin antes causar un efecto negativo sobre el crecimiento. Mientras que la segunda, y más viable, expone que el producto de degradación es también asimilado por la especie y posteriormente aprovechado en el crecimiento.

Respecto a la primera, se ha observado que en condiciones ambientales y experimentales, *Sporopachydermiacereana* es capaz de mineralizar dietilamina (conversión a NO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>) mediante una serie de reacciones (Agteren, *et al.* 1998). La Figura 46 expone el proceso de degradación de dimetilamina bajo condiciones ambientales.



**Figura 46. Degradación de dimetilamina bajo condiciones ambientales (Agteren, et al. 1998)**

## CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

### **Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris***

Los cultivos de *Chlorella vulgaris* tras la adición de las sales de las amina presentan un aumento importante de la biomasa respecto al blanco de microalgas, que se mantiene en fase estacionaria. En todos los casos, la tasa de crecimiento es menor a la referencia lo que supone una inhibición del mismo respecto al cultivo en ausencia de proteosa. Aunado a lo anterior, los tiempo de generación son superiores, parámetro que muestra el tiempo necesario para duplicar la población y se traduce en una aumento lento de biomasa. No obstante, el crecimiento, aún en presencia de contaminantes, demuestra la habilidad de *Chlorella vulgaris* para producir biomasa mediante un mecanismo heterotrófico. Cabe señalar que este proceso únicamente ocurre para cadenas mayores a doce carbonos, puesto que el acetato de octilamina no produce ningún crecimiento debido a la toxicidad del mismo. Por otro lado, se observó que tanto el número de carbonos presentes en la cadena como la concentración de la amina son directamente proporcionales a la tasa de crecimiento e inversas al tiempo de generación, consecuencia de la cantidad de nutrientes en el medio.

### **Biodegradación de aminas por *Chlorella vulgaris***

El análisis por CLAR revela la reducción en la concentración de acetato de amina tras su adición a los cultivos de *Chlorella vulgaris*, el cambio observado se debe tanto a procesos de sorción, intercambio iónico y acumulación en la pared de la microalga como a su habilidad para asimilarlos y posteriormente aprovecharlos en la generación de biomasa.

Adicionalmente, se observó que la velocidad de degradación de las sales de aminas depende de la concentración inicial, puesto que a mayores concentraciones, se produce un aumento en el periodo de adaptación, necesario para su remoción del medio, por lo que las tasas de eliminación más altas se observan a concentraciones más bajas de los agentes de flotación. Además, de

acuerdo a lo obtenido en el estudio, el número de carbonos en la amina también es un factor importante en la asimilación de las mismas ya que un bajo número de átomos de carbono en la cadena implica un menor efecto de asimilación de la amina en la pared celular de la microalga. Así, el acetato de octilamina será asimilado a un mayor tiempo comparado con sus similares.

### **Caracterización del producto de degradación**

El análisis UV-Visible y espectroscopia infrarroja revela la *probable* existencia de aminoácidos en el medio como consecuencia del aprovechamiento de la fuente nitrógeno que representan las sales de aminas, sin embargo, no es el único producto de degradación.

Por su parte, el estudio de espectrometría de masa por ESI presenta, en un tiempo medio de exposición un probable producto con átomos de nitrógeno. Sin embargo, los exámenes a más tiempo no revelan su identidad, lo que sugiere una degradación extensiva que termina en la mineralización del acetato de amina o bien en el aprovechamiento de la posible sustancia como fuente de carbono y posiblemente nitrógeno que posteriormente actúa como un inhibidor del crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

La mineralización de la sal de amina sugiere una conversión a amoníaco y nitratos, un seguimiento de la concentración de nitrógeno total revelaría las pérdidas durante el ensayo.

## BIBLIOGRAFÍA

El-Sheekh, M., Gharieb, M., & Abou-El-Souod, G. (2009). Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 699–704.

Agilent Technologies, Inc. (n.d.). *Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC)* Retrieved 01 04, 2016. From:  
[http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx\\_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf](http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf)

Agteren, M. H., Oosterhaven, J., & Keuning, S. (1998). *Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*. Springer Science & Business Media.

*Algae base*. (2015). Retrieved Noviembre 06, 2015, from <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=6964>

Araujo, D., Yoshida, M., Takahashi, J., Carvalho, C., & Stapelfeldt, F. (2010). Biodegradation studies on fatty amines used for reverse flotation of iron ore. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, 151-155.

Baldev, E., MubarakAli, D., & Ilavarasi, A. (2013). Degradation of synthetic dye, Rhodamine B to environmentally non-toxic products using microalgae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 207-214.

Barraza, G., De la Rosa, L., Martinez, A., Castillo, H., Cotte, M., & Alvarez, E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Rev. Latinoamer. Quím*, 41(3), 125-148.

Becker, E. (1995). *Microalgae. Biotechnology and microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press. Reino Unido.

Blanck, H. (1985). Inhibition of Growth of Freshwater Microalgae by Long-chained Aliphatic. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 14, 609-620.

Brock, T., Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson Prentice Hall.

Bulantovic, S. M. (2007). *Handbook of flotation reagents*. Amsterdam: Elsevier Science & Technology Books.

Chockalingam, E., Subramanian, S., & Natarajan, K. (2003). Studies on biodegradation of organic flotation collectors using *Bacillus polymyxa*. *Hydrometallurgy*, 71, 249-256.



Coldeca. (2012). *Coldeco Educa*. Retrieved Julio 20, 2015, from [https://www.codelcoeduca.cl/procesos\\_productivos/tecnicos\\_exploracion\\_reconocimiento\\_mineralogia.asp#franja-arriba](https://www.codelcoeduca.cl/procesos_productivos/tecnicos_exploracion_reconocimiento_mineralogia.asp#franja-arriba)

Combs, D. (1985). Processing of industrial fatty acids. *Journal of the American Oil Chemist Society*, 62(2), 327-330.

Coppex, L. (2000, Febrero). Derivatives for HPLC Analysis. Ginebra, Suiza.

Coria, N. R. (2014). Caracterización de la actividad fotoquímica de *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) expuesta a Cd<sup>2+</sup>. *Tesis de Licenciatura*. Estado de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Crist, R., Oberhoiser, K., & Wong, B. (1992). Amine-Algae Interactions: Cation Exchange and Possible Hydrogen Bonding. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1523-1526.

Denisov, E., & Afanas'ev, I. (2005). *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*. New York: Taylor & Francis.

Deo, N., & Natarajan, K. (2008). Biodegradation of some organic flotation reagents by *Bacillus polymyxa*. *Bioremediation Journal*, 2, 205-214.

El-Sheekh, M. M., Gharieb, M., & Abou-El-Souod, G. (2009). Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(6), 699-704.

El-Sheekh, M., Hamouda, R., & Nizam, A. (2013). Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82, 67-72.

Fanés Treviño, I. (2008). Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España. *Tesis doctoral*. Granada, España: Universidad de Granada.

Finlay, J., & Callow, M. (2009). The toxicity of alkyl amines: The effects of pH. *Biofouling*, 11, 9-30.

GENMIC. (n.d.). *Microbiología industrial*. Retrieved Enero 07, 2016, from <http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-2.htm>

Geyer, H., Politziki, G., & Freitag, D. (1984). Prediction of ecotoxicological behaviour of chemicals: relationship between n-octanol/water partition coefficient and bioaccumulation of organic chemicals by alga *Chlorella*. *Chemosphere*, 13, 269-284.

Ghasemi, Y., Rasoul, S., & Fotooh, E. (2011). The biotransformation, biodegradation and bioremediation of organic compounds by microalgae. *Phycological Society of America*, 47, 969-980.

Ginkel van, C., Stroo, C., & K roon, A. (1993). Biodegradability of Ethoxylated Fatty & amines and Amides and the Non-Toxicity of their Biodegradation Products. *Tenside, surfactants, detergents*, 30, 213-216.

Greim, H., Bury, D., Klimisch, H.-J., Oeben-Negele, M., & Ziegler-Skylakakis, K. (1998). Toxicity of aliphatic amines: structure-activity relationship. *Chemosphere*, 36, 271-295.

Grooth, e. a. (1985). The cytodisk: a cytometer based upon a new principle of cell alignment. *Cytometry*, 6, 226-233.

Gulnaz, O., & Dincer, S. (2009). Biodegradation of Bisphenol a by *Chlorella vulgaris* and *Aeromonas Hydrophilia*. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3(2), 74-84.

Hao, F., Lwin, T., Buckard, J., & Woodcock, J. T. (2004). Determination of aliphatic amines in mineral flotation liquors and reagents by high-performance liquid chromatography after derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan. *Journal of Chromatography*, 1055, 77-85.

Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Barcelona: Reverté .

Hasegawa, T., & Kumamoto, S. (2005). Host defensive and pharmacological study of *Chlorella vulgaris* strain CK. In Atta-ur-Rahman, *Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products*, 30, 761-795

He, X., Huang, C., & Schuchman, E. (2009). Quantitative analysis of sphingosine-1-phosphate by HPLC after naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) derivatization. *Journal of Chromatography B*, 10, 983-990.

Hernández, L. H. (1998). Producción de tres microalgas bajo condiciones de laboratorio. Estado de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Hoh, G. L., & D. O. Barlow, A. F. (1963). Hydrogen Peroxide Oxidation of Tertiary Amines. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*, 40, 268 - 271.

Houot, R. (1983). Beneficiation of iron ore by flotation. *International Journal of Mineral Processing*, 10(3), 183-204.

Jiménez, L. E. (2015). Caracterización de la respuesta fisiológica de *Chlorella vulgaris* expuesta a estreptomicina. *Tesis de licenciatura*. Estado de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Kataoka, H. (1996). Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. *Journal of Chromatography*, 733, 19-34.

Lawrence, S. (2004). *Amines. Synthesis, Properties and Applications*. Cambridge: Cambridge University Press.

Lei, A., Wong, Y., & Tam, N. (2002). Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Science Technology*, 46, 195-201.

Lika, K., & Papadakis, I. (2009). Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. *Journal of Sea Research*, 62, 135–146.

Lim, S. L., Chu, W. L., & Phang, S. M. (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*, 101, 7314-7322.

Llop, A., Pocurull, E., & Borrull, F. (2010). Automated determination of aliphatic primary amines in wastewater by simultaneous derivatization and headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 575-581.

Mal-Nam, K., Ji-Chul, J., Ik-Mo, L., Han-Sup, L., & Jin-San, Y. (2002). Toxicity and biodegradation of diamines. *Journal of Environmental Science and Health*, 37, 53-64.

Martínez, R. (2009). Evaluación de la calidad nutricional de la microalga de agua dulce *Scenedesmus*, sp. (CHLOROPHYCEAE) modificando algunos parámetros ambientales. Estado de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez, R., & Gragera, R. (2008). *Fundamentos teóricos y prácticos de las Histoquímica*. Madrid: Consejo superior de investigaciones científicas.

Matamoros, V., Uggetti, E., García, J., & Bayona, J. (2016). Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. *Journal of Hazardous Materials*, 31, 197–205.

McMurry, J. (2001). *Química Orgánica*. México: International Thomson Editores.

Meislich, H., Nechmkin, H., & Sharefkin, J. H. (2001). *Química Orgánica*. Colombia: McGraw - Hill Interamericana.

Melo, F., & Laskowski, J. (2006). Fundamental properties of flotation frothers and their effect on flotation. *Minerals Engineering*, 19, 776 - 773.

Moliner, Y., Molins, C., & Campíns, P. (2004). Analysis of primary aliphatic short-chain monoamines by LC in water samples. *Talanta*, 62, 373-382.

Morris, H., Quintana, M., Almareles, Á., & Hernández, L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 13(2), 123-128.

Morrison, R., & Boyd, R. (1998). *Química Orgánica*. Ciudad de México: Addison Wesley Longman de México.

Noble, A. (1993). Partition coefficients (n-octanol-water) for pesticides. *Journal of Chromatography*, 642, 3-14.

Nova García, C. (2015). HPLC-Masas: Instrumentación, ionización y mantenimiento. (pp. 1-31). Madrid: Instituto Tecnológico La Marañosa.

Papazi, A., & Kotzabasis, K. (2007). Bioenergetic strategy of microalgae for the biodegradation of phenolic compounds — exogenously supplied energy and carbon sources adjust the level of biodegradation. *Journal of Biotechnology*, 120, 706-716.

Pepper, I., Gerba, C., & Gentry, T. (2015). *Environmental Microbiology*. San Diego: Elsevier.

Perez-García, O., Bashan, L., Hernández, J., & Bashan, Y. (2010). Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic and mixotrophic cultivation of *C. vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Phycologia*, 46, 800-812.

Pietsch, J., Hampel, S., Braunch, H.-J., & Worch, E. (1996). Determination of aliphatic and alicyclic amines in water by gas and liquid chromatography after derivatization by chloroformates. *Fresenius J Anal Chem*, 355, 164-173.

Pozo Pérez, Á. (2010). *Producción y valorización de biomasa de microalgas: un enfoque de biorrefinería*. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca .

Pumarola, A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J., & Piedrola-Angulo, G. (1999). *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Masson.

Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science Ltd.

Rioboo, C., Herrero, C., González, O., & Cid, A. (2003). Análisis del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en cultivos expuestos al herbicida isoproturon. *IX Conferencia Española de Biometría*, (pp. 17-20). La Coruña.

Rodas-Gaitan, H., Rodríguez-Fuentes, H., Flores-Mendiola, G., Vidales-Contreras, J., Aranda-Ruiz, J., & Luna-Maldonado, A. (2012). Efecto de la densidad celular de inoculación en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* CLV2 cultivada bajo condiciones mixotróficas. *Fitotecnia Mexicana*, 35, 83-86.

Sacher, F., Lenz, S., & Jurgen-Heinz, B. (1997). Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface water by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonyl. *Journal of Chromatography A*, 746, 85-93.

Salager, J.-L., & Forgiarini, A. (2007). *Fundamentos de flotación*. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes.

Schmid, X. (2001, Abril 19). *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. Retrieved Diciembre 6, 2015, from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003142/abstract>

Singh, R., Singh, P., & Sharma, R. (2014). Microorganism as a tool of bioremediation technology for cleaning environment: A review. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 4(1), 1-6.

Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (2001). *Fundamentos de química analítica*. Barcelona: Reverté.

Somasundaran, & Moudgil, B. M. (1998). *Reagents in Mineral Technology*. New York: Marcel Dekker Inc.

Somasundaran, P., Zhang, L., Healy, T. W., & Ducker, W. (2007). *Adsorption of surfactants and its influence on the hydrodynamics of flotation, Froth flotation - A century of innovation*, M.C. Fuerstenau, G. Jameson and R.-H. Yoon, eds., Society for Mining, Metallurgy, and Exploration Inc., 179-225.

Sosa, I. (2014). *Evaluación ambiental del uso de aminas en procesos de flotación*. UNAM: Facultad de Química.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.

Suali, E., & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316-4342.

Syed, S., Ashok, A., & Indhumathi, P. (2015). The Uses of Chlorella Vulgaris as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 7(1), 185-190.

Tahri, N., Wifak, B., Hanane, S., & El ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. In R. Chamy, & F. Rosenkranz, *Biodegradation - Life of Science* (p. 378). InTech.

Texas, U. d. (n.d.). *UTEX The Culture Collection of Algae* . Retrieved April 23, 2014, from <http://www.utex.org/mediaDetail.aspx?mediaID=29>

Thewalim, Y., Bruno, O., & Colmsjo, A. (2011). Study of the gas chromatographic behavior of selected alcohols and amines. *Anal Bioanal Chem*, 399, 2335-1345.

Tikko, V., Scragg, A., & Shales, S. (1997). Degradation of Pentachlorophenol by Microalgae. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 23, 425-431.

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Tsang, C. K., Lau, P. S., Tam, N. Y., & Wong, Y. S. (1999). Biodegradation capacity of tributyltin by two Chlorella species. *Environmental Pollution*, 105(3), 289-297.

Universidad Central de Venezuela. (2008). *Guía para cromatografía*. Retrieved Diciembre 23, 2015, from <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf>

University of Colorado at Boulde. (2013, Agosto 13). Retrieved Diciembre 5, 2015, from IR Spectroscopy Tutorial: <http://orgchem.colorado.edu/Spectroscopy/irtutor/nitrosir.html>

Valcárcel, M., & Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Reverté.

Wade, L. G. (2004). *Química Orgánica*. España: Prentice Hall.

Waters. (n.d.). *How Does High Performance Liquid Chromatography Work?* Retrieved 01 04, 2016, from [http://www.waters.com/waters/es\\_MX/How-Does-](http://www.waters.com/waters/es_MX/How-Does-)

High-Performance-Liquid-Chromatography-  
Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=es\_MX

Woei-Long, G., Sears, K., Alleman, J., & Blantchley, E. (2004). Toxicity of model aliphatic amines and their chlorinated forms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 239-244.

Yan, H., & Pan, G. (2004). Increase in biodegradation of dimethyl phthalate by *Closterium lunula* using inorganic carbon. *Chemosphere*, 55(9) 1281-1285.

You, J., Song, C., Yan, T., Sun, Z., Li, Y., & Suo, Y. (2010). An improved reagent for determination of aliphatic amines with fluorescence and online atmospheric chemical ionization-mass spectrometry identification. *Analytica Chimica Acta*, 658(1), 98-105.

Zurmriye, A., & Tezer, S. (2005). Biosorption of reactive dyes on the green alga *Chlorella vulgaris*. *Process Biochemistry*, 40 (3-4),1347-1361.

# ANEXO I CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

## I. Introducción

La cromatografía es un método de separación en el que los componentes de una mezcla se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y una móvil. Las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los distintos componentes de la mezcla que se hacen pasar a través de la fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil gaseosa o líquida (Skoog, *et al.* 2001).

La cromatografía se divide en varias categorías en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria. Según como se coloque en contacto la fase móvil y estacionaria puede ser cromatografía en columna y cromatografía plana. En cromatografía de columna, la fase estacionaria está retenida en un tubo estrecho y la fase móvil se hace pasara a través del tubo por presión o por gravedad. En la cromatografía plana, la fase estacionaria está inmóvil sobre una placa plana o en los poros de un papel. En este caso la fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por acción capilar o por efecto de la gravedad. Por otro lado, de acuerdo a la fase móvil utilizada la cromatografía se divide en cromatografía de gases, cromatografía de líquidos o cromatografía de fluidos supercríticos. (Universidad Central de Venezuela, 2008).

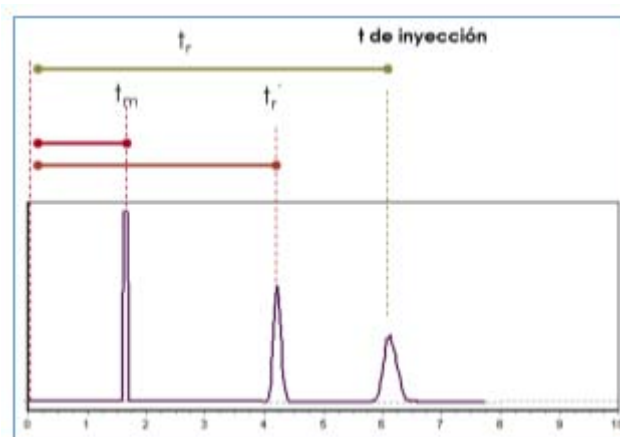
## II. Parámetros cromatográficos

La efectividad de una columna cromatográfica para separar dos solutos depende en parte de la velocidad relativa con que cada una de las especies eluye. A su vez, esos valores de velocidad están determinados por las relaciones de las concentraciones del soluto en cada una de las dos fases. El comportamiento cromatográfico de un soluto puede describirse de diversas formas, por lo que es necesario introducir los parámetros cromatográficos.



- **Tiempo de retención,  $t_r$ .** Es el tiempo que transcurre desde la inyección del analito hasta que éste llega al detector. Es característico del analito para condiciones de operación constantes. La cantidad correspondiente, volumen de retención, es el volumen de la fase móvil necesaria para eluir un soluto determinado de la columna.
- **Tiempo muerto,  $t_m$ .** Es el tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. Representa el espacio vacío de la columna y la tubería desde el inyector hasta el detector.
- **Tiempo de retención ajustado,  $t_r'$ .** Es la diferencia entre el tiempo que tarda un soluto en atravesar la columna y el que emplea un disolvente no retenido.

$$t_r' = t_r - t_m$$



**Figura 47. Cromatograma**

- **Coefficiente de distribución,  $K$ .** Representa el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna. Si los diferentes componentes de una mezcla poseen coeficientes de distribución diferentes, su velocidad de migración a lo largo del sistema será diferente y podrán separarse. Se define como:

$$K = \frac{[S]_{st}}{[S]_m}$$

Donde  $[S]_{st}$  y  $[S]_m$  representan a la cantidad del soluto S en la fase estacionaria y la fase móvil (Sosa, 2014).

- **Factor de capacidad,  $k'$ .** Para un conjunto de parámetros de operación,  $k'$  es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación con el tiempo transcurrido en la fase móvil. Se define como el cociente de los moles de soluto en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil.

$$k' = \frac{n_{fest}}{n_{fmóvil}} = \frac{t'_r}{t_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

donde  $n_{fest}$  y  $n_{fmóvil}$  son los moles de soluto en la fase estacionaria y en la fase móvil respectivamente. Si  $k'$  es muy pequeña, la retención es muy pobre y los picos de interés tienden a generar interferencias, pero si  $k'$  es muy grande, se presenta el ensanchamiento de banda, que dificulta la detección y el tiempo de la corrida se vuelve excesivamente largo, se recomienda un intervalo de  $2 < k' < 10$

- **Factor de selectividad,  $\alpha$ .** Si hay dos componentes, 1 y 2, el factor de selectividad es el cociente de sus tiempos de retención ajustados. Cuanto mayor es la retención relativa, mayor es la separación entre los dos componentes. El valor de  $\alpha$  es importante para determinar la posibilidad de lograr una separación, ya que aún teniendo una columna excelente dos solutos no pueden separarse si  $\alpha=1$ .

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{r2}}{t_{r1}}$$

- **Eficiencia de una columna,  $N$ .** La eficiencia de sistema cromatográfico es una característica muy importante, expresada como una cantidad adimensional se denomina número de platos teóricos  $N$ , este parámetro refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna. El número de platos teóricos se calcula mediante las siguientes expresiones.

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{W_b} \right)^2$$

$$N = 5.54 \left( \frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

Donde  $W_b$  y  $W_{1/2}$  son el ancho del pico a la base y el ancho del pico a la mitad de la altura respectivamente.

- **Altura equivalente del plato teórico,  $H$ .** Se utiliza como punto de comparación en la eficiencia de columnas de diferente longitud, puesto que el número de platos teóricos depende de su longitud ( $L$ ), definido por:

$$H = \frac{L}{N}$$

- **Resolución,  $R$ .** El parámetro que mide la separación efectiva entre dos analitos se denomina resolución. La separación efectiva entre dos componentes depende fundamentalmente de dos factores: a. La separación entre los máximos de los picos (relacionada con la diferencia entre sus constantes de distribución) b. El ensanchamiento de las bandas en su migración a través de la columna. El grado de separación o resolución de dos bandas adyacentes se define como la distancia entre el centro de los picos dividida entre el ancho promedio.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \frac{k_2'}{1 + k_2'}$$

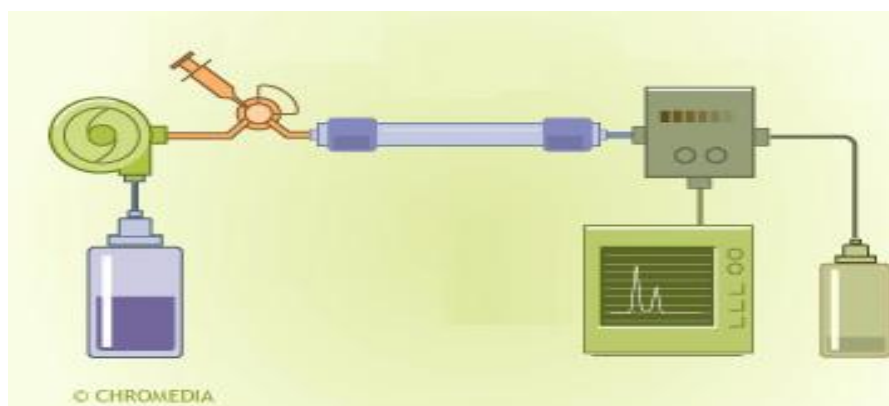
La ecuación anterior muestra que la resolución está ligada a tres factores: la eficiencia, la retención y la selectividad, por lo que una óptima separación puede obtenerse mediante la modificación de cualquiera de estos factores (Sosa, 2014).

### III. Instrumentación de la cromatografía de líquidos de alto rendimiento

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (CLAR) utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a pasar por una columna de partículas finas consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris, 2007). En esta técnica

una muestra líquida o un sólido disuelto es llevado a través de una columna por una fase móvil líquida. La separación es determinada por la interacción soluto-fase estacionaria incluyendo adsorción líquido-sólido, partición líquido-líquido e intercambio iónico, y por la interacción soluto-fase móvil.

El equipo de CLAR consta de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna a alta presión, un detector y un ordenador para controlar el equipo y visualizar los resultados. Actualmente algunos equipos incluyen además un horno para controlar la temperatura de la columna. La Figura 48 muestra el diagrama de un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento.



**Figura 48. Diagrama de un cromatógrafo de líquidos**

- a) **Sistema de suministro de disolvente.** Un equipo de cromatografía de líquidos de alto rendimiento posee uno o más depósitos de vidrio o acero inoxidable con capacidad de 200 a 1000 mL. Los recipientes se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos, en general oxígeno y nitrógeno, que interfieren formando burbujas en la columna y los sistemas de detección. Estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración de polvo y de las partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que dañen a la bomba, los sistemas de inyección o tapen la columna(Sosa, 2014).
- b) **Sistema de bombeo.** Es la parte del cromatógrafo que bombea fase móvil a una presión constante a través de la columna. Durante el experimento

cromatográfico, la bomba puede liberar fase móvil a composición constante (modo isocrático) o en composición creciente, llamado gradiente. Una bomba estándar de CLAR debe satisfacer los siguientes requerimientos(Skoog, West, & Holler, 2001):

- Flujo entre 0.1 a 10.0mL/min
- Posibilidad de presión hasta 480 atm
- Reproducibilidad de flujo al menos del 0.5%
- Estar fabricada con componentes resistentes a la corrosión debida a los disolventes (juntas de acero inoxidable o teflón)

Existen dos tipos básicos de bombas: las de presión constante y las de flujo constante.

**c) Sistema de inyección de la muestra.** Existen dos tipos de inyectores manuales: los de jeringa y los de válvula. Un inyector ideal debe tener las siguientes características:

- Introducir la muestra en la columna como una banda lo más estrecha posible.
- Ser de fácil manejo
- Dar lugar a resultados reproducibles, tanto en la cantidad de muestra inyectada como en el ensanchamiento que origina en la banda cromatográfica.
- Ser capaz de trabajar a presiones elevadas.

**d) Detectores.** Éste dispositivo permite medir, a la salida de la columna, una propiedad física del eluyente, que deberá depender de la composición de éste. La detección de cromatografía se realiza, habitualmente, en continuo aunque es posible la utilización de colectores de fracciones para la identificación y cuantificación de pequeñas fracciones del eluyente. Las características ideales que debe poseer un detector empleado en CLAR se resumen a continuación(Valcárcel & Gómez, 1988):

- Alta sensibilidad (del orden de  $10^{-12}$ - $10^{-11}$ ), que implica un bajo ruido a fondo.
- Respuesta universal a todos los solutos

- Amplio intervalo lineal de concentración: entre 5 y 6 órdenes de magnitud
- Volumen mínimo de la célula de flujo, para evitar dispersión de solutos
- No destructivo.
- Insensible a cambios ambientales: presión, flujo, temperatura.
- Operación simple y a largo tiempo.

La selección del detector a utilizar depende de la muestra, la sensibilidad, selectividad y versatilidad requerida por el análisis(Sosa, 2014). Los tipos de detectores más comunes son:

- UV-Visible
- Fluorescencia
- Índice de refracción
- Dispersión de luz
- Masas
- Conductimétrico
- Amperométrico

#### **IV. Parámetros del método**

El método empleado en esta investigación ha sido validado en su precedente (Sosa, 2014). Se obtuvieron los parámetros de desempeño del método: linealidad, intervalo de trabajo, la veracidad del método (precisión y recobro), en el intervalo de concentración de 0.05-1 mg/L, mostrados en la Tabla 15.

**Tabla 15. Parámetros de desempeño de la técnica**

Parámetro		Valor
Centro de gravedad	$\bar{x}$ ([AF])	0.389
	$\bar{y}$ (Cuentas de área)	119023
Coeficiente de correlación r		0.9996
Coeficiente de determinación $r^2$		0.9992
Sensibilidad (Pendiente m, en mg/L,)		303824
Ordenada al origen (b)		2036
Límite detección (mg/L)		0.007
Límite de cuantificación (mg/L)		0.025
Precisión (A un nivel de concentración de 0.65 mg/L)		Repetibilidad (Desviación estándar relativa, con n=3) 0.72 %
		Reproducibilidad (Desviación estándar relativa, con n=9) 1.47 %
Recobro (porcentaje)		97.22% ( $\pm 2.34$ )

## ANEXO II. TASA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE GENERACIÓN

Durante la fase exponencial, la velocidad de crecimiento es constante, por lo que su representación logarítmica se presenta como línea recta donde la pendiente corresponde a la *tasa de crecimiento* (Brock, Madigan, Martinko, & Parker, 2004). El siguiente apartado muestra el desarrollo matemático que da lugar a esta premisa.

### I. Representación matemática

El aumento de células que se produce en un cultivo bacteriano creciendo exponencialmente es una progresión geométrica de base 2. Debido a esto, existe una relación directa entre el número de células presentes inicialmente en un cultivo y el número presente tras un periodo de crecimiento exponencial:

$$N_t = N_0 \cdot 2^n$$

Donde  $N_t$  = número final de células al tiempo  $t$ ,  $N_0$  = número inicial de células y  $n$  = número de generaciones que han ocurrido durante el periodo de crecimiento exponencial (Tortora, Funke, & Case, 2007). El número de generaciones se puede calcular de la siguiente forma:

$$n = t/g$$

donde  $t$  es el tiempo transcurrido y  $\tau$  es el tiempo de generación definido como el tiempo necesario para que una célula se divida y su población se duplique.

Esto es:

$$N_t = N_0 \times 2^{t/g}$$

Dado que la relación anterior no es lineal se transforma empleando logaritmos en dos términos y resulta:

$$\ln N_t = \ln N_0 + \frac{t}{g} \ln 2$$

Por otro lado, en la fase exponencial del crecimiento, la tasa de incremento del número de bacterias en un tiempo determinado es proporcional a la masa presente y puede representarse por la siguiente ecuación:

$$\frac{dN}{dt} = kN$$



donde  $k$  es la constante de la velocidad del crecimiento, una medida del número de generaciones que ocurren por unidad de tiempo en un cultivo exponencial. Integrando la ecuación anterior durante el tiempo de cultivo, se transforma en la siguiente función exponencial (GENMIC):

$$N = N_0 e^{kt}$$

que tomando logaritmo resulta en:

$$\ln N = \ln N_0 + kt$$

De acuerdo a lo anterior existe una correlación inversa entre el valor de la tasa de crecimiento  $k$  y el tiempo de generación, es decir:

$$k = \frac{\ln 2}{g}$$

## II. Cálculo de la tasa de crecimiento y el tiempo de generación del cultivo control de *Chlorella vulgaris*

Los datos de la absorbancia (A) del control en función del tiempo para la fase de crecimiento exponencial se presentan en la Tabla 16.

**Tabla 16. Absorbancia promedio del cultivo control en función del tiempo**

Tiempo (horas)	A	Ln(A)
96	0.0157	-4.1562
216	0.0351	-3.3486
264	0.0380	-3.2693
360	0.0514	-2.9675
432	0.0682	-2.6853
600	0.1107	-2.2009

La regresión lineal correspondiente da lugar a la siguiente ecuación:

$$\ln N = \ln N_0 + kt$$

$$\ln N = 0.0037t - 1.872$$

Donde la pendiente corresponde a la tasa de crecimiento:

$$m = 0.0037h^{-1} = k$$

En consecuencia, el tiempo de generación se expresa como:

$$g = \frac{\ln 2}{k} = \frac{\ln 2}{0.0037h^{-1}} = 187.33 h$$

Así, para el control se obtiene un valor de tasa de crecimiento de  $0.0037 h^{-1}$  y un tiempo de generación de 187.33 horas.

Los datos de biomasa para cada uno de los experimentos se presenta en la Tabla 17.

**Tabla 17. Relación de biomasa y tiempo de exposición para los ensayos simples**

Ensayo	Tiempo de exposición	Biomasa
<b>A-C<sub>8</sub>NH<sub>12</sub></b> [2.1 mg/L]	1	2.63
	2	3.01
	3	2.75
	4	3.13
<b>A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub></b> [2.1 mg/L]	5	3.99
	10	4.29
	15	4.83
	20	3.61
	25	2.31
	30	3.9
<b>A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub></b> [5.0 mg/L]	6	2.1
	12	3.8
	4	4.97
	48	4.84
	36	2.84
<b>A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub></b> [2.1 mg/L]	5	3.58
	10	4.61
	15	5.08
	20	6.65
	25	5.41
	30	3.43

## ANEXO III. MEMORIA FOTOGRÁFICA DE LOS BIOENSAYOS

### I. Bioensayos con dodecilamina 2.1 mg/L

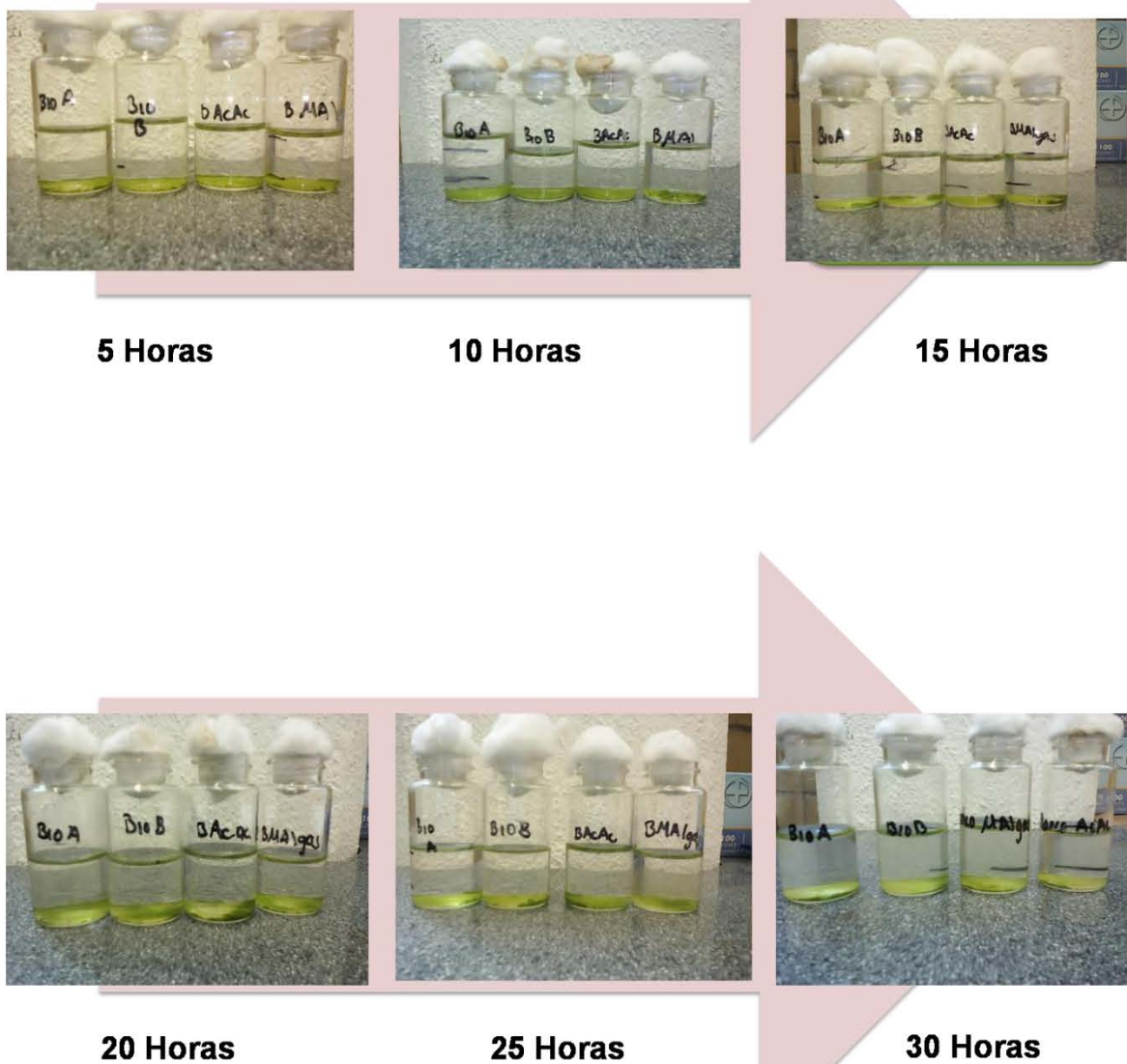


Figura 49. Memoria fotográfica del bioensayo con acetato de dodecilamina 2.1 mg/L

## II. Bioensayos con dodecilamina 5 mg/L

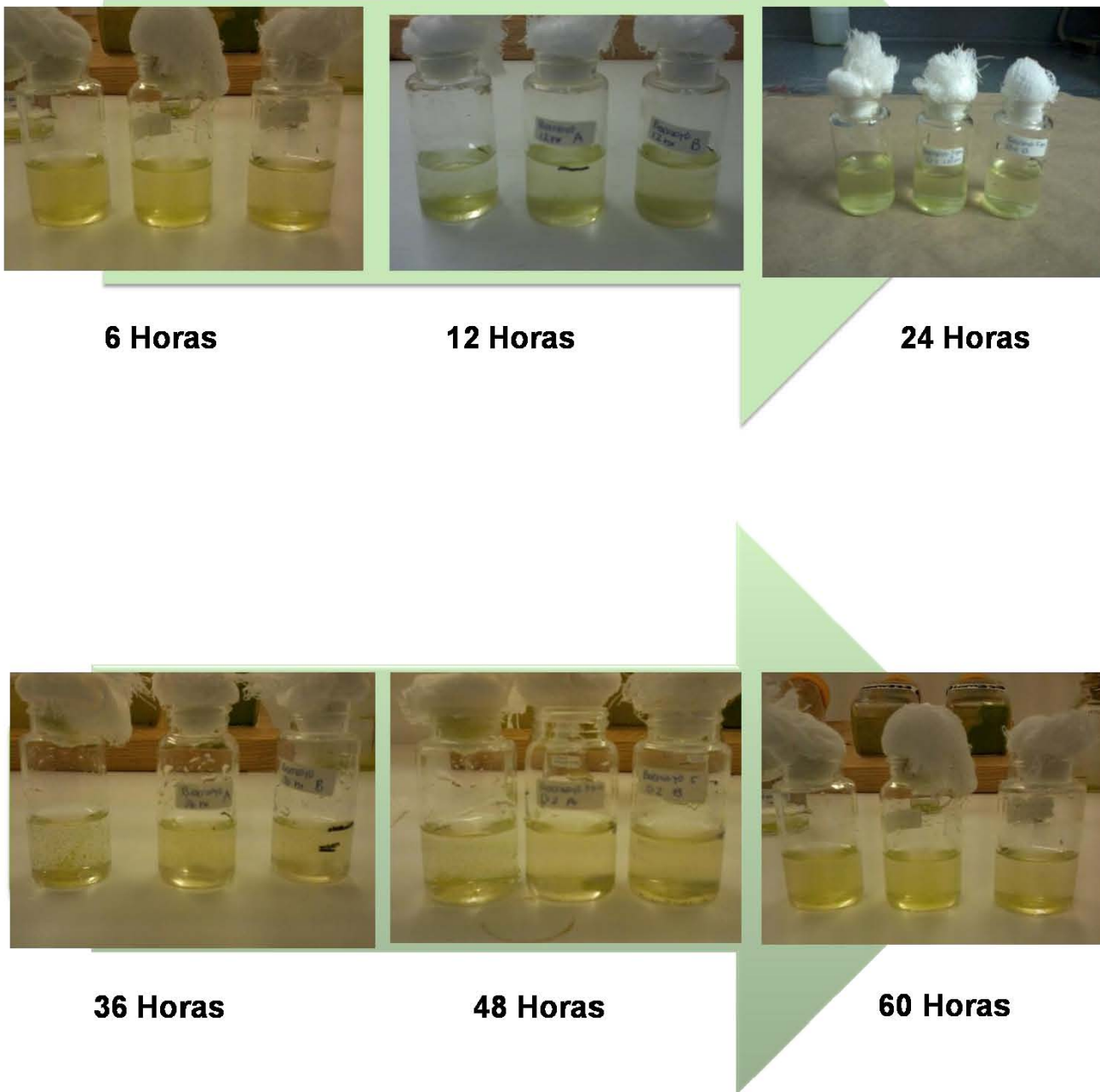


Figura 50. Memoria fotográfica del bioensayo con acetato de dodecilamina 5.0 mg/L

### III. Bioensayos con octilamina 2.1 mg/L

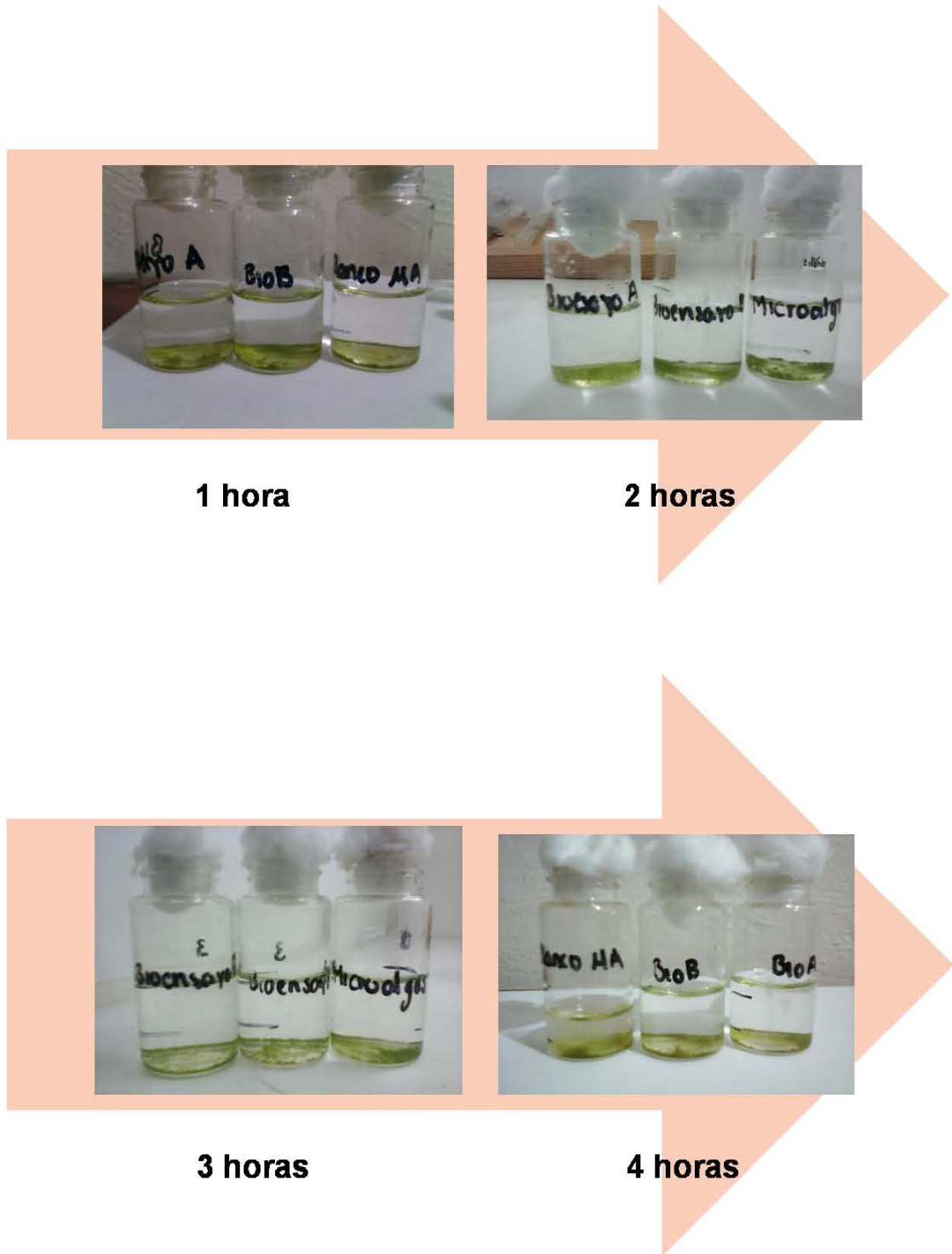


Figura 51. Memoria fotográfica del bioensayo con acetato de octilamina 2.1 mg/L

I. Bioensayos con tetradecilamina 2.1 mg/L



5 Horas



10 Horas



15 Horas



20 Horas



25 Horas



30 Horas

Figura 52. Memoria fotográfica del bioensayo con acetato de tetradecilamina 2.1 mg/L