



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**BIORREMOCIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS EN AGUA MEDIANTE MICROALGAS
INMOVILIZADAS EN UN REACTOR NO CONTINUO: ETAPA
EXPERIMENTAL A PEQUEÑA ESCALA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

EDUARDO DE JESÚS LOERA FLORES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



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: DR. JOSÉ LUZ GONZÁLEZ CHÁVEZ

VOCAL: PROFESOR EDUARDO BONILLA ESPINOSA

SECRETARIO: DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

1er SUPLENTE: DR. ALBERTO ROSAS ABURTO

2do SUPLENTE: DR. JOSÉ AGUSTÍN GARCÍA REYNOSO

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 208, Edificio F2, Facultad de Química, Circuito Interior, Ciudad
Universitaria

Laboratorio 3-D, Edificio A, Facultad de Química, Circuito Interior, Ciudad
Universitaria

ASESORA DEL TEMA:

Dra. Martha Patricia García Camacho _____

SUPERVISORA TÉCNICA:

M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera _____

SUSTENTANTE(S):

Eduardo de Jesús Loera Flores _____

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Segunda Casa, que desde hace 10 años me acogió, me hizo crecer como profesional, como ser humano, y que me encaminó para volverme una persona que servirá para que este país progrese.

Se agradece el apoyo y la beca ofrecidos por la *Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México* DGAPA-UNAM en el proyecto PAPIIT IT203214 Bioremoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos acuosos con microalgas libres e inmovilizadas, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por el apoyo en el proyecto de CB 166389, Análisis de trazas cromatográfico para la caracterización de la biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por microalgas.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho, además de por ser mi asesora, por haber sido un gran apoyo para mí en todo sentido, por permitirme entrar en su equipo de laboratorio, por la confianza, su paciencia, enseñanzas, comprensión, consejos, guía, afecto y amistad, cosas que nunca olvidaré.

A la M. en C. Rosario Covarrubias Herrera, además de por haberme apoyado como asesor técnico, por su apoyo, consejo, paciencia, enseñanzas, amistad y cariño, cosas que atesoro más que cualquier fortuna.

Al M. en C. Carlos Guzmán de las Casas, además de por sus preciados consejos que me ayudaron al diseño de los mini-reactores de este trabajo y por ser mi profesor de Ingeniería Química, por su amistad, buen humor, y por compartir su conocimiento conmigo.

A la Dra. Silene Ferraro, además de por sus enseñanzas en el software SPSS 15.0, para facilitarme enormemente mis cálculos estadísticos para este trabajo, por su apreciada amistad, por su cordialidad, y por todas las pláticas amenas que tuvimos.

A manera personal, quisiera agradecer a mi familia, en resumen, por todo. Por el enorme cariño, amor, apoyo, y calidez del hogar en el que me criaron, con especial mención a mis padres, Josefina, y Raúl, por darme la vida, por haber cuidado de mí, por quererme, por sus enormes sacrificios en nombre del amor por nosotros sus hijos, por haber hecho el mejor de sus esfuerzos para educarme y criarme, y porque además de con sus palabras, con su ejemplo me han dado valiosísimas lecciones de vida que me hacen enorgullecerme de ellos y de querer afrontar los problemas de la vida con sus mismos valores. Mis hermanos, Diana, y Rique, no están exentos de esta mención, porque me siento afortunado de crecer junto a personas tan relajadas pero que en el fondo son buenos tipos, con quien he compartido algunos de los mejores momentos de mi vida, entre juegos, golpes y risas; no me olvido de Daniel y a Ana, que aunque no he tenido la fortuna de haber crecido junto a ellos, son también mi adoración.

También con mención especial, a mis abuelos, tíos, y tías, paternos y maternos, que muchas veces hicieron de segundos padres para mí porque les nació en el corazón, una vez más he de decir que me siento inmensamente afortunado de contar con este excelentísimo grupo de personas, de primera clase, del mejor nivel, a las que puedo llamar familia, cosa que me enorgullece enormemente.

En cuanto a los agradecimientos a mi familia, por último, menciono a mis primos también, que cuando tuve la fortuna de estar a su lado de visita, nos volvíamos como hermanos, teniendo anécdotas divertidas y que también otras que nos harán estar preparados de forma adecuada, para ser los hombres y mujeres del mañana como líderes de esta familia, y como miembros valiosos de este país.

A manera especial, agradezco a mis buenos amigos del Laboratorio L-208, Mayra, Enrique, Everardo, Fernando Blanco, Miguel, Fernando Villeda, y Jorge, pues a su lado enfrente esta pesada pero bonita etapa de la tesis, con los que viví una verdadera camaradería, y con ellos pasé grandes momentos, aprendí muchas cosas, y por ello tendremos una gran amistad de ahora en adelante.

A Óscar Elizalde, además de por ser un jefe ejemplar del que aprendí muchísimo, y colega de trabajo excepcional, por su amistad que atesoro como nada en el mundo, por su calidez humana, y por creer y confiar en mí cuando ni yo mismo lo hacía.

No me olvido de mis colegas de trabajo, René, Zully, Angélica, Cecilia, Rosaura, Eduardo, Diana, y Denisse, por su gran compañerismo, su invaluable amistad, por todos esos ratos tan agradables juntos, y por su incondicional apoyo en todos mis proyectos. Veré porque nuestra amistad dure toda la vida.

Y por último, he de mencionar que esta tesis va dedicada a ti, abuelita Ángela, por tu enorme valentía ante esa enfermedad tan terrible, a la que plantaste cara como una verdadera Titaneza, que peleó hasta el último instante, dejándonos admirados del testimonio de la tremenda fuerza que había en ti. Jamás te olvidaré, y puedo decir que me quedo con esos gratos recuerdos llenos de amor, dulzura, ternura, comprensión, y enseñanzas que me dejaste, siendo la más importante que no importa cualquier obstáculo o desafío que me ponga la vida, si heredé al menos la mitad del valor y la fuerza tu corazón y de tu espíritu, entonces no me debe asustar nada.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	6
1.1. CONTAMINACIÓN DEL AGUA	6
1.1.1. Definición	6
1.1.2. Clases de contaminantes.....	6
1.1.3 Efectos de la contaminación del agua.....	10
1.1.4 Métodos de remoción de contaminantes de medios acuosos	11
1.1.5 Monitoreo de la contaminación del agua.....	13
1.2 BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS.....	13
1.2.1 Definición	13
1.2.2 Bio-reactores	15
1.3 MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO	20
1.3.1 Conceptos y definiciones de método analítico.....	20
1.3.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	25
1.3.3 Extracción en fase sólida en la preparación de muestras biológicas ..	34
1.4 FENÓMENOS DE TRANSPORTE.....	37
1.4.1 Transferencia de <i>momentum</i>	37
1.4.2 Transferencia de energía	38
1.4.3 Transferencia de masa.....	39
1.5 INGENIERÍA DE REACTORES	40
1.5.1 Reacciones homogéneas.....	40
1.5.2 Reacciones heterogéneas	41
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
2.1 EQUIPOS.....	44
2.1.1 Cromatógrafo	44
2.1.2 Otros equipos.....	44

2.2 MATERIALES.....	44
2.2.1 Reactivos.....	44
2.2.2 Disolventes.....	44
2.2.3 Preparación de muestras.....	45
2.3 REACTORES.....	47
2.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	47
2.4.1 Análisis y preparación de muestra.....	49
2.4.2 Manejo de cultivos e inmovilización.....	54
2.4.3 Diseño y evaluación de bio-reactores.....	57
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
3.1 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y DETECCIÓN.....	71
3.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.....	72
3.2.1 B(a)A.....	72
3.2.2 B(a)P.....	76
3.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN PARA LA TÉCNICA DE EFS Y LINEALIDAD DEL MÉTODO EFS-HPLC-UV.....	81
3.3.1 Recobro de la técnica de extracción.....	81
3.3.2 Precisión (repetibilidad) de la técnica de evaporación.....	81
3.3.3 Linealidad del método EFS-HPLC-UV.....	82
3.4 BIOENSAYOS CON MINI REACTORES.....	85
3.4.1 Efecto de tipo de reactor y el tipo de agitación.....	85
3.4.2 Efecto de velocidad de agitación (mini reactor con agitación magnética).....	103
3.4.3 Efecto de aumento de cantidad de masa y volumen.....	109
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....	123
ANEXO 1.....	125
ANEXO 2.....	126
ANEXO 3.....	128
BIBLIOGRAFÍA.....	144
REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.....	150

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura química del Benzo(a)Pireno	9
Figura 1.2 Estructura química del Benzo(a)Antraceno.....	10
Figura 1.3 Imagen al microscopio de la microalga <i>Selenastrum Capricornutum</i>	15
Figura 1.4 Unidades básicas del polímero alginato	18
Figura 1.5 Bloques de segmento del polímero de alginato	19
Figura 1.6 Procedimiento general de inmovilización de microorganismos traducido al español	20
Figura 1.7 Ilustración del modelo de caja de huevo	20
Figura 1.8 Secuencia de Elución	27
Figura 1.9 Columna de destilación fraccionada	33
Figura 1.10 Cartucho de EFS	35
Figura 1.11 Procedimiento de EFS	37
Figura 2.1 Metodología general del trabajo experimental	48
Figura 2.2 Mini reactor de matraz en agitación orbital	59
Figura 2.3 Primera etapa de diseño. Preparación del armazón en vidrio del mini reactor de recirculación (en forma de copa)	59
Figura 2.4 Segunda etapa de diseño. Adaptación al mini reactor de una malla de acero inoxidable	60
Figura 2.5 Tercera etapa de diseño. Adición al mini reactor de las esferas de microalgas inmovilizadas de alginato conteniendo aproximadamente 9×10^5 células por esfera	60
Figura 2.6 Primera etapa de diseño. Preparación del armazón de vidrio de mini reactor	61
Figura 2.7 Segunda etapa de diseño. Mini reactor con mosca agregada	61
Figura 2.8 Tercera etapa de diseño. Mini reactor con mosca y malla	61
Figura 2.9 Cuarta etapa de diseño. Mini reactor con esferas de microalgas inmovilizadas	62
Figura 2.10 Primera etapa de diseño. Armazón de vidrio de mini reactor	62
Figura 2.11 Segunda etapa de diseño. Mini reactor con mosca	62
Figura 2.12 Tercera etapa de diseño. Mini reactor con mosca y malla	63

Figura 2.13 Cuarta etapa de diseño. Mini reactor con esferas de microalgas inmovilizadas	63
Figura 2.14 Mini reactor de lote con agitación magnética	65
Figura 2.15 (A) Mini reactor de lote con agitación magnética. Reactor y Parrilla	65
Figura 2.15 (B) Mini reactor de lote con agitación magnética. Acercamiento al reactor.	65
Figura 2.15 (C) Mini reactor de lote con agitación magnética. Vista por arriba del reactor y la parrilla.	66
Figura 2.16 Diagrama de mini reactor listo para poner en marcha	66
Figura 2.17 (A) Mini reactor de lote con agitación por recirculación.	67
Figura 2.17 (B) Mini reactor de lote con agitación por recirculación. Con acercamiento	67
Figura 3.1 Cromatograma a 285 nm de longitud de onda para obtener la mejor respuesta del equipo al B(a)A	71
Figura 3.2 Cromatograma a 263 nm de longitud de onda para obtener la mejor respuesta del equipo al B(a)P	72
Figura 3.3 Gráfico de curva de calibración de respuesta de equipo en área para B(a)A	75
Figura 3.4 Gráfico de curva de calibración de respuesta de equipo para altura para B(a)A	76
Figura 3.5 Gráfico de curva de calibración de respuesta de equipo para área para B(a)P	79
Figura 3.6 Gráfico de curva de calibración de respuesta de equipo para altura para B(a)P	80
Figura 3.7 Linealidad de método de EFS-HPLC UV para B(a)P	82
Figura 3.8 Linealidad de método de EFS-HPLC-UV de B(a)A para visualizar recobro global	83
Figura 3.9 Linealidad de método de EFS-HPLC UV para B(a)P	84
Figura 3.10 Linealidad de método de EFS-HPLC-UV de B(a)P para visualizar recobro global	84
Figura 3.11 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación orbital de B(a)A (50 rpm)	86
Figura 3.12 Evaluación de mini reactor de matraz	

con agitación orbital de B(a)P (50 rpm)	88
Figura 3.13 Evaluación de mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)A. (Aprox. 90 rpm)	90
Figura 3.14 Evaluación de mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)P. (Aprox. 90 rpm)	93
Figura 3.15 Evaluación de mini reactor de lote con agitación por recirculación de B(a)A. (A flujo de 1 mL/min).	96
Figura 3.16 Evaluación de mini reactor de lote con agitación por recirculación de B(a)P. (A 1 mL/min)	98
Figura 3.17 Estudio comparativo de remoción contra tiempo de mini reactor de agitación magnética para B(a)A y B(a)P	102
Figura 3.18 Evaluación de velocidad de agitación contra remoción en mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)A a 6 horas de exposición	104
Figura 3.19 Gráfico de Evaluación de velocidad de agitación contra remoción en mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)P a 6 horas	107
Figura 3.20 Evaluación del efecto del aumento del volumen y de la masa de HAP (manteniendo concentración constante) en la remoción a 6 horas de exposición para B(a)A y B(a)P.	111
Figura 3.21 Evaluación del efecto del aumento del volumen y de la masa de HAP (para mantener concentración constante) en la remoción a 6 horas para B(a)A y B(a)P.	117

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Los 16 HAP's prioritarios de la EPA	8
Tabla 1.2 Propiedades generales del Benzo(a)Pireno	9
Tabla 1.3 Propiedades generales del Benzo(a)Antraceno	9
Tabla 1.4 Clasificación de materiales de inmovilización de microorganismos más comunes	17
Tabla 1.5 HAP's del estudio de Aygün & Özcimder, 1996	29
Tabla 1.6 Regiones del espectro electromagnético	30
Tabla 2.1 Composición del medio Bristol	45
Tabla 3.1 Parámetros del sistema cromatográfico y detección	71

Tabla 3.2 Variación entre los tiempos de retención, las áreas y las alturas del pico cromatográfico en un mismo día a diferentes concentraciones de B(a)A	73
Tabla 3.3 Variación entre inyección en días diferentes a concentración de 1 µg/mL de B(a)A	74
Tabla 3.4 Variación entre los tiempos de retención, las áreas y las alturas del pico cromatográfico en un mismo día a diferentes concentraciones de B(a)P	77
Tabla 3.5 Variación entre inyección en días diferentes a concentración de 1 µg/mL de B(a)P	78
Tabla 3.6 Recobros y precisión sin evaporación del método EFS-HPLC-UV .	81
Tabla 3.7 Recobros y precisión de la técnica de evaporación	81
Tabla 3.8 Variación entre inyección en un mismo día a diferentes concentraciones de B(a)A para el método de EFS-HPLC-UV	82
Tabla 3.9 Variación entre inyección en un mismo día a diferentes concentraciones de B(a)P para el método de EFS-HPLC-UV	83
Tabla 3.11 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación orbital de B(a)A	85
Tabla 3.12 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación orbital de B(a)P	87
Tabla 3.13 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación magnética de B(a)A.....	90
Tabla 3.14 Análisis estadístico de controles (Prueba Post Hoc) de B(a)A	91
Tabla 3.15 Análisis estadístico de controles (Prueba Post Hoc) de B(a)A	92
Tabla 3.16 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación magnética de B(a)P	93
Tabla 3.17 Análisis estadístico de controles (Prueba Post Hoc) de B(a)P	94
Tabla 3.18 Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)P	95
Tabla 3.19 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación por recirculación de B(a)A	96
Tabla 3.20 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación por recirculación de B(a)P	97
Tabla 3.21 Comparación de remoción en el tiempo mayor	

entre los dos primeros mini reactores para ambos HAP's.	100
Tabla 3.22 Estudio comparativo de remoción contra tiempo de mini reactor de agitación magnética para B(a)A y B(a)P	101
Tabla 3.23 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación magnética de B(a)A a 6 horas de exposición	103
Tabla 3.24 Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)A	105
Tabla 3.25 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación magnética de B(a)P	106
Tabla 3.26 Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)P	108
Tabla 3.27 Evaluación del efecto del aumento del volumen (y de la masa, debido a que se mantuvo concentración constante) de HAP's, para el mini reactor de agitación magnética (50 mL) en el remanente de B(a)A y B(a)P a 6 horas de exposición	110
Tabla 3.28 Análisis estadístico de controles en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A	112
Tabla 3.29 Análisis estadístico de ensayos en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A	113
Tabla 3.30 Análisis estadístico de controles en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A	114
Tabla 3.31 Análisis estadístico de ensayos en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P	115
Tabla 3.32 Evaluación del efecto del aumento del volumen (y de la masa, debido a que se mantuvo concentración constante) de HAP's, para el mini reactor de agitación magnética (100 mL) en el remanente de B(a)A y B(a)P a 6 horas de exposición	116
Tabla 3.33 Análisis estadístico de controles en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A	118
Tabla 3.34 Análisis estadístico de ensayos en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A	119
Tabla 3.35 Análisis estadístico de controles en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P	120
Tabla 3.36 Análisis estadístico de ensayos en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P	121

ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo

B(a)A: Benzo(a)Antraceno

B(a)P: Benzo(a)Pireno

C18: Octadecil Carbono

CV: Coeficiente de Variación

DER: Desviación Estándar Relativa

EFS: Extracción en Fase Sólida

EFS-HPLC-UV: EFS acoplada a Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detector UV

HAP: Hidrocarburo Aromático Policíclico

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*, por sus siglas en inglés)

HPLC-UV: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Detector UV

ICH: Conferencia Internacional de Armonización, por sus siglas en inglés

LC: Límite de cuantificación

LD: Límite de detección

nm: Nanómetro

MeOH: Metanol

S. Capricornutum.: *Selenastrum capricornutum*

s: desviación estándar

tr: Tiempo de retención

USP: Farmacopea de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés

UV: Ultravioleta

\bar{x} : Promedio

INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's) son contaminantes que cuando se encuentran en agua de consumo y en la de los ecosistemas representan un peligro para los seres humanos debido a su potencial cancerígeno (Mastrangelo *et. al.*, 1996), motivo por el cual es de gran importancia la investigación en la remoción de HAP's del agua. Por esta razón, es necesario diseñar un sistema que utilice todos los recursos disponibles para que se efectúe la remediación del agua contaminada con HAP's, es decir, de un reactor en el cual se optimice toda variable y parámetro para asegurar la eficiencia de la remoción.

En efecto, los HAP's pueden sufrir en el ambiente adsorción, volatilización, fotólisis y oxidación química, pero las transformaciones que sufren con los microorganismos, representan los mayores procesos de neutralización para remediar los sitios contaminados de manera ecológica (Ghosal *et al.*, 2016). Así, los microorganismos como bacterias, hongos, plantas y microalgas pueden remover y degradar contaminantes orgánicos para que se vuelvan menos dañinos en los sistemas acuáticos (Chekroun, *et. al.*, 2014), como por ejemplo, el alga *Selenastrum capricornutum* ha demostrado ser capaz de degradar un hidrocarburo aromático policíclico con potencial cancerígeno como el Benzo(a)Pireno (Lindquist & Warshawsky, 1985; Olmos Espejel, *et. al.*, 2012; García de Llasera, *et. al.*, 2016).

Se llamará reactor al recipiente diseñado para que las microalgas efectúen la remoción de HAP's. Estrictamente lo más adecuado para nuestro caso, es llamar a este reactor como "bio-reactor" porque contiene a los microorganismos, sin embargo, por practicidad y porque el reactor utiliza volúmenes muy pequeños, también comúnmente lo llamaremos "mini bio-reactor".

El caso de este trabajo es de un mini bio-reactor no continuo, es decir, sin flujos de entrada ni salida, o "batch", como se conoce en la literatura angloparlante (Aslan & Kapdan, 2006; Chiu, *et. al.*, 2007), debido a que se consideró inicialmente que la remoción por parte de la microalga podría ser muy lenta, y el hecho de tener una corriente de agua entrando y saliendo del dispositivo (reactor continuo), no le daría tiempo al microorganismo para eliminar los

HAP's de manera adecuada, a menos que fuera un flujo muy pequeño, en cuyo caso, se considera más conveniente un reactor no continuo.

Las bases de diseño, operación e inclusive mantenimiento en un sistema a pequeña escala de biorremediación son más prácticas de manejar para la optimización, y con esto analizar y detectar sus ventajas y desventajas, información que será útil para el diseño de un proceso a mayor tamaño en el futuro.

Por lo tanto, en el presente proyecto se estudió a temperatura ambiente la remoción de dos HAP's prioritarios por la Agencia Protectora del Medio Ambiente de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés): Benzo(a)Pireno (B(a)P) y Benzo(a)Antraceno (B(a)A), de una muestra de agua de la llave mediante la microalga *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en esferas de alginato de calcio. La inmovilización se consideró importante porque tiene la finalidad de poder recuperar fácilmente los microorganismos de un medio acuoso después de su proceso de remoción de contaminantes, ya que si no estuvieran inmovilizadas las microalgas estarían dispersas totalmente en el medio acuoso, haciendo complicada su separación total del agua. Para esta inmovilización se encontró que una opción muy adecuada (y la que se adaptó mejor a este trabajo experimental) fue en alginato de sodio, que presenta ventajas como que las células inmovilizadas no sufren cambios físico-químicos extremos durante el proceso de inmovilización, y la estructura polimérica de este polímero natural forma una matriz gentil para los microorganismos, por lo que funciona como barrera protectora para éstos al mismo tiempo, lo que les permite tener las condiciones para sobrevivir y desarrollarse de forma adecuada, como el ingreso de luz hacia éstos (Moreno-Garrido, 2008). Otra ventaja de este material es que si se encuentran las condiciones adecuadas de composición de matriz de alginato (sobre todo de grado de entrecruzamiento en la red polimérica), y se tienen moléculas que no sean demasiado grandes, la difusión hacia el interior y al exterior del alginato de forma adecuada para un propósito como la biorremoción de algún contaminante por un microorganismo, es totalmente viable (Tanaka *et. al.* 1983).

Teniendo en cuenta la gran ventaja de la inmovilización, se aprovechó este conocimiento para diseñar y construir un mini bio-reactor en el cual se optimizaron variables y parámetros para asegurar que efectuará la remoción

biológica, para lo cual la inmovilización en alginato es muy útil. Otro aspecto a mencionar, como lo ya descrito anteriormente, es que los volúmenes de muestra utilizados fueron pequeños, no mayores a 60 mL, para que de este modo en esta etapa en la cual se está comenzando a evaluar el desempeño de estas propuestas de reactores, no represente esta experimentación un gran consumo de agua, reactivos, materiales, energía, recursos, etc., y que este trabajo proporcione valiosa información para en un futuro se escale y poder utilizar volúmenes de muestra mucho mayores.

Para evaluar cuantitativamente la remoción de HAP's mediante las microalgas inmovilizadas y la variación de diferentes factores como forma del reactor, la velocidad de agitación, masa y el volumen de muestra, fue necesario emplear la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con detector espectrofotométrico UV. El aislamiento de los contaminantes del medio acuoso se efectuó por la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS). Las cantidades de Benzo(a)Pireno (B(a)P) y Benzo(a)Antraceno B(a)A remanentes en el medio después de diferentes tiempos de exposición permitieron evaluar los porcentajes de remoción y por lo tanto la eficiencia del mini bio-reactor.

OBJETIVOS

General

Diseño y evaluación de un mini bio-reactor no continuo para la remoción de Benzo(a)Pireno y Benzo(a)Antraceno de un medio acuoso mediante la microalga inmovilizada *Selenastrum capricornutum*.

Particulares

- A. Evaluación del desempeño de dos propuestas de mini bio-reactores no continuos con diferente tipo de agitación.
- B. Evaluación de la velocidad de agitación en la remoción de HAP's por el mini bio-reactor seleccionado por el mejor desempeño.
- C. Evaluación de diferentes volúmenes y cantidad de masa (concentración constante) en la remoción de HAP's en el mini bio-reactor seleccionado.
- D. Proporcionar la información comparativa suficiente para poder establecer las condiciones óptimas para el diseño de un reactor no continuo de mayor tamaño con el mismo fin.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. CONTAMINACIÓN DEL AGUA

1.1.1. Definición

La contaminación de agua se define como su alteración perjudicial causada por la introducción de sustancias químicas, radioactivas o de microbios patógenos, que puede ser también provocada por fenómenos físicos. El hecho de que se altere la calidad de agua puede llegar a producir enfermedades y muertes a los seres humanos y a los ecosistemas en general (Hogan, 2014, referencia electrónica).

1.1.2. Clases de contaminantes

1.1.2.1 Contaminantes biológicos

Se refiere a los microbios patógenos introducidos al agua principalmente mediante desechos sin tratar, y cuyo efecto principal es la reducción de contenido de oxígeno en agua, que la hace no apta para consumo (Mann *et. al.*, 2014)

También tiene relevancia el hecho de hablar de la eutrofización, que se refiere al proceso que trata de que el desarrollo excesivo de ciertos tipos de algas afectan los sistemas acuáticos amenazando la vida humana y animal, debido a la concentración excesiva de nutrientes de plantas que se originan de la agricultura o de tratamientos de desechos (OMS, 2002), que tiene como consecuencia la obstrucción de la luz solar hacia la fauna y flora del sistema acuático, afectando la fotosíntesis y que los depredadores cacen alimentos, así como también este exceso de biomasa causa una disminución drástica en el oxígeno disuelto en este medio acuoso (Chislock *et. al.*, 2013, referencia electrónica).

1.1.2.2 Contaminantes físicos

Los contaminantes físicos del agua son cuerpos de un tamaño considerable que no pueden ser degradados fácilmente, y que obstaculizan la vida normal de un ecosistema, por ejemplo grandes sedimentos de vegetación o desechos tales como bolsas de plástico, botellas, etc. También la contaminación térmica se incluye en este tipo de contaminantes debido a que una variación significativa de la temperatura en un ecosistema afecta el metabolismo de la

fauna acuática de forma inconveniente, y ésta es debida principalmente a la gran liberación de energía térmica de industrias que coexisten con ambientes acuáticos.

1.1.2.3 Contaminantes químicos

Los contaminantes químicos son muy variados y van desde especies inorgánicas hasta especies orgánicas, la mayoría provienen de fuentes antropogénicas, aunque también de fuentes naturales. Las sustancias radioactivas son una subclase de los contaminantes químicos muy importante, ya que, aunque representan una concentración baja a la contaminación, su potencial dañino es muy importante. Estas sustancias en su mayoría no provienen de desechos de plantas nucleares, sino de prácticas de agricultura como cultivo de tabaco, en el cual se utilizan fertilizantes de fosfato, que tiene cantidades significativas de materiales radioactivos, así como pesticidas.

La acidificación de aguas también es un problema de contaminación química de enorme impacto industrial, que afecta principalmente en los Estados Unidos y algunas partes de Europa (Mann *et. al.*, 2014).

Los contaminantes inorgánicos cuyas fuentes principales son la agricultura intensiva y áreas urbanas altamente densas, ejemplos son fosfato de monopotasio, nitrato de amonio, compuestos de fosfatos y nitrógeno de fertilizantes de agricultura, metales pesados y cloro (Hogan, 2014, referencia electrónica).

Los contaminantes orgánicos más comunes son metanol, etanol, gasolina, percloroetileno, grasa, compuestos de aceite tales como octano, nonano, y en especial mención a los HAP's. Este último grupo de compuestos se describe con mayor detalle a continuación, ya que representan a los compuestos en estudio del presente trabajo.

1.1.2.3.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's)

Los HAP's son hidrocarburos aromáticos con dos o más anillos de benceno fusionados, originados tanto de manera natural como antropogénica, que poseen efectos biológicos perjudiciales, toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad, razón por la cual representan una preocupación ambiental significativa (Haritash & Kaushik, 2009). Los HAP's son productos de la

combustión y la pirólisis, y están presentes en el petróleo, el carbón y en productos derivados de éstos (Lijinsky, 1991).

Muchos HAP's son especialmente peligrosos para el ser humano ya que como son altamente liposolubles, se absorben fácilmente en los tejidos grasos del tracto gastrointestinal de los mamíferos (Samanta, *et. al.*, 2002).

Aunque los HAP's pueden existir en más de 100 combinaciones diferentes, la EPA definió 16 HAP's como prioritarios en cuanto a su impacto contra el ser humano y se enlistan en la **Tabla 1.1**, del más pequeño al más grande en cuanto a tamaño molecular (Rubailo & Oberenko, 2008).

Tabla 1.1 Los 16 HAP's prioritarios de la EPA

Núm.	HAP	Fórmula Molecular	CAS*
1.	Naftaleno	C ₁₀ H ₈	[91-20-3]
2.	Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	[85-01-8]
3.	Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	[120-12-7]
4.	Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	[206-44-0]
5.	Pireno	C ₁₆ H ₁₀	[129-00-0]
6.	Criseno	C ₁₈ H ₁₂	[218-01-9]
7.	Benzo(a)Antraceno	C ₁₈ H ₁₂	[56-55-3]
8.	Benzo(b)Fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	[205-99-2]
9.	Benzo(k)Fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	[207-08-9]
10.	Benzo(e)Pireno	C ₂₀ H ₁₂	[192-97-2]
11.	Benzo(a)Pireno	C ₂₀ H ₁₂	[50-32-8]
12.	Perileno	C ₂₀ H ₁₂	[198-55-0]
13.	Benzo(ghi)perileno	C ₂₂ H ₁₂	[191-24-2]
14.	Dibenzo(ah)antracenos	C ₂₂ H ₁₄	[53-70-3]
15.	Indeno(cd)pireno	C ₂₂ H ₁₂	[193-39-5]
16.	Coroneno	C ₂₄ H ₁₂	[191-07-1]

*Chemical Abstracts Service, Número.

De los cuales, en el presente trabajo se estudiaron el compuesto 7. Benzo(a)Antraceno y el compuesto 11. Benzo(a)Pireno.

Propiedades de los HAP's de estudio

Otra de las razones por las cuales los HAP's son preocupantes es porque son muy persistentes, no pueden ser quemados fácilmente y se quedan en el medio ambiente por largos periodos de tiempo. Los HAP's de manera individual varían en su comportamiento, algunos pueden ser convertidos en vapor fácilmente en el aire, otros no se degradan fácilmente en el agua, algunos otros tienen aplicaciones como para elaboración de tintes, plásticos, pesticidas y hasta medicinas.

Los HAP's pueden entrar al organismo a través de aire, humo de tabaco, aguas, alimentos y bebidas contaminados con HAP's, así como también, a través del contacto de la piel con aceites contaminados (Environmental Protection Agency (EPA), 2008). En las **Tablas 1.2 y 1.3** se presentan las fichas con las propiedades fisicoquímicas de los dos compuestos en estudio, y las **Figuras 1.1 y 1.2** muestran sus estructuras:

Tabla 1.2 Propiedades generales del Benzo(a)Pireno
(Iarc, 2010)

Propiedades	
Fórmula condensada	C ₂₀ H ₁₂
Masa molar	252.31 g/mol
Apariencia	Sólido amarillento
Punto de ebullición	310 – 312 °C a 190 mmHg.
Punto de fusión	179 – 179.3 °C
Solubilidad en agua	0.00162 µg/mL a 0.0038 µg/mL a 25 °C
Log K _{ow} (octanol-agua):	6.35
Constante de Henry	0.034 Pa m ³ / mol a 25 °C.

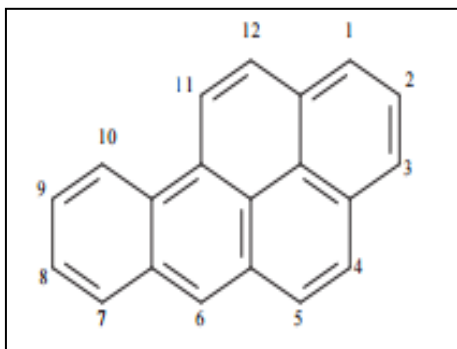


Figura 1.1 Estructura química del Benzo(a)Pireno
(Iarc, 2010)

Tabla 1.3 Propiedades generales del Benzo(a)Antraceno (Iarc, 2005).

Propiedades	
Fórmula condensada	C ₁₈ H ₂₂
Masa molar	228.3 g/mol
Apariencia	Sólido verde amarillento fluorescente
Punto de ebullición	438 °C
Punto de fusión	160.7 °C
Solubilidad en agua	0.009 µg/mL a 25 °C
Log K _{ow} (octanol-agua):	5.91
Constante de Henry	1.22 Pa m ³ / mol a 25 °C

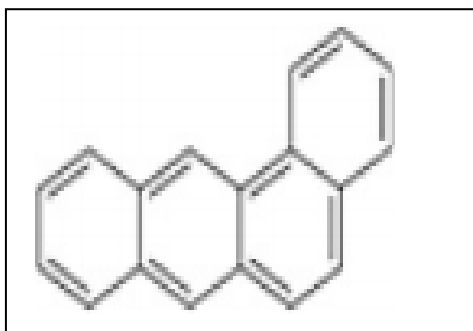


Figura 1.2 Estructura química de Benzo(a)Antraceno
(Forschungsgemeinschaft, 2012, referencia electrónica)

1.1.3 Efectos de la contaminación del agua

El agua además de ser vulnerable a los tipos de contaminantes anteriormente expuestos, es muy susceptible a ser contaminada por fuentes que no están en contacto directamente con la superficie del agua. Por ejemplo, un derrame de sustancias químicas en el suelo (localizado lejos de un cuerpo de agua), no será una fuente de contaminación directa hacia los cuerpos de agua, pero podrá contaminar a los mantos acuíferos subterráneos.

En áreas urbanas la forma más común de contaminación de agua es a través de fugas de tuberías en lugares donde el agua de consumo se pueda mezclar con aguas de drenaje (Mann *et. al.*, 2014).

A continuación se enlistan unos datos que ilustran mejor los efectos de la contaminación del agua (Mann *et. al.*, 2014):

1. Se estima que alrededor de 700 millones de personas globalmente beben agua contaminada.
2. Los animales acuáticos tienen un índice de peligro de extinción 5 veces más alto que los animales terrestres.
3. El derrame masivo de petróleo causado por el British Petroleum (BP) en el 2010, ha causado la muerte de alrededor de 1 000 animales; muchos de ellos estaban en la lista de animales en peligro de extinción.
4. De acuerdo con la UNICEF, más de 3 000 niños mueren diariamente en todo el mundo debido al consumo de agua contaminada.
5. La contaminación en el agua lleva a la propagación de enfermedades como cólera, malaria y diarrea.

1.1.4 Métodos de remoción de contaminantes de medios acuosos

Los métodos de remoción de contaminantes de medios acuosos a grandes rasgos se pueden dividir en tres grandes tipos: Métodos físicos, métodos químicos, y métodos biológicos.

1.1.4.1 Métodos Físicos:

Los métodos físicos, son dados principalmente por dos mecanismos: la sedimentación y la filtración.

1.1.4.1.1 Sedimentación: Aunque es muy poco útil para partículas y microorganismos de tamaños menores a 30 micrómetros, puede representar una técnica de purificación simple y barata. El reposo del agua puede ser suficiente para lograr la sedimentación de los contaminantes, para después removerlos del agua mediante decantación o filtración. Para partículas muy pequeñas o difíciles de sedimentar, se puede promover mediante floculantes o tenso-activos la coagulación de estos contaminantes para formar agregados de tamaño lo suficientemente grande para lograr una sedimentación adecuada (Sobsey, 2002), aunque estrictamente esta parte de floculación ya es un método químico, que se describirá más adelante.

1.1.4.1.2 Filtración: La filtración es el proceso de pasar agua a través de un material para remover partículas y otras impurezas del agua tratada. Una creencia errónea es que la remoción de contaminantes solamente se da mediante el tamizado. Es decir, que solamente porque una partícula es más grande que el tamaño de poro del filtro es la única razón de esta purificación, y sin embargo, se da mediante otros mecanismos, como adsorción en material del filtro y absorción (EPA, 1995), aunque esto ya sea también un proceso químico, que se describirá más adelante.

1.1.4.2 Métodos químicos

Los métodos químicos se pueden catalogar en 4 grandes grupos (Sobsey, 2002):

1.1.4.2.1 Pre-tratamientos de coagulación/floculación: Ejemplo: Mediante la adición de sulfato de aluminio para lograr que los contaminantes se conglomeren.

1.1.4.2.2 Adsorción: Ejemplo: Mediante carbón activado

1.1.4.2.3 Intercambio iónico: Ejemplo: Resinas de suavizamiento de agua

1.1.4.2.4 Desinfección: Ejemplo: Ozonificación del agua.

1.1.4.3 Métodos Biológicos

Los métodos biológicos utilizan microorganismos y se pueden dar con dos tipos de tratamientos: aeróbico y anaeróbico. Estos tratamientos son muy efectivos y amigables con el ambiente. Sin embargo, presentan el inconveniente de la separación de los microorganismos del agua tratada, ya que los microorganismos en un medio acuoso natural no se pueden separar fácilmente por medios físicos, y como solución a esto, se utiliza la inmovilización de microorganismos en diversos materiales, la cual ha tenido un gran auge recientemente y que simplifica mucho un proceso de tratamiento de agua de este tipo (Martins, *et. al.*, 2013). Con respecto a esto, se han hecho estudios en los cuales se ha podido demostrar que el diseño de un bio-reactor para microorganismos inmovilizados presenta ventajas con respecto a un bio-reactor con microorganismos libres, y las ventajas en general son: protección de los microorganismos de sustancias tóxicas, fácil separación de microorganismos del agua, y una transferencia de masa gas-líquido aumentada (para reactores denominados de lecho fluidizado). Como inconveniente principal, cabría resaltar que el rendimiento de remoción de un microorganismo libre con respecto a uno inmovilizado disminuye (Jena, *et. al.*, 2005).

1.1.4.3.1 Métodos aeróbicos: A pesar de que se deben controlar de manera rigurosa la temperatura, humedad, el pH, y los nutrientes a condiciones moderadas, es muy útil ya que no necesita reactores de gran tamaño, y se encuentran abiertos a la atmósfera, además de que las reacciones microbianas aeróbicas son típicamente 10 veces más rápidas que las anaeróbicas.

1.1.4.3.2 Métodos anaeróbicos: Difiere del anterior en que debe de estar cerrado para poder llevar a cabo el metabolismo de los microorganismos, y debe contar con un sistema apropiado para remover gases (principalmente metano y dióxido de carbono), aunque con este tratamiento se puede operar a

condiciones de toxicidad un poco menos moderadas que con el tratamiento aeróbico (Awaleh & Soubaneh, 2014).

1.1.5 Monitoreo de la contaminación del agua

La contaminación del agua puede ser medida por los siguientes métodos: (Mann *et. al.*, 2014):

- **Físicos:** Se mide por propiedades como temperatura, concentración de sólidos o turbiedad.
- **Biológicos:** Involucra el uso de plantas, animales o indicadores microbiológicos para monitorear la salud de un ecosistema acuático. Estas especies biológicas son aquellas cuyas funciones, poblaciones, o estado revelan el grado de integridad ambiental en un ecosistema.
- **Químicos:** Mediante principios de química analítica, se examinan muestras acuosas, cuyos métodos pueden analizar por ejemplo pH, Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), o Demanda Química de Oxígeno (DQO). Se realiza mención especial a los métodos analíticos cromatográficos, donde una de sus aplicaciones para este tema es la separación de sustancias contaminantes de interés del resto de sustancias en una muestra acuosa, y si este método cromatográfico está acoplado a un detector, puede proveer de un monitoreo cuantitativo de un contaminante de interés.

Después de la identificación de sitios contaminados se debe proceder a efectuar su remediación. Ésta puede efectuarse por medios físicos, químicos y biológicos como ya se explicó anteriormente. Los agentes biológicos para la remediación de sitios contaminados han demostrado ser muy eficientes y amigables con el ambiente, por lo que su uso es cada vez más recomendado.

1.2 BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS

1.2.1 Definición

La biorremediación es la aplicación tecnológica que utiliza a organismos y microorganismos vivos para destruir o desintoxicar contaminantes orgánicos e inorgánicos, aprovechando una modificación adecuada del medio ambiente (Environmental Protection Agency (EPA), 2013).

En general estos son los tipos de microorganismos empleados para la biorremediación (Environmental Protection Agency (EPA), 2013):

1. Bacterias
2. Hongos
3. Microalgas

En el trabajo de Mrozik, *et. al*, del año 2003, se resumen algunos tipos de bacterias y sus rutas metabólicas para la degradación de PAHs, específicamente Naftaleno, Acenaftaleno, Fenantreno, Antraceno, Pireno, Fluoranteno, y Criseno, y también se discuten los aspectos biológicos de la biorremediación.

El potencial de organismos y microorganismos del reino vegetal, también se puede ejemplificar en el trabajo de Tru, *et. al.*, del 2015, en donde habla del uso de biorremediación de suelos y tierras húmedas, con la asistencia de plantas, en las que la micro-biota perteneciente a ésta (por ejemplo, la planta *Typha latifolia*), pueden remover de manera adecuada contaminantes, aunque también, no se puede omitir el potencial de las microalgas para la remediación, por ejemplo, en el trabajo de Sharma & Khan, del año 2013, hablan del uso de la microalga *Chlorella minutissima*, para la biorremediación de aguas de desecho de alcantarillas.

Lo anterior es la base de nuestra investigación, ya que gracias a esto se pueden ver las bases para lo cual se utilizó porque específicamente para este trabajo, se evaluará la capacidad de remoción de la microalga: *Selenastrum capricornutum*.

1.2.1.1 *Selenastrum capricornutum*

Pseudokirchneriella subcapitata (Hindak, 1990), mejor conocida por el nombre *Selenastrum capricornutum*, es un alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna (**Figura 1.3**), y de un volumen aproximado de 40 y 60 μm^3 encontrada en agua dulce.

Existen muy pocas referencias en la literatura sobre la degradación de HAP's mediante microalgas, de las cuales, Warshawsky *et. al* (1995), investigaron la remoción de B(a)P mediante la microalga *Selenastrum capricornutum*.

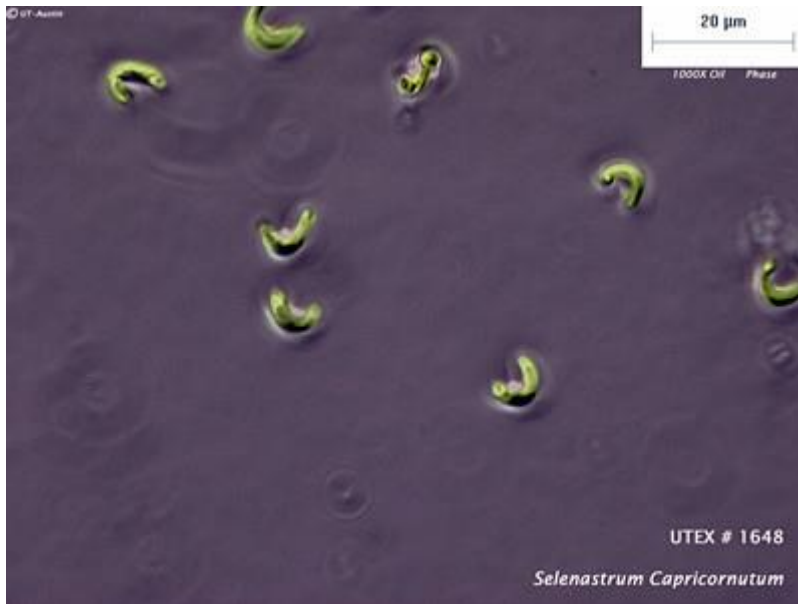


Figura 1.3 Imagen al microscopio de la microalga *Selenastrum capricornutum*
<http://utex.org/products/algae-express-utex-1648-selenastrum-capricornutum>

1.2.2 Bio-reactores

Un bio-reactor es un sistema en el cual se efectúa una reacción biológica, éstos difieren de un reactor en que son diseñados específicamente para influenciar rutas metabólicas. Diseños típicos de bio-reactores incluyen tanques de agitación, tanques de agitación continua, bio-reactores de flujo continuo, reactores de lecho fluidizado, etc (Williams, 2002). Debido a esto, se cree que la agitación en un medio puede influir en la capacidad de remoción de un microorganismo, aspecto que se complementará en la sección de ingeniería de reactores desde un punto de vista enfocado al tema de fundamento de transporte.

Para el presente trabajo, se sabe que el alga *Selenastrum carpicornutum* puede hacer la remoción de algunos HAP's en medios acuosos (Lei, *et. al*, 2007), sin embargo, también los HAP's son eliminados mediante volatilización, foto oxidación, oxidación química, adsorción en materiales con los que entran en contacto, además de la degradación microbiana (Haritash & Kaushik, 2009). Por lo que es necesario tomar en cuenta los efectos abióticos para lograr una evaluación adecuada de la remoción por la microalga. Además, un problema común que se presenta cuando se usan microorganismos en la remediación de medios acuosos, es la separación de las células de la muestra acuosa después de realizar su proceso de remoción. Por esta razón, la inmovilización de estos

microorganismos es una solución viable para el problema de la recuperación de los microorganismos después de su acción de remoción.

1.2.2.1 Inmovilización de microorganismos

La tecnología de inmovilización de microorganismos en diversos materiales resuelve bastantes dificultades a la vez de que ahorra costos en un proceso biológico, debido a que simplifican la colecta de un producto, al estar separado del microorganismo inmovilizado.

El diseño y operación de un sistema con microorganismos inmovilizados es similar al de un sistema de catálisis heterogénea (Williams, 2002). Esta comparación se complementará más adelante desde el punto de vista de ingeniería de reactores.

Los materiales se pueden clasificar de acuerdo con su composición química en inorgánicos y orgánicos, que a su vez ambas se pueden subdividir en naturales y sintéticos o fabricados. La **Tabla 1.4** muestra la clasificación y a su vez algunos ejemplos comunes de estos materiales (Elnashar 2011):

Tabla 1.4 Clasificación de materiales de inmovilización de microorganismos más comunes

ORGÁNICOS	INORGÁNICOS
Polímeros naturales	Minerales
Polisacáridos Celulosa Dextrano Almidón Agar y agarosa Alginato Carragena Quitina y Quitosano Proteínas Colágeno Gelatina Albúmina Ferritina	Arcilla de atapulgita Bentonita Diatomita Piedra pómez Hornablenda Tierra diatomácea Arena
Polímeros sintéticos	Materiales Fabricados
Poliestireno Policarilato y polimetacrilato Poliacrilamidas Hidroxi-alkil metacrilato Polímero de vinilo Polímero de anhídrido maleico Polietilenglicol Polímero con base de aldehído	Vidrio no poroso Vidrio con poro controlado Óxidos de metal con poro controlado Catalizador de aluminio Sílice porosa Silo Cromo Óxido de hierro Acero inoxidable

También la forma del material de soporte de la inmovilización se puede dividir en formas irregulares y regulares, siendo para esta última las más comunes en forma de esfera, fibras, esferas huecas, películas delgadas, discos, y membranas. La selección adecuada del tipo de soporte y la forma que tomará es dependiente de la aplicación para la que se utilizará (Elnashar, 2011).

Igualmente es de mucha utilidad inmovilizar microorganismos para poder fácilmente separarlos del medio acuoso donde se encuentren, siendo la elección más práctica y utilizada la inmovilización en polímeros, así como también la elección más adecuada para nuestro objetivo de remover HAP's de un medio acuoso (Bernal Toris, 2014) el alginato de sodio, que puede formar partículas esféricas al ser goteado en cloruro de calcio (Moreno-Garrido 2008). El alginato es un polisacárido natural extraído de algas marinas, específicamente del alga café. Está compuesto por dos tipos de ácido urónico: la Unidad de Ácido Manurónico (M) y la Unidad de Ácido Gulurónico (G), que se muestran en la **Figura 1.4**.

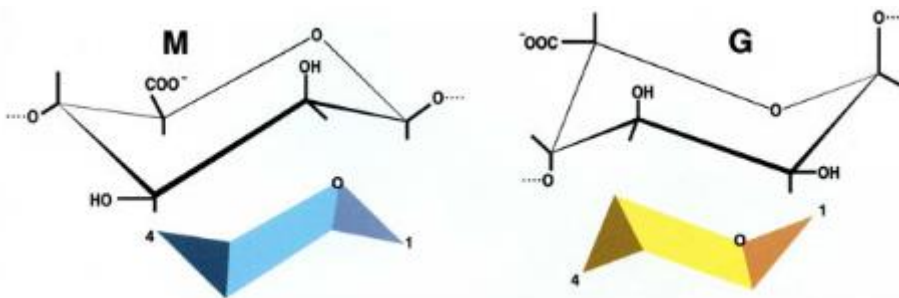
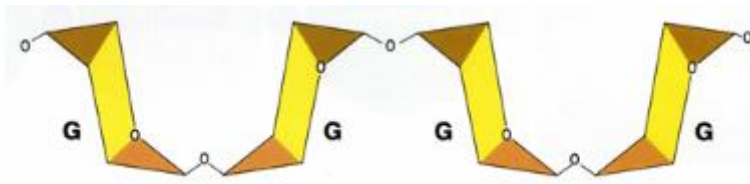


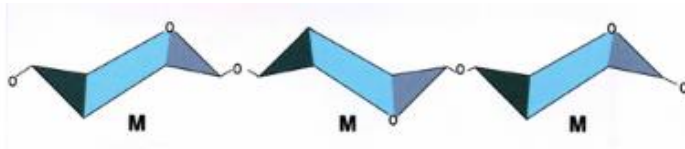
Figura 1.4 Unidades básicas del polímero de alginato

Y que a su vez, en la **Figura 1.5** se muestra como se unen entre sí en tres combinaciones de segmentos de bloques para formar el polímero

G-G



M-M



G-M

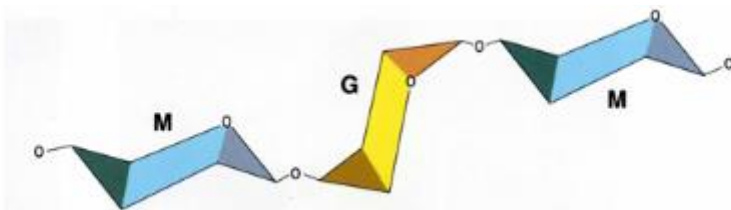


Figura 1.5 Bloques de segmento del polímero de alginato

Los grupos carboxilos de las unidades M y G presentan fácilmente intercambio iónico, y pueden reaccionar con varios tipos de cationes, lo que confiere propiedades características al alginato (KIMICA Corporation, 2009, referencia electrónica). La formación de las esferas de alginato se lleva a cabo mediante un procedimiento a condiciones moderadas, por lo que es compatible con la gran mayoría de microorganismos. Consta en mezclar la suspensión de microorganismos con la disolución de alginato de sodio, y la mezcla gotearla lentamente en una disolución de iones multivalentes, siendo el más usado el Ca^{2+} . Estas gotas forman esferas de gel casi instantáneamente atrapando a los microorganismos en una red tridimensional del polímero de alginato entrecruzado iónicamente (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990). El procedimiento general se ilustra en la **Figura 1.6**. El modelo de “caja de huevo”, propone una explicación para la formación de las esferas. Si se aplica este modelo en nuestro caso donde el alginato se gotea en cloruro de calcio, las cadenas poliméricas de alginato de sodio realizan un intercambio catiónico al entrar en contacto con la solución de cloruro de calcio (Sikorski et. al, 2007).

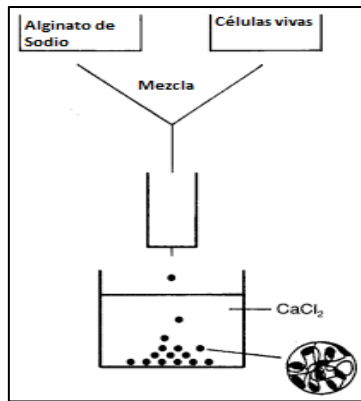


Figura 1.6 Procedimiento general de inmovilización de microorganismos, traducido al español (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990)

Inmediatamente se realiza el intercambio iónico (**Figura 1.7**) debido a que el Calcio es divalente, por lo cual posee más afinidad con las cadenas poliméricas, que a su vez, sirve para rodearse fuertemente con éstas, formando un arreglo en forma de “caja de huevo”.

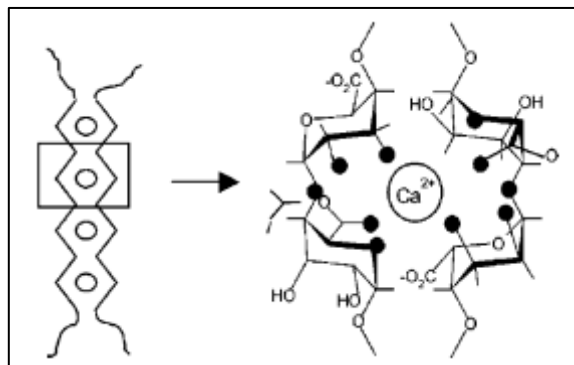


Figura 1.7 Ilustración del modelo de caja de huevo (Sikorski *et. al.*, 2007).

1.3 MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO

1.3.1 Conceptos y definiciones de método analítico

1.3.1.1 Desarrollo de métodos analíticos

Un procedimiento analítico se desarrolla para probar una característica definida de una sustancia o producto en contraste con un criterio establecido aceptado de esa característica. Al inicio del desarrollo de un procedimiento analítico la elección de instrumentación y metodologías se deben seleccionar con base en la especificidad, linealidad, límites de detección (LD), límites de cuantificación (LC), intervalo, precisión y exactitud. (FDA, 2015).

1.3.1.1 Validación de métodos analíticos

La validación es el proceso de demostración de que un método analítico es apto para su propósito intencionado. Debe ser claramente definido y comprensible. Este entendimiento se obtiene de un método de desarrollo que tenga sustento científico y estudios de optimización. La información de validación debe ser generada bajo un protocolo aprobado por autoridades competentes (CDER, 1994).

Éstos son los parámetros a ser evaluados y determinados para una validación correcta (CDER, 1994):

A. Exactitud: La medida de cuan cercanos se encuentran los valores experimentales del valor real.

Determinación:

1) Primero con un estándar del analito de alta pureza, se procede a analizar en el equipo para conocer su respuesta en el equipo, y éste se considera el valor teórico ideal de respuesta para la muestra, que debería tener cualquier muestra con analito inyectada en el equipo HPLC. Este valor debe encontrarse dentro del intervalo lineal de trabajo. Realizar réplica (por. ej. duplicado o triplicado) y tomar el valor promedio.

2) Después, se toma el analito que se encuentre en las condiciones a las que se realizará la experimentación, y proceder a conocer la respuesta del equipo. Este valor debe encontrarse dentro del intervalo lineal de trabajo. Realizar réplica (por. ej. duplicado o triplicado) y tomar el valor promedio.

3) Evaluar que tan próximo se encuentra el valor promedio del analito a condiciones de experimentación con respecto al estándar en condiciones ideales (punto 1).

B. Límite de Detección y Límite de Cuantificación:

El límite de detección es la concentración más baja de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito en una muestra que puede ser determinada con precisión aceptable y exactitud bajo las condiciones experimentales indicadas.

Determinación

A pesar de que la Farmacopea de los E.U. (USP, por sus siglas en inglés), expresa el límite de detección como 2 ó 3 veces el nivel de ruido, y 10 veces el nivel del ruido como el límite de cuantificación, no resulta práctico, ya que siempre es necesario primero realizar la evaluación de un sistema cromatográfico para poder visualizar el nivel del ruido de un sistema y también analizar si la variación del nivel del ruido en un detector es aceptable, y si esto se cumple, aun así se tiene el problema de que esta variación puede cambiar de sistema a sistema, por esto, no es tan práctico aplicar los valores recomendados por la USP, porque no necesariamente siempre aplican. Es por eso que se deben determinar de manera adecuada los límites de detección y cuantificación para cada sistema, y además tener mucho cuidado con fijar las condiciones experimentales para la correcta determinación de estos límites de detección y cuantificación, para que el nivel de ruido varíe lo menos posible y los límites de detección y de cuantificación sean en todo momento correctos. También se debe tener mucho cuidado en no confundir el nivel de ruido con picos extraños debidos a impurezas o manejo incorrecto de procedimientos, materiales y equipos. Es de suma importancia asegurarse que las altas y bajas concentraciones de operación se encuentren en el límite lineal de detección del analito, para que los resultados no se encuentren sesgados de ninguna manera.

C. Linealidad: El intervalo lineal de detección que obedece a la Ley de Beer (en el caso del detector espectrofotométrico) aunque depende del compuesto analizado y del detector empleado. Como se mencionó anteriormente, es necesario que el intervalo de trabajo se encuentre dentro de este intervalo lineal, para poder tener una relación directa, entre la concentración de analito y la respuesta del equipo, ya que esto es lo que permite la adecuada cuantificación, de otro modo, no se podría predecir con exactitud una concentración adecuada correspondiente a la respuesta del equipo.

Determinación: De acuerdo con el intervalo de trabajo necesario para las condiciones requeridas en el método, se designan varios puntos de la curva de calibración, y a cada punto se le realizan inyecciones réplica (triplicado o duplicado por ejemplo), y cuando se obtengan todas las réplicas de todos los

puntos, se procede a realizar una técnica de regresión lineal, y mediante el coeficiente de correlación (r^2), evaluar que tan lineal es la curva.

D. Precisión: Es la medida de cuan cerca se encuentran los valores de los datos entre sí, para un determinado número de mediciones bajo las mismas condiciones analíticas.

La Conferencia Internacional de Armonización (ICH, por sus siglas en inglés), define 3 componentes para la precisión:

a) Repetibilidad: La determinación, mediante la Desviación Estándar Relativa (DER), de múltiples mediciones de una muestra por el mismo analista bajo las mismas condiciones analíticas.

b) Precisión Intermedia: Anteriormente conocida como reproducibilidad, y es la que evalúa la confiabilidad del método en un ambiente diferente al utilizado durante el desarrollo del método. El objetivo es asegurar que el método provea los mismos resultados con muestras similares. Se evalúa en días múltiples, analistas diferentes, instrumentos, etc.

c) Reproducibilidad: Expresa la precisión entre laboratorios (por ejemplo, entre distintos laboratorios o compañías en colaboración). Lo que hace variar enormemente las condiciones experimentales de un método de manera drástica. Esto se puede visualizar en el concepto de robustez, el cual permite ver que tan drásticamente se pueden variar las condiciones de análisis de un método sin que afecte los parámetros de validación.

Otro concepto relacionado importante a mencionar es la sensibilidad analítica, que es la capacidad de detección de cambios en la concentración del analito en la muestra; es decir, con un equipo con poca sensibilidad analítica, ante un cambio en la concentración, se obtendrá un cambio muy poco pronunciado en la respuesta del equipo, dicho de otra manera, su respuesta lineal (ecuación lineal de curva de calibración), tiene una pendiente muy pequeña. Por el contrario, un equipo con mucha sensibilidad analítica, ante un cambio en la concentración de analito, proporcionará una gran respuesta, dicho de otra manera su respuesta lineal tiene una pendiente grande.

Determinación: Para una concentración de analito de una muestra, y sus réplicas de inyecciones, se puede obtener el promedio y la desviación estándar, con los cuales se puede calcular la desviación estándar relativa

(DER), y mediante esta, se puede conocer que tan preciso es un método, a una concentración dada.

E. Intervalo: Es el rango entre los niveles altos y bajos del analito estudiado.

Determinación: Depende de las condiciones de análisis, pero lo conveniente es determinar qué concentraciones están incluidas en un intervalo lineal. Para esto se abarcan varios puntos de una curva de calibración, con lo que se pueda observar que presenta dos partes, una lineal y otra no lineal. Gracias a esto se puede observar a partir de qué concentración se pierde la linealidad del sistema.

F. Recuperación: Se expresa como la cantidad de compuesto de interés analizado como porcentaje de la cantidad teórica que debería estar presente en el medio.

Determinación: Se procede a conocer la respuesta del equipo para una muestra con la concentración de analito a la condición "ideal", en la cual, se pueda obtener el 100 % de la respuesta del equipo, que generalmente se obtendría si no estuviera presente el efecto del método que se está validando. Después, se procede a conocer la respuesta del equipo para una muestra con la misma concentración de analito pero bajo las condiciones del método a validar, y comparar ambas respuestas mediante sus porcentajes. Por ejemplo, si la muestra a condición ideal arroja 5 unidades de absorbancia de respuesta en una medición espectrofotométrica, y la muestra a condición de análisis arroja 4 unidades, entonces la recuperación es del 80 %.

G. Robustez: La ICH define a la robustez como la medida de la capacidad de un método de permanecer inafectada por variaciones pequeñas, pero deliberadas en los parámetros del método.

Determinación: Realización de pruebas para cambio de tipo de columna, temperatura de columna, pH, fase móvil, etc.

H. Estabilidad de Solución de Muestra: La medida que refiere a qué tanta variación se puede tener en el método debido a las propiedades de la solución de la muestra, que es afectada por ejemplo, por la volatilidad del solvente, degradación mediante hidrólisis o fotólisis del analito, o adhesión a vidrio.

I. Especificidad / Selectividad La medida de cuántas interferencias puedan afectar la resolución de un analito (o analitos) de un método de cromatografía y a su cuantificación.

Determinación: Si una impureza impide la correcta cuantificación de un analito, se deberán variar parámetros cromatográficos como tipo de columna, gradiente de fase móvil, longitud de onda de detección, etc., para poder minimizar este efecto de la impureza.

J. Pruebas y Especificaciones de Adecuabilidad de Sistema: Es lo que permite analizar qué tan adecuados son los parámetros Cromatográficos como factor de capacidad (k'), precisión, retención relativa o selectividad (α), resolución (R_s), factor de asimetría (T), número de platos teóricos (N), con respecto al método a validar.

K. Puntos Generales a considerar:

Algunos puntos básicos a considerar en el método de prueba son:

1. Disolución completa del analito en la fase móvil.
 2. Concentraciones cercanas entre muestras y estándar.
 3. Acondicionamiento de la muestra a analizar antes de inyectarla en el equipo.
- Los parámetros cromatográficos se detallarán en la siguiente sección.

1.3.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía es una técnica de separación de mezclas mediante “migración diferencial” de sus componentes por interacciones entre una fase estacionaria y una fase móvil. La **fase estacionaria** es un material cuya función es retener cierto tiempo alguna(s) sustancia(s) de interés durante el proceso de elución por la fase móvil (transporte de los componentes), debido a que posee afinidad hacia esta sustancia.

En la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), la fase estacionaria generalmente está formada por partículas porosas empacadas en una columna, aunque también puede ser una red polimérica empacada en la columna, y ésta es la razón por la cual, por razones de comodidad, se puede nombrar a la fase estacionaria como columna cromatográfica.

Por otra parte, la **fase móvil** es un fluido cuya función es transportar los componentes de una mezcla, a lo largo de la fase estacionaria, antes y después de la separación cromatográfica, y en cromatografía de líquidos los analitos también presentan interacciones con ésta. En la migración de los componentes, el tiempo de recorrido de un componente a través de una

columna se denomina “tiempo de retención” (t_r), y mediante la diferencia de los tiempos de retención entre componentes, se puede saber qué tan buena es una separación de una mezcla junto con otros parámetros que se mencionarán más adelante.

En una separación cromatográfica, cuando es eluída una mezcla a través de una fase estacionaria, es posible separar los componentes de interés debido a la afinidad que éstos poseen por esta fase estacionaria, ya que los que sean más afines, más tiempo tardarán en salir de la columna cromatográfica, los que tengan menor grado de afinidad tardarán un poco menos, y los que tengan muy poca o nula afinidad tardarán el menor tiempo.

Esto está representado en la **Figura 1.8**, en donde primero la mezcla ingresa a la columna, para después irse separando poco a poco. En el paso **1** ingresa la muestra con los componentes sin separar, en el **2**, gracias a la acción de la columna, poco a poco se van separando los analitos, en el paso **3** se muestra ya la completa separación de éstos con base en la afinidad de cada uno por la columna, en el **4** se puede apreciar que el de menor tiempo de retención sale de la columna para su posterior recolección (cromatografía preparativa), o en el caso la cromatografía analítica para su cuantificación, en el paso **5** se aprecia que el componente de mayor tiempo de retención sale con bastante diferencia respecto al compuesto anterior (lo que habla de una buena técnica de separación), y en el punto **6** se observa cómo sale el compuesto más retardado para su recolección o cuantificación. Lo anterior aplica también para cuando son más de dos sustancias a separar.

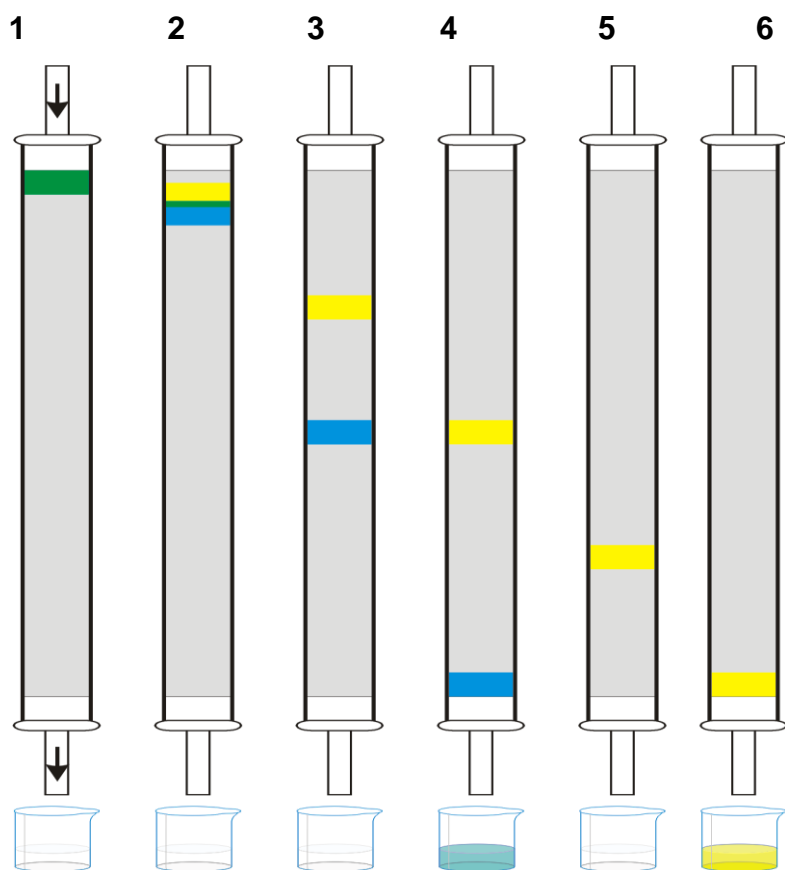


Figura 1.8 Secuencia de Elución, de Chemistry Glossary, Paper Chromatography, 2015, <http://glossary.periodni.com/dictionary.php?en=paper+chromatography>

En el modo más básico de cromatografía, como la cromatografía de capa fina, la elución se da por efectos tales como la gravedad o la capilaridad, con tiempos largos de elución. Sin embargo, se implementó una mejora en los años 70s, la cual consistía básicamente en utilizar columnas cromatográficas con partículas de tamaño y poro pequeñísimos, lo cual aumenta considerablemente el área de contacto entre los analitos y esta fase estacionaria, así como también altas presiones para acarrear la fase móvil a través de la columna, lo cual trajo como resultado una técnica más rápida y con mejor eficiencia (Karger 1997).

1.3.2.2 Cromatografía de Fase Normal

La cromatografía en fase normal por adsorción es el tipo de cromatografía de líquidos más básica que fue de las primeras en ser implementadas en HPLC, la cual emplea como fases estacionarias a la sílice y a la alúmina. Este tipo de

cromatografía es empleada para separar compuestos polares con cierta afinidad hacia una fase estacionaria polar. También se han desarrollado fases estacionarias a base de sílices u otros materiales con grupos polares enlazados.

1.3.2.3 Cromatografía de Fase Reversa

La cromatografía en fase reversa, la cual es de uso posterior a la cromatografía de fase normal con sílice virgen, fue el tipo de cromatografía de líquidos empleada para este trabajo, y utiliza el principio de separación por reparto e interacciones hidrófobas, y emplea una fase estacionaria no polar, para atraer compuestos apolares, cuyo empaque por lo general está hecho de sílica unida a una cadena de octadecil-carbono (C18), y la fase móvil es polar, por lo general metanol o acetonitrilo.

Esta técnica es muy poderosa para el análisis de péptidos y proteínas debido a varios factores como: (1) excelente resolución que puede ser alcanzada bajo un amplio intervalo de condiciones cromatográficas para moléculas con estructura muy similar inclusive; (2) la facilidad experimental con la que la selectividad cromatográfica puede ser manipulada a través de cambios en las características de la fase móvil; (3) altas recuperaciones en general y por tanto mayor productividad y (4) excelente reproducibilidad de separaciones repetitivas llevadas a cabo a través de largos periodos de tiempo. Sin embargo, esta técnica puede causar la desnaturalización irreversible de muestras de proteína y por esto la reducción del recobro potencial del material en una forma biológicamente activa (Aguilar, 2004).

Para relación con nuestro caso específico, los HAP's pueden ser separados adecuadamente mediante HPLC de fase reversa y fase normal, sin embargo, en la publicación de Aygün & Özcimder de 1996, demuestran que los siguientes 13 HAP's (**Tabla 1.5**) son mejor separados mediante HPLC de fase reversa, con ventajas tales como una mejor eficiencia.

Tabla 1.5 HAP's del estudio de Aygün & Özcimder, 1996.

Núm.	HAP
1.	Fluoranteno
2.	9-10 Dibenzantraceno
3.	Benzo(a)antraceno
4.	Criseno
5.	2-3, Dibenzantraceno
6.	Benzo(b)fluoranteno
7.	Benzo(k)fluoranteno
8.	Perileno
9.	Benzo(a)pireno
10.	Dibenzo(a,h) antraceno
11.	Dibenzo(a,c) antraceno
12.	Indeno(1,2,3-c,d) pireno
13.	Benzo (g,h,i) perileno

1.3.2.4 HPLC con detección UV

La HPLC acoplada a un detector de luz ultravioleta para el análisis cuantitativo de los componentes separados de una mezcla fue la empleada para este trabajo de tesis.

Los detectores UV se utilizan con HPLC para detectar e identificar analitos en la muestra. Mediante la edición de la absorción de luz de los enlaces de la estructura química de uno o más analitos a diferentes longitudes de onda, estos analitos pueden ser identificados (parcialmente). Existen dos tipos de detectores UV que se acoplan a la HPLC, y son los de longitud de onda simple, y los de longitud de onda múltiple, además de los de arreglo de diodos (Biocompare, 2016, referencia electrónica).

La radiación es una forma de energía que podemos percibir mediante la luz, que se considera una onda, con una longitud de onda λ , con lo que se puede clasificar y cuantificar el espectro electromagnético de radiación. En la **Tabla 1.6** se pueden ver diferentes regiones del espectro electromagnético.

Tabla 1.6 Regiones del espectro electromagnético

Región	Longitud de onda (nm)
Ultravioleta lejano	10-200
Ultravioleta cercano	200-380
Visible	380-780
Infrarrojo cercano	780-3 000
Infrarrojo mediano	3 000-30 000
Infrarrojo lejano	30 000-300 000
Microondas	300 000-1 000 000 000

Una molécula de cualquier sustancia tiene una energía interna que es la suma de la energía de sus electrones, la energía de vibración entre sus átomos y la energía asociada a la rotación de la molécula. Un átomo tiene niveles de energía de electrones, mientras más lejano del núcleo se encuentre el nivel de energía, los electrones en este nivel requerirán absorber mayor energía para poder estar en ese nivel. El menor nivel energético con electrones se llama nivel basal, y para poder ir subiendo de nivel es necesario que absorba energía, y esta energía es la que se mide mediante el detector de luz en el espectro del UV (ThermoSpectronic, 2001).

1.3.2.5 Parámetros cromatográficos

Los parámetros cromatográficos serán descritos a continuación:

Tiempo de retención (tr): Tiempo recorrido por un compuesto afín a la fase estacionaria desde que está mezclado homogéneamente con otros compuestos en una muestra y se inyecta a un equipo o dispositivo cromatográfico, hasta que es eluido (ya separado por la columna cromatográfica) y sale del dispositivo cromatográfico para ser cuantificado en un detector.

Tiempo muerto (tm): Tiempo recorrido por un compuesto no afín a la fase estacionaria desde que se inyecta a un equipo o dispositivo cromatográfico, hasta que es eluido y sale del dispositivo cromatográfico para ser cuantificado en un detector.

Constante de distribución (K): Es útil presentar el equilibrio de un analito en este proceso de separación, el cual se presenta entre la fase móvil y la fase estacionaria, representado por esta ecuación:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Donde C_s = Concentración de analito en fase estacionaria (unidades de masa/unidades de volumen)

C_m = Concentración de analito en fase móvil (unidades de masa/unidades de volumen)

Factor de capacidad (k'): Se utiliza para relacionar la constante de distribución (K) de un analito con la relación de volúmenes de fase móvil y fase estacionaria. Se representa como:

$$k' = \frac{k V_s}{V_m}$$

De esta ecuación se puede ver que mientras mayor sea este factor menor es la velocidad de elución de un analito en una columna.

También se puede calcular con ecuación, que es más práctica, pues relaciona directamente el tiempo de retención y tiempo muerto, con el factor de capacidad

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Factor de selectividad (α): La selectividad en HPLC se define como la capacidad de un sistema cromatográfico para separar adecuadamente 2 analitos, tomando como referencia sus tiempos de retención, ya que con una mala selectividad dos analitos tendrían tiempos de retención muy cercanos, lo cual impediría tanto una buena separación como una buena cuantificación con un detector. Mientras mayor sea el valor a 1 de este factor mejor separación habrá, ya que si el valor es 1 quiere decir que 2 componentes tienen el mismo tiempo de retención. Se representa con la ecuación:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t_{rB} - t_m}{t_{rA} - t_m}$$

Donde k'_B es el factor de capacidad de la sustancia con mayor tiempo de retención, y t_{rB} su respectivo tiempo de retención, y t_m es tiempo muerto. k'_A

es el factor de capacidad de la sustancia con menor tiempo de retención, y t_R su respectivo tiempo de retención.

Eficiencia de la columna: Es un parámetro relacionado directamente con el ensanchamiento de un pico en un cromatograma, ya que una columna poco eficiente presentará picos muy ensanchados que podrían traslaparse con otros de diferente tiempo de retención aunque se tenga buena selectividad. La eficiencia o número de platos teóricos se simboliza con la letra N. Se representa con la ecuación:

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

L, representa la longitud de la columna, y H la altura de cada plato teórico de la columna.

Analizando la ecuación anterior, podemos ver que mientras más larga sea la columna, mayor será la eficiencia, ya que las moléculas tienen más espacio (mayor oportunidad) de separarse, y por el contrario, mientras mayor altura tenga cada plato teórico, menor será la eficiencia, ya que las moléculas en cada plato estarán más difundidas, quitando oportunidad a que las moléculas se unan de forma adecuada a la fase estacionaria. El caso contrario sería que mientras menor sea la altura de columna teórica, mayor oportunidad tendrán las moléculas de estar en contacto con la fase estacionaria y se dará una mejor separación.

Esta conclusión de que la altura de plato teórico está inversamente relacionada a la eficiencia, es análoga a la conclusión de una columna de destilación fraccionada en ingeniería química (**Figura 1.9**), donde a mayor cantidad de platos (menor altura de plato, en este caso de plato real), se considera más eficiente la columna de destilación (Henley & Seader, 2000).

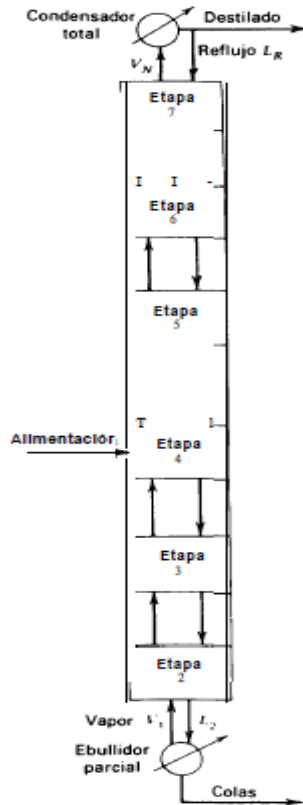


Figura 1.9 Columna de destilación fraccionada (Henley & Seader, 2000)

De otro modo, esta ecuación representa la fórmula para calcular también la eficiencia pero mediante el t_r (tiempo de retención), t_m (tiempo muerto) y W (ancho de base):

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

Y esta ecuación representa la fórmula mediante el t_r (tiempo de retención), t_m (tiempo muerto) y $W_{1/2}$ (ancho de base a la mitad del pico):

$$N = 5.55 \left(\frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$$

De estas ecuaciones se observa una conclusión similar a la de la primera ecuación para calcular eficiencia aquí mostrada, ya que mientras mayor ancho de base del pico un compuesto en un cromatograma, quiere decir que la columna no es tan eficiente, porque tomó mucho tiempo para la separación, y lo contrario sería un pico con poca anchura de base, que hizo la separación en poco tiempo, y mientras menor sea el ancho de base, mayor será la eficiencia.

Resolución (R_s): Es el factor que relaciona los tres parámetros anteriores: Factor de capacidad, Eficiencia y Selectividad, ya que una columna con buena

Resolución separará 2 analitos de tal forma que para su cuantificación en un cromatograma, se cumplirá que los tiempos de retención de los picos tendrán suficiente diferencia y que el ensanchamiento de bandas será adecuado para que no se traslape uno con otro. Se representa con la ecuación:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}(\alpha-1)(k' B)}{4(\alpha)(1+k' \text{ promedio})}$$

Que relaciona el factor de la capacidad (k'), de la eficiencia (N), y de la selectividad (α), y de una manera más práctica se puede representar como:

$$R_s = \frac{2(tr_B - tr_A)}{W_A + W_B}$$

Donde tr es el tiempo de retención y W es el ancho de banda, y A y B son los analitos.

Si es que solo se cuenta con los valores del ancho de base a la mitad del pico ($W_{1/2}$), estas ecuaciones sirven para con base en esta conocer el ancho de base (W).

$$W_{1/2} = 2.35 \sigma$$

Donde σ es la desviación estándar.

Y la ecuación para obtener el ancho de base:

$$W = 4 \sigma$$

Referencia bibliográfica de esta sección de cromatografía: (Snyder 1979)

Referencia bibliográfica de las ecuaciones de esta sección. (Harris, 2001)

1.3.3 Extracción en fase sólida en la preparación de muestras biológicas

1.3.3.1 Descripción General

La preparación de muestras para analizar muestras complejas puede llegar a ser un cuello de botella, esto debido a la naturaleza de estas muestras, ya que tienen muchísimos interferentes que impiden un análisis y detección adecuados, con lo cual es necesario contar con una técnica de extracción que sea selectiva y lo más rápida, segura, y amigable con el ambiente (Fidalgo *et al.*, 2007). Considerando todo lo anterior, para el tipo de muestra biológica que se manejó en el presente trabajo (cultivos líquidos de microalgas), se usó utilizando la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS), y demostró ser rápida, eficiente y segura para el aislamiento de los analitos de interés.

La EFS es una técnica de extracción que se puede considerar que sigue los principios básicos de la cromatografía de líquidos, debido a que sirve para separar compuestos de interés (analitos) de una muestra proveniente de una matriz compleja, gracias a la afinidad de estos analitos por una fase sólida. Además, generalmente la EFS utiliza las mismas fases estacionarias de la cromatografía de líquidos, y precisamente una de sus principales aplicaciones es la extracción de los compuestos de interés junto con la limpieza de muestras a ser empleadas en un método analítico para su cuantificación en un detector (Biziuk, 2006).

En la literatura se conoce también a la fase sólida como adsorbente. La selección apropiada del adsorbente depende del tipo de analito de interés y de disolvente adecuado a éste. Como en cromatografía, los mecanismos más comunes de retención de esta fase estacionaria, son mediante fuerzas de Van der Waals (Interacciones no-polares), puentes de hidrógeno, fuerzas dipolo-dipolo e interacciones iónicas.

En la **Figura 1.10** se representa de manera general el empaque del adsorbente en un cartucho de EFS, como fue manejado en el presente trabajo; sin embargo, la EFS puede también realizarse en otros dispositivos como son las pre-columnas y membranas que se colocan en los sistemas de filtración de fases móviles.

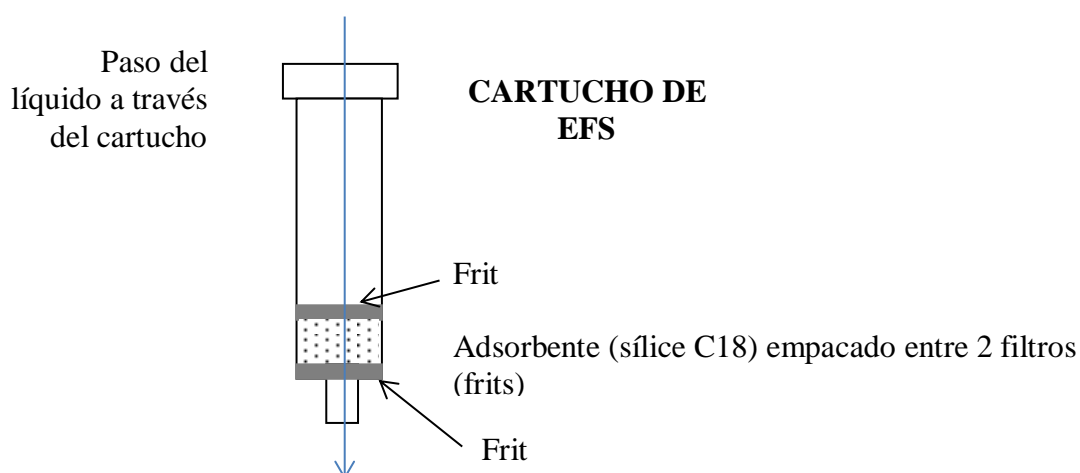


Figura 1.10 Cartucho de EFS

Análogamente a la cromatografía de líquidos, existe una EFS de fase normal, que involucra un analito polar, una fase móvil moderadamente polar o apolar, y

un adsorbente polar, así como también, una EFS de fase reversa, con un analito apolar, fase móvil moderadamente polar o totalmente polar, y un adsorbente apolar.

1.3.3.2 Procedimiento de la EFS

El procedimiento general consiste en primero acondicionar la fase sólida, después cargar la muestra a la fase sólida empacada en el cartucho de extracción, retirar impurezas y compuestos no deseados mediante lavados con mezclas de disolventes de fuerza eluyente débil, y finalmente eluir de la fase sólida el analito deseado con un disolvente adecuado hacia un recipiente colector (Biziuk, 2006).

En la **Figura 1.11** se ilustra el procedimiento en detalle, se divide en 4 partes (Camel 2003):

- 1) Acondicionamiento del adsorbente con un disolvente apropiado y además con el mismo disolvente que contiene la muestra, para que se humecte totalmente el adsorbente empacado, para que cuando se pase la muestra fácilmente encuentre su camino a través de la fase sólida y para que los grupos funcionales de esta última se solvaten y orienten hacia el disolvente. Otros beneficios de esto son la limpieza de impurezas que puedan estar presentes en la fase y la eliminación de aire que pueda estar atrapado dentro del empaque de adsorbente.
- 2) Carga de la muestra, mediante gravedad, vacío, bombeo o un sistema automatizado.
- 3) Lavado de impurezas, con un disolvente o mezcla de disolventes tal que eliminen significativamente las impurezas sin eliminar el o los analitos de interés.
- 4) Elución de analitos, mediante un disolvente adecuado

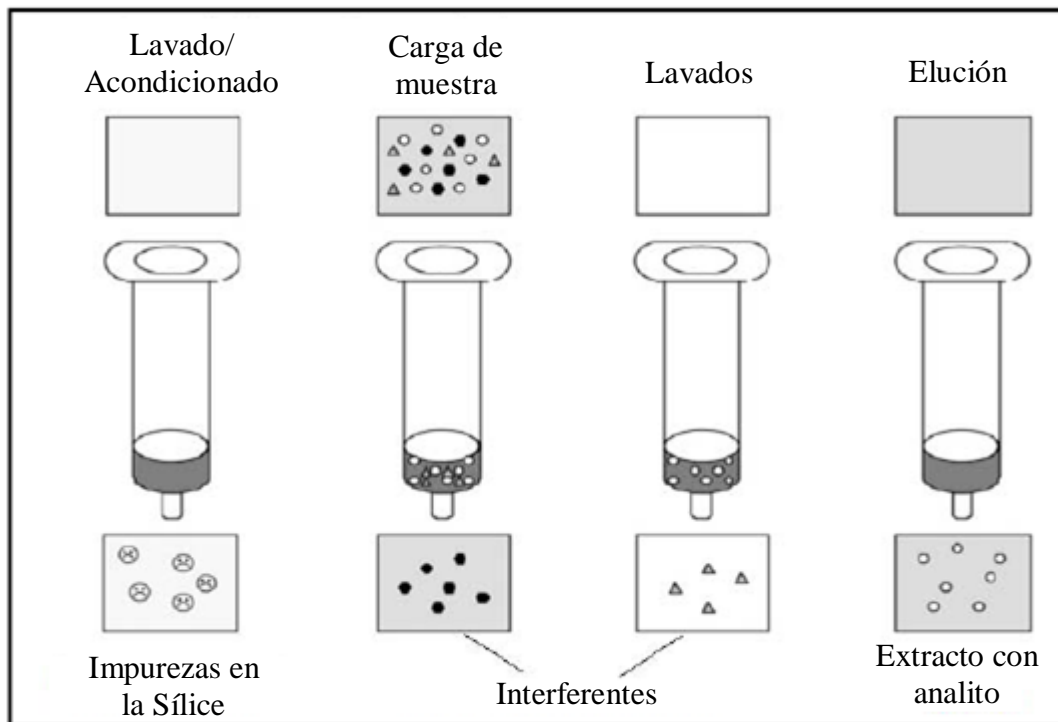


Figura 1.11 Procedimiento EFS, traducido al español (Camel, 2003)

1.4 FENÓMENOS DE TRANSPORTE

Para una comprensión adecuada de las bases del tema de "Ingeniería de reactores", es necesario aprender el tema de fundamentos de transporte.

Para comprender a profundidad este tema, es necesario conocer las 3 partes en que está dividido principalmente, siendo la Transferencia de *momentum*, Transferencia de energía y Transferencia de Masa en estas separaciones, y a su vez, también tener en cuenta que las 3 partes comparten muchos conceptos análogos entre sí, que se detallarán brevemente a continuación.

1.4.1 Transferencia de *momentum*

Este tema involucra el estudio del movimiento de los fluidos y de las fuerzas que los producen. Se ha demostrado que exceptuando fuerzas de acción a distancia tales como la gravedad, las fuerzas que actúan directamente sobre un fluido como la causada por la presión, son resultado de una transferencia microscópica o molecular de la cantidad de movimiento.

Este tema resulta de los conocimientos adquiridos de hidráulica desde la antigüedad, así como también de los conocimientos de hidrodinámica desarrollados en los siglos XIX y XX.

La transferencia de la cantidad de movimiento (*momentum*), se puede representar con la siguiente ecuación:

$$\tau = \mu \frac{dV}{dx}$$

Relaciona el esfuerzo cortante (cizalla), con la viscosidad (μ), y la velocidad (V) respecto a una distancia (x) recorrida (dV/dx). Esto se puede interpretar como el efecto de la transmisión del momento a lo largo de una zona perpendicular al movimiento de un fluido.

1.4.2 Transferencia de energía

Para el diseño de un sistema es el tema que aborda la ganancia o pérdida de calor que se puedan presentar, así como la velocidad a las que se dan. Hay 3 tipos de mecanismos de transferencia de energía:

1.4.2.1 Conducción:

Principalmente es el mecanismo que se da mediante interacciones moleculares, en el cual moléculas con un nivel de energía (temperatura) superior imparte energía a moléculas adyacentes con menor energía.

Se puede representar mediante la Ley de Fourier:

$$q/A = Q = -k dT/dx$$

donde:

q : flujo o rapidez de transferencia de energía (calor) [Cal/h]

A : Área normal a la dirección de flujo de energía [m^2]

Q : Flux de energía, que representa el flujo de energía en el área normal a la dirección de flujo de energía [$cal/h m^2$]. Se representa con la siguiente ecuación:

$$Q = q/A$$

k = constante de conductividad calorífica [$cal / m ^\circ C$]

dT/dx = Gradiente de Temperatura en dirección x [$^\circ C / m$]

El signo negativo indica que la transferencia de energía ocurre en un gradiente negativo de temperatura, es decir, del cuerpo con mayor temperatura al de menor temperatura.

1.4.2.2 Convección:

Refiere al intercambio de energía entre una superficie y un fluido adyacente, y se representa con la ecuación de Newton de rapidez o ley de enfriamiento de Newton:

$$Q = h\Delta T$$

Donde h = coeficiente de transferencia de energía convectivo [$\text{Cal} / \text{m}^2 \text{ } ^\circ\text{C}$]

ΔT = Diferencia de temperatura entre la superficie y el fluido [$^\circ\text{C}$]

1.4.2.3 Radiación:

Difiere de los anteriores debido a que no necesita un medio para propagarse, ya que este mecanismo alcanza su intercambio máximo entre dos cuerpos separados por vacío perfecto, y aunque aún no queda aclarado del todo, se atribuye a ondas causadas por un emisor de energía, como el sol.

1.4.3 Transferencia de masa

El mecanismo que guarda una relación más claramente análoga a la transferencia de energía, trata principalmente de la transferencia de materia de una región de alta concentración de una sustancia a otra región de menor concentración.

La materia puede transferirse por medio del movimiento molecular fortuito en fluidos en reposo, o puede transferirse entre una superficie y un fluido en movimiento.

Existen dos modos de transferencia de masa: el molecular o difusivo, que es análogo al mecanismo de conducción pero para la transferencia de energía, y el convectivo, que igualmente es análogo al mecanismo de convección para la transferencia de energía.

1.4.3.1 Difusión:

Conocido también como transferencia de masa molecular, es análogo al mecanismo convectivo de transferencia de energía. Se representa con la Ley de Fick, aunque puede llegar a ser más compleja esta relación debido a que puede haber más de 2 componentes en el proceso.

$$J_A = -D_{AB} \frac{dC_A}{dz}$$

Donde J_A = es el Flux de materia A y B corresponden a 2 sustancias diferentes

D_{AB} = Coeficiente de difusividad entre una sustancia A y una B

dC_A/dz = Gradiente de concentración en una dirección z

Comprensiblemente análoga a la ley de Fourier para transferencia de energía

1.4.3.2 Convección:

Mecanismo análogo al mecanismo correspondiente de la transferencia de energía. Ocurre entre un fluido en movimiento y una superficie o entre dos fluidos. Se representa con una ecuación análoga a la ley de enfriamiento de Newton:

$$N_A = K_c \Delta C_A$$

Donde N_A = Es la transferencia de masa molar de la especie A

K_c = Coeficiente de transferencia de masa convectiva

ΔC_A = diferencia de concentraciones entre un fluido en movimiento y una superficie o entre dos fluidos

La literatura empleada para esta sección: (Welty 1982)

1.5 INGENIERÍA DE REACTORES

Los fundamentos anteriores son la base de esta sección de Ingeniería de reactores.

El objetivo principal de este tema es el diseño de reactores, que requieren el conocimiento de las velocidades de los procesos físicos y químicos involucrados. Frecuentemente, los principios que gobiernan las transferencias de masa y energía en estos sistemas son tan importantes como los que rigen a la cinética química, y este tema corresponde al estudio de todo lo anterior, sin embargo, este trabajo no se involucró en la rapidez de reacción y se manejó a temperatura ambiente la experimentación, por lo cual, solamente se discutirán de forma general las secciones convenientes para este trabajo, ignorando convenientemente los temas de cinética química y de transferencia de energía.

1.5.1 Reacciones homogéneas

Son aquellas en las que toda la reacción del sistema se lleva a cabo en una sola fase, sea sólida, líquida o gaseosa.

1.5.2 Reacciones heterogéneas

Son aquellas en las que la reacción se lleva a cabo en 2 ó 3 fases, sea líquido-sólido, líquido-gas, o líquido-sólido-gas. Es importante subrayar que es en esta sección donde se desarrolla más ampliamente el tema de la catálisis. Sin embargo, a pesar de que para el sustento teórico de nuestro proyecto se requieren conceptos como difusión de reactivos a través de poros y adsorción (ya que los HAP's tienen que difundirse internamente a través de los poros de las esferas de alginato y adsorberse en sitios con las microalgas inmobilizadas, tal y como algún reactivo de interés puede difundir en los poros de los catalizadores hasta llegar a sus sitios activos), es conveniente indicar que estrictamente el trabajo no involucró una reacción catalítica, por lo cual, con sólo señalar los conceptos en común anteriores es más que suficiente.

1.5.2.1 Proceso de reacción heterogénea

Se puede esquematizar con el siguiente listado numérico:

- 1.- Transporte de los reactantes del fluido global a la interfase fluido sólido (superficie externa de la partícula catalizadora)
- 2.- Transporte de los reactantes en el interior de la partícula (si es porosa)
- 3.- Adsorción de los reactantes en puntos internos de la partícula
- 4.- Reacción química de los reactantes adsorbidos formando productos adsorbidos (reacción superficial)
- 5.- Desorción de los productos adsorbidos
- 6.- Transporte de los productos internos a la superficie externa de la partícula
- 7.- Transporte de los productos de la interfase fluido-sólido a la corriente de fluido global

Si se considera que nuestros reactivos no tendrán oportunidad en nuestro sistema de difundir muy adentro de una esfera de alginato, y que la acción de la microalga se dará más en sus capas externas, se pueden omitir los pasos 2 y 4, y además que la reacción es irreversible, la concentración de productos no afecta la velocidad, con lo cual, se puede representar el proceso con las siguientes dos ecuaciones:

- a) Velocidad de transporte del reactante del fluido global a la interfase fluido-superficie donde está la microalga en la parte externa de la esfera
 $r_p = k_m a_m (C_b - C_s)$

Donde r_p = Velocidad de reacción

k_m = Coeficiente de transferencia de masa basado en una unidad de

superficie de transferencia

a_m = superficie de transferencia

C_b = Concentración de reactante en el fluido global

C_s = Concentración de reactante en la interfase fluido-sólido

b) Velocidad de reacción de la microalga

$$r_p = k C_s$$

Donde k es la constante de velocidad de reacción

Mediante un procedimiento algebraico descrito en la sección de procesos heterogéneos del libro (Smith, 1991), uniendo las ecuaciones a) y b) se puede llegar a esta ecuación:

$$r_p = \left(\frac{1}{\frac{1}{k} + \frac{1}{k_m a_m}} \right) C_b$$

De donde se pueden interpretar los términos $(1/k)$ y $(1/k_m a_m)$ como resistencias a la velocidad de reacción química y a la velocidad de transferencia de masa externa, respectivamente.

Todo lo anterior ha sido expuesto para explicar un fundamento formal de por qué la velocidad de agitación en nuestro reactor pudiera tener efecto sobre la biorremoción. En esta misma literatura se considera que en un fluido turbulento o con agitación, la resistencia a la transferencia de masa externa se vuelve despreciable, debido a que con esto se fomenta una homogeneidad de concentración de reactivo en todo el fluido, y exista mayor probabilidad de que la mayor cantidad de reactantes lleguen a la mayor cantidad de superficie de microalgas, de lo contrario, los reactantes podrían permanecer estancados o acumulados sólo en un sitio del fluido y atiborrar a las microalgas cercanas, esperando su turno en un cuello de botella, sin poder llegar a las microalgas inmovilizadas libres de otros sitios.

Si esta resistencia a la transferencia de masa es despreciable, el término $1/k_m a_m$ se puede anular, y la ecuación quedaría:

$$r_p = \frac{1}{\bar{k}} C_b = k C_b$$

Con lo cual solamente quedaría la resistencia a la velocidad de reacción inherente a la capacidad de remoción de la microalga.

Literatura empleada en esta sección: (Smith, 1991).

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 EQUIPOS

2.1.1 Cromatógrafo

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Knauer, Alemania), con dos bombas modelo Smartline 1000.
- Detector UV Knauer modelo Smartline 2600.
- “Software” de control y procesamiento de datos “EuroChrom” Ver. 3.05
- Pre-columna de 20 x 2 mm empacada con adsorbente Nucleosil 100-5 C18 5 µm Macherey-Nagel.
- Columna analítica ThermoScientific de 150 x 4.6 mm empacada con fase inversa C18 tamaño de partícula 5 µm.
- Bucle de inyección de 20 µL Knauer.
- Jeringa de 100 µL (Hamilton, EUA).

2.1.2 Otros equipos

- Agitador con control de temperatura, Marca Daigger ® Hotplate/Stirrer
- Balanza analítica de marca Ohaus, modelo Adventurer Pro AV114C
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (Thermo Scientific, EUA).
- Microscopio óptico (National Optica, EUA).
- Lámpara con foco de luz amarilla 10 Watts (Osram, México)
- Autoclave eléctrica Tuttnauer, modelo 2540EL
- Agitador orbital (para cultivo de microorganismos) marca Thermo Scientific EUA
- Centrífuga Fisher Scientific, Modelo 225
- Campana de Bioseguridad clase 2 AA 11231 BBC86 (Biobase, Shandong, China)

2.2 MATERIALES

2.2.1 Reactivos

- Estándar Benzo(a)Pireno (ChemService, PA, EUA) pureza 99 %
- Estándar Benzo(a)Antraceno (ChemService, PA, EUA) pureza 99 %

2.2.2 Disolventes

- Metanol (MeOH) grado cromatográfico (J.T. Baker, EUA)

- Acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico (J.T. Baker, EUA)
- Isopropanol (J.T. Baker, EUA)

2.2.3 Preparación de muestras

2.2.3.1 Cultivos

- Microalga *Selenastrum capricornutum* adquirida de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Texas (TX, EUA).
- Medio Bristol: nitrato de sodio (NaNO_3), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), cloruro de sodio (NaCl). (JT Baker, D.F., Méx.). (Composición mostrada en la **Tabla 2.1**)
- Proteosa Peptona (MCD Lab, Edo. de México, Méx.).
- Agar bacteriológico (MCD Lab, Edo. de México, Méx.).

Tabla 2.1 Composición del medio Bristol

Componente	Disolución "Stock"	Volumen de solución "Stock" para 1 L de cultivo	Concentración final en 1 L de cultivo (mM)
NaNO_3	10 g/400 mL agua destilada	10 mL	2.94
$\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	1 g/400 mL agua destilada		0.17
$\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$	3 g/400 mL agua destilada		0.3
K_2HPO_4	3 g/400 mL agua destilada		0.43
KH_2PO_4	7 g/400 mL agua destilada		1.29
NaCl	1 g/400 mL agua destilada		0.43

2.2.3.2 Inmovilización

- Alginato de sodio Sigma-Aldrich W201502.
- Cloruro de calcio Sigma-Aldrich C1016.

- Citrato de sodio tribásico di-hidratado Sigma-Aldrich C8532
- Sistema aséptico Sterifil con porta filtros de 47 mm (Milipore, EUA)
- Filtros de nitrocelulosa estériles con tamaño de poro de 0.22 μm y 47 mm de diámetro (Milipore, Ireland).

2.2.3.3 Extracción en Fase Sólida

- Cartuchos de empaque para Extracción en Fase Sólida de 6 mL con frites (Varian, EUA).
- Jeringa con mariposa
- Sílice C-18 Supelclean de 45 μm de diámetro de partícula (Supelco, EUA).

2.2.3.4 Otros materiales

- Agua tipo I obtenida de un equipo de purificación Simplicity UV (Millipore, MA, EUA) (Agua desionizada).
- Agua de la llave
- Algodón
- Gasas
- Tubos de ensayo
- Pipeta Graduada de 10 mL.
- Propipeta
- Matraces Erlenmayer de 50 mL.
- Matraces Erlenmayer de 150 mL.
- Vaso de precipitados de 200 mL.
- Pipeta Pasteur.
- Bulbo de goma de Succión para Pipeta Pasteur.
- Tubos para centrifuga de 15 mL.
- Probeta de 10 mL.
- Papel estraza
- Masking tape
- Papel aluminio
- Micropipeta 100-1 000 μL (Eppendorf, EUA)
- Espátula
- Viales ámbar de 5 mL con tapa de rosca

- Plástico Parafilm
- Viales ámbar con tapón de rosca de 60 mL

2.3 REACTORES

2.3.1 Mini reactor de matraz en agitación orbital

- Matraces Erlenmeyer de 50 mL
- Agitador orbital Jeio Tech modelo SI-300/300R/600/600R

2.3.2 Mini reactor de lote con agitación por recirculación

- Recipiente de vidrio de 50 mL en forma de vaso de precipitados con salida por el fondo en forma de copa
- Manguera de silicón
- Bomba peristáltica

2.3.3 Mini reactor de lote en agitación magnética (50 mL)

- Recipientes de vidrio en forma de vaso de precipitados de 50 mL con fondo diseñado para resguardar barra de agitación magnética
- Barras de agitación magnética de 13 mm de ancho x 18 mm de largo
- Mallas de acero inoxidable de 2 mm de espacio
- Agitador orbital, Marca Cimarec ®, Thermolyne,

2.3.4 Mini reactor de lote en agitación magnética (100 mL)

- Recipientes de vidrio en forma de vaso de precipitados de 100 mL con fondo diseñado para resguardar barra de agitación magnética
- Barras de agitación magnética de 13 mm de ancho x 42 mm de largo
- Malla de acero inoxidable de 2 mm de espacio
- Agitador orbital, Marca Cimarec ® 2, Thermolyne.

2.4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la **Figura 2.1** se presenta un diagrama general de la metodología usada, el cual consta de tres grandes secciones:

1. Análisis y preparación de muestra
2. Manejo de cultivos e inmovilización
3. Diseño y evaluación de bio-reactores

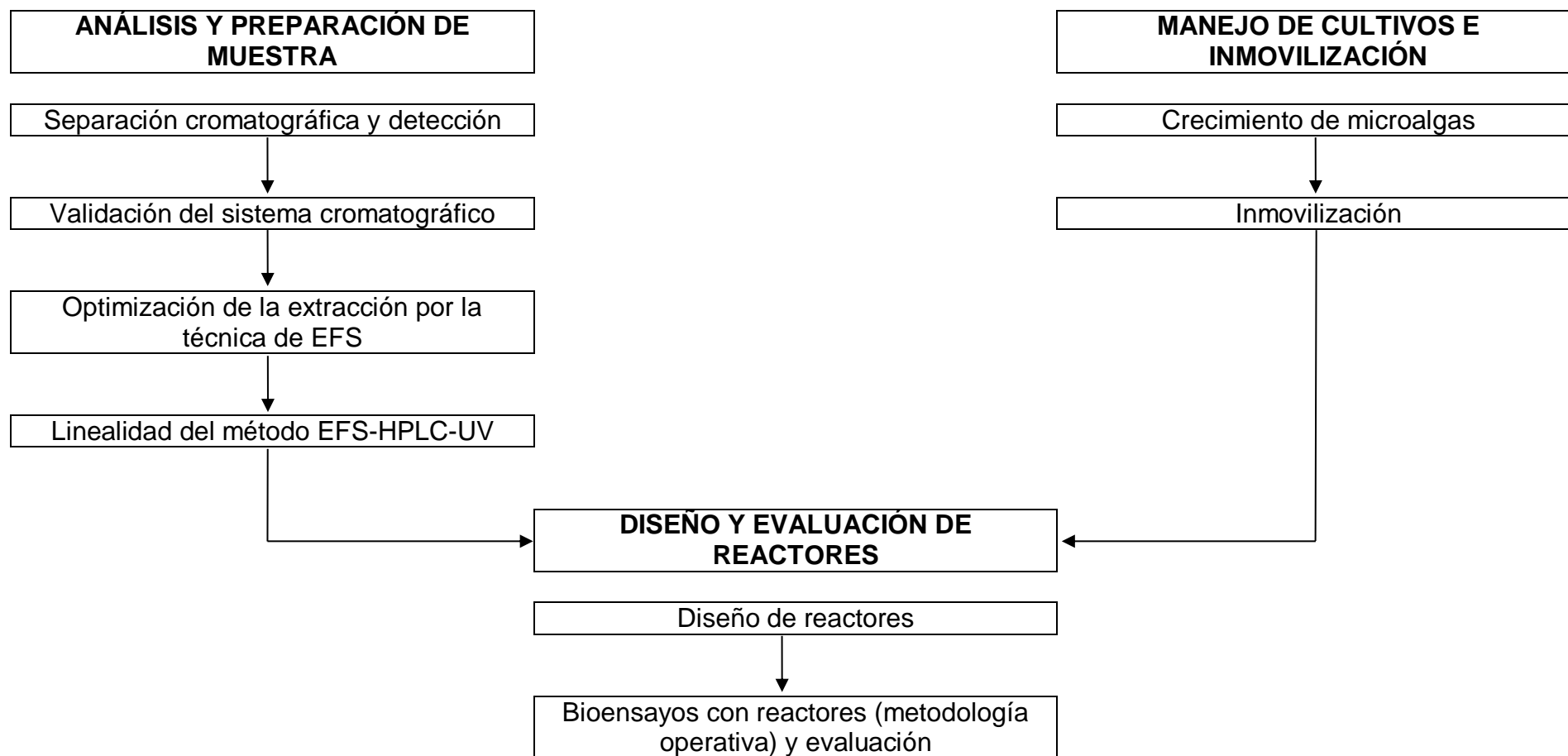


Figura 2.1 Metodología general del trabajo experimental

2.4.1 Análisis y preparación de muestra

2.4.1.1 Separación cromatográfica y detección

Se analizaron las muestras por cromatografía de líquidos a diferentes longitudes de onda en el detector UV, y se encontró la longitud de absorción óptima para el B(a)P de 263 nm y para el B(a)A de 285 nm, en donde se obtuvieron los mayores valores de área y altura en cromatogramas.

2.4.1.1.1 Condiciones cromatográficas

- a) Fase móvil: 100 % Metanol
- b) Fase estacionaria: Columna analítica Thermoscientific de 150 x 4.6 mm empacada con fase inversa C18 tamaño de partícula 5 µm
- c) Flujo: 1 mL/min
- d) Volumen de inyección: 20 µL

2.4.1.2 Validación del sistema cromatográfico

Para poder asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos por el sistema HPLC-UV, fue necesario efectuar la validación del sistema cromatográfico y de los métodos respecto a nuestro sistema cromatográfico junto a la EFS.

2.4.1.2.1 Precisión del sistema

2.4.1.2.1.1 Repetibilidad intra-día

Se analizaron muestras por triplicado con B(a)A y B(a)P a la misma concentración para ambos HAP's en un mismo día a 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4 y 5 µg/mL, obteniéndose los datos de altura y áreas de cada cromatograma, para poder observar el coeficiente de variación (CV) entre cada inyección.

Para poder calcular el CV se emplea la siguiente fórmula:

$$\% CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \%$$

Donde " \bar{x} " es el promedio de los resultados obtenidos del cromatograma y "s" es la desviación estándar de los resultados.

Nota: Para la concentración de 1 µg/mL se realizó un quintuplicado, para una mejor comparación con inyecciones realizadas en días subsecuentes.

2.4.1.2.1.1 Repetibilidad inter-día

Se analizaron muestras por quintuplicado con B(a)A y B(a)P a la misma concentración para ambos HAP's a 1 µg/mL en 4 días diferentes, obteniéndose los datos de altura y áreas de cada cromatograma, para poder observar la variación entre cada inyección y además en días diferentes.

2.4.1.2.2 Linealidad del sistema

2.4.1.2.2.1 Curvas de calibración

Se analizaron disoluciones por triplicado con B(a)A y B(a)P a la misma concentración de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4 y 5 µg/mL, obteniéndose los datos de altura y áreas de cada cromatograma, para poder relacionarlas en un gráfico con la concentración correspondiente, y verificar su relación lineal.

Nota: Para mejor precisión en la obtención de los datos de las curvas mostradas en este documento, fue necesario realizar un ajuste de volumen de alícuota mediante peso por balanza. Este procedimiento se muestra en el **Anexo 1**.

2.4.1.3 Optimización del método EFS-HPLC-UV

Para poder analizar cuantitativamente la biorremoción del mini reactor fue necesario recuperar exclusivamente (en la mejor medida posible) del medio acuoso los HAP's remanentes después de este proceso de exposición, mediante un método basado en la técnica de EFS optimizado para aislar a los contaminantes de los medios acuosos con microalgas inmovilizadas. La evaluación de la biorremoción de estos experimentos se realizó con el análisis de las cantidades remanentes de los HAP's a diferentes tiempos de exposición de los extractos (resultado final del proceso de EFS a las muestras acuosas originales de los experimentos) que se analizaron mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) de fase reversa, con columna C18 y fase móvil 100 % metanol, con detector UV a una longitud de onda de 263 nm para B(a)P y 285 nm para B(a)A.

La optimización de este método por EFS-HPLC-UV fue basada en la referencia de Bernal Toris, del año 2015, donde se evita la presencia de alginato en la muestra acuosa proveniente de las esferas con algas inmovilizadas, ya que de

no eliminar este alginato la aplicación de la muestra acuosa en el cartucho sería gravemente obstaculizada por taponamientos de este cartucho.

2.4.1.3.1 Procedimiento de la técnica de extracción de EFS

1. Activación de sílice C18 virgen

La sílice C18 a ser utilizada se empaca en un cartucho de EFS de 6 mL en medio de 2 frits (filtro) y se le hace pasar 1 mL de metanol por cada gramo de sílice C18 empacado. Se deja pasar el metanol totalmente por gravedad, y después se deja secando con vacío por 1 hora; esto con el objeto de orientar las cadenas hidrofóbicas de la sílice C18 hacia el exterior favoreciendo que puedan estar expuestas a los HAP's y tener un mejor contacto con los mismos.

2. Preparación y acondicionamiento del cartucho de EFS con sílice C18

Una vez activada y seca la sílice C18 se empaca con 300 g en un cartucho de EFS de 6 mL en medio de 3 tapones frits delgados, dos debajo de la sílice C18 y uno arriba.

Posteriormente, a gravedad se le hace pasar 4 mL de ACN, y luego 10 mL de agua destilada. Esto con el objetivo tanto de orientar las cadenas hidrofóbicas de la sílice C18 al exterior como para acondicionarla a un medio similar al de la muestra acuosa que a continuación será introducida.

3. Introducción de muestra acuosa fortificada con HAP's

La muestra acuosa (agua de la llave) de volumen de 15 mL es fortificada con HAP's (4 µg de B(a)P y 4 µg B(a)A), para lograr una concentración de 0.2666 µg/mL. La muestra se hace pasar a través del cartucho (en el caso de bioensayos, después de que la muestra haya estado en contacto con las microalgas inmovilizadas), regulando mediante vacío, para que la velocidad de goteo sea tal que caigan aproximadamente 2 gotas cada segundo.

Nota: En el caso de los mini reactores con agitación magnética y de recirculación, se presentó la dificultad de vaciar la muestra acuosa hacia el cartucho EFS ya que no tienen el mismo diseño de boca de un matraz, por lo cual, a pesar de haberseles diseñado una apertura (protuberancia para verter líquidos) de vaciado similar a la de un vaso de precipitados, se riega muy fácilmente el contenido, por lo cual se optó primero por transferir la muestra del medio acuoso en el mini reactor hacia un vaso de precipitados de 50 mL; cuya

apertura de vaciado de líquidos está mejor diseñada para verter el contenido en el cartucho de EFS.

4. Lavado del reactor y aplicación al cartucho

Se procede a enjuagar el reactor, con 10 mL de una mezcla de agua-isopropanol 80-20 % por alrededor de 1 minuto, es decir, se agregan los 10 mL de agua-isopropanol al reactor que aún contiene las esferas de alginato y se procede a agitar por un minuto, para que se enjuague bien el interior y se pueda desorber la mayor cantidad posible de HAP's que aún estén presentes en la superficie del vidrio, de la rejilla y/o alginato, para posteriormente, llevar esta mezcla ya agitada dentro de este mini-reactor hasta el cartucho de EFS. Es importante destacar que se tuvo que verter primero el medio del medio acuoso desde el mini reactor hacia un vaso de precipitados de 50 mL, y por esto también se enjuagó este vaso de precipitados de 50 mL con la misma mezcla de agua-isopropanol con la que se enjuagó el mini reactor. La aplicación de estos lavados al cartucho de EFS se efectuó a una velocidad de goteo de aproximadamente 2 gotas cada segundo mediante vacío regulado.

5. Secuencia de elución en la EFS

La secuencia de elución aplicada al cartucho EFS fue la siguiente:

- a. 10 mL H₂O-ACN (90:10)
- b. 1 mL H₂O-ACN (70:30)
- c. 3 mL H₂O-ACN (55:45)
- d. 6 mL ACN 100%

Siendo las mezclas “a”, “b” y “c” usadas para la eliminación de interferencias o “clean-up” y el acetonitrilo (d) usado para la elución de los HAP's de interés (extracto final). La elución “a”, “b” y “c” se efectuó al vacío (2 gotas por segundo) y la “d” a gravedad.

Nota: Para el caso de los mini reactores, así como se enjuagó y agitó este mini reactor y el vaso de precipitados con la mezcla agua-isopropanol 80:20, se procedió a enjuagar y agitar nuevamente el mini reactor y el vaso de precipitados con la mezcla “a”, para posteriormente ser vertida en el cartucho de EFS.

6. Concentración por evaporación de extracto

El extracto se coloca a baño María entre 70 y 80 °C con agitación magnética hasta evaporación a sequedad, cuidando que no quede mucho tiempo después

de llegar a la sequedad, para que se retire el vial del baño María, y entonces se añade 1 mL de acetonitrilo al vial. Esto tiene la finalidad de concentrar en una razón de 1:6 el extracto del inciso “d” (punto 5 anterior).

2.4.1.3.2 Recobro de la extracción

La evaluación del recobro se realizó mediante las siguientes inyecciones de disolución estándar y extracto en el cromatógrafo:

Disolución estándar: En cada día de experimentación, se inyectó al equipo una disolución estándar en acetonitrilo con 4 µg/mL de B(a)P y B(a)A, para obtener el área de los picos de cada uno.

Extracto: El extracto concentrado por evaporación, se inyecta en el equipo aplicando el método cromatográfico descrito más arriba para obtener el área. Con la siguiente ecuación se calculó el recobro.

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Área de extracto}}{\text{Área de disolución estándar}} \times 100 \%$$

Este % de Recobro, es la medida de la recuperación real (mediante la técnica de EFS) de la cantidad total de HAP's contenidas en la muestra acuosa original. También se realizó triplicado para observar su variación.

2.4.1.3.3 Precisión (Repetibilidad) de la técnica de evaporación

Se realizó un triplicado de la evaporación hasta la sequedad de tres muestras de 6 mL de ACN con 4 µg de B(a)A y B(a)P, para posteriormente añadir 1 mL de ACN y poder observar la variación de éstos, mediante el recobro.

2.4.1.3.4 Linealidad del método EFS-HPLC-UV

Se hizo la extracción por EFS a nueve muestras de 15 mL de agua de la llave; tres de ellas se fortificaron con 1 µg de HAP's (0.066 µg/mL), otras tres con 2 µg (0.133 µg/mL), y las últimas tres con 4 µg (0.266 µg/mL) y se obtuvieron los extractos correspondientes. Las concentraciones de HAP's esperadas en los extractos fueron de 1 µg/6 mL (0.166 µg/mL), 2 µg/6 mL (0.333 µg/mL) y 4 µg/6 mL (0.666 µg/mL) respectivamente. Con estas 3 concentraciones (en triplicado) se procedió a construir la curva linealidad del método. No se realizó evaporación de los extractos para solamente evaluar la técnica de EFS.

2.4.2 Manejo de cultivos e inmovilización

2.4.2.1 Crecimiento de microalgas

El cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum* se mantuvo en condiciones axénicas sembrándolo primero en medio sólido con agar al 1 %. Posteriormente, los medios líquidos se sembraron con un asa bacteriológica con la que se transfirió la microalga desde el medio sólido hacia el medio líquido.

Los medios de cultivo líquido de la microalga utilizados para los ensayos de exposición a los HAP's fueron tomados cuando tuvieron un valor de absorbancia de 1, que fue medida con un espectrofotómetro a 685 nm (longitud de onda de máxima absorción de la clorofila), de acuerdo con la curva de crecimiento de esta microalga, donde se tiene una cantidad de 4.5×10^6 células/mL aproximadamente (Olmos, 2013). Para que un cultivo líquido llegue a esta absorbancia se cultiva en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo Bristol, cuya composición se describe en la tabla 2.1, al que además se le adiciona proteosa peptona al 1 %. Antes de transferir la microalga del cultivo sólido al cultivo líquido, este medio Bristol con proteosa peptona se esteriliza por 30 minutos en la autoclave eléctrica a 121 °C, esto para asegurar la condición aséptica cuando se siembre la microalga en este medio. Ya que se cultiva la microalga en condiciones axénicas en el medio líquido se somete a ciclo de iluminación de 16 horas (con foco de luz amarilla de 10 Watts) y a 8 horas de oscuridad, a temperatura ambiente y agitación semiconstante, ya que no permanece en agitación las 24 horas, de este modo tarda en crecer de 30 a 40 días.

2.4.2.2 Inmovilización

Se inmovilizó a la microalga *Selenastrum capricornutum* en esferas de alginato de calcio que fueron puestas en diferentes tipos de “mini reactores” (debido a su pequeño volumen, de no más de 100 mL) y su vez se evaluaron diferentes condiciones de operación, con la cuantificación de B(a)P y B(a)A en agua de la llave después de la exposición de las microalgas, con el objetivo de encontrar la información necesaria para construir un reactor adecuado para la biorremoción de HAP's con estos microorganismos. Las condiciones para inmovilización se discuten a continuación.

2.4.2.2.1 Preparación de materiales y soluciones para inmovilización

2.4.2.2.1.1 Esterilización

En la autoclave, se procede a esterilizar el siguiente material:

- Matraces Erlenmeyer de 50 mL con aproximadamente 20 mL de solución acuosa (agua desionizada) de cloruro de calcio 1 % m/v con tapón de algodón envuelto en gasa.
- Matraz Erlenmeyer de 150 mL vacío con tapón de algodón envuelto en gasa (para almacenar solución acuosa de alginato de sodio 3% m/v esterilizada).
- Sistema aséptico “Sterifil” con filtros de nitrocelulosa envuelto en papel estraza y sellado con “masking tape”.
- Tubo de 15 mL de centrifugado (para medir 4 mL de alginato de sodio)
- Tubos de ensayo con tapón de algodón envuelto en gasa (para centrifugar el cultivo de microalgas).
- Pipeta de 10 mL envuelta en papel estraza y sellada con “masking tape”.

Por 30 minutos se esteriliza a 121 °C.

2.4.2.2.1.2 Solución acuosa de alginato de sodio (3 % m/v)

- 1) En un vaso de precipitados de 200 mL se añaden 97 mL de agua desionizada y se coloca en un agitador magnético encendido, para posteriormente ir agregando lentamente 3 g de alginato de sodio y se tapa el vaso de precipitados con plástico parafilm. Se deja agitando por alrededor de 2 horas hasta que el alginato de sodio se disuelva completamente en el agua. Debe tener consistencia viscosa.
- 2) En una mesa previamente limpiada con alcohol, se encienden 2 mecheros Bunsen separados a una distancia de aproximadamente 20 cm, y en medio de éstos, con ayuda del sistema aséptico “Sterifil” con filtros de nitrocelulosa, se procede a filtrar la solución acuosa de alginato de sodio disuelto, auxiliándonos también de un vacío de fuerza leve. Ya recolectada la solución acuosa de alginato filtrado, se procede a trasvasarla hacia un matraz Erlenmeyer de 150 mL previamente esterilizado en autoclave, todo esto en medio de los 2 mecheros.

Nota: La razón por la cual no se hace un volumen mayor de esta solución es porque presenta el riesgo de perder viscosidad con el tiempo, y si esto sucede

la solución ya no sirve para la inmovilización. También por esto es importante cubrir el matraz con papel estraza para que esté aislado de la luz y con esto disminuir el riesgo de que pierda viscosidad.

2.4.2.2.1.3 Solución acuosa de cloruro de calcio (1 % m/v)

En matraces Erlenmeyer de 50 mL, se colocan alrededor de 20 mL de cloruro de calcio al 1 % m/v en agua desionizada y en la boca de los matraces se coloca un tapón de algodón envuelto con gasa para que después de esterilizar en autoclave la solución, este tapón sea una barrera que impida la entrada de contaminantes al interior del matraz.

2.4.2.2.1.4 Cultivo líquido de la microalga *S. capricornutum* para inmovilización

De un cultivo líquido con la microalga que ya haya alcanzado la absorbancia de 1, en condiciones asépticas se depositan 15 mL en un tubo de ensayo previamente esterilizado, se cierra con su tapón de algodón envuelto en gasa y se centrifuga a aproximadamente 3900 rpm por 15 minutos. Cuando se tenga el botón de microalgas separado totalmente del resto del cuerpo del agua, se retira el medio líquido con ayuda de una pipeta de 10 mL previamente esterilizada y un bulbo de succión de micropipeta Pasteur hasta dejar un volumen de 2 mL. Posteriormente se agita el tubo de ensayo para que el botón de microalgas se re-suspenden en el agua y se cierra con un tapón de algodón envuelto con gasa. Las microalgas así concentradas se utilizan para la inmovilización.

2.4.2.2.1.5 Procedimiento de inmovilización

El proceso de inmovilización se lleva a cabo dentro de la Campana de Bioseguridad clase 2 AA 11231 BBC86.

- 1) Todo el material esterilizado anteriormente nombrado se introduce a la Campana de Bioseguridad y es expuesto a 20 minutos de luz UV.
- 2) Se apaga la luz UV y se enciende el flujo laminar y se dejan estabilizar las condiciones internas por 10 minutos.
- 3) Se lavan las manos y se desinfectan con alcohol.

- 4) Se agregan 4 mL de la solución acuosa de alginato de sodio a los 2 mL del cultivo acuoso de microalgas en el tubo de ensayo (sección 2.4.2.2.1.4) y se agita hasta la completa homogeneización.
- 5) Con ayuda de la pipeta de 10 mL y un bulbo de succión de pipeta Pasteur se gotea a una velocidad moderada la mezcla de alginato-medio con microalgas en un matraz con cloruro de calcio. Procurar después de añadir cierta cantidad de gotas agitar el matraz para que no se peguen las gotas unas con otras.
- 6) Al terminar se dejan endurecer las esferas de alginato de calcio formadas por 2.5 minutos (se forman aproximadamente 70-80 esferas con un promedio de 75).
- 7) Decantar las esferas para desechar la solución acuosa de cloruro de calcio.
- 8) Enjuagar las esferas 2 veces con 20 mL de agua de la llave.
- 9) Añadir el volumen de agua de la llave necesario para el bioensayo.

2.4.3 Diseño y evaluación de bio-reactores

2.4.3.1 Diseño de reactores

Para el diseño de los bio-reactores se contemplaron los siguientes aspectos:

- Geometría (dimensiones, forma)
- Volumen de muestra acuosa
- Materiales empleados en el reactor
- Practicidad del dispositivo
- Agitación de la muestra acuosa:
 - Tipo de agitación
 - Velocidad de agitación

En cuanto al aspecto biológico del reactor:

- Condiciones de desarrollo de las microalgas: Para asegurar las mejores condiciones posibles de desarrollo los experimentos fueron llevados a cabo con iluminación de lámpara amarilla y los reactores son de material de vidrio transparente para permitir perfectamente el paso de luz a los microorganismos.
- Tipo de inmovilización de microalgas: Es importante mencionar que este trabajo se basó en las condiciones de inmovilización de microalgas

reportadas por Bernal Toris del año 2015, en el cual se evaluó la remoción de B(a)P con algas inmovilizadas en alginato con aproximadamente 90 esferas por cada ensayo de 15 mL, y los microorganismos provenientes de una solución acuosa con concentración de 4.5×10^6 células/mL aproximadamente. En el caso de este trabajo, se tuvieron en promedio aprox. 75 esferas de microalgas inmovilizadas en alginato, con 9×10^5 células/esfera.

Con base en la información consultada sobre este tema y después de bastante reflexión, se decidió que las opciones siguientes fueron las mejores:

Nota: Los reactores se sobre-diseñaron en tamaño (es decir, para el reactor cuyo volumen necesario fue de 15 mL, se sobre-diseñó a un tamaño mayor a 15 mL) para que no fuera problema el incremento de volumen debido a la adición de las esferas de alginato, ni que debido a agitación o recirculación el agua llegara a salirse del reactor. Es decir, si los reactores, se hubieran construido para almacenar exactamente el volumen requerido para el ensayo, el nivel del agua hubiera estado hasta el tope de la altura de los reactores, y se corría el riesgo de que con la agitación se saliera el agua del reactor.

Se diseñaron tres diferentes reactores: mini reactor de matraz en agitación orbital (es el que ya se venía utilizando en trabajos anteriores de esta línea de investigación del laboratorio, para tomarlo como base de partida), mini-reactor de lote en agitación magnética, y mini reactor en lote con agitación por recirculación, porque mecánicamente cada uno ofrecía un tipo distinto de agitación, y se procedió a investigar qué tipo de agitación funciona mejor para nuestro proceso.

2.4.3.1.1 Mini reactor de matraz en agitación orbital

El mini reactor de matraz con agitación orbital se presenta en la **Figura 2.2** y solamente consistió en un matraz Erlenmeyer de 50 mL en agitación orbital. Se manejaron 15 mL de medio con aproximadamente 75 esferas de alginato conteniendo aproximadamente 11.25×10^6 células de microalgas/mL de alginato de calcio, o 9×10^5 células por esfera de alginato.



Figura 2.2 Mini reactor de matraz en agitación orbital

2.4.3.1.2 Mini reactor de lote con agitación por recirculación

Este reactor fue hecho en el taller de soplado de vidrio de la Facultad de Química de la UNAM, con el diseño específico solicitado para nuestros experimentos. El diseño consistió en las tres etapas mostradas de las **Figuras 2.3** a la **2.5**. Se construyó para un volumen de 40 mL.

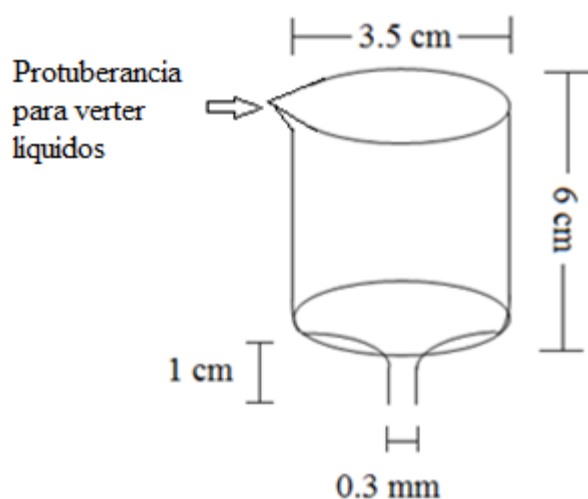


Figura 2.3 Primera etapa de diseño. Preparación del armazón en vidrio del mini reactor de recirculación (en forma de copa)

Se utilizaron 50 cm de una manguera de silicón, con un flujo de aproximadamente 1 mL/min de flujo de la bomba peristáltica.

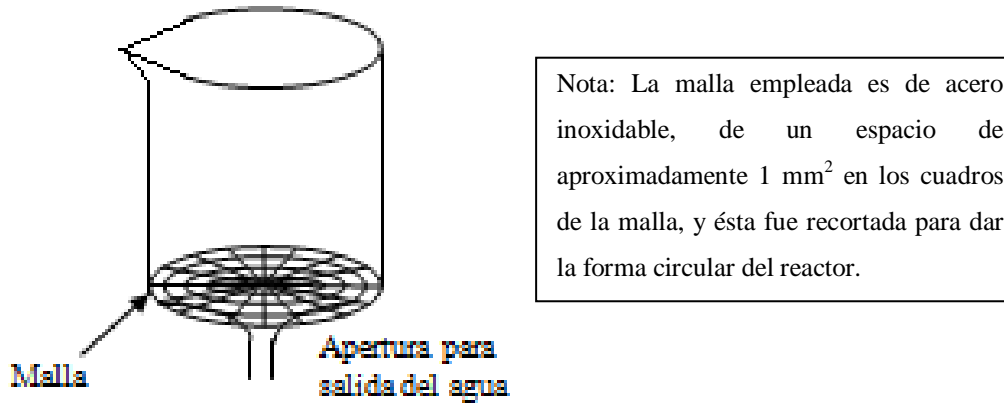


Figura 2.4 Segunda etapa de diseño. Adaptación al mini reactor de una malla de acero inoxidable.

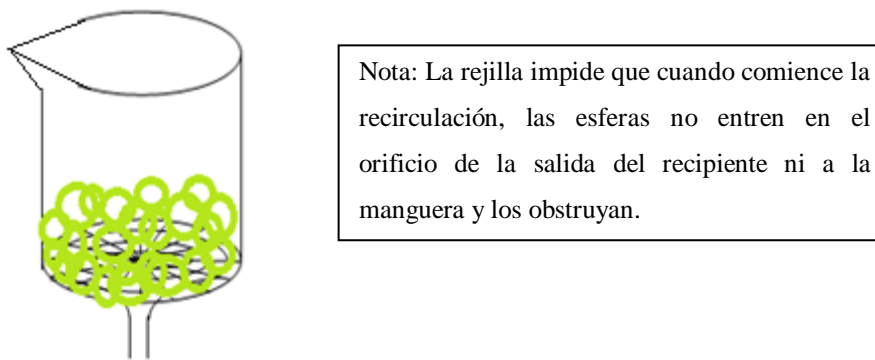
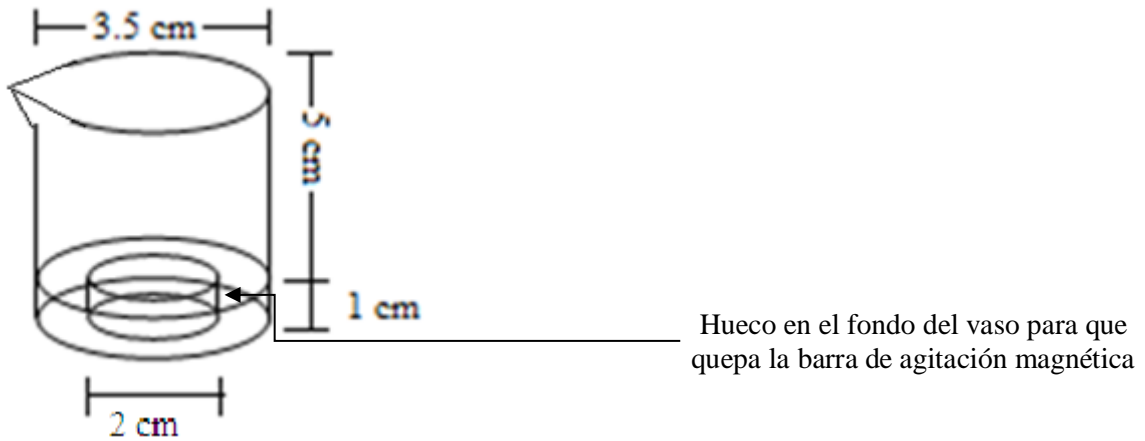


Figura 2.5 Tercera etapa de diseño. Adición al mini reactor de las esferas de microalgas inmovilizadas de alginato conteniendo aproximadamente 9×10^5 células por esfera

2.4.3.1.3 Mini reactor de lote con agitación magnética (50 mL)

Este reactor fue hecho en el taller de soplado de vidrio de la Facultad de Química de la UNAM, con el diseño específico solicitado para nuestros experimentos. El diseño consistió en las cuatro etapas mostradas de las **Figuras 2.6 a la 2.9.**



Para un volumen de 50 mL

Figura 2.6 Primera etapa de diseño. Preparación del armazón de vidrio de mini reactor

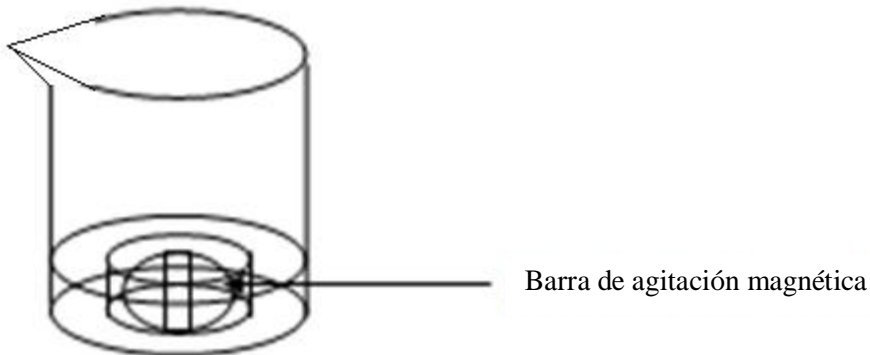
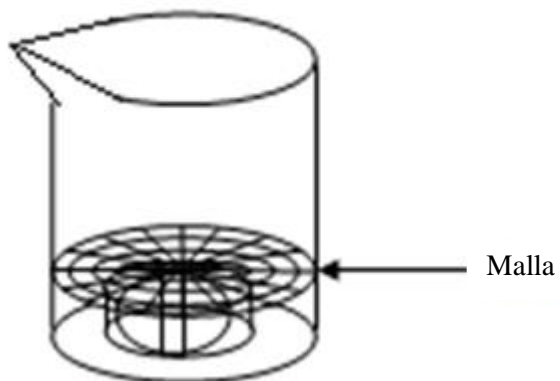
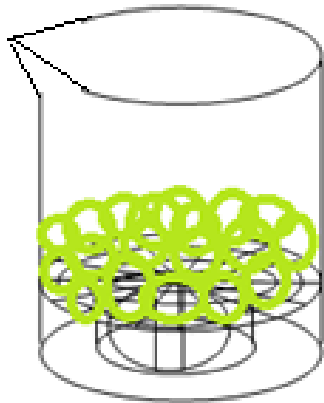


Figura 2.7 Segunda etapa de diseño. Mini reactor con mosca agregada



Nota: La malla empleada es de acero inoxidable, de un espacio de aproximadamente 1 mm² en los cuadros de la malla, y ésta fue recortada para dar la forma circular del reactor.

Figura 2.8 Tercera etapa de diseño. Mini reactor con mosca y malla

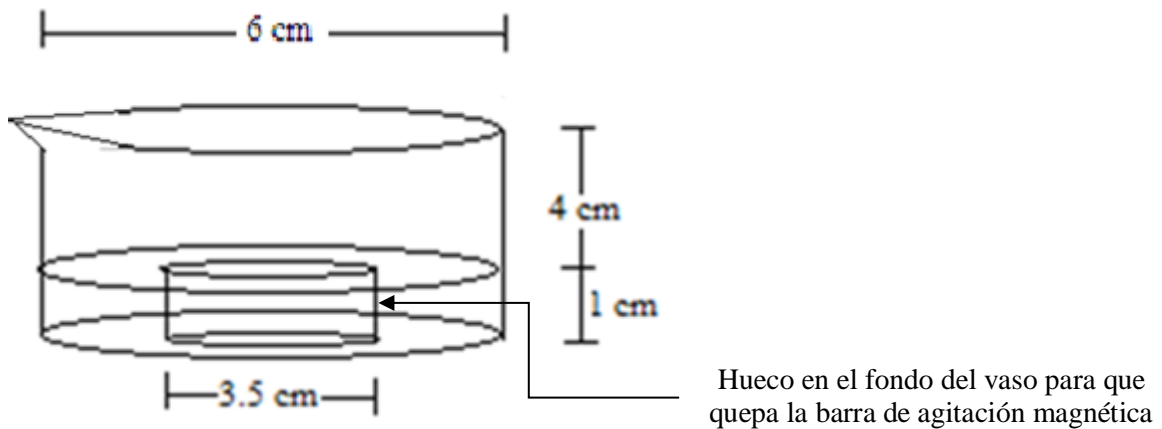


Nota: La rejilla impide que cuando la barra magnética gire, las esferas no sean destruidas.

Figura 2.9 Cuarta etapa de diseño. Mini reactor con esferas de microalgas inmovilizadas

2.4.3.1.4 Mini reactor de lote con agitación magnética (100 mL)

Este reactor fue hecho en el taller de soplado de vidrio de la Facultad de Química de la UNAM, con el diseño específico solicitado para nuestros experimentos. El diseño consistió en las cuatro etapas mostradas de las **Figuras 2.10 a la 2.13**.



Para un volumen de 100 mL

Figura 2.10 Primera etapa de diseño. Armazón de vidrio de mini reactor

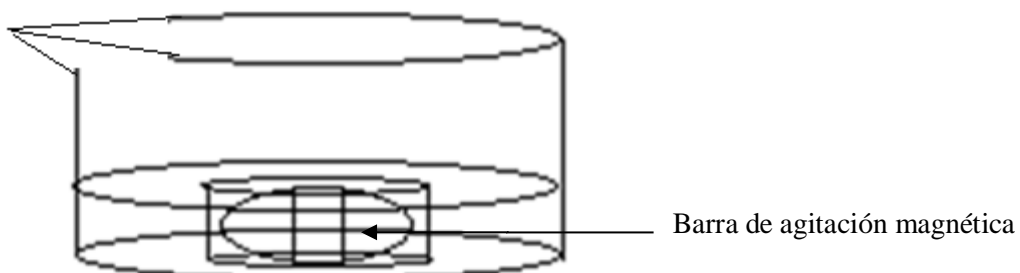


Figura 2.11 Segunda etapa de diseño. Mini reactor con mosca

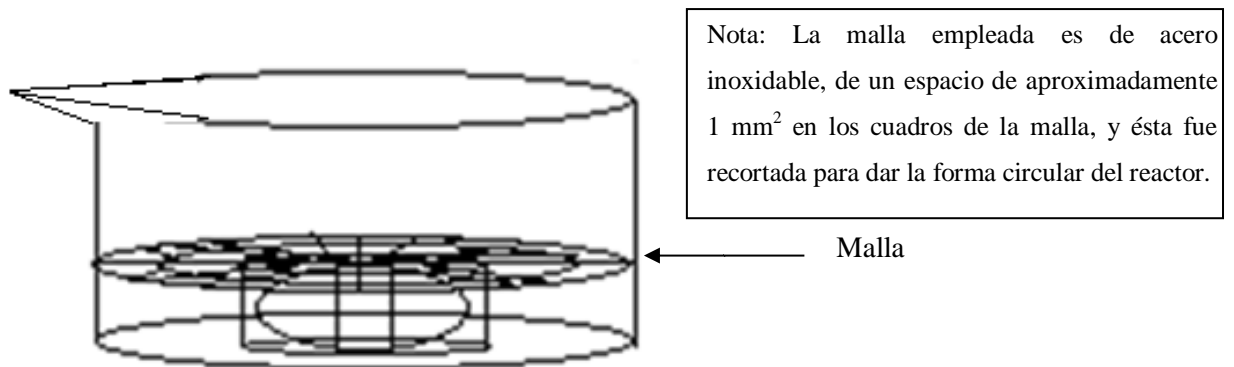


Figura 2.12 Tercera etapa de diseño. Mini reactor con mosca y malla

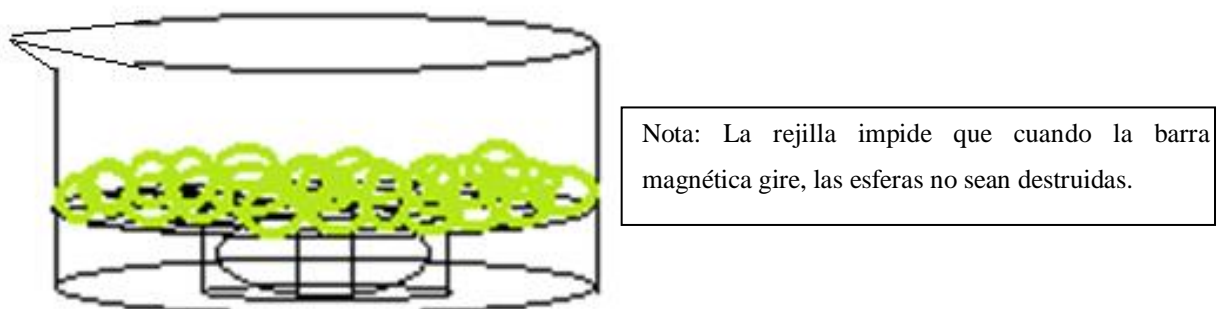


Figura 2.13 Cuarta etapa de diseño. Mini reactor con esferas de microalgas inmovilizadas

2.4.3.2 Bioensayos con reactores. Metodología operativa y evaluación

Experimentalmente se evaluaron en los reactores los siguientes efectos en la remoción de HAP's en una muestra acuosa:

- 1) Agitación: Debido a que las microalgas requieren agitación para que tengan un suministro constante y homogéneo de oxígeno, nutrientes y HAP's a lo largo de todo el espacio donde puedan estar distribuidas, este factor se considera importante, por lo cual se estudió:
 - Tipo de agitación (orbital, con agitador magnético y con recirculación)
 - Velocidad de agitación (diferentes posiciones del botón del agitador)
- 2) Cantidad de masa de HAP's: Manteniendo constante el número de microalgas (aproximadamente 9×10^5 células por esfera y las mismas 75 esferas aprox.) y la concentración de HAP's en el medio acuoso ($0.266 \text{ } \mu\text{g/mL}$), se estudió la remoción a distintas cantidades de masa

(agregadas en diferentes volúmenes), para el mini reactor de agitación magnética.

Siguiendo los pasos de la metodología expuesta en el equipo de trabajo (Bernal Toris, 2015), se fortifica cada bioensayo para que la concentración de ambos HAP's sea de 0.266 µg/mL. El efecto del volumen de muestra acuosa en la remoción se abordará en este trabajo.

La rutina general de todos los experimentos para evaluar un determinado efecto fue primero realizar un ensayo de control y después el bioensayo. El ensayo de control tiene como función observar el efecto de la remoción del mini reactor pero sin microalgas, es decir, el efecto de remoción de HAP's que se pueda presentar debido a adsorción en el vidrio o alginato, fotólisis, etc. (remoción abiótica), y ya con esta información, se puede discriminar el efecto de remoción que se tiene con microalgas, en el bioensayo (remoción biótica).

2.4.3.2.1 Efecto de tipo de reactor y el tipo de agitación

Estos experimentos se realizaron con 15 mL de muestra acuosa, fortificando con 4 µg de ambos HAP's, incubación a 4, 6 y 15 horas con luz amarilla, por triplicado, en una caja cerrada con lámparas en los laterales, a cada reactor con microalgas inmovilizadas.

Los ensayos fueron realizados para cada reactor, manteniendo fijas las condiciones anteriores. Se evaluó cómo afecta la remoción dependiendo del tipo de reactor de la agitación.

2.4.3.2.1.1 Reactor en agitación orbital

En la **Figura 2.2**, en la página 59, se presentó una imagen del reactor, el cual es simplemente un agitador orbital con velocidad fija de 50 rpm, conteniendo a los matraces de 50 mL.

2.4.3.2.1.2 Mini reactor de lote con agitación magnética

En la **Figura 2.14** se muestra el tipo de reactor diseñado, que fue colocado encima de una parrilla con agitación magnética. En las Figuras **2.15 (A)**, **(B)** y **(C)** se muestran imágenes de esos diseños.

La velocidad de agitación empleada fue 90 rpm aprox.

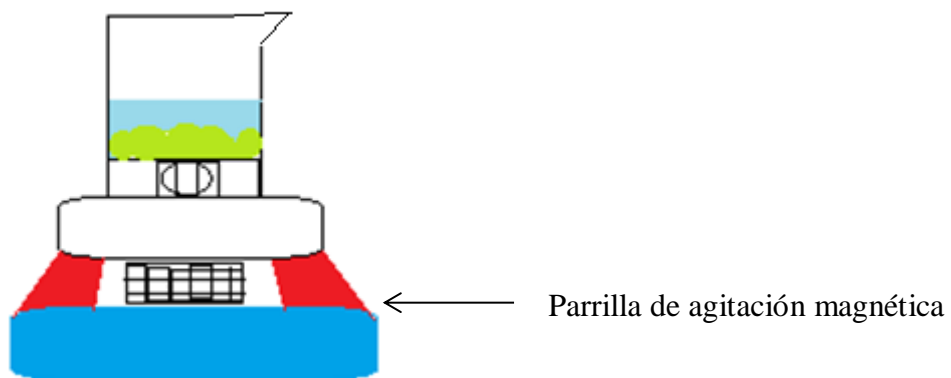


Figura 2.14 Mini reactor de lote con agitación magnética



Figura 2.15 (A) Mini reactor de lote con agitación magnética. Reactor y Parrilla.

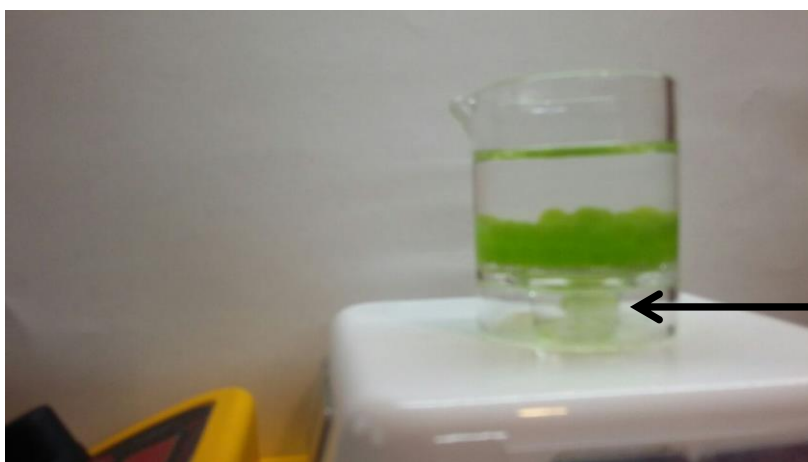


Figura 2.15 (B) Mini reactor de lote con agitación magnética. Acercamiento al reactor.



Figura 2.15 (C) Mini reactor de lote con agitación magnética. Vista por arriba del reactor y la parrilla.

2.4.3.2.1.3 Mini reactor de lote con agitación por recirculación

A un flujo de 1 mL/min enviado por la bomba, la recirculación misma fue la que proporcionó el movimiento (agitación) a las esferas con las microalgas. En la **Figura 2.16** se muestra este dispositivo, que consiste del reactor, su soporte y la bomba. En la **Figura 2.17 (A)** y **(B)**, se muestran fotografías de este diseño.

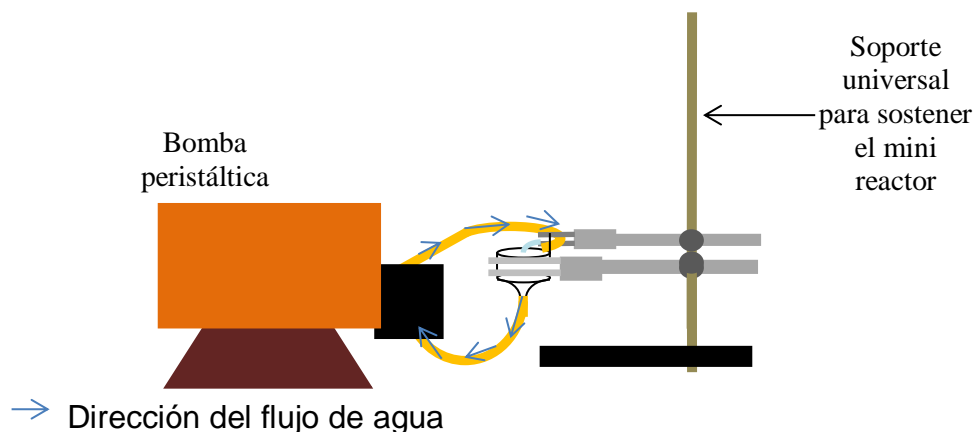


Figura 2.16 Diagrama de mini reactor listo para poner en marcha

En este tipo de reactor de la **Figura 2.16**, de la salida inferior del reactor la muestra se dirige hacia la bomba peristáltica de donde se vuelve a recircular hacia la parte superior.

La velocidad de recirculación empleada fue 1 mL/min.



Figura 2.17 (A) Mini reactor de lote con agitación por recirculación.

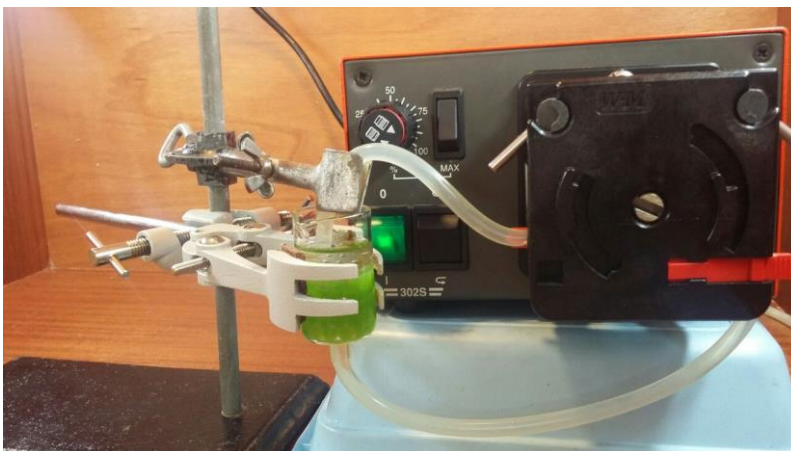


Figura 2.17 (B) Mini reactor de lote con agitación por recirculación. Con acercamiento.

2.4.3.2.2 Efecto de la velocidad de agitación

De los 3 mini reactores anteriores, se eligió el mejor, que fue el mini reactor de lote con agitación magnética, y con base en éste, se evaluó el efecto de agitación a:

- Cero velocidad = 0 rpm aprox.
- Baja velocidad = 90 rpm aprox.
- Media velocidad = 300 rpm aprox.
- Alta velocidad = 600 rpm. aprox.

El tiempo de exposición fue de 6 horas, ya que en los resultados de la experimentación del tipo de reactor de la sección anterior se observó que a este tiempo se tiene la mayor diferencia entre los ensayos del control y del bioensayo, es decir, entre la experimentación con todo el sistema pero sin

microalgas, y la experimentación con todo el sistema pero con microalgas, respectivamente.

Nota: se reportan velocidades aproximadas, ya que no se encontró una forma de conocer con exactitud la velocidad en rpm del ensayo, ya que solamente se puede contar en el manual de la bomba con el intervalo de especificaciones de velocidad (100-1 000 rpm) y como coincidirían de acuerdo con la numeración del 1 al 10 en la perilla del agitador, es decir, como se sabe que el agitador tiene un intervalo de 100-1 000 rpm, se asume que para el número 1 en la perilla de agitación corresponde 100 rpm, al número 5 corresponde 500 rpm y al número 10 (el valor más alto para la perilla) corresponde 1 000 rpm.

La más alta velocidad se eligió con base en la máxima velocidad a la cual pudiera operar la parrilla sin que se llegara a empezar a levantar las esferas de alginato por el movimiento de agitación del agua.

2.4.3.2.3 Efecto de cantidad de masa

Al igual que en el caso anterior, el mini reactor seleccionado fue el de agitación magnética. Como se observó que la velocidad media fue la óptima para la remoción, se realizaron los siguientes experimentos a esta velocidad, con la **misma cantidad de microorganismos inmovilizados** y a **6 horas (de incubación)**, ya que este tiempo fue en el que se presenta la mejor diferenciación en la remoción entre control y ensayo:

En el reactor de 50 mL

- 1) A 15 mL, se añadieron 4 μg de ambos HAP's
- 2) A 30 mL, 8 μg de ambos HAP's
- 3) A 40 mL, 10.66 μg de ambos HAP's

En el reactor de 100 mL

- 4) A 30 mL, 8 μg de ambos HAP's
- 5) A 45 mL, 12 μg de ambos HAP's
- 6) A 60 mL, 16 μg de ambos HAP's

Estrictamente estos experimentos no evalúan solamente el efecto de la cantidad de masa en la remoción, sino también la variación proporcional del volumen, para poder mantener la concentración en la muestra de 0.266 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm o $\mu\text{g}/\text{mL}$) en todos los casos. Lo anterior se justifica porque la solubilidad

de los HAP's en el agua es muy baja, (ambos a 25 °C), por lo cual, a un mismo volumen de 15 mL, hacer experimentos aumentando la cantidad de HAP de 4 µg (0.266 µg/mL) a 8 µg (0.533 µg/mL), 12 µg (0.8 µg/mL) y 16 µg (1.067 µg/mL), hubiera sido problemático porque posiblemente a medida que se aumentara la concentración, se hubiera hecho más notoria la poca solubilidad de los analitos mediante la aparición de HAP sin disolver en forma de precipitado, lo que hubiera alterado totalmente la condición de solución acuosa homogénea, al existir sedimentos que al iniciar la agitación permanecieran en movimiento, y que además pudieran entorpecer la agitación. (Nota: aunque se tenga una concentración de HAP's en medio acuoso de 0.266 µg/mL y la solubilidad del B(a)P en agua se encuentra entre 0.00162 y 0.0038 µg/mL a 25°C (Iarc, 2010) y para el B(a)A de 0.009 µg/mL a 25°C (Iarc, 2005), estos HAP's no se sedimentan debido a que todos los ensayos en mini reactores siempre están en agitación continua).

La cantidad de microalgas se mantuvo constante.

2.4.3.3 Análisis estadístico

- Para los análisis con dos grupos de muestras (ejemplo: en el ensayo de mini reactor de matraz en agitación orbital, para el ensayo de control, solamente se realizó la evaluación por triplicado del remanente para dos tiempos), se realizó un análisis de prueba t para dos muestras independientes, que requiere primero que los datos cumplan un supuesto de normalidad (Shapiro-Wilk), y una igualdad de varianzas (Prueba de Levine), para que tenga validez el uso de la prueba t en los datos, todo lo anterior con el objetivo de, mediante la prueba t observar si hay una diferencia de medias que sea significativa de forma estadística.
- Para los análisis con más de tres grupos de muestras, se realizó una prueba ANOVA (ANalysis Of VAriance), para poder corroborar si existe una diferencia significativa estadísticamente de forma general entre las medias de los conjuntos. Posteriormente, para poder corroborar entre qué pares de poblaciones de forma particular existe diferencia significativa estadística, se realizó un análisis de comparaciones múltiples Post Hoc (prueba de Tukey).

Hipótesis nula = μ_0

Para todas las pruebas, es necesario tener en cuenta la hipótesis nula, que en caso del supuesto de normalidad, y supuesto de igualdad de varianzas.

- Si $\text{valor-p} \geq 0.05$ se acepta la hipótesis nula, que establece que existe distribución normal, o igualdad de varianzas.
- Si $\text{valor-p} < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula, y se concluye que no existe distribución normal, o igualdad de varianzas.

Y para todas las pruebas, es necesario tener en cuenta la hipótesis nula, que en caso de la prueba t, análisis ANOVA y análisis Post Hoc.

- Si valor-p (bilateral en caso de la prueba t) ≥ 0.05 se acepta la hipótesis nula, que establece que no existe diferencia significativa estadísticamente entre las medias.
- Si valor-p (bilateral en caso de la prueba t) < 0.05 , se rechaza la hipótesis nula, y se concluye que existe diferencia significativa estadísticamente entre las medias.

Todos estos análisis estadísticos se realizaron con ayuda del Software SPSS 15.0. y se presentan en el **Anexo 3**.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y DETECCIÓN

En la **Tabla 3.1** se muestran los parámetros cromatográficos del sistema cromatográfico y longitudes de onda utilizadas para la detección.

Tabla 3.1 Parámetros del sistema cromatográfico y detección

Analito	Longitud de onda (nm)	Tiempo de retención (min)	Ancho a la mitad de la base (min)	Desviación estándar	Ancho de la base (min)	k' (Factor de capacidad)	α (factor de selectividad)	N (eficiencia)	Rs (resolución)
B(a)A	285	3.167	0.109	0.0464	0.1855	0.7792	1.5652	4685.2861	3.9200
B(a)P	263	3.951	0.126	0.0536	0.2145	1.2197		5457.1508	

$t_m = 1.78$ min. Con nitrato de sodio 1 M

El límite de detección de B(a)A en este sistema cromatográfico es 0.0069 $\mu\text{g/mL}$ y de cuantificación 0.021 $\mu\text{g/mL}$, y para B(a)P el límite de detección en este sistema cromatográfico es 0.0083 $\mu\text{g/mL}$, y de cuantificación es 0.025 $\mu\text{g/mL}$ (León Santiago, 2016).

A continuación se muestran cromatogramas para B(a)A y B(a)P en las **Figuras 3.1** y **3.2**, respectivamente.

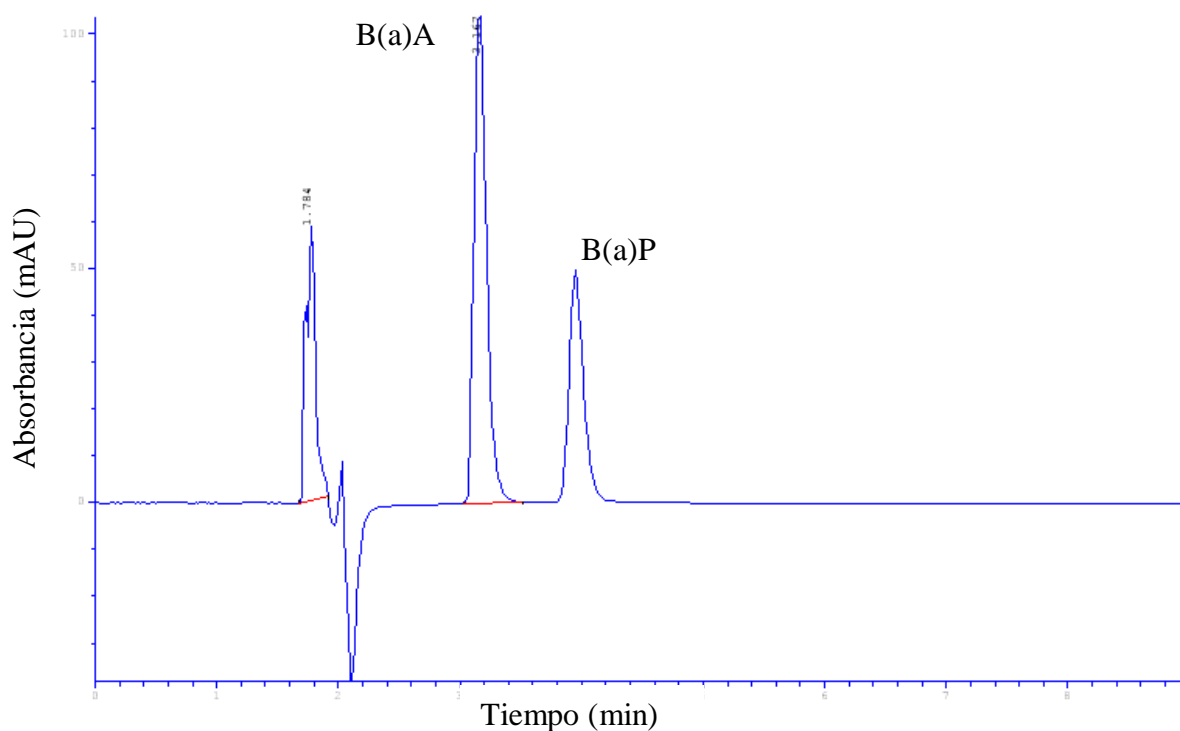


Figura 3.1 Cromatograma a 285 nm de longitud de onda para obtener la mejor respuesta del equipo al B(a)A

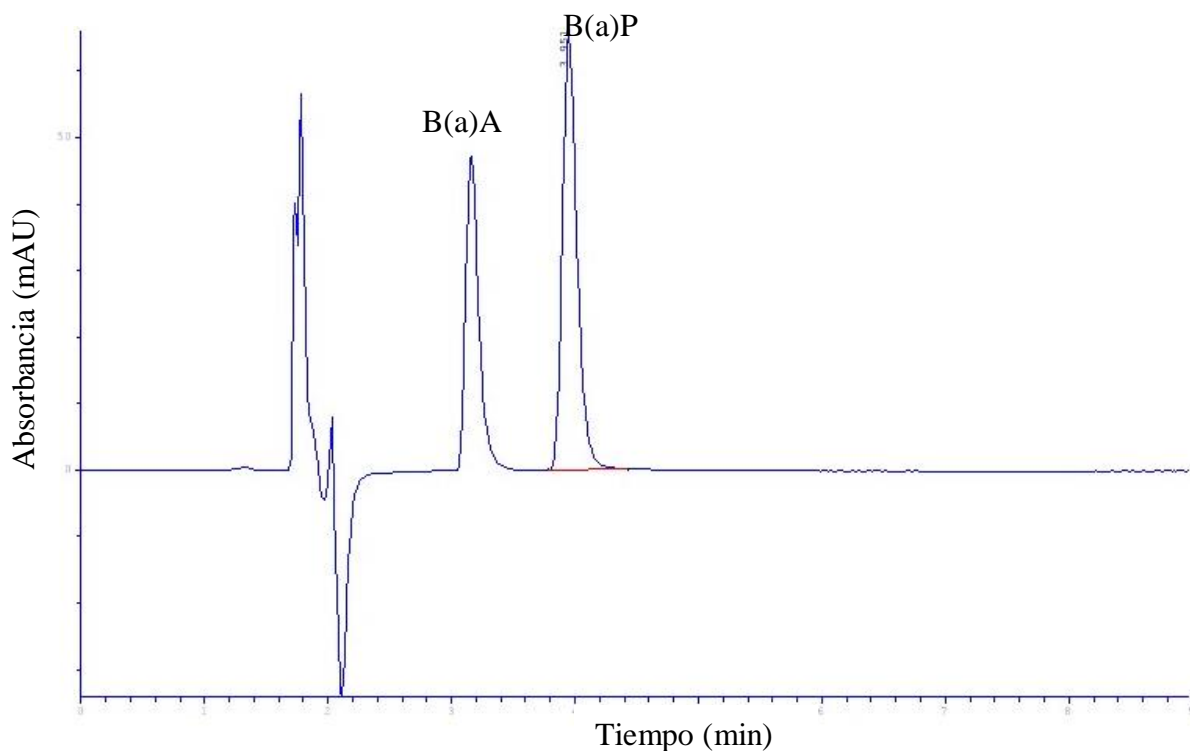


Figura 3.2 Cromatograma a 263 nm de longitud de onda para obtener la mejor respuesta del equipo al B(a)P

En esto se verifica el hecho de que el B(a)A es menos hidrófobo que el B(a)P, ya que el Benzo(a)pireno tiene 1 anillo aromático más que el Benzo(a)antraceno, y por esto el tiempo de retención del B(a)A es menor que el del B(A)P en la cromatografía en fase reversa que se manejó.

3.2 VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

3.2.1 B(a)A

3.2.1.1 Precisión del sistema

3.2.1.1.1 Repetibilidad intra-día

En la **Tabla 3.2** se presentan los datos correspondientes al estudio de la repetibilidad en un mismo día para el B(a)A. Las variaciones en las mediciones de área y altura son representadas por el coeficiente de variación CV.

Tabla 3.2 Variación entre los tiempos de retención, las áreas y las alturas del pico cromatográfico en un mismo día a diferentes concentraciones de B(a)A

Concentración teórica (µg/mL)	Corrida	tr (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Área (mAU)			Altura (mAU)		
					S (mAU)	\bar{x} (mAU)	CV (%)	S (mAU)	\bar{x} (mAU)	CV (%)
0.25	1	3.1430	2.0378	18.8246	0.0172	2.0180	0.8517	0.2664	18.8297	1.4147
	2	3.1410	2.0100	19.0986						
	3	3.1420	2.0063	18.5659						
0.5	1	3.0570	3.4371	33.3329	0.0548	3.4612	1.5843	0.0603	33.3735	0.1805
	2	3.0590	3.4225	33.4427						
	3	3.0410	3.5240	33.3448						
1	1	3.0580	9.9929	103.3300	0.1534	10.0192	1.5312	1.5266	101.7828	1.4998
	2	3.0590	9.8426	100.6680						
	3	3.0590	10.2034	101.3660						
	4	3.0580	10.1473	103.4350						
	5	3.0430	9.9100	100.1150						
2	1	3.0390	17.0470	162.7650	0.4994	16.9161	2.9521	2.8526	162.4210	1.7563
	2	3.0420	17.3370	165.0860						
	3	3.0420	16.3643	159.4120						
4	1	3.0400	35.7209	341.3850	0.1483	35.7955	0.4142	2.9635	343.1670	0.8636
	2	3.0550	35.6994	341.5280						
	3	3.0430	35.9663	346.5880						
5	1	3.0590	39.5869	393.7370	0.0575	39.6431	0.1450	2.1297	395.7853	0.5381
	2	3.0580	39.6405	397.9880						
	3	3.0590	39.7018	395.6310						
						CV global promedio (%)	1.25		CV global promedio (%)	1.04

También para el B(a)A se observa que la variación en la respuesta del equipo con respecto a la concentración entre varias inyecciones seguidas en un mismo día es menor al 2.9 %, lo cual evidencia que no se tiene una variación significativa al hacer repeticiones de una inyección de muestra.

3.2.1.1.2 Repetibilidad inter-día

La repetibilidad en diferentes días se comparó con respecto a la concentración de 1 µg/mL inyectado en diferentes días. En la **Tabla 3.3** se presentan los datos correspondientes al estudio de la repetibilidad para el B(a)A. Las variaciones en las mediciones de área y altura son representadas por el coeficiente de variación CV.

Tabla 3.3 Variación entre inyección en días diferentes a concentración de 1 µg/mL de B(a)A

Día	Corrida	tr (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Área (mAU)			Altura (mAU)		
					S (mAU)	\bar{x} (mAU)	CV (%)	S (mAU)	\bar{x} (mAU)	CV (%)
1	1	2.906	6.8441	71.6428	0.0977	6.8104	1.4342	1.0621	72.4229	1.4666
	2	2.905	6.7816	73.1207						
	3	2.907	6.8038	70.9559						
	4	2.956	6.9456	73.0179						
	5	2.907	6.6767	73.3773						
2	1	2.89	6.7643	71.2603	0.1564	6.7900	2.3038	1.4723	70.4232	2.0906
	2	2.908	6.5394	67.802						
	3	2.902	6.8366	70.9633						
	4	2.907	6.851	70.9155						
	5	2.891	6.9589	71.1747						
3	1	2.941	7.1426	67.6481	0.2604	6.7065	3.8832	0.7605	68.2019	1.1150
	2	2.943	6.641	69.409						
	3	2.943	6.4575	67.5595						
	4	2.941	6.7066	67.935						
	5	2.943	6.5848	68.4579						
4	1	2.994	7.0036	69.3844	0.2637	6.9463	3.7958	1.0583	68.9743	1.5344
	2	2.992	7.0145	68.5142						
	3	3.01	7.0788	69.1779						
	4	2.992	6.4861	67.4751						
	5	2.976	7.1483	70.3201						
				Promedio total	0.1945	6.8133	2.8542	1.0883	70.0056	1.5516

También se observa que la variación en la respuesta del equipo con respecto a la concentración de 1 µg/mL entre 4 inyecciones en días diferentes es menor al 3.9 %, lo cual evidencia que se puede trabajar en días distintos una muestra y la variación debido a esto no será significativa.

3.2.1.2 Linealidad del sistema

3.2.1.2.1 Curva de calibración*

A continuación en las **Figuras 3.3** y **3.4** se presentan los datos de linealidad obtenidos de la áreas y las alturas para B(a)A, respectivamente.

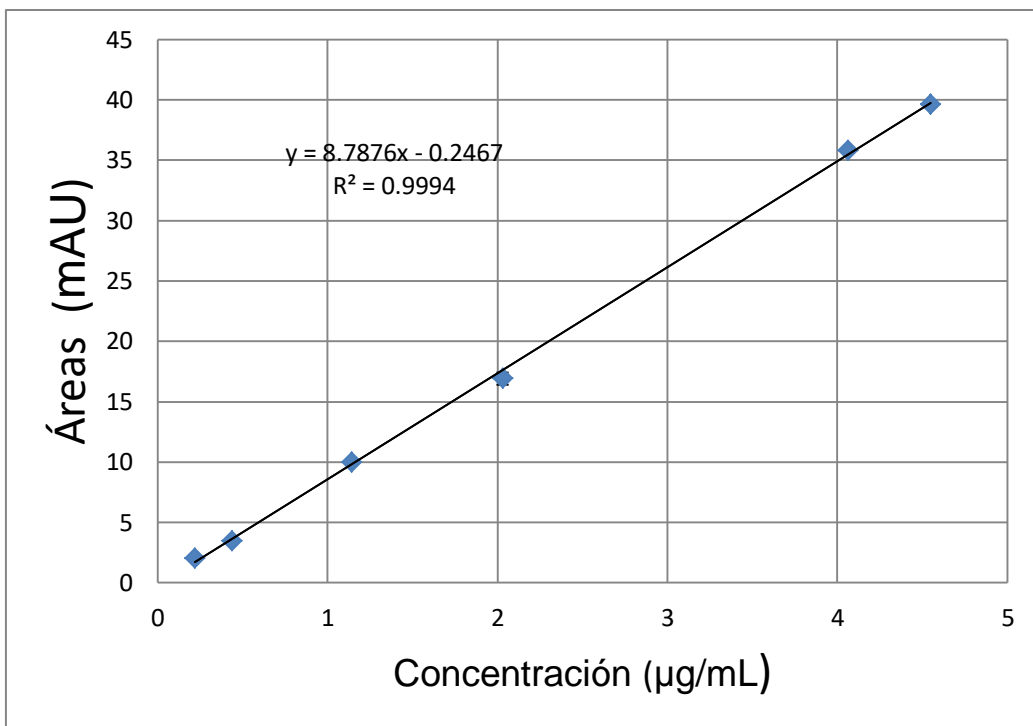


Figura 3.3 Gráfico de curva de calibración de respuesta de equipo en área para B(a)A

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.99$ lo que comprueba que el sistema presenta buena linealidad.

* Estas curvas tienen un ajuste. Consultar **Anexo 1** para descripción de este ajuste.

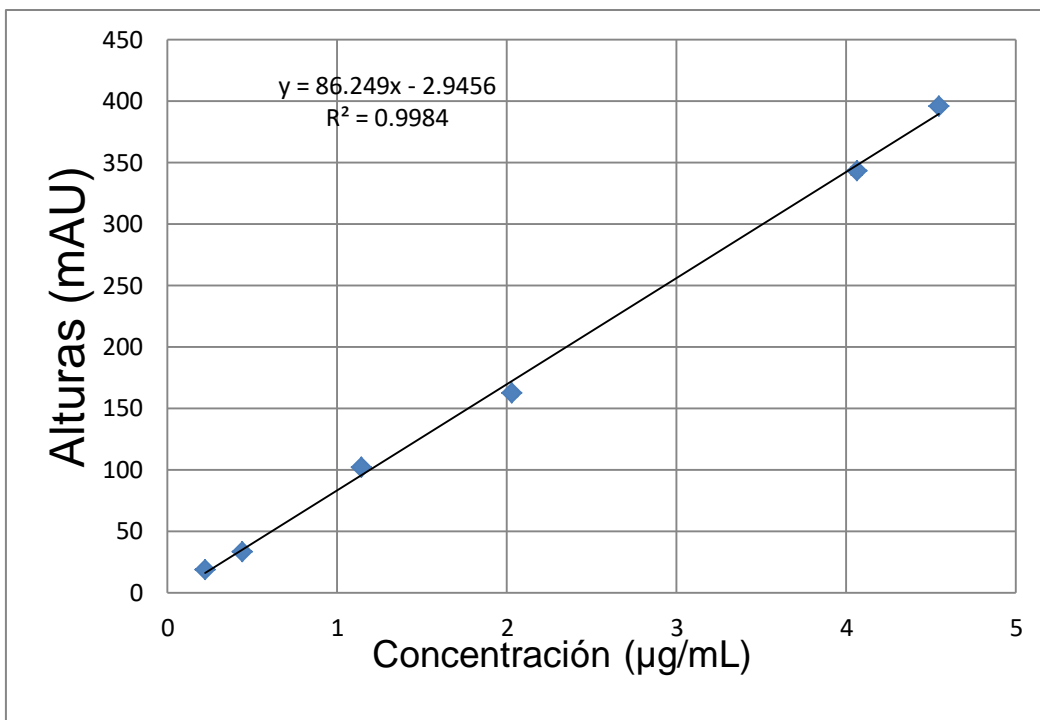


Figura 3.4 Gráfico de curva de calibración de respuesta de equipo para altura para B(a)A

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.99$ lo que comprueba que el sistema presenta buena linealidad.

3.2.2 B(a)P

3.2.2.1 Precisión del sistema

3.2.2.1.1 Repetibilidad intra-día

En la **Tabla 3.4** se presentan los datos correspondientes al estudio de la repetibilidad en un mismo día para el B(a)P. Las variaciones en las mediciones de área y altura son representadas por el coeficiente de variación CV.

Tabla 3.4 Variación entre los tiempos de retención, las áreas y las alturas del pico cromatográfico en un mismo día a diferentes concentraciones de B(a)P

Concentración (µg/mL)	Corrida	tr (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Área (mAU)			Altura (mAU)		
					S (mAU)	\bar{x} (mAU)	CV (%)	S (mAU)	\bar{x} (mAU)	CV (%)
0.25	1	4.012	1.4599	11.664	0.0491	1.4298	3.4372	0.0796	11.5973	0.6868
	2	4.01	1.4564	11.619						
	3	4.012	1.373	11.509						
0.5	1	3.809	2.9998	24.512	0.0481	2.9659	1.6215	0.2654	24.8132	1.0695
	2	3.812	2.987	25.013						
	3	3.81	2.9108	24.915						
1	1	3.794	6.2006	53.574	0.0653	6.1630	1.0598	0.7345	53.2970	1.3781
	2	3.795	6.1272	52.777						
	3	3.811	6.1725	53.176						
	4	3.794	6.2415	54.409						
	5	3.812	6.073	52.549						
2	1	3.79	13.663	115.39	0.4014	13.5268	2.9677	3.0299	112.6417	2.6899
	2	3.794	13.842	113.14						
	3	3.777	13.075	109.39						
4	1	3.792	24.416	204.22	0.0565	24.3776	0.2317	0.8967	204.4350	0.4386
	2	3.79	24.313	203.66						
	3	3.795	24.405	205.42						
5	1	3.811	27.955	241.41	0.1513	27.8167	0.5439	2.7014	241.5577	1.1183
	2	3.811	27.84	238.93						
	3	3.811	27.655	244.33						
				Promedio total	0.1286	12.7133	1.6436	1.2846	108.0569	1.2302

En esta tabla se observa que la variación en la respuesta del equipo (tanto por área como por altura) con respecto a la concentración entre varias inyecciones seguidas en un mismo día es menor al 3.4 %, lo cual evidencia que no se tiene una variación significativa al hacer repeticiones de una inyección de muestra.

3.2.2.1.2 Repetibilidad inter-día

La repetibilidad en diferentes días se comparó con respecto a la concentración de 1 µg/mL a diferentes días. En la **Tabla 3.5** se presentan los datos correspondientes al estudio de la repetibilidad para el B(a)P. Las variaciones en las mediciones de área y altura son representadas por el coeficiente de variación CV.

Tabla 3.5 Variación entre inyección en días diferentes a concentración de 1 µg/mL de B(a)P

Día	Corrida	tr (min)	Área (mAU)	Altura (mAU)	Área (mAU)			Altura (mAU)		
					S (mAU)	\bar{x} (mAU)	CV (%)	S (mAU)	\bar{x} (mAU)	CV (%)
1	1	3.607	5.98815	54.8112	0.0620	5.9887	1.0354	0.4803	55.0875	0.8719
	2	3.606	5.9723	55.3283						
	3	3.609	5.92445	54.4674						
	4	3.691	6.0913	55.1077						
	5	3.625	5.96737	55.7228						
2	1	3.609	5.95403	54.3555	0.1342	5.9548	2.2540	1.3708	53.8689	2.5447
	2	3.61	5.7292	51.6024						
	3	3.602	6.01409	54.148						
	4	3.609	5.99568	53.9344						
	5	3.61	6.08122	55.3043						
3	1	3.894	6.27477	52.3819	0.2349	5.8926	3.9866	1.0853	51.8556	2.0930
	2	3.645	5.84521	52.8531						
	3	3.663	5.63574	50.1715						
	4	3.66	5.8948	52.4793						
	5	3.662	5.81228	51.3923						
4	1	3.746	6.15213	52.725	0.2188	6.0496	3.6170	0.8828	52.5432	1.6802
	2	3.744	6.14139	52.725						
	3	3.762	6.05035	52.5136						
	4	3.744	5.67491	51.1525						
	5	3.728	6.22899	53.5999						
				Promedio total	0.1625	5.9714	2.7232	0.9548	53.3388	1.7974

Se nota que la variación en la respuesta del equipo con respecto a la concentración de 1 µg/mL entre 4 inyecciones en días diferentes es menor al 4 %, lo cual evidencia que se puede trabajar en días distintos una muestra y la variación debido a esto no será significativa.

3.2.2.2 Linealidad del sistema

3.2.2.2.1 Curva de calibración*

A continuación, en las **Figuras 3.5** y **3.6** se presentan los datos obtenidos de la áreas y las alturas para B(a)P, respectivamente.

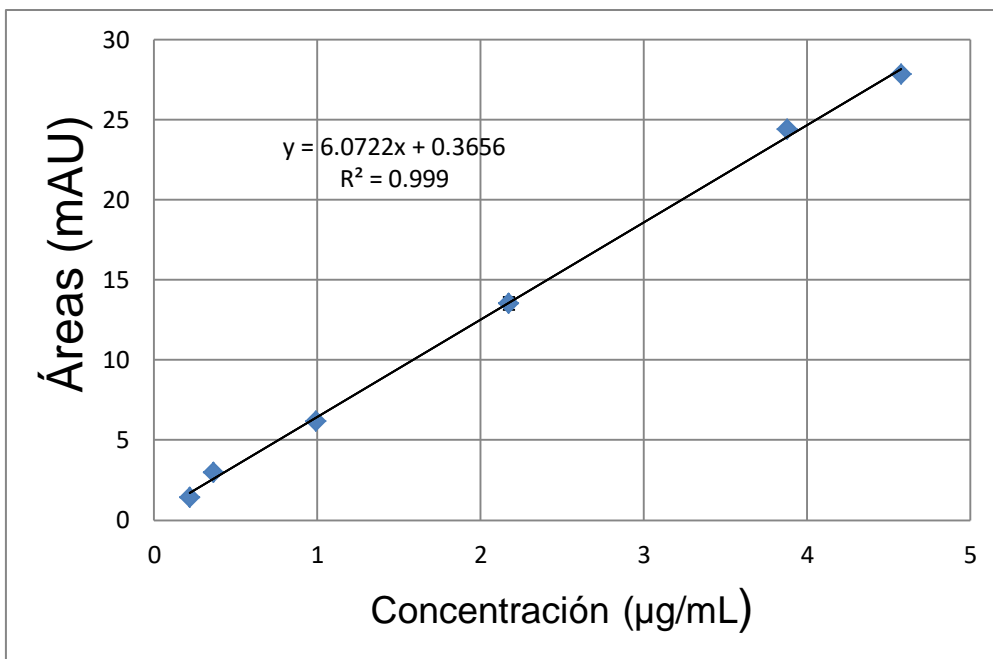


Figura 3.5 Gráfico de curva de calibración de respuesta de equipo para área para B(a)P

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.99$ lo que comprueba que el sistema presenta buena linealidad.

* Estas curvas tienen un ajuste. Consultar **Anexo 1** para descripción de este ajuste.

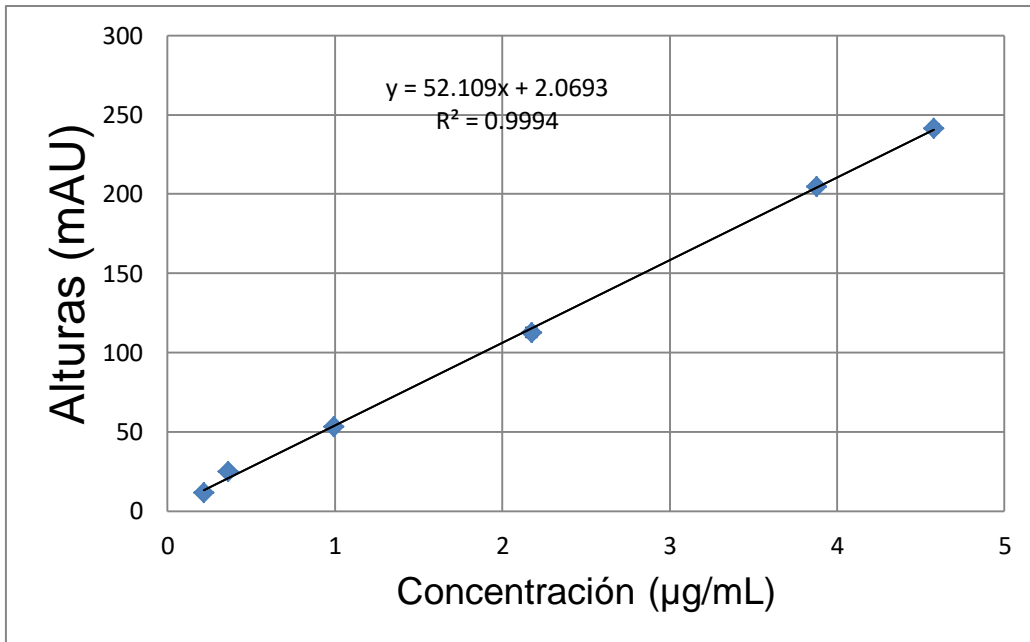


Figura 3.6 Gráfico de curva de calibración de respuesta de equipo para altura para B(a)P

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.99$ lo que comprueba que el sistema presenta buena linealidad.

NOTA: Para estas curvas de calibración, se tuvo que realizar un ajuste para obtener un mejor coeficiente de linealidad. Consultar el Anexo 1 para una explicación detallada del ajuste mencionado.

3.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN PARA LA TÉCNICA DE EFS Y LINEALIDAD DEL MÉTODO EFS-HPLC-UV

3.3.1 Recobro de la técnica de extracción

En la sección 2.4.1.3.1., se describe el procedimiento utilizado para la extracción de los HAP's de las muestras acuosas (Bernal-Toris, 2015). Este método fue optimizado al realizar una evaporación de los extractos para obtener mayor respuesta en el análisis cromatográfico. En la **Tabla 3.6** se presentan los valores de los recobros obtenidos y sus variaciones cuando se analizaron los extractos sin evaporar.

Tabla 3.6 Recobros y precisión sin evaporación del método EFS-HPLC-UV

Prueba	Analito	Recobro (%)		
1	B(a)P	72		
	B(a)A	75		
2	B(a)P	76		
	B(a)A	79		
3	B(a)P	68		
	B(a)A	77		
		S (%)	\bar{x} (%)	CV (%)
	B(a)P	4.03	72	5.61
	B(a)A	1.68	77	2.19

Del triplicado de la prueba se obtiene una variación menor al 5.6 %, por lo que se considera adecuado el método. Sin embargo, los recobros se observaron relativamente bajos, pero estos resultados se mejoraron al efectuarse el análisis de los extractos evaporados, los cuales se presentan en la **Tabla 3.7**

3.3.2 Precisión (repetibilidad) de la técnica de evaporación.

Tabla 3.7 Recobros y precisión de la técnica de evaporación

	Recobro (%)			S (%)	\bar{x} (%)	CV (%)
	A	B	C			
B(a)P	90	92	96	3.04	93	3.27
B(a)A	87	102	92	7.49	93	8.01

En este caso, debido a que la variación del triplicado es menor a 8 %, se considera que la evaporación es adecuada.

3.3.3 Linealidad del método EFS-HPLC-UV

3.3.3.1 B(a)A

Los diferentes valores de área obtenidos del pico cromatográfico del B(a)A a diferentes concentraciones y sus variaciones se presentan en la **Tabla 3.8** y de forma gráfica en la **Figura 3.7**

Tabla 3.8 Variación entre inyección en un mismo día a diferentes concentraciones de B(a)A para el método de EFS-HPLC-UV

Concentración en el extracto teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Área (mAU)	\bar{x} (mAU)	S (mAU)	CV (%)
0.16	1.11	1.12	0.05	4.12
	1.18			
	1.09			
0.33	1.97	1.99	0.16	8.06
	2.16			
	1.84			
0.66	4.37	4.18	0.19	4.53
	3.99			
	4.18			

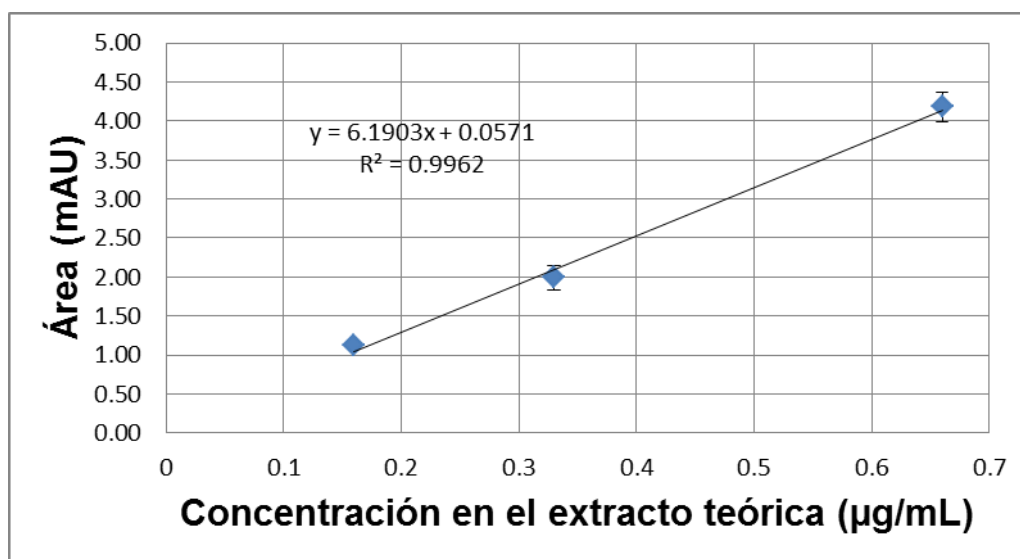


Figura 3.7 Linealidad de método de EFS-HPLC UV para B(a)A

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.99$, por lo que se concluye que el método es lineal.

Para poder obtener el recobro global del método, en la **Figura 3.8** se procede a graficar la cantidad de analito agregada de B(a)A contra la cantidad recuperada de analito de B(a)A, en μg .

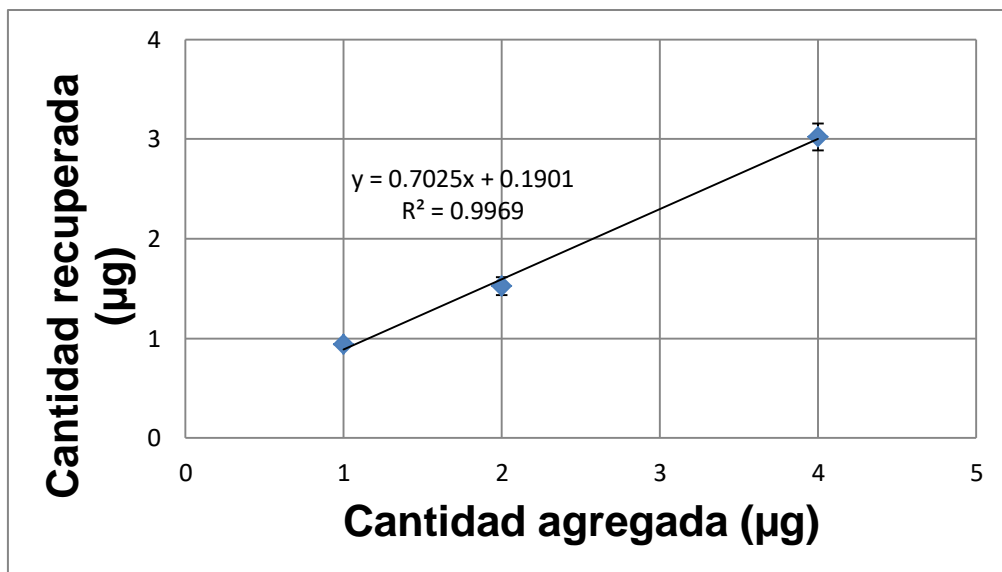


Figura 3.8 Linealidad de método de EFS-HPLC-UV de B(a)A para visualizar recobro global

De la figura se ve que la pendiente es 0.7025, y si multiplicamos este valor por 100 %, obtenemos: $0.7025 \times 100 \% = 70.25 \%$ de recobro global.

Nota: En el **Anexo 2** se muestran los cálculos para obtener **cantidad recuperada** y **cantidad agregada**.

3.3.3.2 B(a)P

Los diferentes valores de área obtenidos del pico cromatográfico del B(a)P a diferentes concentraciones y sus variaciones se presentan en la **Tabla 3.9** y de forma gráfica en la **Figura 3.9**

Tabla 3.9 Variación entre inyección en un mismo día a diferentes concentraciones de B(a)P para el método de EFS-HPLC-UV

Concentración en el extracto teórica (µg/mL)	Área (mAU)	\bar{x} (mAU)	S (mAU)	CV (%)
0.16	0.69	0.70	0.02	2.30
	0.71			
	0.72			
0.33	1.19	1.22	0.09	7.17
	1.32			
	1.15			
0.66	2.73	2.57	0.14	5.34
	2.48			
	2.51			

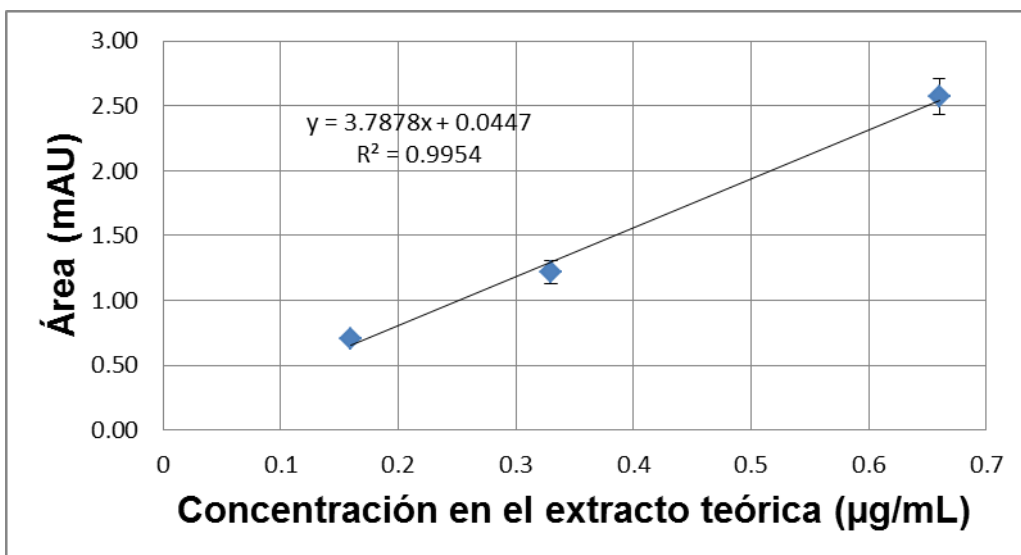


Figura 3.9 Linealidad de método de EFS-HPLC UV para B(a)P

La recta ajustada por el método de mínimos cuadrados presenta un coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.99$, por lo que se concluye que el método es lineal.

Para poder obtener el recobro global del método, en la **Figura 3.10** se procede a graficar la cantidad de analito agregada de B(a)P contra la cantidad recuperada de analito de B(a)P, en µg.

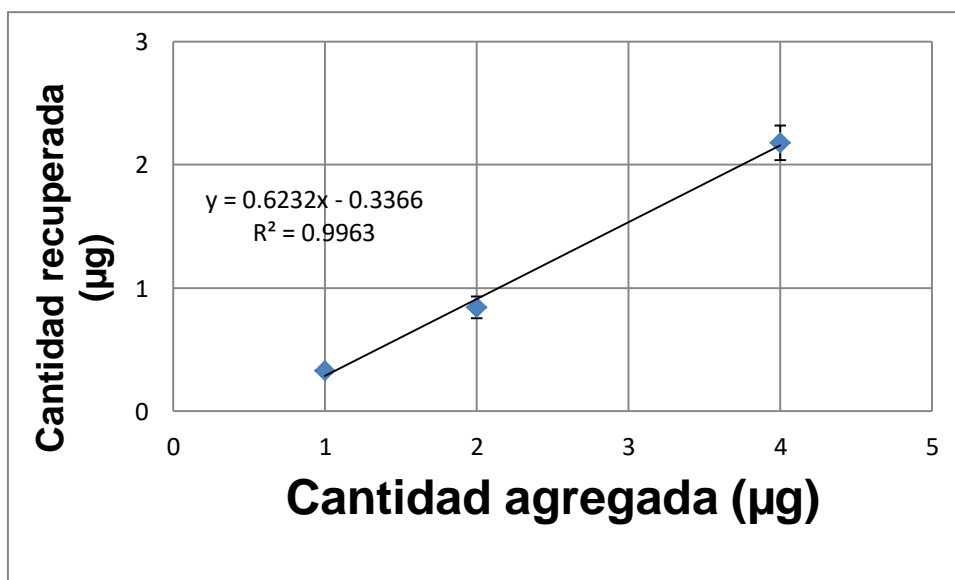


Figura 3.10 Linealidad de método de EFS-HPLC-UV de B(a)P para visualizar recobro global

De esta tabla se ve que la pendiente es 0.6232, y si multiplicamos este valor por 100 %, obtenemos: $0.6232 \cdot 100 \% = 62.32 \%$ de recobro global.

3.4 BIOENSAYOS CON MINI REACTORES

En los bioensayos se observaron las mismas tendencias en la remoción del B(a)P y el B(a)A, ya que estos compuestos tienen estructuras similares (el B(a)P solamente tiene 1 anillo aromático más que el B(a)A), y aunque la presencia de un analito no afecta la remoción del otro, este estudio es un buen indicador de que si tuviera un sistema de varios HAP's, podría efectuar de remoción para todos estos.

NOTA: En el Anexo 3 se encuentran los resultados de las pruebas estadísticas más a detalle.

3.4.1 Efecto de tipo de reactor y el tipo de agitación

3.4.1.1 Mini reactor de matraz con agitación orbital

3.4.1.1.1 B(a)A

En la **Tabla 3.11** se presenta la evaluación de este mini reactor con agitación orbital en el remanente de B(a)A a lo largo del tiempo, y la **Figura 3.11** presenta el gráfico de la evaluación de la remoción en el mini reactor de agitación orbital a lo largo del tiempo para el B(a)A. La velocidad de agitación fue de 50 rpm.

Tabla 3.11 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación orbital de B(a)A

Tipo de ensayo	Duración (horas)	Ensayo	Remanente de B(a)A (μg)	\bar{x} (μg)	S (μg)	CV (%)
Control	6	A	2.09	2.11	0.08	3.59
		B	2.05			
		C	2.20			
	15	A	2.28	1.92	0.37	19.51
		B	1.53			
		C	1.95			
Bioensayo	6	A	1.36	1.47	0.19	13.05
		B	1.36			
		C	1.69			
	15	A	0.56	0.62	0.07	11.22
		B	0.59			
		C	0.69			

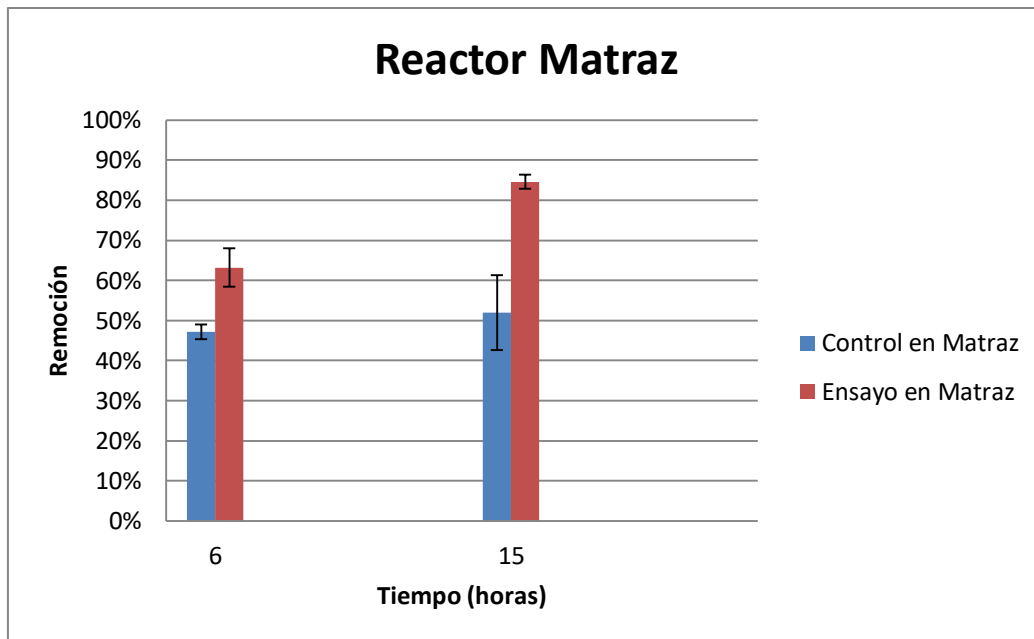


Figura 3.11 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación orbital de B(a)A (50 rpm)

De los resultados de la evaluación anterior se observa que:

- a) La remoción abiótica (sin algas o control) es demasiado lenta o es constante conforme pasa el tiempo.
- b) La remoción biótica (con algas) aumenta conforme pasa el tiempo y la remoción se diferencia de los blancos.

Estas dos observaciones fueron probadas como hipótesis en el análisis estadístico.

En el caso de los **controles** se dio como resultado que se acepta la hipótesis nula, es decir no existe diferencia significativa estadísticamente entre el porcentaje de remoción entre los controles ($t = 0.432$, $t \geq 0.05$), lo que confirma la observación a) anterior. Para el caso de los **ensayos**, el conjunto de datos para 6 horas no cumplió el supuesto de normalidad (el valor de significancia (p) para la prueba de Shapiro-Wilk del análisis estadístico es menor a 0.05), condición necesaria para realizar la prueba t , por lo tanto, desafortunadamente no se puede emplear esta prueba para ver si existe diferencia significativa entre las medias de forma estadística. Sin embargo, se puede ver en la **Figura 3.11** que el intervalo de incertidumbre del triplicado a 6 horas no se traslapa con el intervalo de incertidumbre a 15 horas, por lo que se puede concluir (aunque sin una herramienta estadística), que el tiempo si afecta en la remoción biótica

(ensayos con algas), y esto confirma la observación b) anterior. También es notorio que la remoción es mayor en los bioensayos que en los controles; de igual manera se puede observar que a mayor tiempo de exposición la remoción aumenta.

3.4.1.1.2 B(a)P

A continuación en la **Tabla 3.12** se presenta la evaluación del efecto del tipo de agitación orbital de este mini reactor en el remanente de B(a)P a lo largo de tiempo, y en la **Figura 3.12** se presenta el gráfico de la evaluación de la remoción en el mini reactor de agitación orbital a lo largo del tiempo para el B(a)P.

Tabla 3.12 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación orbital de B(a)P

Tipo de ensayo	Duración (horas)	Ensayo	Remanente de B(a)P (μg)	\bar{x} (μg)	S (μg)	CV (%)
Control	6	A	2.06	2.22	0.15	6.84
		B	2.25			
		C	2.36			
	15	A	2.11	2.00	0.20	10.26
		B	1.76			
		C	2.12			
Bioensayo	6	A	1.77	1.85	0.22	12.02
		B	1.68			
		C	2.10			
	15	A	1.04	1.03	0.03	3.25
		B	1.00			
		C	1.06			

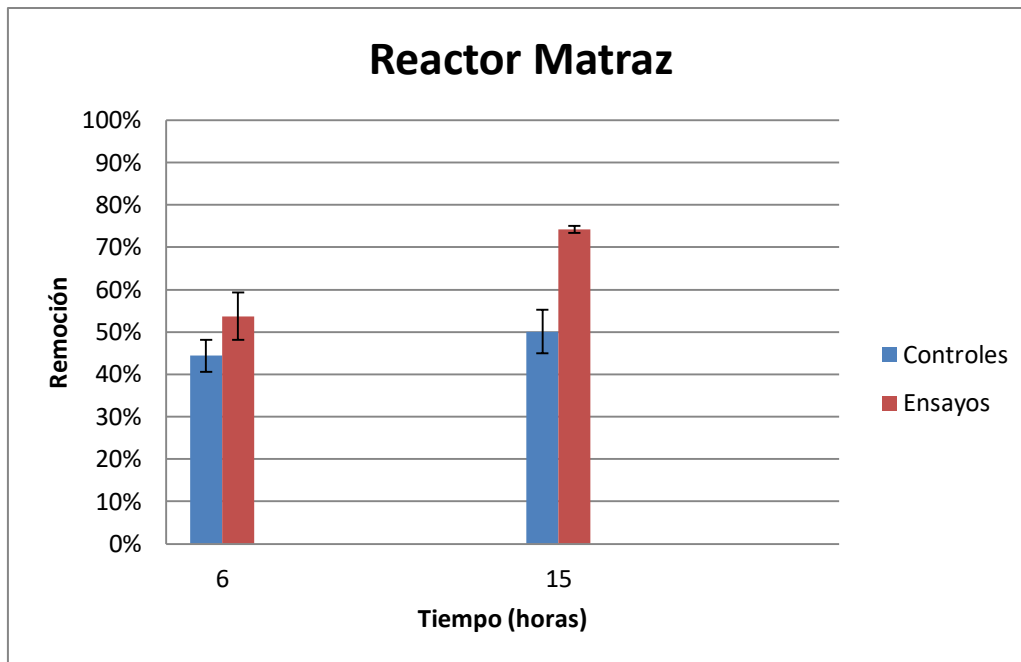


Figura 3.12 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación orbital de B(a)P (50 rpm)

De lo anterior se derivan dos observaciones:

- a) El control solo se ve afectado poco a lo largo del tiempo, es decir, la remoción abiótica entre un tiempo de 6 horas a 15 horas es prácticamente constante.
- b) En los bioensayos se comprueba lo que era esperable, a mayor tiempo mayor remoción presenta la microalga y la remoción se diferencia de los blancos.

Estas observaciones consideradas como hipótesis se analizaron estadísticamente.

En el caso de los **controles**, el conjunto de datos para 15 horas no cumplió el supuesto de normalidad (valor de significancia (p) de la prueba de Shapiro-Wilk es menor a 0.05), condición necesaria para realizar la prueba t, por lo tanto, desafortunadamente no se puede emplear esta prueba para ver si existe diferencia significativa entre las medias de forma estadística. Sin embargo, se puede ver en la **Figura 3.12** que el intervalo de incertidumbre del triplicado a 6 horas se traslapa con el intervalo de incertidumbre a 15 horas, por lo que se puede concluir (aunque sin una herramienta estadística), que el tiempo no

afecta en la remoción abiótica (ensayos sin algas), y esto confirma la observación a) anterior.

En el caso de los **ensayos**, a pesar de que tampoco se pudo realizar la prueba t para visualizar si existe diferencia significativa entre las medias en la experimentación de controles para este mini reactor debido a que no se cumple el supuesto de igualdad de varianzas, se puede ver en la **Figura 3.12** que el intervalo de incertidumbre del triplicado a 6 horas no se traslapa con el intervalo de incertidumbre a 15 horas, por lo que se puede concluir (aunque sin una herramienta estadística), que el tiempo si afecta en la remoción biótica (ensayos con algas), y esto confirma la conclusión b) anterior. También con esto se puede observar el efecto de la microalga, ya que la remoción es mayor en los ensayos que en los controles; también se puede observar que a mayor tiempo de exposición la remoción aumenta.

Comparando los valores de % de remoción biótica entre el B(a)A y el B(a)P, se observa que siempre se tienen valores mayores para el B(a)A, indicando que este compuesto, siendo más pequeño y menos hidrófobo, es más fácil de remover por la microalga.

3.4.1.2 Mini reactor de lote con agitación magnética

3.4.1.2.1 B(a)A

A continuación en la **Tabla 3.13** se presenta la evaluación del efecto del tipo de agitación magnética del mini reactor de lote con agitación magnética en el remanente de B(a)A a lo largo del tiempo, y en la **Figura 3.13** se presenta el gráfico de la evaluación de la remoción en el mini reactor de agitación magnética a lo largo del tiempo para el B(a)A.

Tabla 3.13 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación magnética de B(a)A

Tipo de ensayo	Duración (horas)	Ensayo	Remanente de B(a)A (μg)	\bar{x} (μg)	S (μg)	CV (%)
Control	4	A	2.18	2.02	0.32	15.84
		B	1.65			
		C	2.22			
	6	A	1.89	1.68	0.25	14.58
		B	1.41			
		C	1.74			
	15	A	0.90	0.81	0.16	19.75
		B	0.63			
		C	0.90			
Bioensayo	4	A	1.80	1.80	0.04	2.10
		B	1.84			
		C	1.76			
	6	A	0.78	0.82	0.07	8.14
		B	0.79			
		C	0.90			
	15	A	0.28	0.31	0.05	17.35
		B	0.29			
		C	0.38			

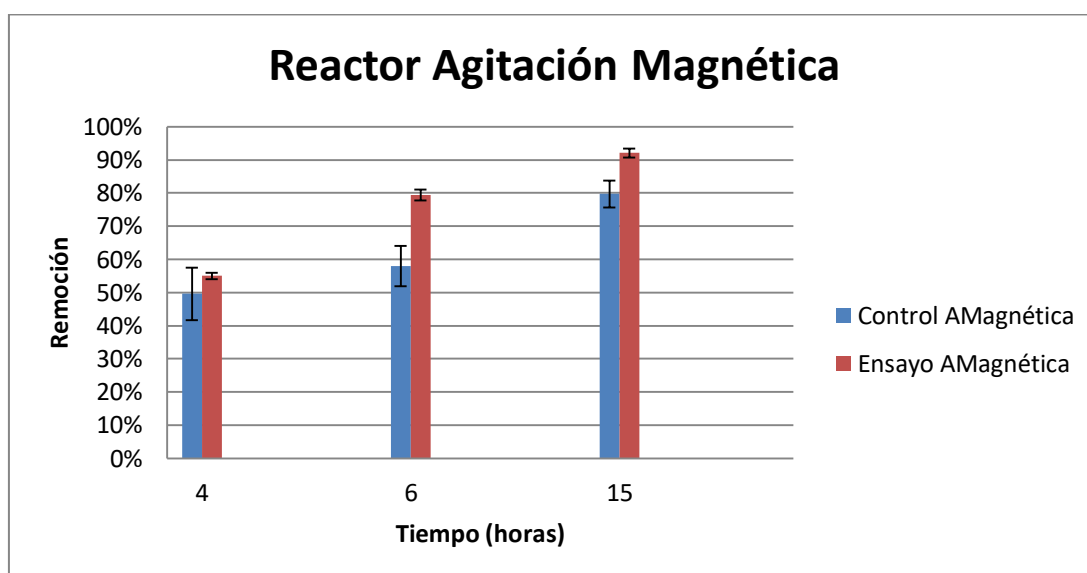


Figura 3.13 Evaluación de mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)A. (Aprox. 90 rpm)

De la evaluación anterior se observa que:

- a) La remoción abiótica (sin algas, control) aumenta conforme pasa el tiempo.

b) La remoción biótica (con algas) aumenta conforme pasa el tiempo, y es mayor que la remoción abiótica, aunque solamente después de las 6 h.

Las observaciones se consideran como hipótesis en el análisis estadístico.

En el caso de **controles**, se encontró que hay diferencia significativa entre las medias de forma general ($p < 0.05$, para análisis ANOVA). Esto confirma la observación a) anterior, que estipula que efectivamente la velocidad de agitación influye en la remoción abiótica (sin algas).

A continuación, en la **Tabla 3.14** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre qué medias, es decir, entre que medias de tiempos de incubación o entre que valores medidos de los tiempos de incubación utilizados, existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.14 Análisis estadístico de controles (Prueba Post Hoc) de B(a)A

Media de Tiempo (horas)	Media de Tiempo (horas)	¿Existe diferencia estadística significativa?
4.00	6.00	
	15.00	Si
6.00	4.00	
	15.00	Si
15.00	4.00	Si
	6.00	Si

Se puede observar, que existe diferencia significativa entre los tiempos de 4 y 15 horas, pero no entre 4 y 6 horas, por lo que se puede ver que para que se asegure un efecto de remoción abiótico real es necesario que transcurra un tiempo mayor a 6 horas. Estos resultados estadísticos también confirman la observación a) anterior.

En el caso de los **bioensayos**, se encontró que si hay diferencia significativa entre las medias de forma general de los 3 tiempos de exposición ($p < 0.05$) para prueba ANOVA). Esto confirma la conclusión b) anterior, que estipula que efectivamente la velocidad de agitación influye en la remoción biótica (con algas).

A continuación en la **Tabla 3.15** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre qué medias de los tiempos de exposición existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.15 Análisis estadístico de controles (Prueba Post Hoc) de B(a)A

Media de Tiempo (horas)	Media de Tiempo (horas)	¿Existe diferencia estadística significativa?
4.00	6.00	Si
	15.00	Si
6.00	4.00	Si
	15.00	Si
15.00	4.00	Si
	6.00	Si

Se puede observar, que sí existe diferencia significativa entre todas las medias, lo que también confirma la observación b) anterior.

En la **Figura 3.13** anterior también se puede visualizar que el efecto de la remoción por la microalga, en este mini reactor de lote con agitación magnética es mayor en los ensayos que en los controles y que a mayor tiempo de exposición la remoción aumenta. Un aspecto conveniente a notar es que a las 6 horas se presenta la diferencia mayor entre el efecto de remoción en el control y el ensayo.

3.4.1.2.2 B(a)P

A continuación en la **Tabla 3.16** se presenta la evaluación del efecto del tipo de agitación magnética de este mini reactor en el remanente de B(a)P a lo largo de tiempo, y la **Figura 3.14** se presenta el gráfico de la evaluación de la remoción en el mini reactor de agitación magnética a lo largo del tiempo para el B(a)P.

Tabla 3.16 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación magnética de B(a)P

Tipo de ensayo	Duración (horas)	Ensayo	Remanente de B(a)P (μg)	\bar{x} (μg)	S (μg)	CV (%)
Control	4	A	2.79	2.27	0.46	20.17
		B	2.06			
		C	1.95			
	6	A	2.11	1.86	0.28	14.84
		B	1.57			
		C	1.91			
	15	A	1.03	0.89	0.28	31.27
		B	0.57			
		C	1.06			
Bioensayo	4	A	2.04	2.09	0.09	4.53
		B	2.03			
		C	2.20			
	6	A	1.18	1.12	0.14	12.25
		B	0.96			
		C	1.22			
	15	A	0.40	0.52	0.11	20.50
		B	0.55			
		C	0.61			

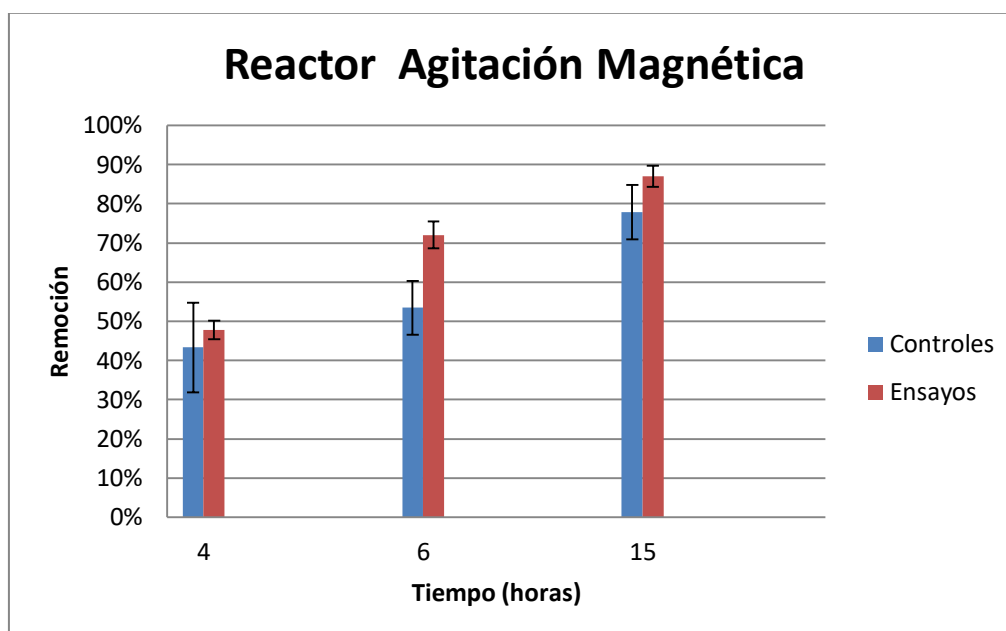


Figura 3.14 Evaluación de mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)P. (Aprox. 90 rpm)

De la evaluación anterior se obtienen dos observaciones:

- a) La remoción abiótica (sin algas o control) aumenta conforme pasa el tiempo.
- b) La remoción biótica (con algas) aumenta conforme pasa el tiempo, y es mayor que la remoción abiótica

Las observaciones anteriores se consideraron como hipótesis estadísticas.

En el caso de los **controles**, se encontró que hay diferencia significativa entre las medias de forma general ($p < 0.05$, para análisis ANOVA). Esto sustenta la observación a) anterior, que estipula que efectivamente la velocidad de agitación influye en la remoción abiótica (sin algas). Además, en el siguiente análisis Post Hoc resumido, en la **Tabla 3.17**, se observa entre qué conjuntos de datos se presentan diferencias significativas.

Tabla 3.17 Análisis estadístico de controles (Prueba Post Hoc) de B(a)P

Media de Tiempo (horas)	Media de Tiempo (horas)	¿Existe diferencia estadística significativa?
4.00	6.00	
	15.00	Si
6.00	4.00	
	15.00	Si
15.00	4.00	Si
	6.00	Si

Y efectivamente, con la excepción del tiempo 4 al 6, entre todos los tiempos hay diferencia significativa estadísticamente entre medias, confirmando la observación a) anterior.

En el caso de **bioensayos**, se encontró que si hay diferencia significativa entre las medias de forma general de los 3 tiempos de exposición ($p < 0.05$) para prueba ANOVA). Esto confirma la observación b) anterior, que estipula que efectivamente la velocidad de agitación influye en la remoción biótica (con algas).

A continuación en la **Tabla 3.18** se presenta el análisis estadístico resumido (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.18 Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)P

Media de Tiempo (horas)	Media de Tiempo (horas)	¿Existe diferencia estadística significativa?
4.00	6.00	Si
	15.00	Si
6.00	4.00	Si
	15.00	Si
15.00	4.00	Si
	6.00	Si

Los resultados estadísticos anteriores confirman que, hay una diferencia significativa estadísticamente entre las medias de todas las poblaciones, confirmando la observación b) anterior.

En la **Figura 3.14** anterior se puede visualizar mejor que el efecto de la remoción por la microalga, en este mini reactor de lote con agitación magnética es mayor en los bioensayos que en los controles; también se puede observar que a mayor tiempo de exposición la remoción aumenta. Un aspecto conveniente a notar es que a las 6 horas se presenta la diferencia mayor entre el efecto de remoción en el control y el ensayo.

Comparativamente se encontró mayor remoción para B(a)A que para B(a)P, al igual que con el reactor anterior.

3.4.1.3 Mini reactor de lote con agitación por recirculación

3.4.1.3.1 B(a)A

A continuación en la **Tabla 3.19** se presenta la evaluación del efecto del tipo de agitación por recirculación del mini reactor de lote con agitación por recirculación en el remanente de B(a)A a lo largo de tiempo, y la **Figura 3.15** se presenta el gráfico de la evaluación de la remoción en el mini reactor de agitación por recirculación a lo largo del tiempo para el B(a)A.

Tabla 3.19 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación por recirculación de B(a)A

Tipo de ensayo	Duración (horas)	Ensayo	Remanente de B(a)A (μg)	\bar{x} (μg)	S (μg)	CV (%)
Control	4	A	0.28	0.42	0.14	33.26
		B	0.56			
		C	0.41			
	6	A	ND	0.05	0.02	38.57
		B	0.07			
		C	0.04			
	15	A	0.06	0.09	0.05	59.49
		B	0.15			
		C	0.05			
Bioensayo	4	A	0.31	0.32	0.02	6.96
		B	0.30			
		C	0.34			
	6	A	0.27	0.27	0.07	24.20
		B	0.20			
		C	0.33			
	15	A	0.08	0.07	0.02	32.00
		B	0.04			
		C	0.09			

ND: Valor no detectado. Este fue un valor omitido para cálculos de promedio, desviación estándar, y CV ya que un valor cercano a cero tiene mucha posibilidad de encontrarse erróneo.

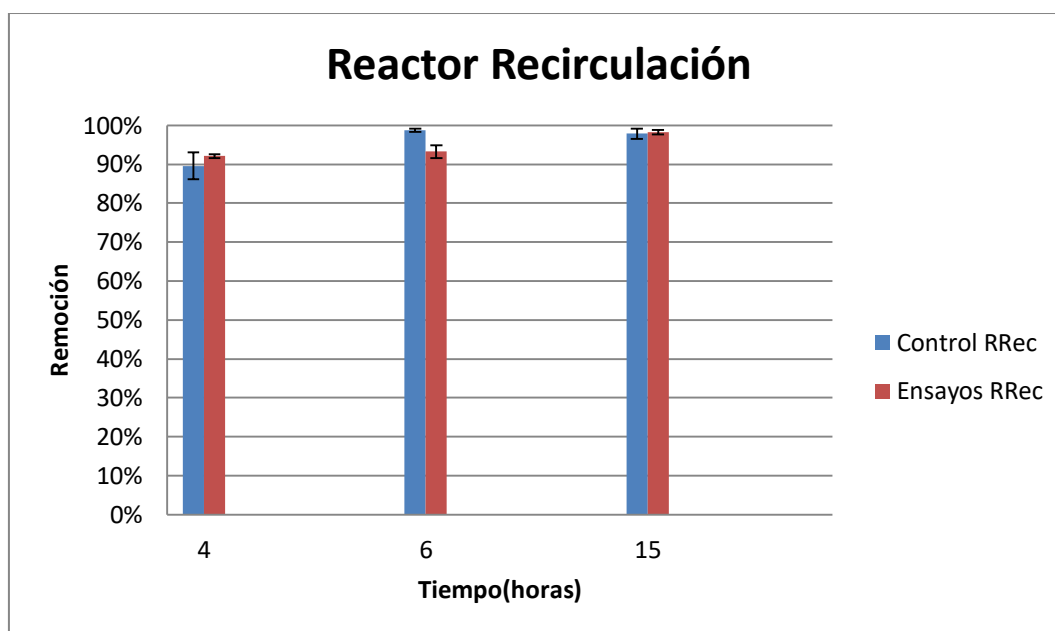


Figura 3.15 Evaluación de mini reactor de lote con agitación por recirculación de B(a)A. (A flujo de 1 mL/min).

3.4.1.3.2 B(a)P

A continuación en la **Tabla 3.20** se presenta la evaluación del efecto del tipo de agitación por recirculación de este mini reactor en el remanente de B(a)P a lo largo de tiempo, y la **Figura 3.16** presenta el gráfico de la evaluación de la remoción en el mini reactor de agitación por recirculación a lo largo del tiempo para el B(a)P.

Tabla 3.20 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación por recirculación de B(a)P

Tipo de ensayo	Duración (horas)	Ensayo	Remanente de B(a)A (μg)	\bar{x} (μg)	S (μg)	CV (%)
Control	4	A	0.35	0.57	0.28	49.06
		B	0.89			
		C	0.47			
	6	A	ND	0.07	0.02	28.28
		B	0.09			
		C	0.06			
	15	A	0.08	0.10	0.04	36.30
		B	0.15			
		C	0.08			
Bioensayo	4	A	0.58	0.52	0.10	19.13
		B	0.58			
		C	0.40			
	6	A	0.38	0.36	0.06	16.40
		B	0.29			
		C	0.40			
	15	A	0.11	0.09	0.02	25.24
		B	0.07			
		C	0.09			

ND: Valor no detectado. Este fue un valor omitido para cálculos de promedio, desviación estándar y CV, ya que un valor cercano a cero tiene mucha posibilidad de encontrarse erróneo.

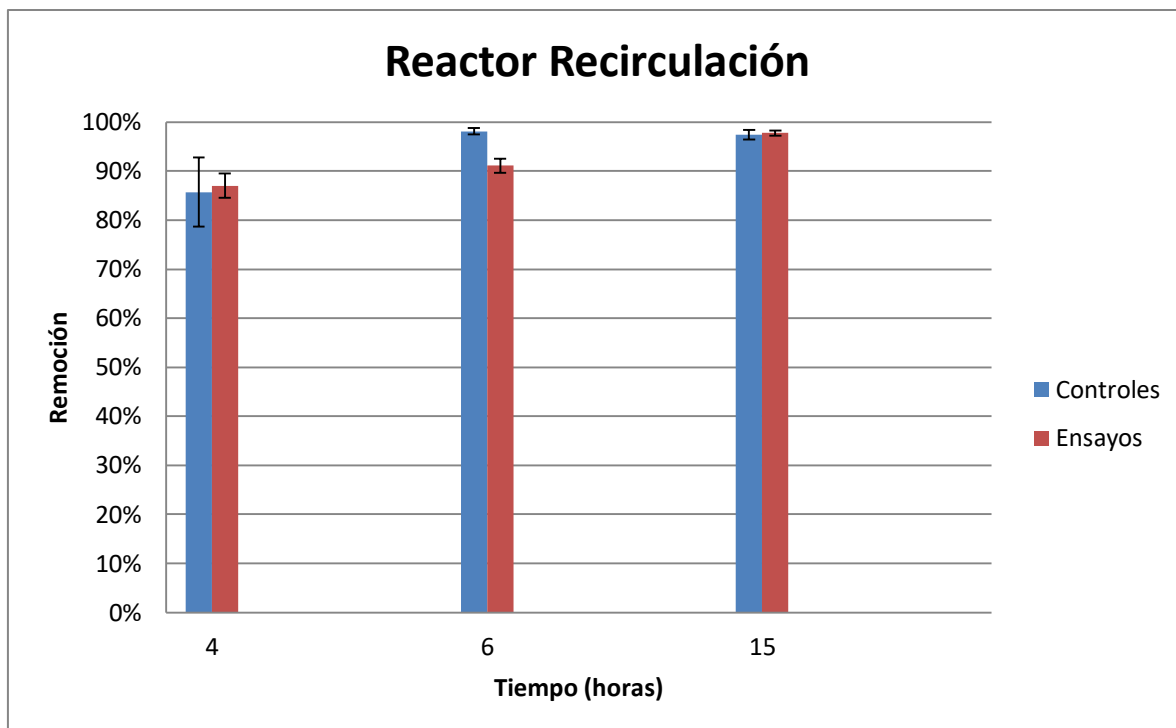


Figura 3.16 Evaluación de mini reactor de lote con agitación por recirculación de B(a)P. (A 1 mL/min)

Los resultados que se observan tanto para B(a)A como para B(a)P son proporcionales entre la remoción y el tiempo. Sin embargo, las concentraciones remanentes fueron muy bajas (es decir, una remoción alta), cercanas a los límites de cuantificación y con mucha variabilidad, lo que no permite ver claramente esta relación de proporcionalidad como en los dos anteriores reactores, es decir, aun cuando se puede observar que para los bioensayos a mayor tiempo se tiene mayor remoción, no se observa lo mismo con los controles, ya que de 4 a 6 horas aumenta y 6 a 15 horas se presenta una disminución. Estos resultados se justifican con los siguientes puntos:

- 1) El hecho de que desde las 4 horas se presentaron remociones altas, muy cercanas los 4 µg totales del ensayo (100 % de remoción), se debe a que se obtuvo una señal muy pequeña del remanente de HAP lo que se acercó al límite de detección, por lo cual, a esas cantidades tan pequeñas de concentración de HAP's medidas, la precisión disminuyó bastante, y se tuvo mayor error.
- 2) Este diseño de reactor cuenta con una manguera de silicón, a la cual, los HAP's se adsorben en gran medida, razón por la cual este dispositivo presenta

remociones tan altas, siendo muy significativo el efecto de la remoción abiótica (por la adherencia a la manguera de los analitos), que impidió una correcta evaluación del efecto de la remoción biótica (por parte de la microalga).

Por lo anterior, no se considera de utilidad realizar pruebas estadísticas a estos resultados, pero sí se evidencia la necesidad de manejar materiales inertes en las mangueras.

3.4.1.4 Evaluación y selección de reactor

1) Por las razones anteriormente expuestas, el reactor de recirculación resultó demasiado inconveniente debido a que los HAP's se adsorben en la manguera, por lo cual, a volúmenes tan pequeños como los que se manejaron para este experimento, este efecto de adsorción resultó muy significativo. Tal vez en un volumen mucho mayor, este reactor pudiera ser estudiado de mejor manera, para que este efecto de adsorción afecte la remoción del sistema. También el efecto de sorción a las mangueras sería menor si se utilizaran materiales más inertes.

2) Por lo tanto, se seleccionó el mini reactor de agitación magnética justificando con las siguientes razones:

- El mini reactor de agitación magnética tiene una tendencia a la remoción por parte de la microalga superior al de agitación orbital a las 15 horas. La **Tabla 3.21** expone estos resultados de manera numérica.

Tabla 3.21 Comparación de remoción en el tiempo mayor entre los dos primeros mini reactores para ambos HAP's.

	µg removidos a 15 horas (µg)		Remoción a 15 horas (%)	
	Mini reactor de agitación orbital	Mini reactor con agitación magnética	Mini reactor de agitación orbital	Mini reactor con agitación magnética
B(a)A	3.38	3.69	85	92
B(a)P	2.97	3.61	74	90

- Es más conveniente utilizar este reactor para el análisis posterior, donde se disminuye y aumenta la velocidad de agitación, debido a que la mosca dentro del reactor solamente girará más rápido, mientras que en el reactor en agitación orbital, no se puede incrementar demasiado la velocidad ya que incrementará la brusquedad y esto pudiera dañar y/o romper el matraz.
- En la **Figura 3.17**, y la **Tabla 3.22** se muestra un estudio comparativo de remoción contra tiempo para este mini reactor con agitación magnética para B(a)A y B(a)P.

Tabla 3.22 Estudio comparativo de remoción contra tiempo de mini reactor de agitación magnética para B(a)A y B(a)P

Tipo de ensayo	Duración	Ensayo	B(a)P					B(a)A				
			Remanente (%)	Remoción (%)	\bar{x} (%)	S (%)	CV (%)	Remanente (%)	Remoción (%)	\bar{x} (%)	S (%)	CV (%)
Control	4	A	69.79%	30.21%	0.43	0.11	26.39	54.55%	45.45%	0.50	0.08	16.10
		B	51.46%	48.54%				41.21%	58.79%			
		C	48.79%	51.21%				55.48%	44.52%			
	6	A	52.86%	47.14%	0.53	0.07	12.93	47.29%	52.71%	0.58	0.06	10.56
		B	39.17%	60.83%				35.30%	64.70%			
		C	47.66%	52.34%				43.47%	56.53%			
	15	A	25.84%	74.16%	0.78	0.07	8.89	22.55%	77.45%	0.80	0.04	5.02
		B	14.15%	85.85%				15.65%	84.35%			
		C	26.42%	73.58%				22.62%	77.38%			
Bioensayo	4	A	51.05%	48.95%	0.48	0.02	4.95	44.93%	55.07%	0.55	0.01	1.72
		B	50.72%	49.29%				45.96%	54.04%			
		C	54.97%	45.03%				44.07%	55.93%			
	6	A	29.47%	70.53%	0.72	0.03	4.77	19.47%	80.53%	0.79	0.02	2.10
		B	24.09%	75.91%				19.69%	80.31%			
		C	30.47%	69.53%				22.47%	77.53%			
	15	A	10.08%	89.92%	0.87	0.03	3.06	7.04%	92.96%	0.92	0.01	1.48
		B	13.63%	86.37%				7.13%	92.87%			
		C	15.30%	84.70%				9.45%	90.55%			
				Promedio General	0.64	0.06	10.17			0.69	0.04	6.17

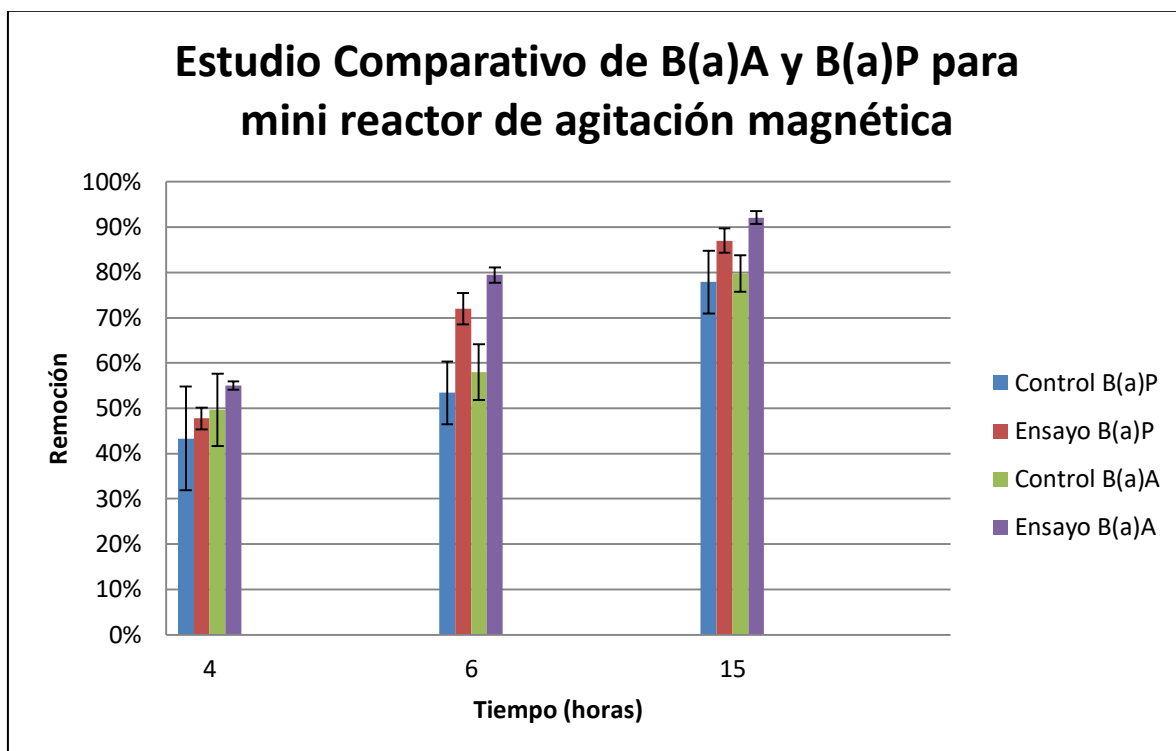


Figura 3.17 Estudio comparativo de remoción contra tiempo de mini reactor de agitación magnética para B(a)A y B(a)P

En esta gráfica se muestra el aumento de la remoción para ambos HAP's y se rescata lo siguiente:

- Tanto para los experimentos de controles como de ensayos, al aumentar el tiempo la remoción aumenta.
- La remoción tiene el mismo comportamiento descrito en el punto anterior para ambos HAP's.
- A las 6 horas es donde se observa la mejor diferencia entre las experimentaciones de control y de ensayo para ambos HAP's.
- En todos los ensayos siempre se mostró una mayor tendencia a remover mayor cantidad de B(a)A que de B(a)P, y esto es totalmente lógico, ya que el B(a)A tiene menor tamaño molecular, y por lo tanto le es más fácil a la microalga dentro de la esfera del alginato (y también a la esfera de alginato sin microalgas en el ensayo de control) degradarlo. Sin embargo, en los tiempos largos (15 h) la remoción para ambos compuestos es muy parecida.

3.4.2 Efecto de velocidad de agitación (mini reactor con agitación magnética)

Con el mini reactor de agitación magnética se estudió el efecto de la velocidad de agitación en la remoción en los dos HAP's en estudio.

3.4.2.1 B(a)A

A continuación en la **Tabla 3.23** se presenta la evaluación del efecto de la velocidad de la agitación magnética de este mini reactor en el remanente de B(a)A a lo largo de tiempo, y la **Figura 3.18** presenta el gráfico de la evaluación del efecto de la velocidad de agitación en la remoción. El tiempo de exposición fue de 6 horas.

Tabla 3.23 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación magnética de B(a)A a 6 horas de exposición

Tipo de ensayo	Velocidad aproximada (rpm)	Ensayo	Remanente (μg)	\bar{x} (μg)	S (μg)	CV (%)
Control	0	A	1.71	1.79	0.17	9.35
		B	1.99			
		C	1.69			
	90	A	1.89	1.68	0.25	14.58
		B	1.41			
		C	1.74			
	300	A	2.21	1.98	0.23	11.51
		B	1.98			
		C	1.75			
	600	A	1.46	1.45	0.25	17.02
		B	1.19			
		C	1.69			
Bioensayo	0	A	1.50	1.34	0.19	13.97
		B	1.13			
		C	1.38			
	90	A	0.78	0.82	0.07	8.14
		B	0.79			
		C	0.90			
	300	A	0.51	0.63	0.12	19.13
		B	0.75			
		C	0.65			
	600	A	1.17	0.96	0.19	19.48
		B	0.90			
		C	0.81			

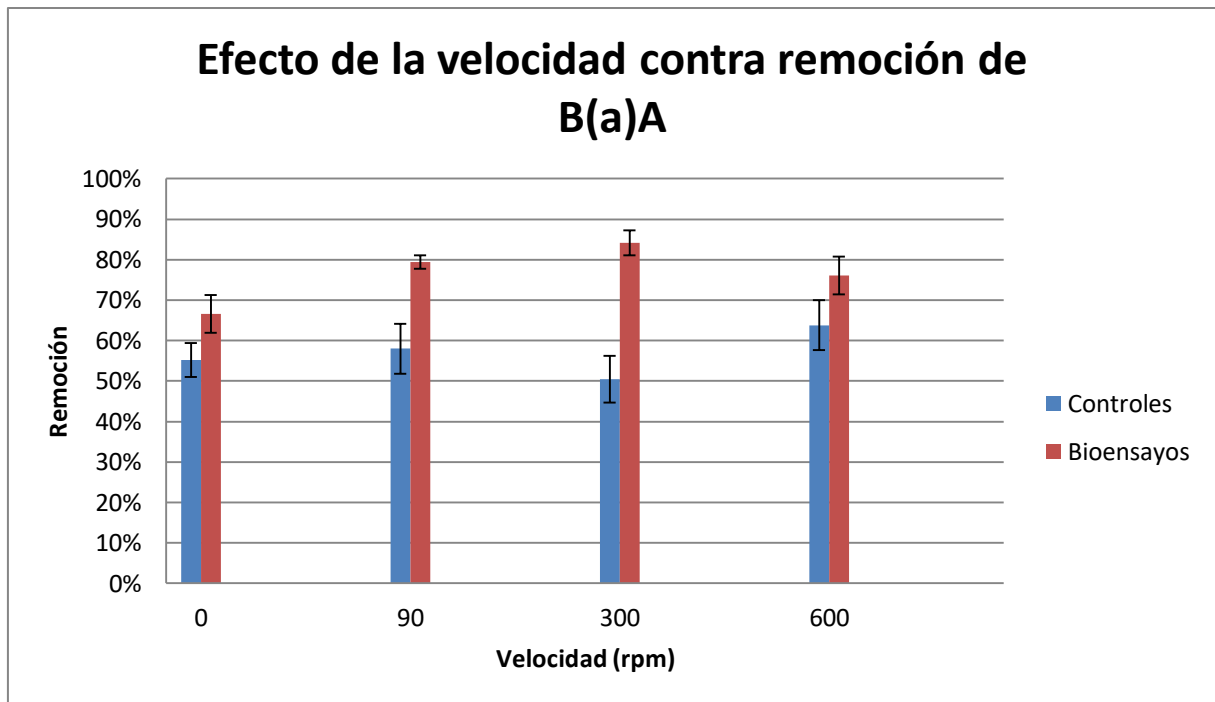


Figura 3.18 Evaluación de velocidad de agitación contra remoción en mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)A a 6 horas de exposición

De esta evaluación se obtienen tres observaciones:

- a) La remoción de los ensayos abióticos (controles sin algas) no tiene que ver con la velocidad de agitación.
- b) La remoción de los ensayos bióticos (con algas) si tiene que ver con la velocidad de agitación.
- c) A mayor velocidad de agitación aumenta la remoción, pero hay una velocidad óptima, en la cual, al sobrepasarse, comienza a disminuir la remoción.

Para el **análisis estadístico de controles**, el valor de significancia $p \geq 0.05$, por lo cual, se concluye que no hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación a) anterior, ya que no existe diferencia significativa estadísticamente entre las medias de los controles.

Para el **análisis estadístico de ensayos**, el valor de significancia $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación b) anterior, que estipula que efectivamente la velocidad de agitación influye en la remoción biótica (ensayo con algas).

A continuación, en la **Tabla 3.24** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa para las velocidades de agitación.

Tabla 3.24 Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)A

Velocidad (rpm)	Velocidad (rpm)	¿Existe diferencia estadística significativa?
0	90	Si
	300	Si
	600	
90	0	Si
	300	
	600	
300	0	Si
	90	
	600	
600	0	
	90	
	300	

Esta prueba confirma la observación c) anterior, ya que, se muestra diferencia significativa entre la media de conjuntos de datos de la velocidad cero y las demás velocidades, a excepción de la velocidad cero con la velocidad más alta (600 rpm), con lo cual, se confirma que, llega un punto que si la velocidad es muy alta, este efecto beneficioso que pudo aportar la velocidad, se pierde.

3.4.2.2 B(a)P

A continuación en la **Tabla 3.25** se presenta la evaluación del efecto de la velocidad de agitación por agitación magnética de este mini reactor en el remanente de B(a)P a lo largo de tiempo, y la **Figura 3.19** presenta el gráfico de la evaluación del efecto de la velocidad de agitación en la remoción.

Tabla 3.25 Evaluación de mini reactor de matraz con agitación magnética de B(a)P

Tipo de ensayo	Velocidad aproximada (rpm)	Ensayo	Remanente (μg)	\bar{x} (μg)	S (μg)	CV (%)
Control	0	A	1.81	1.84	0.17	9.33
		B	2.02			
		C	1.68			
	90	A	2.11	1.86	0.28	14.84
		B	1.57			
		C	1.91			
	300	A	2.50	2.20	0.30	13.79
		B	2.22			
		C	1.89			
	600	A	1.96	1.91	0.15	7.78
		B	1.75			
		C	2.03			
Bioensayo	0	A	1.61	1.53	0.09	5.73
		B	1.44			
		C	1.55			
	90	A	1.18	1.12	0.14	12.25
		B	0.96			
		C	1.22			
	300	A	0.75	0.95	0.17	18.26
		B	1.08			
		C	1.01			
	600	A	1.36	1.33	0.09	6.58
		B	1.23			
		C	1.40			

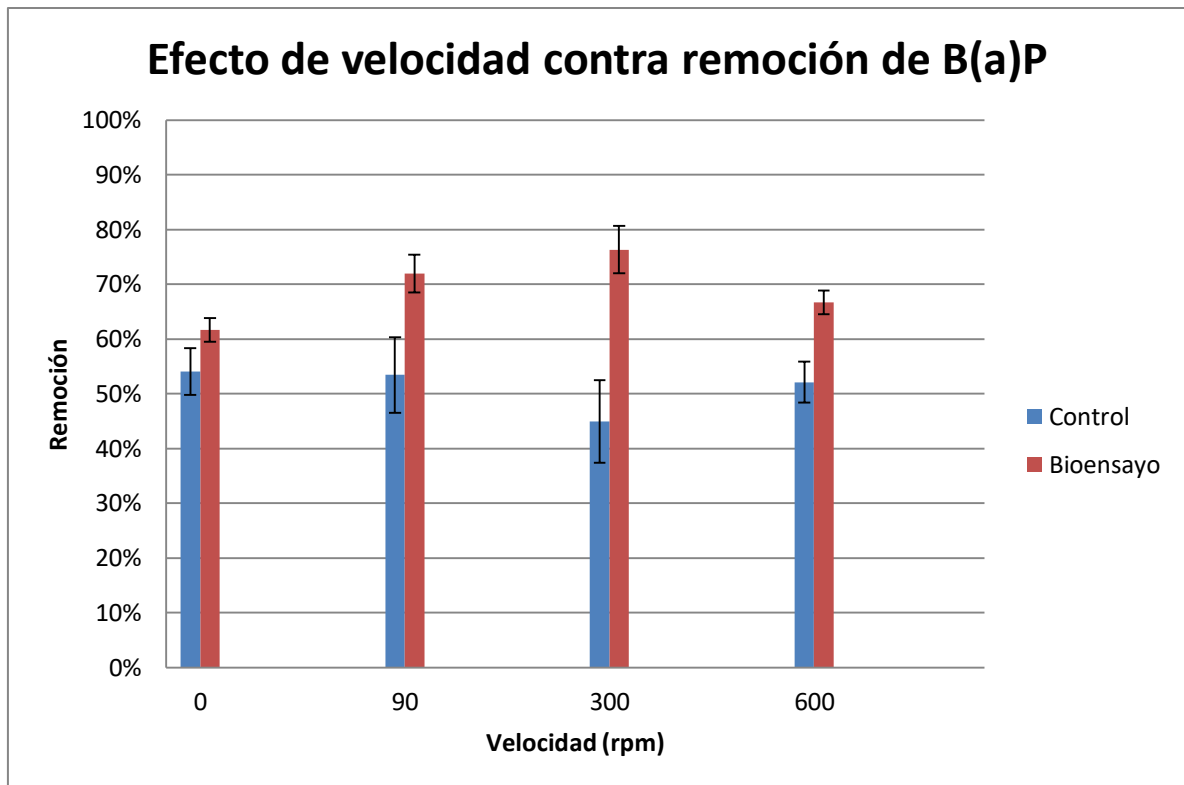


Figura 3.19 Gráfico de Evaluación de velocidad de agitación contra remoción en mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)P a 6 horas

De esta evaluación se obtienen tres observaciones:

- La remoción de los ensayos abióticos (controles sin algas) no tiene que ver con la velocidad de agitación.
- La remoción de los ensayos bióticos (con algas) tiene que ver con la velocidad de agitación.
- A pesar de que a mayor velocidad de agitación aumenta la remoción, parece ser que hay una velocidad óptima, en la cual, al sobrepasarse, comienza a disminuir la remoción.

Para el **análisis estadístico de controles**, el valor $p \geq 0.05$, por lo cual, se concluye que no hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación a) anterior, ya que no existe diferencia significativa estadísticamente entre las medias.

Para el **análisis estadístico de ensayos**, el valor $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general. Estos resultados estadísticos confirman la observación b) anterior.

A continuación en la **Tabla 3.26** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.26 Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)P

Velocidad (rpm)	Velocidad (rpm)	¿Existe diferencia estadística significativa?
0	90	Si
	300	Si
	600	
90	0	Si
	300	
	600	
300	0	Si
	90	
	600	Si
600	0	
	90	
	300	Si

Esta prueba confirma la observación c) anterior, ya que, se muestra diferencia significativa entre la media de conjuntos de datos de la velocidad cero y las demás velocidades, a excepción de la velocidad más alta (600 rpm) con la velocidad cero, con lo cual, se confirma que llega un punto que si la velocidad es muy alta, este efecto beneficioso que pudo aportar la velocidad, se pierde.

3.4.2.3 Discusión de la evaluación

Para ambos HAP's se puede observar en los bioensayos, que la agitación efectivamente mostró efecto en la remoción de HAP, ya que a medida que fue aumentando la agitación, la remoción fue mayor. Esto debido a que la agitación provoca una distribución de HAP's homogénea en todo el volumen de agua, lo que trae como consecuencia que la mayor cantidad de HAP está en contacto con la mayor cantidad de microalgas distribuidas en todo el volumen de agua. Sin este efecto de la agitación, los HAP's solamente estarían en contacto con

una parte de las microalgas y la mayor parte de los HAP's no estaría en contacto con las demás microalgas por estar sedimentadas.

Aunque también los resultados mostraron que llega un punto en que si la velocidad es demasiada, los analitos que circulan en el medio acuoso viajan tan rápido que no tienen oportunidad de interactuar de manera adecuada, y este efecto de desventaja aumenta conforme aumenta la velocidad.

En cuanto al control, se puede observar que no hay variación significativa a mayor o menor velocidad, y si la hay, se puede atribuir a variaciones experimentales.

3.4.3 Efecto de aumento de cantidad de masa y volumen

3.4.3.1 Mini reactor pequeño (50 mL)

3.4.3.1.1 Resultados y evaluaciones estadísticas

A continuación en la **Tabla 3.27** se presenta la evaluación del efecto del aumento del volumen (y de la masa, debido a que se mantuvo concentración constante) de HAP's, en el mini reactor de agitación magnética en el remanente de B(a)A y B(a)P a 6 horas de exposición, y en la **Figura 3.20** se presenta el gráfico de la evaluación de este mismo efecto a 6 horas para B(a)A y B(a)P.

Tabla 3.27 Evaluación del efecto del aumento del volumen (y de la masa, debido a que se mantuvo concentración constante) de HAP's, para el mini reactor de agitación magnética (50 mL) en el remanente de B(a)A y B(a)P a 6 horas de exposición.

Tipo de ensayo	Volumen (mL)	Masa de HAP en μg (para mantener concentración constante de $0.266 \mu\text{g/mL}$)	Ensayo	Remanente B(a)A (μg)	Remanente B(a)P (μg)	\bar{x} de Remanente de B(a)A (μg)	Remanente de B(a)A (%)	\bar{x} de Remanente de B(a)P (μg)	Remanente de B(a)P (%)	S B(a)A (μg)	S B(a)P (μg)	CV (%) B(a)A	CV (%) B(a)P
Control	15	4	A	2.21	2.5	1.98	49.50	2.20	55.08	0.23	0.31	11.62	13.86
			B	1.98	2.22								
			C	1.75	1.89								
	30	8	A	5.82	7.6	5.61	70.17	7.49	93.67	0.36	0.53	6.38	7.05
			B	5.82	7.96								
			C	5.2	6.92								
	40	10.67	A	8.40	9.89	8.97	84.06	9.35	87.64	1.17	0.49	13.10	5.26
			B	8.19	8.93								
			C	10.32	9.23								
Bioensayo	15	4	A	0.51	0.75	0.64	15.92	0.95	23.67	0.12	0.17	18.94	18.37
			B	0.75	1.08								
			C	0.65	1.01								
	30	8	A	5.28	5.16	4.36	54.50	5.05	63.17	0.82	0.96	18.84	19.09
			B	3.7	4.04								
			C	4.1	5.96								
	40	10.67	A	9.04	10.67	8.68	81.31	9.86	92.39	0.42	0.72	4.86	7.26
			B	8.21	9.60								
			C	8.77	9.31								

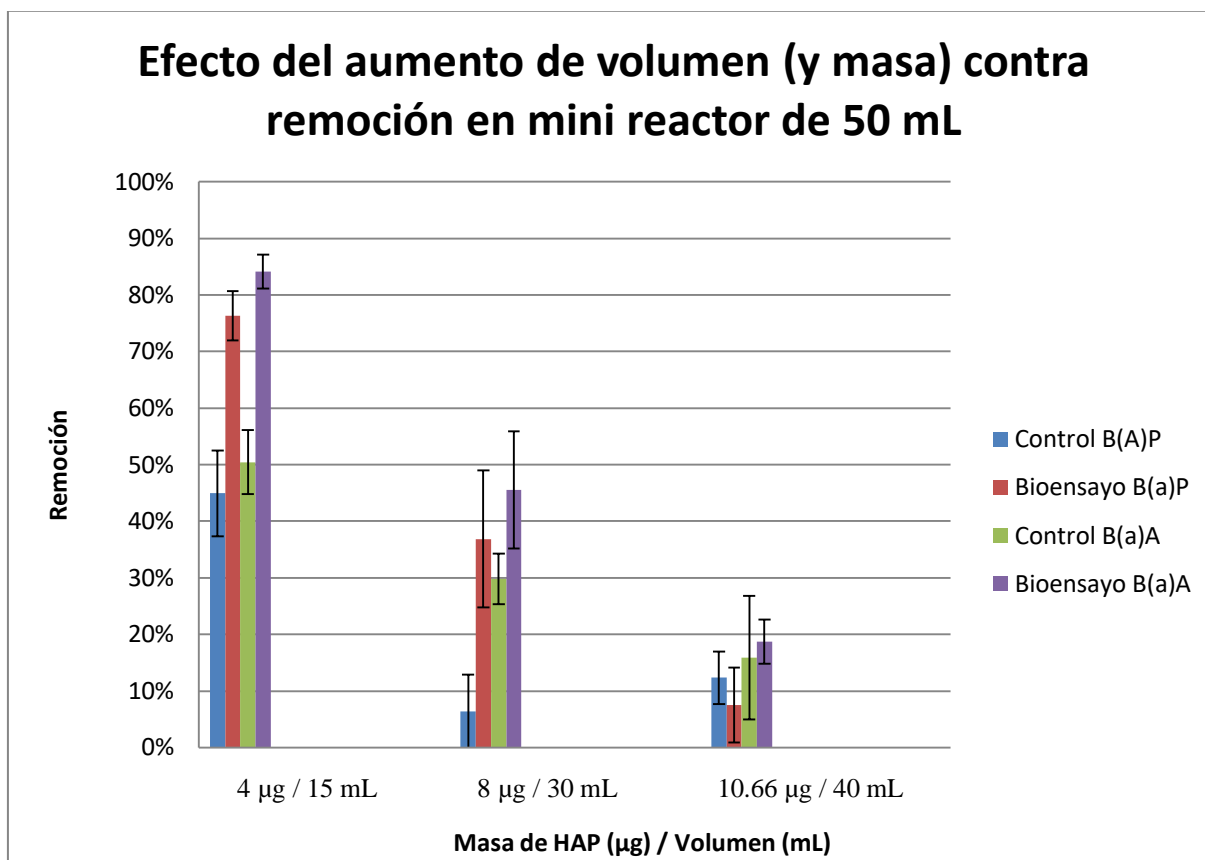


Figura 3.20 Evaluación del efecto del aumento del volumen y de la masa de HAP (manteniendo concentración constante) en la remoción a 6 horas de exposición para B(a)A y B(a)P.

De la evaluación se observa que la remoción abiótica (control sin algas) y biótica (ensayo con algas) disminuyen cuando la masa de analitos y el volumen es mayor (aunque la concentración de analitos sea la misma).

En el caso de la mayor cantidad de masa y volumen (10 µg/ 40 mL) ya no se observan diferencias entre controles y bioensayos. Es de notarse que las microalgas necesitan más tiempo para remover esas cantidades y hacer notoria la degradación.

Evaluaciones estadísticas para B(a)A

Para el **análisis estadístico de controles**, el valor de significancia $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general. Esto confirma la observación anterior, que estipula que efectivamente la cantidad de volumen y de masa influyen en la remoción abiótica (ensayo sin algas) disminuyendo.

A continuación, en la **Tabla 3.28** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.28 Análisis estadístico de controles en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A

Volumen (mL)	Volumen (mL)	¿Existe diferencia estadística significativa?
15.00	30.00	Si
	40.00	Si
30.00	15.00	Si
	40.00	
40.00	15.00	Si
	30.00	

Se puede ver que hay diferencia significativa entre todas las medias, a excepción de la de entre los dos volúmenes mayores (30 y 40 mL), lo que nos indica que llega un punto en que si se aumenta el volumen y la cantidad de masa de analito todavía más, la capacidad de remoción abiótica ya no dará para más.

Para el **análisis estadístico de ensayos**, el valor $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación anterior, que estipula que efectivamente la cantidad de volumen y masa influyen en la remoción biótica (ensayo con algas).

A continuación, en la **Tabla 3.29** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre que medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.29 Análisis estadístico de ensayos en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A

Volumen (mL)	Volumen (mL)	¿Existe diferencia estadística significativa?
15.00	30.00	Si
	40.00	Si
30.00	15.00	Si
	40.00	Si
40.00	15.00	Si
	30.00	Si

Los resultados estadísticos anteriores confirman la observación anterior, ya que efectivamente, hay diferencias estadísticas significativas entre todas las medias y por esto también se confirma que cuando aumenta la masa de analito y su volumen (aunque la concentración sea la misma) disminuye la remoción biótica, según la tendencia vista en la gráfica.

Evaluaciones estadísticas para B(a)P

Para el **análisis estadístico de controles**, el valor $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación anterior, que estipula que efectivamente la cantidad de volumen y masa influyen en la remoción abiótica (ensayo sin algas).

A continuación en la **Tabla 3.30** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.30 Análisis estadístico de controles en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A

Volumen (mL)	Volumen (mL)	¿Existe diferencia estadística significativa?
15.00	30.00	Si
	40.00	Si
30.00	15.00	Si
	40.00	
40.00	15.00	Si
	30.00	

Se puede ver que hay diferencia significativa entre todas las medias, a excepción de la de entre los dos volúmenes mayores (30 y 40 mL), lo que nos indica que llega un punto en que si se aumenta el volumen y la cantidad de masa de analito todavía más, la capacidad de remoción abiótica ya no dará para más.

Para el **análisis estadístico de ensayos**, el valor $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación anterior, que estipula que efectivamente la cantidad de volumen y masa influyen en la remoción biótica (ensayo con algas).

A continuación, en la **Tabla 3.31** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.31 Análisis estadístico de ensayos en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P

Volumen (mL)	Volumen (mL)	¿Existe diferencia estadística significativa?
15.00	30.00	Si
	40.00	Si
30.00	15.00	Si
	40.00	Si
40.00	15.00	Si
	30.00	Si

Todos los resultados estadísticos anteriores confirman la observación anterior, ya que efectivamente, hay diferencias estadísticas significativas entre todas las medias y por esto también se confirma que cuando aumenta la masa de analito y su volumen (aunque la concentración sea la misma) disminuye la remoción biótica, según la tendencia vista en la gráfica.

3.4.3.1.3 Discusión de la evaluación

En ambos casos de B(a)A y B(a)P para el bioensayo y de control, se puede observar que a medida que se aumenta la masa proporcionalmente con el volumen (para mantener constante la concentración), el remanente de HAP's en la solución acuosa aumenta, esto es lógico debido a que como se mantuvo constante el número de microalgas y la cantidad de alginato, pero la cantidad de masa aumentó, el mismo número de microorganismos y de alginato no removerán del medio más de lo que de su capacidad.

3.4.3.2 Mini reactor grande (100 mL)

3.4.3.2.1 Resultados y evaluaciones estadísticas

A continuación, en la **Tabla 3.32** se presenta la evaluación del efecto del aumento del volumen (y de la masa, debido a que se mantuvo concentración constante) de HAP's, en el mini reactor grande (de 100 mL) de agitación magnética en el remanente de B(a)A y B(a)P a 6 horas de incubación, y en la **Figura 3.20** se presenta el gráfico de la evaluación de este mismo efecto a 6 horas para B(a)A y B(a)P.

Tabla 3.32 Evaluación del efecto del aumento del volumen (y de la masa, debido a que se mantuvo concentración constante) de HAP's, para el mini reactor de agitación magnética (100 mL) en el remanente de B(a)A y B(a)P a 6 horas de exposición.

Tipo de ensayo	Volumen (mL)	Masa de HAP en μg (para mantener concentración constante de $0.266 \mu\text{g/mL}$)	Ensayo	Remanente B(a)A (μg)	Remanente B(a)P (μg)	\bar{x} de Remanente de B(a)A (μg)	Remanente de B(a)A (%)	\bar{x} de Remanente de B(a)P (μg)	Remanente de B(a)P (%)	S B(a)A (μg)	S B(a)P (μg)	CV (%) B(a)A	CV (%) B(a)P
Control	30	8	A	2.28	2.34	2.80	35.00	3.05	38.08	0.66	0.74	23.51	24.36
			B	2.58	2.98								
			C	3.54	3.82								
	45	12	A	6.96	11.64	8.01	66.75	10.78	89.83	1.62	1.49	20.17	13.82
			B	7.2	11.64								
			C	9.87	9.06								
	60	16	A	14.56	15.16	12.60	78.75	14.64	91.50	1.74	0.46	13.80	3.15
			B	12	14.28								
			C	11.24	14.48								
Bioensayo	30	8	A	2.2	3.12	1.91	23.92	2.83	35.42	0.25	0.31	12.99	11.03
			B	1.78	2.88								
			C	1.76	2.5								
	45	12	A	6.45	8.28	6.02	50.17	7.32	61.00	0.91	1.14	15.04	15.57
			B	6.63	7.62								
			C	4.98	6.06								
	60	16	A	13.32	12.92	11.43	71.42	13.01	81.33	1.79	0.08	15.67	0.64
			B	9.76	13.08								
			C	11.2	13.04								

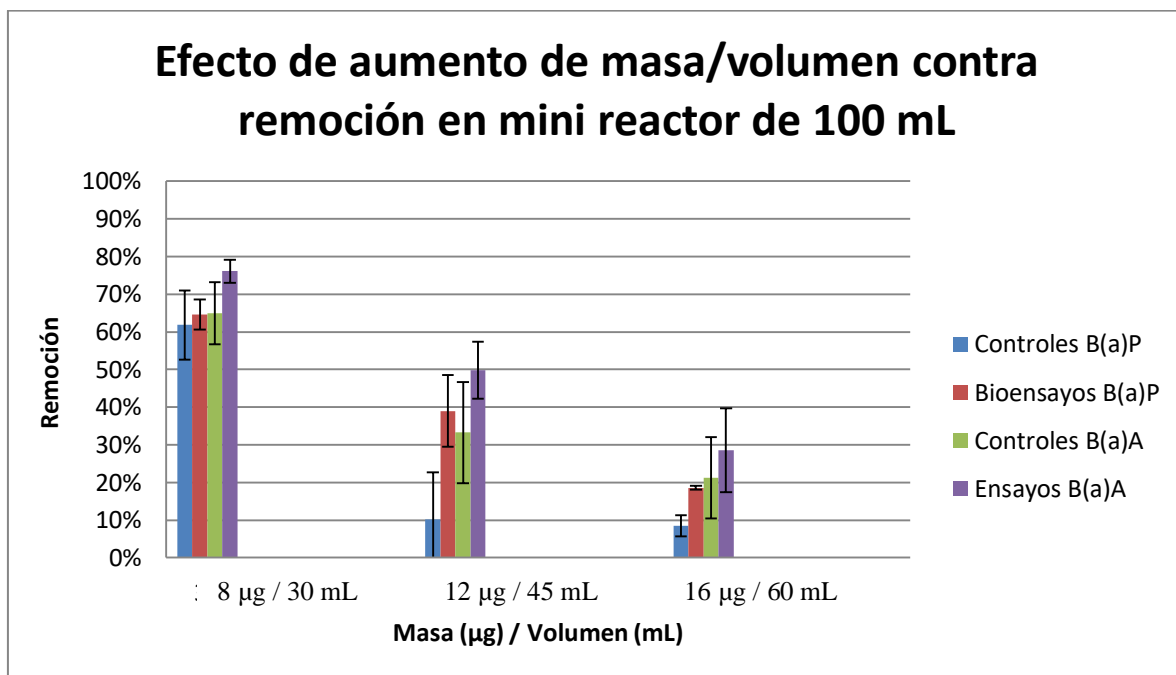


Figura 3.21 Evaluación del efecto del aumento del volumen y de la masa de HAP (para mantener concentración constante) en la remoción a 6 horas para B(a)A y B(a)P.

Al igual que para el reactor pequeño con el analito de B(a)P, de la evaluación se observa que la remoción abiótica (control sin algas) y biótica (con algas) disminuye cuando la masa de analitos y el volumen es mayor (aunque la concentración de analitos sea la misma). En el caso para el B(a)A de la mayor cantidad de masa y volumen (16 µg/ 60 mL) ya no se observan diferencias entre controles y bioensayos, ya que las microalgas necesitan más tiempo para remover esas cantidades y hacer notoria la degradación.

Evaluaciones estadísticas para B(a)A

Para el **análisis estadístico de controles**, el valor de significancia $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación anterior, que estipula que efectivamente la cantidad de masa y volumen influyen en la remoción abiótica (ensayo sin algas).

A continuación, en la **Tabla 3.33** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.33 Análisis estadístico de controles en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A

Volumen (mL)	Volumen (mL)	¿Existe diferencia estadística significativa?
30.00	45.00	Si
	60.00	Si
45.00	30.00	Si
	60.00	
60.00	45.00	Si
	60.00	

Se puede ver que hay diferencia significativa entre todas las medias, a excepción de la de entre los dos volúmenes mayores (45 y 60 mL), lo que nos indica que llega un punto en que si se aumenta el volumen y la cantidad de masa de analito todavía más, la capacidad de remoción abiótica ya no dará para más.

Para el **análisis estadístico de ensayos**, el valor de significancia $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación anterior, que estipula que efectivamente la cantidad de masa y volumen influyen en la remoción biótica (con algas).

A continuación, en la **Tabla 3.34** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.34 Análisis estadístico de ensayos en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A

Volumen (mL)	Volumen (mL)	¿Existe diferencia estadística significativa?
30.00	45.00	Si
	60.00	Si
45.00	30.00	Si
	60.00	Si
60.00	45.00	Si
	60.00	Si

Todos los resultados estadísticos anteriores confirman la observación anterior, ya que efectivamente, hay diferencias estadísticas significativas entre todas las medias y por esto también se confirma que cuando aumenta la masa de analito y su volumen (aunque la concentración sea la misma) disminuye la remoción biótica, según la tendencia vista en la gráfica.

Evaluaciones estadísticas para B(a)P

Para el **análisis estadístico de controles**, el valor $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación anterior, que estipula que efectivamente la cantidad de masa y volumen influyen en la remoción abiótica (sin algas).

A continuación, en la **Tabla 3.35** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre que medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.35 Análisis estadístico de controles en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P

Volumen (mL)	Volumen (mL)	¿Existe diferencia estadística significativa?
30.00	45.00	Si
	60.00	Si
45.00	30.00	Si
	60.00	
60.00	45.00	Si
	60.00	

Se puede ver que hay diferencia significativa entre todas las medias, a excepción de la de entre los dos volúmenes mayores (45 y 60 mL), lo que nos indica que llega un punto en que si se aumenta el volumen y la cantidad de masa de analito todavía más, la capacidad de remoción abiótica ya no dará para más.

Para el **análisis estadístico de ensayos**, el valor de significancia $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

Esto confirma la observación anterior, que estipula que efectivamente la cantidad de masa y volumen influyen en la remoción biótica (ensayo con algas).

A continuación, en la **Tabla 3.36** se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) resumido para visualizar de mejor manera, entre que medias existe diferencia estadística significativa.

Tabla 3.36 Análisis estadístico de ensayos en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P

Volumen (mL)	Volumen (mL)	¿Existe diferencia estadística significativa?
30.00	45.00	Si
	60.00	Si
45.00	30.00	Si
	60.00	Si
60.00	45.00	Si
	60.00	Si

Al igual que para el reactor pequeño, todos los resultados estadísticos anteriores confirman la observación anterior, ya que efectivamente, hay diferencias estadísticas significativas entre todas las medias y por esto también se confirma que cuando aumenta la masa de analito y su volumen (aunque la concentración sea la misma) disminuye la remoción biótica, según la tendencia vista en la gráfica.

3.4.3.2.3 Discusión de la evaluación

De estos resultados se comprueba lo mismo que en los casos anteriores de experimentación variando la masa con el reactor pequeño, que a mayor cantidad de masa y mayor volumen, pero con la misma cantidad de microorganismos y alginato, en el bioensayo, quedará mayor remanente (se realizará menor remoción).

Otro aspecto importante, es que se demostró que el sistema se puede ir escalando a volúmenes mayores, aun mostrando remoción, y que el aspecto mecánico del reactor, como la agitación de la mosca, no es afectado por un mayor volumen de agua, y esto es la base para el escalamiento del proceso.

3.4.3.3 Resultado de la evaluación del efecto de cantidad de masa.

De forma general, en las evaluaciones se observa el efecto de que a mayor cantidad de volumen y masa de analito (concentración igual) la remoción disminuye.

También se vuelve a observar que en todos los ensayos siempre se mostró una mayor tendencia a remover mayor cantidad de B(a)A que de B(a)P, y esto es totalmente lógico, ya que el B(a)A tiene menor tamaño molecular, y por lo tanto le es más fácil a la microalga dentro de la esfera del alginato (y también a la esfera de alginato sin microalgas en el ensayo de control) degradarlo.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

El objetivo general de diseñar y evaluar un mini bio-reactor no continuo para la remoción de B(a)P y B(a)A de un medio acuoso mediante la microalga inmovilizada *Selenastrum capricornutum* fue cumplido, como se explica en las siguientes conclusiones respecto a los objetivos particulares:

A. Evaluación del desempeño de dos propuestas de tipos de bio-reactores no continuos con diferente tipo de agitación.

La evaluación de estas propuestas de tipo de bio-reactor indicó que el mini reactor de lote con agitación magnética fue el de mejor capacidad de remoción, mejor practicidad, mayor facilidad de operación y mayor potencial para un escalamiento.

B. Evaluación de la velocidad de agitación en la remoción de HAP's por el reactor con mejor desempeño de los propuestos anteriormente.

Se concluyó que la agitación si influye en la capacidad de remoción de las microalgas inmovilizadas, ya que provoca una homogeneización de la concentración de analitos en todo el volumen de agua disponible que hace que la mayor cantidad de estos llegue a la mayor cantidad posible de microalgas, y evita que estos analitos se puedan estancar en un solo sitio del volumen de agua donde solo tendrían contacto con una parte reducida del área de contacto con microalgas.

También sirvió para comprender que existe una velocidad óptima de agitación para la remoción que representa el equilibrio que maximiza el beneficio por la agitación y minimiza la desventaja de que a velocidades muy grandes de agitación no haya un contacto apropiado de los analitos con el microorganismo inmovilizado.

C. Evaluación de diferentes volúmenes y cantidad de masa (concentración constante) en la remoción de HAP's en el bio-reactor seleccionado.

Se confirmó que mientras mayor volumen y mayor cantidad de analitos para cierta cantidad de microorganismos inmovilizados, la remoción disminuirá.

D. Proporcionar la información comparativa suficiente para poder establecer las condiciones óptimas para el diseño de un reactor no continuo de mayor tamaño con el mismo fin.

Además de que gracias a las conclusiones del punto C anterior se observó que la remoción siguió presente a un volumen de hasta 60 mL (buen indicio de que es posible el escalamiento a mayor volumen), también se pueden proponer algunos factores que valdría la pena estudiar a futuro para mejorar esta biorremoción:

- Tamaño de esfera de alginato inmovilizada: Debe ser un tamaño óptimo de diámetro de esferas, el cual, no sea tan grande que tenga tantas microalgas encerradas en el centro, pero que tampoco sea tan pequeño como para que sean muy frágiles.
- Tipo de material de inmovilización: Evaluar qué tipos de materiales permiten una mejor difusión de analitos hacia las microalgas inmovilizadas, así como también, estudiar propiedades como viscosidad, porosidad, estructura química, etc., con el objetivo de encontrar las propiedades que ayuden al proceso de remoción con las microalgas.

ANEXO 1

Curvas de calibración ajustadas

Para minimizar el error en el uso de la micropipeta, se optó por pesar en una balanza analítica las cantidades añadidas, obteniéndose de este modo una masa real de alícuota.

Para detallar esto se ejemplificará con lo realizado para el Benzo(a)Pireno:

Si el volumen puesto en la micropipeta es de 25 micro litros, es decir 0.025 mL, haciendo el siguiente cálculo utilizando la densidad del metanol (0.79 g/mL):

$$0.025 \text{ mL} \left(0.79 \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right) = 0.01975 \text{ g}$$

Que correspondería a la masa de alícuota teórica

Y si la concentración de la solución inicial (stock) de donde se toma la alícuota con la micropipeta para preparar la muestra a inyectar en el cromatógrafo (estándar), es de 10.045 µg/mL, para calcular la concentración de esta muestra a inyectar se utiliza la siguiente fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$\text{Se despeja } C_2=C_1V_1 / V_2$$

Donde

C_2 = Concentración de estándar para curva de calibración

V_2 = Volumen de estándar para curva de calibración (1 mL)

C_1 =Concentración del HAP proveniente del stock (En este ejemplo B(a)P con concentración de 10.045 µg/mL)

V_1 = Volumen de alícuota tomada con micropipeta

Y se calcula:

$$C_2=(10.045 \text{ µg/mL}) (0.025 \text{ mL}) / 1 \text{ mL}$$

$$C_2= 0.2511 \text{ µg/mL, que es prácticamente } 0.25 \text{ µg/mL}$$

Gracias a lo anterior se tiene esto:

Volumen de alícuota de micropipeta para preparar estándar (mL)	Masa de alícuota teórica (g)	Concentración teórica (µg/mL)
0.02500	0.01975	0.2500

Y para hacer el ajuste, si por ejemplo, al pesar en vez de obtener la masa teórica de alícuota de 0.01975 g, obtenemos 0.0171 g, se procede a conocer el volumen de alícuota real de la siguiente manera:

$$0.0171 \text{ g} \left(\frac{\text{mL}}{0.79 \text{ g}} \right) = 0.0216 \text{ mL}, \text{ diferente al que se supone tendría que ser } 0.025$$

mL.

Y con este volumen real procedemos a obtener la concentración real de estándar con la fórmula anterior para concentración de estándar:

$$C_2 = (10.0450 \text{ } \mu\text{g/mL}) (0.0216 \text{ mL}) / 1 \text{ mL}$$

$C_2 = 0.2170 \text{ } \mu\text{g/mL}$, que es una concentración más exacta.

Y así se obtiene el ajuste con el cual las concentraciones de estándar se acoplan con mayor linealidad a la respuesta del equipo, tanto en área como en altura:

Masa de alícuota real (g)	Volumen de alícuota real (mL)	Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)
0.0171	0.0216	0.2174

Y este mismo procedimiento se realizó para calcular las curvas del B(a)P y del B(a)A, con la única diferencia que la concentración del stock para el B(a)A es de 10.026 $\mu\text{g/mL}$.

Es importante recalcar, que inclusive sin este ajuste las curvas mostraban un coeficiente $r^2 > 0.99$, pero con este ajuste este coeficiente mejora.

ANEXO 2

Explicación de cálculo para obtener la curva de la Figura 3.8 de la Sección 3.3 Linealidad del método de EFS-HPLC-UV

Para poder obtener la cantidad adicionada y la cantidad recuperada en los ensayos para la linealidad del método de EFS-HPLC-UV, se procede a obtener las ecuaciones de las Curvas de Linealidad de la sección 3.2.1.2.1 para B(a)A y 3.2.2.2.1 para B(a)P ($y = 8.7876x - 0.2467$ e $y = 6.0722x + 0.3656$ respectivamente), para posteriormente despejar x en ambas:

$$\text{Para B(a)A; } x = \frac{y + 0.2467}{8.7876} \quad \text{y Para B(a)P; } x = \frac{y - 0.3656}{6.0722}$$

Ya que “y” simboliza la respuesta del cromatógrafo, que es el área en el cromatograma de un pico y “x” simboliza la concentración (en ppm o µg/mL) en una muestra.

Con esto, teniendo las respuestas de cromatograma (áreas) de la Curva de Linealidad de EFS, podremos conocer la concentración recuperada del ensayo.

Por ejemplo, si en la **Tabla 3.8**, de la sección **3.3.2.1**, si la concentración en el extracto teórica esperada de B(a)A es de 0.33 µg/mL, si multiplicamos este valor por 6 mL, que es el volumen del extracto, sería:

0.33 µg/mL x 6 mL = 2 µg, que sería la cantidad total de analito, es decir la **cantidad agregada** desde un inicio a la muestra.

Pero de lo mencionado antes, sabemos que la técnica de EFS no tiene un recobro de 100%, sino uno menor entre el 60% y 70% aproximadamente, con lo cual se tiene que conocer la **cantidad recuperada** en el extracto. Para esto, procedemos a ver el área obtenida del cromatograma para cada concentración en el extracto esperada.

Y según la **Tabla 3.8**, si tomamos como ejemplo el área promedio de la concentración de 0.33 µg/mL, a esta le corresponde un área promedio de 1.99 mAU, por lo que aplicamos la fórmula para B(a)A mencionada anteriormente:

$$x = \frac{y + 0.2467}{8.7876} = \frac{(1.99) + 0.2467}{8.7876} = 0.26 \text{ µg/mL, que correspondería a la}$$

concentración recuperada (real) del extracto, muy diferente a los 0.33 µg/mL teóricos esperados mencionados anteriormente.

Y para conocer la cantidad en µg, procedemos a multiplicar esa concentración por 6 mL, que es la cantidad de volumen del extracto después de la EFS.

$$0.26 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times 6 \text{ mL } \mu\text{g} = 1.5 \text{ µg, que correspondería a la } \mathbf{cantidad recuperada}$$

después de realizar la EFS, muy diferente a los 2 µg mencionados anteriormente.

Y con esto, tenemos ese punto de la curva de linealidad de la **Figura 3.8**, el punto (2 µg, 1.5 µg).

ANEXO 3

Análisis estadísticos de la sección 3.4 BIOENSAYOS CON MINI REACTORES

- 3.4.1 Efecto de tipo de reactor (tipo de agitación)

- **Figura 3.11** Gráfico de Evaluación de mini reactor de matraz con agitación orbital de B(a)A

- **Controles**

A continuación se presenta el análisis estadístico de las medias para la experimentación de controles de esta figura para ver si cumplen la distribución normal, condición necesaria para realizar la prueba t.

Análisis estadístico de controles (Supuesto de normalidad) mediante Software SPSS15.0 de B(a)A

	Tiempo (horas)	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig. (Valor-p)
Remoción	6	.285	3	.	.932	3	.497
a	15	.198	3	.	.995	3	.868

a Corrección de la significación de Lilliefors

El valor $p \geq 0.05$ para 6 horas, por lo tanto se cumple la distribución normal.

El valor $p \geq 0.05$, para 15 horas, por lo tanto se cumple la distribución normal.

Sabiendo que se cumple la distribución normal, a continuación se muestran los resultados que indican que se cumple la segunda condición necesaria para poder realizar la prueba t: igualdad de varianzas. A su vez, la tabla también muestra el valor de significancia.

Análisis estadístico de controles (Supuesto de igualdad de varianzas) y de prueba t mediante Software SPSS15.0 de B(a)A

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig. (Valor-p)	t	gl	Sig. (Valor-p bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95 % Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Remoción	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	2.998	0.158	0.872	4	0.432	0.19333	0.22161	-0.42196	0.80862
				0.872	2.170	0.469	0.19333	0.22161	-0.69188	1.07855

Valor-p ≥ 0.05 en prueba de Levene, por lo tanto se cumple la igualdad de varianzas.

Hipótesis nula = μ_0

Si valor-p bilateral ≥ 0.05 se acepta la hipótesis nula, que establece que no existe diferencia entre las medias.

Y con esto, valor-p bilateral = 0.432

Y como $0.432 \geq 0.05$, se acepta la hipótesis nula, por esto, no existe diferencia entre las medias

- **Ensayos**

Al igual que para los resultados de experimentación para controles, a continuación se presenta el análisis estadístico de las medias para la experimentación de ensayos para ver si cumple la distribución normal, condición necesaria para realizar la prueba t.

Análisis estadístico de ensayos (Supuesto de normalidad) mediante Software SPSS15.0 de B(a)A

	Tiempo (horas)	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig. (Valor-p)
Remoción	6	0.385	3	.	0.750	3	0.000
a	15	0.301	3	.	0.912	3	0.424

a Corrección de la significación de Lilliefors

El valor $p < 0.05$ para 6 horas, por esto no se cumple el supuesto de normalidad.

El valor $p \geq 0.05$, para 15 horas, por lo tanto se cumple la distribución normal.

Uno de los dos conjuntos de datos no cumplió el supuesto de normalidad, por lo tanto, desafortunadamente no se puede emplear la prueba t para ver si existe diferencia significativa entre las medias de forma estadística.

- **Figura 3.12 B(a)P** Gráfico de evaluación de mini reactor de matraz con agitación orbital de B(a)P

- **Controles**

Al igual que para B(a)A, a continuación se presenta el análisis estadístico de las medias para la experimentación de controles para ver si cumple la distribución normal, condición necesaria para realizar la prueba t.

Análisis estadístico de controles (Supuesto de normalidad) mediante Software SPSS15.0de B(a)P

	Tiempo (horas)	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig. (Valor-p)
Remoción a	6	0.236	3	.	0.977	3	0.708
	15	0.376	3	.	0.771	3	0.047

a Corrección de la significación de Lilliefors

El valor $p \geq 0.05$ para 6 horas, por lo tanto se cumple la distribución normal.

El valor $p < 0.05$, para 15 horas, por lo tanto no se cumple la distribución normal.

- **Ensayos**

Al igual que para los resultados de experimentación para controles, a continuación se presenta el análisis estadístico de las medias para la experimentación de ensayos para ver si cumple la distribución normal, condición necesaria para realizar la prueba t.

Análisis estadístico de ensayos (Supuesto de normalidad) mediante Software

SPSS15.0de B(a)P

	Tiempo (unidades)	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig. (Valor-p)
Remoción a	6	0.308	3	.	0.902	3	0.391
	15	0.253	3	.	0.964	3	0.637

a Corrección de la significación de Lilliefors

El valor $p \geq 0.05$ para 6 horas, por lo tanto se cumple la distribución normal.

El valor $p \geq 0.05$, para 15 horas, por lo tanto se cumple la distribución normal.

Sabiendo que se cumple la distribución normal, a continuación se muestran los resultados que indican si se cumple o no la segunda condición necesaria para poder realizar la prueba t: igualdad de varianzas. A su vez, la tabla también muestra el valor de significancia.

Análisis estadístico de ensayos (supuesto de igualdad de varianzas) y de prueba t mediante Software SPSS15.0 de B(a)P

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig. (Valor-p)	t	gl	Sig. (Valor-p bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95 % Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Remoción	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	8.429	0.044	6.336	4	0.003	0.81667	0.12888	0.45883	1.17451
				6.336	2.076	0.022	0.81667	0.12888	0.28121	1.35213

Valor-p < 0.05 en prueba de Levene, por lo tanto no cumple el supuesto de igualdad de varianzas, entonces no se puede tomar en cuenta el resultado de esta prueba para valor de significancia.

- **Figura 3.13** Gráfico de Evaluación de mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)A
- **Controles B(a)A**

A continuación se presenta el análisis estadístico (ANOVA) de las medias para la experimentación de controles.

Análisis estadístico de controles (Prueba ANOVA) de B(a)A Análisis Estadístico de Controles

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	2.326	2	1.163	18.777	0.003
Intra-grupos	0.372	6	0.062		
Total	2.698	8			

El valor p < 0.05, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de controles (Prueba Post Hoc) de B(a)A

(I) Tiempo (horas)	(J) Tiempo (horas)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
4.00	6.00	0.33667	0.20321	0.295	-0.2869	0.9602
	15.00	1.20667(*)	0.20321	0.002	0.5831	1.8302
6.00	4.00	-0.33667	0.20321	0.295	-0.9602	0.2869
	15.00	0.87000(*)	0.20321	0.012	0.2465	1.4935
15.00	4.00	-1.20667(*)	0.20321	0.002	-1.8302	-0.5831
	6.00	-0.87000(*)	0.20321	0.012	-1.4935	-0.2465

Los paréntesis * indican el par de tiempos entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Ensayos B(a)A**

A continuación se presenta el análisis estadístico (ANOVA) de las medias para la experimentación de controles.

Análisis estadístico de ensayos (Prueba ANOVA) de B(a)A

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	3.411	2	1.705	564.298	0.000
Intra-grupos	0.018	6	0.003		
Total	3.429	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)A

(I) Tiempo (unidades)	(J) Tiempo (unidades)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
4.00	6.00	0.97667(*)	0.04489	0.000	0.8389	1.1144
	15.00	1.48333(*)	0.04489	0.000	1.3456	1.6211
6.00	4.00	-0.97667(*)	0.04489	0.000	-1.1144	-0.8389
	15.00	0.50667(*)	0.04489	0.000	0.3689	0.6444
15.00	4.00	-1.48333(*)	0.04489	0.000	-1.6211	-1.3456
	6.00	-0.50667(*)	0.04489	0.000	-0.6444	-0.3689

Los paréntesis * indican el par de tiempos entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Figura 3.14** Gráfico de evaluación de mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)P

- **Controles B(a)P**

A continuación se presenta el análisis estadístico (ANOVA) de las medias para la experimentación de controles.

Análisis estadístico de controles (Prueba ANOVA) de B(a)P

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-P)
Inter-grupos	3.021	2	1.510	12.644	0.007
Intra-grupos	0.717	6	0.119		
Total	3.738	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual, se rechaza la hipótesis nula (μ_0) y se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general. A continuación se comprobará entre qué conjuntos de datos se presentan diferencias significativas.

Análisis estadístico de controles (Prueba Post Hoc) de B(a)P

(I) Tiempo (horas)	(J) Tiempo (horas)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
					Límite inferior	Límite superior
4.00	6.00	0.40333	0.28221	0.386	-0.4626	1.2692
	15.00	1.38000(*)	0.28221	0.007	0.5141	2.2459
6.00	4.00	-0.40333	0.28221	0.386	-1.2692	0.4626
	15.00	0.97667(*)	0.28221	0.031	0.1108	1.8426
15.00	4.00	-1.38000(*)	0.28221	0.007	-2.2459	-0.5141
	6.00	-0.97667(*)	0.28221	0.031	-1.8426	-0.1108

Los paréntesis * indican el par de tiempos entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Ensayos B(a)P**

A continuación se presenta el análisis estadístico (ANOVA) de las medias para la experimentación de ensayo.

Análisis estadístico de ensayos (Prueba ANOVA) de B(a)P

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-P)
Inter-grupos	3.766	2	1.883	139.819	0.000
Intra-grupos	0.081	6	0.013		
Total	3.847	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual se rechaza la hipótesis nula, y se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)P

(I) Tiempo (horas)	(J) Tiempo (horas)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (Valor-P)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
4.00	6.00	0.97000(*)	0.09475	0.000	0.6793	1.2607
	15.00	1.57000(*)	0.09475	0.000	1.2793	1.8607
6.00	4.00	-0.97000(*)	0.09475	0.000	-1.2607	-0.6793
	15.00	0.60000(*)	0.09475	0.002	0.3093	0.8907
15.00	4.00	-1.57000(*)	0.09475	0.000	-1.8607	-1.2793
	6.00	-0.60000(*)	0.09475	0.002	-0.8907	-0.3093

Los paréntesis * indican el par de tiempos entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

Análisis estadísticos de la sección 3.4 BIOENSAYOS CON MINI REACTORES

- 3.4.2 Efecto de la velocidad de agitación (mini reactor con agitación magnética)

- **Figura 3.18** Gráfico de Evaluación de velocidad de agitación contra remoción del mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)A
- **Controles B(a)A**

A continuación se presenta el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los controles a diferentes velocidades.

Análisis estadístico de controles (Prueba ANOVA) de B(a)A

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia (Valor-p)
Inter-grupos	0.449	3	0.150	2.935	0.099
Intra-grupos	0.408	8	0.051		
Total	0.857	11			

El valor $p \geq 0.05$, por lo cual se concluye que no hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

- **Ensayos B(a)A**

A continuación se muestra el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los ensayos a diferentes velocidades.

Análisis estadístico de ensayos (Prueba ANOVA) de B(a)A

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia (Valor-p)
Inter-grupos	0.790	3	0.263	11.744	0.003
Intra-grupos	0.179	8	0.022		
Total	0.969	11			

El valor $p < 0.05$, por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)A

(I) Velocidad (rpm)	(J) Velocidad (rpm)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
0.00	90.00	0.51333(*)	0.12227	0.013	0.1218	0.9049
	300.00	0.70000(*)	0.12227	0.002	0.3084	1.0916
	600.00	0.37667	0.12227	0.059	-0.0149	0.7682
90.00	0.00	-0.51333(*)	0.12227	0.013	-0.9049	-0.1218
	300.00	0.18667	0.12227	0.466	-0.2049	0.5782
	600.00	-0.13667	0.12227	0.690	-0.5282	0.2549
300.00	0.00	-0.70000(*)	0.12227	0.002	-1.0916	-0.3084
	90.00	-0.18667	0.12227	0.466	-0.5782	0.2049
	600.00	-0.32333	0.12227	0.110	-0.7149	0.0682
600.00	0.00	-0.37667	0.12227	0.059	-0.7682	0.0149
	90.00	0.13667	0.12227	0.690	-0.2549	0.5282
	300.00	0.32333	0.12227	0.110	-0.0682	0.7149

Los paréntesis * indican el par de velocidades entre las cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Figura 3.19** Gráfico de Evaluación de velocidad de agitación contra remoción del mini reactor de lote con agitación magnética de B(a)P

• Controles B(a)P

A continuación se presenta el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los controles a diferentes velocidades.

Análisis estadístico de controles (Prueba ANOVA) de B(a)P

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	0.257	3	0.086	1.571	0.271
Intra-grupos	0.437	8	0.055		
Total	0.694	11			

El valor $p \geq 0.05$, por lo cual se concluye que no hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

- **Ensayos B(a)P**

A continuación se muestra el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los ensayos a diferentes velocidades.

Análisis estadístico de ensayos (Prueba ANOVA) de B(a)P

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	0.583	3	0.194	11.930	0.003
Intra-grupos	0.130	8	0.016		
Total	0.713	11			

El valor $p < 0.05$ por lo cual, se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de ensayos (Prueba Post Hoc) de B(a)P

(I) Velocidad (rpm)	(J) Velocidad (rpm)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
0.00	90.00	0.41333(*)	0.10422	0.017	0.0796	0.7471
	300.00	0.58667(*)	0.10422	0.002	0.2529	0.9204
	600.00	0.20333	0.10422	0.281	-0.1304	0.5371
90.00	0.00	-0.41333(*)	0.10422	0.017	-0.7471	-0.0796
	300.00	0.17333	0.10422	0.400	-0.1604	0.5071
	600.00	-0.21000	0.10422	0.259	-0.5437	0.1237
300.00	0.00	-0.58667(*)	0.10422	0.002	-0.9204	-0.2529
	90.00	-0.17333	0.10422	0.400	-0.5071	0.1604
	600.00	-0.38333(*)	0.10422	0.026	-0.7171	-0.0496
600.00	0.00	-0.20333	0.10422	0.281	-0.5371	0.1304
	90.00	0.21000	0.10422	0.259	-0.1237	0.5437
	300.00	0.38333(*)	0.10422	0.026	0.0496	0.7171

Los paréntesis * indican el par de velocidades entre las cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

Análisis estadísticos de la sección 3.4 BIOENSAYOS CON MINI REACTORES

- 3.4.3 Efecto de aumento de cantidad de masa y volumen

- **Figura 3.20** Evaluación del efecto del aumento del volumen y de la masa de HAP (para mantener concentración constante) en la remoción a 6 horas para B(a)A y B(a)P.

- **Controles B(a)A**

A continuación se presenta el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los controles a diferentes volúmenes.

Análisis estadístico de controles en reactor de 50 mL (Prueba ANOVA) de B(a)A

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	2.907	2	1.453	15.625	0.004
Intra-grupos	0.558	6	0.093		
Total	3.465	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de controles en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A

(I) Tiempo (horas)	(J) Tiempo (horas)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
15.00	30.00	-0.82667(*)	0.24903	0.037	-1.5908	-0.0626
	40.00	-1.38333(*)	0.24903	0.003	-2.1474	-0.6192
30.00	15.00	0.82667(*)	0.24903	0.037	0.0626	1.5908
	40.00	-0.55667	0.24903	0.143	-1.3208	0.2074
40.00	15.00	1.38333(*)	0.24903	0.003	0.6192	2.1474
	30.00	0.55667	0.24903	0.143	-0.2074	1.3208

Los paréntesis * indican el par de volúmenes entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Ensayos B(a)A**

A continuación se muestra el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los ensayos a diferentes volúmenes.

Análisis estadístico de ensayos en reactor de 50 mL (Prueba ANOVA) de B(a)A

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	10.381	2	5.190	74.766	0.000
Intra-grupos	0.417	6	0.069		
Total	10.797	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de ensayos en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A

(I) Tiempo (horas)	(J) Tiempo (horas)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
15.00	30.00	-1.54333(*)	0.21513	0.001	-2.2034	-0.8833
	40.00	-2.61667(*)	0.21513	0.000	-3.2767	-1.9566
30.00	15.00	1.54333(*)	0.21513	0.001	0.8833	2.2034
	40.00	-1.07333(*)	0.21513	0.006	-1.7334	-0.4133
40.00	15.00	2.61667(*)	0.21513	0.000	1.9566	3.2767
	30.00	1.07333(*)	0.21513	0.006	0.4133	1.7334

Los paréntesis * indican el par de tiempos entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Controles B(a)P**

A continuación se presenta el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los controles a diferentes volúmenes.

Análisis estadístico de controles en reactor de 50 mL (Prueba ANOVA) de B(a)P

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	4.138	2	2.069	31.509	0.001
Intra-grupos	0.394	6	0.066		
Total	4.532	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de controles en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P

Volumen (mL)	Volumen (mL)	Diferencia de medias (I-J)		Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
15.00	30.00	-1.54333(*)	0.20923	0.001	-2.1853	-0.9014	
	40.00	-1.30333(*)	0.20923				0.002
30.00	15.00	1.54333(*)	0.20923	0.001	0.9014	2.1853	
	40.00	0.24000	0.20923				0.523
40.00	15.00	1.30333(*)	0.20923	0.002	0.6614	1.9453	
	30.00	-0.24000	0.20923				0.523

Los paréntesis * indican el par de volúmenes entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Ensayos B(a)P**

A continuación se muestra el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los ensayos a diferentes volúmenes.

Análisis estadístico de ensayos en reactor de 50 mL (Prueba ANOVA) de B(a)P

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	11.428	2	5.714	51.200	0.000
Intra-grupos	0.670	6	0.112		
Total	12.097	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de ensayos en reactor de 50 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P

Volumen (mL)	Volumen (mL)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
15.00	30.00	-1.58000(*)	0.27276	0.003	-2.4169	-0.7431
	40.00	-2.75000(*)	0.27276	0.000	-3.5869	-1.9131
30.00	15.00	1.58000(*)	0.27276	0.003	0.7431	2.4169
	40.00	-1.17000(*)	0.27276	0.012	-2.0069	-0.3331
40.00	15.00	2.75000(*)	0.27276	0.000	1.9131	3.5869
	30.00	1.17000(*)	0.27276	0.012	0.3331	2.0069

Los paréntesis * indican el par de volúmenes entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Figura 3.21** Evaluación de mini reactor de 100 mL de lote con agitación magnética de B(a)A
- **Controles B(a)A**

A continuación se muestra el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los controles a diferentes volúmenes.

Análisis estadístico de controles en reactor de 100 mL (Prueba ANOVA) de B(a)A

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	4.906	2	2.453	12.530	0.007
Intra-grupos	1.175	6	0.196		
Total	6.080	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de controles en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A

(I) Volumen (mL)	(J) Volumen (mL)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
30.00	45.00	-1.27000(*)	0.36126	0.029	-2.3785	-0.1615
	60.00	-1.75000(*)	0.36126	0.007	-2.8585	-0.6415
45.00	30.00	1.27000(*)	0.36126	0.029	0.1615	2.3785
	60.00	-0.48000	0.36126	0.432	-1.5885	0.6285
60.00	30.00	1.75000(*)	0.36126	0.007	0.6415	2.8585
	45.00	0.48000	0.36126	0.432	-0.6285	1.5885

Los paréntesis * indican el par de volúmenes entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Ensayos B(a)A**

A continuación se muestra el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los ensayos a diferentes volúmenes.

Análisis estadístico de ensayos en reactor de 100 mL (Prueba ANOVA) de B(a)P

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	5.435	2	2.718	26.564	0.001
Intra-grupos	0.614	6	0.102		
Total	6.049	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de ensayos en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)A

(I) Volumen (mL)	(J) Volumen (mL)	Diferencia de medias (I-J)		Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior			Límite superior	Límite inferior
30.00	45.00	-1.05000(*)	0.26115	0.016	-1.8513	-0.2487	
	60.00	-1.90000(*)	0.26115	0.001	-2.7013	-1.0987	
45.00	30.00	1.05000(*)	0.26115	0.016	0.2487	1.8513	
	60.00	-0.85000(*)	0.26115	0.040	-1.6513	-0.0487	
60.00	30.00	1.90000(*)	0.26115	0.001	1.0987	2.7013	
	45.00	0.85000(*)	0.26115	0.040	0.0487	1.6513	

Los paréntesis * indican el par de volúmenes entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

- **Controles B(a)P**

A continuación se presenta el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los controles a diferentes volúmenes

Análisis estadístico de controles en reactor de 100 mL (Prueba ANOVA) de B(a)P

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	8.855	2	4.427	33.408	0.001
Intra-grupos	0.795	6	0.133		
Total	9.650	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de controles en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P

(I) Volumen (mL)	(J) Volumen (mL)	Diferencia de medias (I-J)		Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior			Límite superior	Límite inferior
30.00	45.00	-2.07000(*)	0.29723	0.001	-2.9820	-1.1580	
	60.00	-2.13667(*)	0.29723				0.001
45.00	30.00	2.07000(*)	0.29723	0.001	1.1580	2.9820	
	60.00	-0.06667	0.29723				0.973
60.00	30.00	2.13667(*)	0.29723	0.001	1.2247	3.0487	
	45.00	0.06667	0.29723				0.973

Los paréntesis * indican el par de volúmenes entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

A continuación se muestra el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los ensayos a diferentes tiempos.

• **Ensayos B(a)P**

A continuación se muestra el análisis estadístico (ANOVA) para ver si hay diferencia significativa entre las medias de los ensayos a diferentes volúmenes.

Análisis estadístico de ensayos en reactor de 100 mL (Prueba ANOVA) de B(a)P

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig. (Valor-p)
Inter-grupos	5.082	2	2.541	45.036	0.000
Intra-grupos	0.339	6	0.056		
Total	5.421	8			

El valor $p < 0.05$, por lo cual se concluye que hay diferencia significativa estadísticamente entre las medias de forma general.

A continuación se presenta el análisis estadístico (Prueba Post Hoc) para visualizar de mejor manera, entre qué medias existe diferencia estadística significativa.

Análisis estadístico de ensayos en reactor de 100 mL (Prueba Post Hoc) de B(a)P

(I) Volumen (mL)	(J) Volumen (mL)	Diferencia de medias (I-J)		Error típico	Sig. (Valor-p)	Intervalo de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
30.00	45.00	-1.02333(*)	0.19395	0.005	-1.6184	-0.4283	
	60.00	-1.83667(*)	0.19395	0.000	-2.4317	-1.2416	
45.00	30.00	1.02333(*)	0.19395	0.005	0.4283	1.6184	
	60.00	-0.81333(*)	0.19395	0.014	-1.4084	-0.2183	
60.00	30.00	1.83667(*)	0.19395	0.000	1.2416	2.4317	
	45.00	0.81333(*)	0.19395	0.014	0.2183	1.4084	

Los paréntesis * indican el par de tiempos entre los cuales los conjuntos de datos exhiben diferencia significativa estadísticamente.

BIBLIOGRAFÍA

A

1. Aguilar, M.I., 2004, "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", HPLC of Peptides and Proteins, Methods and protocols, ISBN: 978-0-89603-977-3, Springer.
2. Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28 (1), 64-70.
3. Awaleh & Soubaneh, 2014. "Waste Water Treatment in Chemical Industries: The Concept and Current Technologies", *Hydrology Current Research*, ISSN: 2157-7587, Volumen 5, publicación 1, 1000164., Université du Québec á Rimouski, Canadá
4. Aygün, F. & Özcimder M., 1996, "A comparison of Normal(-CN) and Reversed (C-18) Phase Chromatographic Behaviour of polycyclic Aromatic Hydrocarbons", *Universidad Ondokuz Mayıs, Turquía; J. of Chemistry*, 20, 269-275, © TÜBITAK.

B

5. Benz, G., 2011. "Bioreactor design for chemical engineers", *AIChE (American Institute of Chemical Engineering)*, 21-26.

6. Bernal Toris D.N., 2015, "Evaluación de la capacidad de *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en alginato para remover Benzo(a)Pireno de medio cultivo acuoso". Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM.

7. Biziuk, M. 2006. "Solid Phase Extraction Technique - Trends, Opportunities and Applications." *Polish Journal of Environmental Studies* 15(5); 677-690.

C

8. CDER (Center for Drug Evaluation and Research), 1994, "Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods" ; US FDA; E.E.U.U.

9. Chekroun, K.B.; Sánchez, E.; Baghour, M., 2014, "The role of algae in bioremediation of organic pollutants", Departamento de Biología, Facultad Pluridisciplinaria de Nador, Séloune, Nador, Marruecos.

10. Chiu, Y. C.; Lee, L. L.; Chang, C. N.; & Chao, A. C. (2007). Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. *International biodeterioration & biodegradation*, 59 (1), 1-7.

D

11. Díaz Rojas, M., 2015, "Análisis cromatográfico aplicado en la evaluación de la biorremoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio acuoso con diferentes cantidades de microalga", Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

E

12. Elnashar, M., 2011, "The Art of Immobilization using Biopolymers, Biomaterials and nanobiotechnology", Intechopen; Centre of Scientific excellence, Departamento de polímeros, Materiales Avanzados y Laboratorio de Nanotecnología, Centro de Investigación Nacional, Egipto.

13. Environmental Protection Agency (EPA), 2008. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)", Office of Solid Waste, Washington, Estados Unidos.

14. Environmental Protection Agency (EPA), 2013. "Introduction to in situ bioremediation of groundwater", Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, Estados Unidos.

15. EPA, 2015, "Water Treatment Manuals, Filtration", Irlanda, 80 páginas, Ardcavan, Wexford, Irlanda.

F

16. FDA, 2015. "Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics, Guidance of Industry". U.S: Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).

17. FDA, 2015 "Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics_July 2015."

18. Fidalgo-Used, N.; Blanco-González, E.; Sanz-Medel: A., 2007. "Sample Handling Strategies for the Determination of Persistent Trace Organic Contaminants from Biota Samples." *Analytica Chimica Acta* 590 (1);1-16.

G

19. García de Llasera, M. P.; Olmos Espejel, J.J.; Díaz Flores, G.; Montañó Montiel A., 2016 "Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: A comparative study usefull for bioremediation." *Environmental Science and Pollution Research*. 23; 3365-3375

20. Ghosai, D., Ghosh, S., Dutta., T.K., Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of PAHs: A review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-27

H

21. Haritash, A.K., & Kaushik, C.P., 2009 "Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review." *Journal of Hazardous Materials*, 169; (1-15):

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389409005494>.

22. Harris, D., 2001, "Análisis Químico Cuantitativo", 2da Edición, Editorial Reverté, España, 984 páginas.

I

23. Iarc. 2005. "IARC Monographs Volume 92 - Appendix. Chemical and Physical Data for Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Water* 92; 774-814.

24. Iarc, 2010, "Benzo[a]Pyrene". Iarc Monographs, Vol. 100F, 2005: 111-44. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/index.php>.

J

25. Jena, G.M.; Roy, G.K.; Meikap, B.C., 2005, "Comparative Study of Immobilized Cell Bioreactors for Industrial Wastewater Treatment", Departamento de Ingeniería Química, Instituto Hindú de Tecnología, India, 11 páginas, Archivado en <http://dspace.nitrkl.ac.in/dspace>

K

26. Karger, Barry L., 1997 "HPLC: Early and Recent Perspectives." J. Chem. Educ. Journal of Chemical Education 74 (1): 45-48.

L

27. Lei A., Hu Z., Wong Y., Tam N., 2007 "Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species". Bioresource Technology 98, 273-280.

28. León Santiago, M., 2006, "Biorremoción de contaminantes orgánicos de medio acuoso con sistemas algales", Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM.

29. Lijinsky, W., 1991. "The Formation and Occurrence of Polinuclear Aromatic Hydrocarbons Associated with Food." Mutation research 259 (3-4): 251-61.

30. Lindquist & Warshawsky, 1985, "Identification of the 11,12 dihydro-11,12-dihydroxybenzo(a)pireno as a major metabolite produced by the green alga, *Selenastrum capricornutum*. Biochemical and Biophysical research communications, 130 (1), 71-75.

M

31. Mann, U. S.; Dhingra, A.; Singh, J., 2014 "Water Pollution: Causes, Effects and Remedies." Vol. 2; 70-74.

32. Martins, S.; Martins, C.; Fiúza, L.; Santaella, S., 2013, "Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater", African Journal of Biotechnology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brasil, Vol 12. 4412-4418.

33. Mastrangelo, G.; Fadda, E.; Marzia, V., 1996, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Cancer in Man." Environmental Health Perspectives 104 (11); 1166-1170.

34. Moreno Garrido I., 2008, "Microalgae immobilization: Current techniques and uses", Bioresource Technology 99, 3949-3964.

35. Mrozik, A.; Seget, Z.; Labuzek, S., 2003 "Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons", Departamento de Bioquímica, Departamento de Microbiología, Universidad de Silesia, Polonia; Polish Journal of Environmental Studies, Vol. 12 (1). 15-25.

N

36. Norton, J.M., 2012 "Fungi for Bioremediation of Hydrocarbon Pollutants", Universidad de Hawai, Hawai Community College, HOHONU 2012, Vol. 10.

O

37. Olmos-Espejel, JJ., García de Llasera, M.P. & Velasco-Cruz, M., 2012. "Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology base on matrix solid phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography." Journal of Chromatography A, 1262, 138-147.

38. Olmos Espejel, J.J., 2013, "Metodologías cromatográficas en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microorganismos". Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.

39. OMS, 2002, "Eutrophication and Health", Oficina Regional para Europa, 32 pp.

R

40. Rubailo, A., & Oberenko, A.2008, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as Priority Pollutants", Instituto de Química y Tecnología Química, Universidad Federal Siberiana, Rusia.

S

41. Samanta, Sudip K., Om V. Singh, and Rakesh K. Jain, 2002. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Environmental Pollution and Bioremediation." Trends in Biotechnology 20(6): 243-248.

42. Sikorski, P.; Frode, M.; Skjak-Braek, G.; Stokke, B., 2007. "Evidence for egg-box compatible interactions in calcium alginate gels from fiber X-ray diffraction", Department of Physics and Norwegian Biopolymer Laboratory, Departamento de Biotecnología, Universidad Noruega de Ciencia y Tecnología, publicado en el American Chemical Society, en Biomacromolecules, Vol. 8, 2098-2103.

43. Sharma, K., 2013, "Bioremediation of Sewage Wastewater Using Selective Algae for Manure Production", Instituto Hindú de Investigación Agrícola, India; International Journey of Environmental Engineering and Management, ISSN 2231-1319, Vol. 4, (6). 573-580.

44. Smidsrod, O. & Skjak-Braek, G., 1990 "Alginate as immobilisation matrix for cells", Elsevier Science Publishers Ltd. (UK), 0167-9430/90/\$2.00, 71-78.

45. Smith, 1991. "Ingeniería de la cinética química", McGraw Hill, 6ta impresión.

46. Snyder, 1979. "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da edición, John Willey & Sons, Inc. E.E.U.U.

47. Sobsey, M.D., 2002. "Managing water in the home, Accelerated health gains from improved water supply". Publicaciones WASH (WATER Sanitisation & Health) de la OMS, número de referencia: WHO/SDE/WSH/02.07, 83 páginas., Universidad de Carolina del Norte, E.E.U.U.

T

48. Tanaka, H.; Matsumura, M.; Veliky, I.A., 1983, "Diffusion Characteristics of Substrates on Ca-alginate Gel Beads", Instituto de Bioquímica Aplicada, Universidad de Tsukuba, Ibaraki, Japón

49. ThermoSpectronic, 2001, "Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications".

50. Tru, Tru, Espenberg, Nolvak, Juhanson, 2015, "Phytoremediation and Plant-Assisted Bioremediation in Soil and Treatment Wetlands: A review", Universidad de Tartu, Estonia; Universidad de Latvia, República de Letonia; Universidad Sueca de Ciencias de la Agricultura, Suecia; The Open Biotechnology Journal, Vol. 9, (Suppl 1-M9) 85-92.

W

51. Warshawsky, D.; Cody, T.; Radike, M.; Reilman, R.; Schumann, B.; LaDow, K.; Schneider, J., 1995. "Biotransformation of Benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several Green algae and other algal species under gold and White light." Chemico-biological interactions, Vol. 97 (2), 131-148.

52. Welty, J., 1982 "Fundamentos de transferencia de momento, calor y masa", Ed. Limusa, 887 páginas.

53. Williams, J., 2002. "Keys to Bioreactor Selection", EPS, Environmental and Production Solutions, Inc., <http://www.cepmagazine.org>,

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

B

1. Biocompare, 2016, "HPLC UV Detector (UV/Visible HPLC Detectors) ", en línea en la dirección electrónica: <http://www.biocompare.com/Lab-Equipment/13036-HPLC-UV-Detector-UV-Visible-HPLC-Detectors/>

C

2. Chemistry glossary, Paper Chromatography, 2015, en la dirección electrónica: <http://glossary.periodni.com/dictionary.php?en=paper+chromatography>, consultada el 25-Ene-16.

3. Chislock, Michael (Departamento de Pesca y Agricultura Aliada, Universidad Auburn), Doster, Enrique (Departamento de Ciencias Animales, Universidad Auburn), Zitomer, Rachel (Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Humboldt), Wilson, Alan (Departamento de Pesca y Agricultura Aliada, Universidad Auburn) © 2013 Nature Education, "Eutrophication: Causes, Consequences, and Controls in Aquatic Ecosystems" en la dirección electrónica: <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/eutrophication-causes-consequences-and-controls-in-aquatic-102364466>

D

4. DDBST - Dortmund Data Bank Software & Separation Technology GmbH, Servicio Online para cálculo de densidad de líquidos con la ecuación DIPPR 105, en la dirección electrónica: <http://ddbonline.ddbst.de/DIPPR105DensityCalculation/DIPPR105CalculationCGI.exe>

F

5. Forschungsgemeinschaft, Deutsche DFG (Fundación Alemana de Investigación), 2012 "Benzo(a)Anthracene, The MAK collection Part I: Occupational Toxicants", Vol. 27. 231-233, en la dirección electrónica: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.mb5655e0027/pdf>

H

6. Hogan, Artículo en línea: Water Pollution, del sitio web Encyclopedia of Earth, año 2014, en la dirección electrónica: <http://www.eoearth.org/view/article/156920/>)

K

7. KIMICA Corporation, 2009, Propiedades del alginato, en la dirección electrónica: http://www.kimica-alginate.com/alginate/botanical_source.html

L

8. La guía: Química, del artículo en línea Volatilidad relativa y Destilación fraccionada, año 2012, Autor: Mónica González, en la dirección electrónica: <http://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/volatilidad-relativa-y-destilacion-fraccionada>

P

9. Pollution Issues, año 2015, Biorremediación, en la dirección electrónica: <http://www.pollutionissues.com/A-Bo/Bioremediation.html>)