



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS
PRIORITARIOS DE 4 Y 5 ANILLOS Y SUS METABOLITOS PROVENIENTES DE
MICROALGAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. FERNANDO JOSÉ HERNÁNDEZ BLANCO

Dra. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

Facultad de Química, Departamento de Química Analítica

Ciudad de México, 13 de febrero de 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS
PRIORITARIOS DE 4 Y 5 ANILLOS Y SUS METABOLITOS PROVENIENTES DE
MICROALGAS**

PRESENTA

M. en C. FERNANDO JOSÉ HERNÁNDEZ BLANCO

Dra. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

Facultad de Química, Departamento de Química Analítica



Ciudad de México, 13 de febrero de 2017

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por coadyuvar en mi desarrollo profesional y personal en sus aulas y laboratorios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México CONACyT, por el apoyo otorgado al proyecto CB 166389 y la beca doctoral N° 475155 otorgada para mis estudios de doctorado.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México DGAPA-UNAM, por el apoyo al proyecto PAPIIT IT203214.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por su asesoría para la realización de la presente tesis.

A la Maestra en Ciencias Rosario Covarrubias Herrera por sus consejos y colaboración durante estos años del doctorado.

A mis compañeros a lo largo de cuatro años, Jesús, Gabriel, Adriana, Miriam, Evelyn, Iran, Jessica, Mayra, Enrique, Fernando, Everardo, Jorge, Alan, Nayeli, Eduardo y Maribel por su apoyo, colaboración y amistad.

A los doctores(as) Araceli Patricia Peña Álvarez, Luz Elena Vera, Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero, y Rafael Villalobos Pietrini (q.e.p.d), por hacer parte de mi comité tutor.

A los miembros del Jurado por sus aportes y correcciones durante la revisión de este trabajo.

Esta tesis fue revisada, evaluada y aprobada por los siguientes sinodales

Presidente Dra. Josefina de Gyves Marciniak

Vocal Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Vocal Dra. Margarita Salazar González

Vocal Dr. Oscar Augusto Peralta Rosales

Secretario Dra. Selena Gutiérrez Flores

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis padres Luis Fernando y Nubia, a mi esposa Ayda Marcela, a mi hermano Oscar Mauricio y a mi sobrina Danna Marcela quienes con una palabra de aliento y una sonrisa siempre se hicieron presentes.

La permanencia, perseverancia y persistencia a pesar de todos los obstáculos, desalientos e imposibilidades: es eso lo que distingue las almas fuertes de las débiles.

Thomas Carlyle

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de la

Dra. Martha Patricia García Camacho

En el Departamento de Química Analítica, Laboratorio 227, edificio F2 de la Facultad de Química

PRODUCTOS DE INVESTIGACION

Hernández Blanco F. J., García de Llasera M. P., 2016, Monitoring of polyaromatic hydrocarbons dihydrodiol metabolites produced by the freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum*, *Chemosphere*, 158, September 2016, 80-90

Congresos

1. Presentación del trabajo titulado “Cuantificación de metabolitos del benzo(a)pireno generados por *Scenedesmus acutus*” en el **48° Congreso Mexicano de Química** realizado en Guanajuato del 31 de agosto al 4 de septiembre de 2013.
2. Participación y presentación del trabajo titulado “Determinación Analítica de Contaminantes y sus Productos de Degradación en un Proceso de remoción por Microorganismos en Medio Acuoso” en la **Semana de la Investigación en la Facultad de Química 2014**.
3. Participación y presentación en modalidad de poster del trabajo titulado “Análisis y caracterización de hidrocarburos aromáticos policíclicos prioritarios de 4 a 5 anillos y sus metabolitos provenientes de microalgas” en el **QuimiUNAM 2015**.
4. Participación en el trabajo titulado “Biodegradación simultánea de cuatro hidrocarburos aromáticos policíclicos por la microalga *Selenastrum capricornutum*” en el **28° Congreso de la Asociación Mexicana de Química Analítica** realizado del 24 al 27 de junio en Ixtapa-Zihuatanejo del 2015
5. Martha Patricia García Camacho, Fernando J. Hernández Blanco, Rosario Covarrubias Herrera. Cromatografía de líquidos para el seguimiento de la degradación microalgal del benzo(b)fluoranteno y benzo(k)fluoranteno. **VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental**. Cancún, Quintana Roo. México. 15 al 18 de noviembre de 2016.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. HIPOTESIS	9
3. OBJETIVOS	10
4. ANTECEDENTES	11
4.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs)	11
4.1.1 Importancia ambiental	11
4.1.2 Formación de HAPs	11
4.1.3 HAPs y su relación con el cáncer	13
4.1.4 Contaminación en aguas	16
4.1.5 Métodos tradicionales de remediación de HAPs	18
4.2 PROCESOS DE BIOREMEDIACIÓN APLICADOS A HAPs	21
4.2.1 Mecanismo de remoción de contaminantes por microorganismos	21
4.2.1.1 Adsorción y absorción	21
4.2.1.2 Transformación y degradación	22
4.2.2 Factores que afectan a la degradación de HAPs	23
4.2.2.1. Condiciones ambientales	24
4.2.2.2 Factores dependientes del contaminante	24
4.2.3 Uso de microorganismos en degradación de HAPs: Hongos y Bacterias	25

4.2.3.1	Biodegradación por bacterias	29
4.2.3.2	Biodegradación por hongos	34
4.2.4	Empleo de microalgas para la biodegradación de HAPs	36
4.3	EFS Y DMFS APLICADAS A LA EXTRACCIÓN DE HAPs	42
4.3.1	Extracción en fase sólida (EFS)	42
4.3.1.1	Equilibrio en EFS	43
4.3.1.2	Parámetros que son característicos en el rendimiento de la EFS	47
4.3.1.3	Procedimiento de la extracción en fase sólida	47
4.3.2	Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)	50
4.3.2.1	Procedimiento de la dispersión de matriz en fase sólida	53
4.3.2.2	Parámetros importantes en el proceso de DMFS	54
4.3.2.3	Diferencias entre DMFS y EFS	55
4.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS DE HAPs	56
4.4.1	Cromatografía de Gases (CG)	56
4.4.2	Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	57
4.4.3	Acoplamiento CLAR/CGAR-EM	57
4.5	VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	58
4.5.1	Clasificación de los métodos analíticos	58
4.5.2	Características del proceso de validación	60
4.5.2.1	Especificidad	60
4.5.2.2	Exactitud	60
4.5.2.3	Precisión	61

4.5.2.4	Reproducibilidad	61
4.5.2.5	Linealidad	62
4.5.2.6	Rango dinámico lineal	62
4.5.2.7	Límite de detección y cuantificación	62
4.5.2.8	Robustez	62
4.5.3	Empleo de la revalidación ó verificación de un método analítico.	63
5.	METODOLOGÍA	64
5.1	MATERIALES Y EQUIPOS	64
5.2	CULTIVOS DE MICROALGAS	66
5.3	DESARROLLO DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA EL ANÁLISIS DE METABOLITOS DE HAPs	67
5.3.1	Factores de retención	67
5.3.2	Condiciones de elución	67
5.3.3	Longitudes de onda de trabajo	67
5.4	VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA LOS METABOLITOS DE LOS HAPs	68
5.4.1	Límites de detección y cuantificación	68
5.4.2	Repetibilidad y rango dinámico lineal.	68
5.4.3	Curva de calibración.	68
5.5	VERIFICACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HAPs	69
5.5.1	Repetibilidad y reproducibilidad.	69
5.5.2	Curva de calibración	69

5.6	MÉTODOS EFS-CLAR/FL/UV Y DMFS-CLAR/FL/UV	69
5.6.1	Metabolitos de los HAPs por EFS-CLAR/FL y DMFS-CLAR/FL	69
5.6.1.1	Revalidación del método EFS-CLAR/FL	69
5.6.1.2	Revalidación del método DMFS-CLAR/FL	71
5.6.2	Método para HAPs por EFS-CLAR/FL y DMFS-CLAR/FL	72
5.6.2.1	Revalidación del método EFS-CLAR/UV	72
5.6.2.2	Verificación del método DMFS-CLAR/UV	72
5.7	ENSAYOS DE EXPOSICIÓN	73
5.7.1	Crecimiento de la microalga en medio líquido contaminado	73
5.7.2	Ensayos de exposición con mezcla de HAPs (BaA, BbF, BkF, BaP) a concentración de 266 µg/L con la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> (3×10^6 células mL ⁻¹) en función del tiempo (0.75, 1, 3, 8, 16, 24 y 48 h) a 25°C	74
5.7.3	Ensayos de exposición con mezcla de HAPs (BbF, BkF) a concentración de 266 µg/L con la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> (5×10^6 células mL ⁻¹) en función del tiempo (16, 24, 48 y 76h) a 25 C	75
5.8	ANÁLISIS POR CLAR-EM	76
6.	RESULTADOS	78
6.1	DESARROLLO DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA EL ANÁLISIS DE METABOLITOS DE HAPs	78
6.1.1	Determinación de factores de retención (k')	78
6.1.2	Condiciones de elución	82
6.1.3	Establecimiento de las longitudes de onda de trabajo	82
6.2	VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA LOS METABOLITOS DE LOS HAPs	85

6.2.1	Límites de detección y cuantificación	85
6.2.2.	Repetibilidad y linealidad	87
6.3	VERIFICACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS HAPs	89
6.3.1	Repetibilidad y reproducibilidad	89
6.3.2	Curvas de calibración	89
6.4	MÉTODOS EFS-CLAR/FL/UV Y DMFS-CLAR/FL/UV	90
6.4.1	Metabolitos de los HAPs por EFS-CLAR/FL y DMFS-CLAR/FL	90
6.4.1.1	Revalidación del método EFS-CLAR/FL	90
6.4.1.2	Revalidación del método DMFS-CLAR/FL	91
6.4.2	Método para HAPs por EFS-CLAR/FL y DMFS-CLAR/FL	93
6.4.2.1	Revalidación del método EFS-CLAR/UV	93
6.4.2.2	Verificación del método DMFS-CLAR/UV	95
6.5	ENSAYOS DE EXPOSICIÓN	96
6.5.1	Crecimiento de la microalga en medio líquido contaminado	96
6.5.2	Ensayos de exposición con mezcla de HAPs (BaA, BbF, BkF, BaP) a concentración de 266 µg/L con la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> (3×10^6 células/mL) en función del tiempo (0.75, 1, 3, 8, 16, 24 y 48 h) a 25°C	99
6.5.2.1	Cuantificación de HAPs	99
6.5.2.2	Cuantificación metabolitos	104
6.5.2.2.1	Metabolitos del BaA	107
6.5.2.2.2	Metabolitos del BaP	111
6.5.2.2.3	Metabolitos del BbF y BkF	113

6.5.3	Ensayos de exposición con mezcla de HAPs (BbF, BkF) a concentración de 266 µg/L con la microalga <i>Scenedesmus acutus</i> (3×10^6 células/mL) en función del tiempo (16, 24, 48 y 76h) a 25°C	118
6.5.4	Comparación de la degradación de la mezcla de BbF y BkF con <i>Scenedesmus acutus</i> y <i>Selenastrum capricornutum</i>	123
6.6	ANÁLISIS POR CLAR-EM	126
6.6.1	Dihidrodióles del BaP	129
6.6.2	Dihidrodióles del BaA	130
6.6.3	Dihidrodióles de BbF y BkF	131
6.6.4	Análisis de muestras	131
7	CONCLUSIONES	140
8.	PERSPECTIVAS	143
9.	BIBLIOGRAFÍA	146
10.	ANEXOS	175

ABREVIATURAS

BaA	Benzo(a)antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
BbF	Benzo(b)fluoranteno
BkF	Benzo(k)fluoranteno
CEDER	Center for Drug Evaluation and Research- Centro de Evaluación e Investigación de Fármacos
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
CLAR-EM	Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas
CV	Coefficiente de Variación
DAD	Diodes Array Detector- Detector de Arreglo de Diodos
DMFS	Dispersión de Matriz en Fase Sólida
EFS	Extracción en Fase Sólida
EFS-CLAR/FL	Método Extracción Fase Sólida-Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección de Fluorescencia
EFS-CLAR/UV	Método Extracción Fase Sólida-Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección Ultravioleta
EM	Espectrometría de Masas
ESI	Electrospray Ionization (Ionización electro-espray)
FDA	Food & Drug Administration-Administración de Medicamentos y Alimentos

FID	Flame Ionization Detector (detector de ionización por llama)
FL	Fluorescencia
FLU	Fluoranteno
HAP	Hidrocarburo Aromático Policíclico
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
Koc	Coefficiente de partición carbón-agua
Kow	Coefficiente de partición octanol-agua
MC	Muestra Control
ME	Muestra Expuesta
MFO	Mixed Function Oxidase (Oxidasa de Función Mixta)
mM	miliMolar
P.E.	Punto de Ebullición
P.F.	Punto de Fusión
PIR	Pireno
SIM	Selective ión Monitoring (Monitoreo del ión Selectivo)
SPME	Solid Phase Microextraction (Microextracción en Fase Sólida)
USEPA	United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos)
UV	Ultravioleta
VOCs	Volatil Organic Compounds (Compuestos Orgánicos Volátiles)

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Propiedades fisicoquímicas de los HAPs involucrados en la presente investigación.	14
Tabla 2.	Reporte de concentraciones de HAPs en diferentes aguas.	18
Tabla 3.	Aplicación de hongos y bacterias en la biodegradación de HAPs.	28
Tabla 4.	Reportes del empleo de microalgas en la remoción de HAPs.	38
Tabla 5.	Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos de estudio.	39
Tabla 6.	Estudios realizados con <i>S. capricornutum</i> y <i>S. acutus</i> en la biorremediación de HAPs.	41
Tabla 7.	Comparación de las condiciones de extracción (tiempo, cantidades, LD y LC) entre la extracción fase sólida y la extracción líquido-líquido	44
Tabla 8.	Algunos parámetros de caracterización para dispositivos de extracción en fase sólida (EFS).	48
Tabla 9.	Comparación entre diferentes metodologías para la extracción de HAPs en matrices sólidas.	52
Tabla 10.	Reportes sobre el empleo de sistemas cromatográficos en el análisis de HAPs.	59
Tabla 11.	Valores de k'_w y k_{ow} para los metabolitos de interés.	81
Tabla 12.	Resumen de los resultados obtenidos de la determinación de espectros de fluorescencia.	83
Tabla 13.	Límites de detección y cuantificación ($\mu\text{g/L}$) para los metabolitos estudiados de acuerdo a su orden de elución.	86
Tabla 14.	Linealidad para la curva de calibración de los metabolitos y relación entre las pendientes de la curva a diferentes longitudes de onda.	87
Tabla 15.	Resultados obtenidos para la separación analítica de los HAPs de estudio.	88
Tabla 16.	Resultados obtenidos para la repetición del sistema cromatográfico.	89
Tabla 17.	Linealidad y límites de detección y cuantificación para los HAPs.	90
Tabla 18.	Linealidad del método, límites de detección y cuantificación encontrados para EFS-CLAR/FL.	91
Tabla 19.	Linealidad del método, límites de detección y cuantificación encontrados para DMFS-CLAR/FL.	92
Tabla 20.	Comparación de los porcentajes de recobro y coeficiente de variación de extractos de HAPs en agua y medio de cultivo de <i>S. capricornutum</i> .	94
Tabla 21.	Porcentaje de remoción y degradación de los HAPs expuestos a la especie <i>S. capricornutum</i> en función del tiempo.	102
Tabla 22.	Cantidad medida de cada metabolito en función del tiempo.	104
Tabla 23.	Cantidad de metabolitos en medio de cultivo y biomasa de metabolitos de BbF y BkF.	119
Tabla 24.	Posibles fragmentos calculados teóricamente por ionización negativa para el sistema electrospray.	128

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) considerados cancerígenos por la EPA, Mut (Mutagenicidad), + Prueba de Ames positiva, - Prueba de Ames negativa, Can. (Cancerogenicidad) U. No clasificado, A. Probable cancerígeno, B. Posible cancerígeno.	12
Figura 2.	Mecanismo de mutagenicidad de los HAPs, CPYs (citocromo P ₄₅₀) mEH (hidrolasa epóxido mitocondrial) GST (glutathiona S-transferasa).	17
Figura 3.	Oxidación del BaA con oxígeno singulete y generación de endoperóxidos.	20
Figura 4.	Mecanismo de la oxidación del BaA con ozono.	20
Figura 5.	Metabolismo general de xenobióticos por plantas.	23
Figura 6.	Mecanismo general de biodegradación de un HAP por hongos y bacterias.	26
Figura 7.	Mecanismo propuesto para el metabolismo del fluoranteno por bacteria.	27
Figura 8.	Ruta catabólica de degradación del naftaleno en <i>Pseudomona putida</i> .	30
Figura 9.	Ruta de degradación del pireno en <i>M. vanbaalenii</i>	32
Figura 10.	Mecanismo propuesto para la degradación del BaP por bacterias.	33
Figura 11.	Activación metabólica del BaP.	34
Figura 12.	Mecanismo propuesto para la degradación del antraceno por <i>I. lacteum</i> .	35
Figura 13.	Microalgas <i>S. capricornutum</i> (a) y <i>S. acutus</i> (b) empleados en la biodegradación de HAPs.	36
Figura 14.	Influencia de la concentración del analito en el efluente sobre la adición de volumen de solución (curva de fuga)	47
Figura 15.	Procedimiento general de la EFS.	49
Figura 16.	Procedimiento de extracción por DMFS.	54
Figura 17.	Metodología de extracción fase sólida para la extracción de metabolitos y HAPs del medio de cultivo	71
Figura 18.	Metodología de dispersión de matriz en fase sólida para la extracción de metabolitos y HAPs de la biomasa	72
Figura 19.	Procedimiento de exposición de HAPs a las microalgas de estudio	76
Figura 20.	Estimación de los valores de log k' _w y tendencia lineal para a) los metabolitos dihidrodioles y b) hidroxi del BaP con diferente relación de metanol en la fase móvil.	79
Figura 21.	Estimación de los valores de log k' _w y tendencia lineal para los metabolitos dihidrodioles del BaA, BbF y BkF con diferente relación de metanol en la fase móvil.	80
Figura 22.	Cromatograma obtenido del estándar de la solución de metabolitos a una concentración de 12 µg/L ($\lambda_{ext.}$ 260 nm and $\lambda_{em.}$ 410 nm) con el gradiente final a) metabolitos del BaP (1) 9,10-dBaP, (7)4,5-dBaP, (9)7,8-dBaP, b) metabolitos del BaA (4) 5,6-dBaA (5) 8,9-dBaA, (6) 10,11-dBaA, c) metabolitos del BbF y BkF (2)11,12-dBbF, (3) 1,2-dBbF, (8)8,9-dBkF, (10)9,10-dBbF.	83
Figura 23.	Espectros de fluorescencia obtenidos para el 1,2-dhd-BbF a) excitación b) emisión.	84

Figura 24.	Gradiente final para el método de análisis de metabolitos de estudio a) 260-410nm b)270-438 nm, (1) 9,10-dBaP, (2)11,12-dBbF, (3) 1,2-dBbF, (4) 5,6-dBaA (5) 8,9-dBaA, (6) 10,11-dBaA, (7)4,5-dBaP, (8)8,9-dBkF, (9)7,8-dBaP (10)9,10-dBbF.	86
Figura 25.	Efecto de la presencia de BaP y mezcla de HAPs en el crecimiento de la especie <i>S. capricornutum</i> .	96
Figura 26.	Cantidad remanente (μg) vs tiempo de exposición (h) en medio líquido y biomasa para A) BaA, B) BkF, C) BbF y D) BaP.	101
Figura 27.	Cantidad recuperada de metabolitos del BaA a diferentes tiempos de exposición en a) medio líquido; b) en biomasa; Cantidad total de c1) 5,6-dBaA y c2) 8,9-dBaA/10,11-dBaA.	106
Figura 28.	Cantidad recuperada de metabolitos del BaP a diferentes tiempos de exposición en a) medio líquido; b) en biomasa; Cantidad total de c1) 9,10-dBaP y c2) 7,8-dBaP y c3) 4,5-dBaP.	110
Figura 29.	Cromatograma de a) Solución estándar de metabolitos a 12 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ex.}}$ 260 nm y $\lambda_{\text{em.}}$ 410 nm); b) Solución estándar de metabolitos a 12 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ex.}}$ 270 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 428 nm) y extractos de medio líquido ($\lambda_{\text{ext.}}$ 260 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 410 nm); c) ME 16 h; d) ME 24 h; e) ME 48 h.	112
Figura 30.	Cromatograma de a) Solución estándar de metabolitos a 12 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ex.}}$ 260 nm y $\lambda_{\text{em.}}$ 410 nm); b) Solución estándar de metabolitos a 12 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ex.}}$ 270 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 428 nm) y extractos de biomasa ($\lambda_{\text{ext.}}$ 260 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 410 nm); c) ME 16 h; d) ME 24 h; e) ME 48 h.	113
Figura 31.	Cantidades recuperadas de metabolitos de BbF y BkF con respecto al tiempo en exposición con <i>S. capricornutum</i> a) Medio líquido; b) Biomasa. Cantidad total de c1)1,2-dBbF, c2)8,9-dBkF, c3)9,10-dBbF.	114
Figura 32.	Cromatogramas a $\lambda_{\text{ex.}}$ 270 nm y $\lambda_{\text{em.}}$ 428 nm de a) Solución de metabolitos a 20 $\mu\text{g/L}$; y extractos de medio líquido de b) ME 8 h; c) ME 16 h; d) ME 24 h; e) ME 48 h.	117
Figura 33.	Cromatogramas a $\lambda_{\text{ex.}}$ 270 nm y $\lambda_{\text{em.}}$ 428 nm de a) Solución de metabolitos a 20 $\mu\text{g/L}$; y extractos de biomasa de b) ME 8 h; c) ME 16 h; d) ME 24 h; e) ME 48 h.	118
Figura 34.	Cantidades recuperadas de metabolitos de BbF y BkF con respecto al tiempo en exposición con <i>S. acutus</i> a) Medio líquido; b) Biomasa. Cantidad total de c1)1,2-dBbF, c2)8,9-dBkF, c3)9,10-dBbF.	121
Figura 35.	Cromatograma de extracción del medio líquido para determinación de dihidrodioles de la exposición de la mezcla de BbF y BkF a)16h b)24h c)48h d)72h e)96h de exposición y f) Estándar de 15 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ext.}}$ 270 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 428 nm) de mezcla de dihidrodioles 2). 11,12-dBbF, 3)1,2-dBbF; 8)8,9-dBkF y 10) 9,10-dBbF.	122
Figura 36.	Cromatograma de extracción de la biomasa para determinación de dihidrodioles de la exposición de la mezcla de BbF y BkF a)16h b)24h c)48h d)72h e)96h de exposición y f) estándar de 15 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ext.}}$ 270 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 428 nm) de mezcla de dihidrodioles 2). 11,12-dBbF, 8)8,9-dBkF y 10) 9,10-dBbF.	123
Figura 37.	Comparación de las cantidades obtenidas para los 3 metabolitos en medio líquido (a1, b1 y c1) y biomasa (a2, b2 y c2) en las exposiciones con <i>S. capricornutum</i> (rojo) <i>S. acutus</i> (azul).	124

Figura 38.	Cromatograma de extractos obtenidos a 48h de exposición para a) biomasa <i>Scenedesmus</i> b) medio líquido <i>Scenedesmus</i> c) biomasa <i>Selenastrum</i> y d) medio líquido <i>Selenastrum</i> .	127
Figura 39.	Corriente iónica total para los metabolitos dihidrodioles del BaP.	129
Figura 40.	Corriente iónica total para los metabolitos hidroxilados del BaP.	130
Figura 41.	Corriente iónica total para los metabolitos dihidrodioles del BaA.	130
Figura 42.	Corriente iónica total para los metabolitos dihidrodioles del BbF y BkF.	131
Figura 43.	Metabolitos generados en la biodegradación de BaP por enzimas di-oxigenasas.	133
Figura 44.	Metabolitos generados en la biodegradación de BaA por enzimas di-oxigenasas.	135
Figura 45.	Corriente iónica total y fragmentogramas para la muestra de medio líquido de la exposición de la mezcla de los 4 HAPs con <i>S. capricornutum</i> durante 24 h.	136
Figura 46.	Corriente iónica total y fragmentogramas para la muestra de biomasa de la exposición de la mezcla de los 4 HAPs con <i>S. capricornutum</i> durante 24 h.	137
Figura 47.	Metabolitos formados por los HAPs estudiados con <i>S. capricornutum</i> y <i>S. acutus</i> en posición <i>cis</i> , el símbolo.	139

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Pruebas de regresión lineal para los estándares de dihidrodioles de cada HAP por SPSS.	176
Anexo 2.	Prueba t de muestras relacionadas para las pendientes de las curvas de calibración de metabolitos y prueba Duncan a las dos longitudes de absorción y emisión.	179
Anexo 3.	Análisis estadístico para la validación del sistema cromatográfico en la determinación de HAPs.	181
Anexo 4.	Pruebas de regresión lineal para el método EFS-CLAR/FL para los dihidrodioles.	184
Anexo 5.	Comparación entre los valores medios del control y las diferentes mezclas adicionadas al cultivo para evaluar su crecimiento.	188
Anexo 6.	Prueba t de medias de muestras relacionadas para las concentraciones de HAPs recuperadas en la exposición con <i>S. capricornutum</i> .	189
Anexo 7.	Cromatogramas de medio líquido y biomasa de la exposición de la mezcla de HAPs a <i>Selenastrum capricornutum</i> a diferentes tiempos.	190
Anexo 8.	Análisis estadístico para los datos obtenidos en las exposiciones de BbF y BkF.	192
Anexo 9.	Corriente iónica total y fragmentograma obtenido de cada metabolito.	194
Anexo 10.	Resumen de fragmentos encontrados para los metabolitos tipo dihidrodiol en estándares y muestras.	198
Anexo 11	Artículo publicado como resultado de la investigación	199

RESUMEN

En este trabajo se desarrollaron metodologías analíticas para la determinación de una mezcla de cuatro hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) a saber benzo(a)pireno (BaP), benzo(a)antraceno (BaA), benzo(b)fluoranteno (BbF) y benzo(k)fluoranteno (BkF) por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección por ultravioleta (UV); y diez metabolitos dihidroxilados: 9,10-dihidrodiol del BaP, 4,5-dihidrodiol del BaP, 7,8-dihidrodiol del BaP, 5,6-dihidrodiol del BaA, 8,9-dihidrodiol del BaA, 10,11-dihidrodiol del BaA, 1,2-dihidrodiol del BbF, 10,11-dihidrodiol del BbF, 11,12-dihidrodiol del BbF y 8,9-dihidrodiol del BkF por CLAR con detección por fluorescencia (FL), en muestras de cultivos líquidos de microalgas, empleando la extracción en fase sólida (EFS) y dispersión de matriz en fase sólida (DMFS). Se utilizaron cultivos de *Selenastrum capricornutum* (Utex 1648) y *Scenedesmus acutus* (Utex B72) adquiridos de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Texas (Austin), que han sido reportados por su actividad en procesos de biodegradación de HAPs de tres y cuatro anillos y para el BaP como representante de los HAPs de cinco anillos. Se emplearon cultivos de algas con absorbancia de 1.0 μA correspondiente a 5×10^6 células mL^{-1} y en fase de crecimiento medio exponencial para realizar los procesos de biodegradación.

Después de realizar la exposición de la microalga a los HAPs y separar el medio líquido de la biomasa por centrifugación, fue realizada la extracción por EFS y DMFS respectivamente, para la obtención de dos fracciones por cada método de extracción, una con los HAPs remanentes analizadas por CLAR/UV y la otra que contenía los dihidrodioles formados analizados por CLAR/FL. El método de EFS-CLAR/FL/UV fue validado para concentraciones de dihidrodioles entre 0.85 y 21 $\mu\text{g/L}$ (utilizando 15 mL de medio de cultivo) y entre 0.1 y 4.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para los HAPs, mientras para el método DMFS-CLAR/FL/UV las concentraciones de dihidrodioles entre 0.5 y 20 ng/mg y para los HAPs entre 0.1 y 4.0 $\mu\text{g/mg}$. Los valores del estadístico de Pearson (R^2), asociados a la linealidad del método de cuantificación por curva de calibración para los metabolitos, son superiores a 0.992 para el método de extracción en fase sólida y 0.985 para los de dispersión de matriz en fase sólida, los coeficientes de variación que indican la dispersión de los resultados obtenidos para los experimentos de biodegradación, se encuentran entre

el 2.3 y el 8.4% para el primero y entre el 0.7 y el 5.4% para el segundo. Estos métodos permitieron el seguimiento de la exposición de la mezcla de los cuatro HAPs a la especie *S. capricornutum* y de mezcla de BbF y BkF a *S. acutus* demostrándose que ambas especies, son capaces de bioacumular y biodegradar generando dihidrodioles del tipo *cis*-dihidrodioles, que podría ser originados por enzimas di-oxigenasas, como resultado de la incorporación de los dos átomos de una molécula de oxígeno al núcleo. Finalmente, se encontró que la especie *S. acutus*, aunque alcanza el valor de absorbancia de 1.0 (correspondiente a 3×10^6 células/mL) en menor tiempo (10 a 15 días) que la *S. capricornutum* (27 a 29 días), es más lenta en el proceso de biodegradación (24h contra 48 y 72h respectivamente) y con menor cantidad de metabolito generado.

ABSTRACT

In this work, analytical methodologies were developed for the determination of a mixture of four polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) namely benzo(a)pyrene (BaP), benzo(a)anthracene (BaA), benzo(b)fluoranthene (BbF) and benzo(k)fluoranthene (BkF) by and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) and by HPLC with fluorescence (FL) detection, ten metabolites such as 9,10-dihydrodiol BaP, 4,5-dihydrodiol BaP, 7,8-dihydrodiol BaP, 5,6-dihydrodiol BaA, 8,9-dihydrodiol BaA, 10,11-dihydrodiol BaA, 1,2-dihydrodiol BbF, 10,11-dihydrodiol BbF, 11,12-dihydrodiol BbF and 8,9-dihydrodiol of BkF, in samples of microalgae liquid cultures, using solid phase extraction (SPE) and solid phase matrix dispersion (SPMD). Cultures of *Selenastrum capricornutum* (Utex1648) and *Scenedesmus acutus* (Utex B72) acquired from the culture collection of algae at the University of Texas (Austin), that have been reported as active for biodegradation processes of PAHs of three, four rings and for BaP as representative of five ring PAHs were used. Microalgae cultures with absorbance of 1.0 μA corresponding to 5×10^6 cells mL^{-1} and in mid-exponential growth phase were used to perform the biodegradation processes.

After carrying out the exposure of the microalgae to the HAPs and separating the liquid medium from the biomass by centrifugation, it was carried out by SPE and SPME respectively, to obtain two fractions for each extraction method, one with the HAPs Remnants analyzed by HPLC-UV and the other containing the formed dihydrodiols analyzed by HPLC-FL. The SPE-HPLC-FL/UV method was validated for concentrations of dihydrodiols between 0.85 and 21 $\mu\text{g/L}$ (using 15 mL of culture liquid) and between 0.1 and 4.0 $\mu\text{g/mL}$ for PAHs, while for the method SPMD-HPLC-FL/UV for concentrations of dihydrodiols between 0.5 and 20 ng/mg and for PAHs between 0.1 and 4.0 $\mu\text{g/mg}$. The values of Pearson coefficient (R^2), associated with the linearity of calibration curve quantification method to metabolites are greater than 0.992 for the method of solid phase extraction and 0.985 for solid phase matrix dispersion, the coefficients of variation indicating the dispersion of the results obtained for biodegradation experiments, are between 2.3 and 8.4% for the first and between 0.7 and 5.4% for the second. These methods allowed the monitoring of the exposure of the mixture of the four HAPs to the S.

capricornutum microalgae and the mixture of BbF and BkF to *S. acutus* microalgae, demonstrating that the two species are capable of bioaccumulating and biodegrading generating dihydrodiols of the type *cis* -dihydrodiol metabolites as a result of the incorporation of the two atoms of an oxygen molecule to the aromatic nucleus, what could apparently be caused by dioxygenase enzymes. Finally, it was found that species *S. acutus*, although it reaches the absorbance value of 1.0 (corresponding to 3×10^6 cells/mL) in less time (10 to 15 days) than *S. capricornutum* (27 to 29 days), is slower in the process of biodegradation (24 hours against 48 and 72 hours respectively) and with less amount of metabolite generated.

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), son históricamente los primeros contaminantes en ser reconocidos como posibles causantes de tumores en humanos [Sarigiannis *et al.*, 2015 y Li *et al.*, 2018], por su abundancia, propiedades mutagénicas y cancerogénicas, se han situado en las listas de contaminantes orgánicos altamente peligrosos, y persistentes, por estas razones, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) [Yan *et al.*, 2004 y Idowu *et al.*, 2019], han reglamentado el control de estas sustancias en el medio ambiente. En los últimos años ha aumentado el interés por la eliminación de los HAPs de cuerpos de agua con el empleo de metodologías de biodegradación, y la razón es que son considerados métodos versátiles y flexibles, ya que, entre otras características, pueden ejecutarse en condiciones aerobias [Kuppusamy *et al.*, 2016] o anaerobias [Li *et al.*, 2015 y Nzila, 2018] y emplear organismos autóctonos del sitio contaminado ó incorporar otros foráneos, y/o de forma *in situ* ó *ex situ* (en inglés *on site* y *off site*). Ahora bien, es cierto que no todos los contaminantes son susceptibles de ser biodegradados, pero los reportes muestran el empleo de microorganismos con éxito en la degradación de contaminantes en suelos [Dias *et al.*, 2012 y Sagarkar *et al.*, 2013], HAPs y VOCs en diferentes matrices [Biswas *et al.*, 2015] y últimamente en la biodegradación de contaminantes emergentes [Thelusmond *et al.*, 2018] dan una idea de la necesidad de ampliar los estudios.

Diferentes tipos de microorganismos (principalmente hongos y bacterias) [Kadri *et al.*, 2017 y Rabodonirina *et al.*, 2019] y plantas superiores [Xiao *et al.*, 2015] han sido reportados en estudios de biodegradación de HAPs de 2 hasta 4 anillos [Yu *et al.*, 2011 y Sungthong R. *et al.*, 2015]. Se ha establecido que la degradación aeróbica de HAPs en bacterias, es generalmente iniciada por la acción de las di-oxigenasas que catalizan la incorporación de dos átomos de oxígeno y dos electrones desde el NADH para formar *cis*-dihidrodiolos que son posteriormente degradados mediante la ruptura del anillo y la eventual formación de intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Por otro lado, Heitkamp *et al.* (1988), reportaron, que se ha encontrado también en bacterias que los HAPs pueden ser metabolizados por el citocromo P450 y emplear mono-oxigenasas para formar *trans*-dihidrodiolos, y reportan que la actividad de las mono-oxigenasas es generalmente mucho

menor que la de las di-oxigenasas cuando se encuentran en el mismo organismo. Se conoce poco acerca de cómo los HAPs atraviesan las membranas bacterianas para alcanzar las enzimas catabólicas presentes en el citoplasma, se han incluido en la discusión la difusión pasiva y la captación dependiente de energía, la cual se activaría durante el crecimiento en medios contaminados con HAPs y donde éstos son la única fuente de carbono [Neher y Lueking, 2009].

En cuanto a especies de hongos también se han empleado como degradadores de HAPs, [Silva *et al.*, 2009 y Jia *et al.*, 2011] y se han implementado varias pruebas de actividad donde las protagonistas han sido las enzimas fúngicas, las cuales se consideran una buena opción para la degradación de los HAPs [Kadri *et al.*, 2017], la producción de enzimas lignolíticas como la lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa y la lacasa que tienen una especificidad extremadamente reducida [Davis *et al.*, 1993] debido a la dependencia de la estructura irregular de la lignina [Haritash y Kaushik, 2009] son las causantes de la capacidad degradadora de los hongos. Reportes recientes indican que las peroxidases extracelulares son responsables de la oxidación inicial de los HAPs [Betts, 2012; Li *et al.*, 2014 y Zhang *et al.*, 2015] ya que oxidan directamente, mientras que las peroxidases de manganeso las co-oxidan indirectamente a través de la peroxidación de lignina, generando diferentes metabolitos de tipo cetónico, hidróxido y en menor cantidad *trans*-dihidrodióles. [Vyas *et al.*, 1994 y Kadri *et al.*, 2017]

El papel de las microalgas en el campo de la biodegradación de HAPs es menos conocido y la literatura es aún limitada. Cerniglia *et al.* (1980), reportaron dieciocho especies de microalgas de diferentes grupos taxonómicos, que fueron capaces de metabolizar naftaleno (de 0.1 a 2.4%). La especie *Selenastrum capricornutum* y *Scenedsemus acutus*, entre otras, también pudieron metabolizar el benzo[a]pireno en diferente medida de acuerdo con Schoeny *et al.* (1988). Posteriormente en la revisión de Juhasz y Naidu (2000), se reportaron diecinueve especies empleadas en la degradación de naftaleno, fenantreno, pireno y benzo[a]pireno. Lei *et al.* (2003), informaron que seis especies, entre ellas la *Selenastrum capricornutum*, degradaron entre el 34 y el 100% de concentraciones de 0.1 mg/L de pireno en siete días. Lika y Papadakis (2009) reportan en su estudio de simulación sobre la biodegradación de fenoles por microalgas, que una célula de

microalga tiene la capacidad de producir biomasa a través de la asimilación autótrofa (captación de luz y carbono inorgánico disuelto), la asimilación heterótrofa (captación de carbono orgánico disuelto) y, en menor medida, a través de la biodegradación de fenoles. Recientemente Papazi *et al.* (2019), al realizar estudios de biodegradación de clorofenoles con la especie *Scenedesmus obliquus* concluye que la microalga parece seguir dos estrategias distintas; La primera, cuando está rodeada por compuestos fenólicos tóxicos de bajo peso molecular (fenol, monoclorofenoles, entre otros), usan sus reservas de energía para aumentar la producción de biomasa y no ocurre biodegradación. Mientras, que cuando está rodeada de clorofenoles superiores (triclorofenoles, tetraclorofenoles, etc.) invierten sus reservas de energía en la biodegradación de los compuestos, y nada en el aumento de la biomasa. La forma en que las microalgas realizan la eliminación de los HAPs del medio ambiente, es desconocida, el mecanismo asociado a la interacción entre el contaminante y el microorganismo, podría ser mediante procesos de adsorción (biosorción), ó absorción (bioacumulación) y con respecto a la degradación (biodegradación ó biotransformación), no hay una concordancia en el mecanismo propuesto, algunos autores indican que puede presentarse por la participación de mono-oxigenasas dando como principales productos HAPs mono-sustituidos y en menor cantidad *trans*-dihidrodiol [Chan *et al.*, 2006 y Luan *et al.* 2007] mientras otros se inclinan por la intervención de di-oxigenasas, generando principalmente *cis*-dihidrodiol [Warshawsky *et al.*, 1995 y Haritash y Kaushik, 2009], y que fue corroborado por Olmos *et al.* (2012), quienes reportaron la presencia de dihidrodiol del BaP (4,5- y 9,10-) y García de Llasera y García-Cicourel (2017) que reportan de igual forma la presencia de dihidrodiol en la degradación del BaA (5,6-, 8,9- y 10,11-), concordante con la acción principalmente de enzimas di-oxigenasas.

Para la extracción de los metabolitos tipo dihidrodiol y de HAPs remanentes en el medio de cultivo, se seleccionó la Extracción en Fase Sólida (EFS) por sus ventajas en ahorro de disolvente y su proceso simultáneo de extracción y concentración de analitos. Los antecedentes, muestran su aplicación en la extracción de HAPs en diferentes matrices acuosas [Delhomme *et al.*, 2007; Siemers *et al.*, 2015 y Lorenzo-Parodi *et al.*, 2018] y el adsorbente más reportado es sílice sustituida con cadenas de octadecilos (C18) [Pitarch

et al., 2007 y Hashemi *et al.* 2018]. Por otra parte, para la extracción de los metabolitos de la biomasa (microalgas), la técnica de extracción de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS), permitió la posibilidad de manejar directamente las muestras sólidas, sin etapas previas de tratamientos físicos ó químicos, se ha reportado su empleo en la extracción de HAPs en diferentes matrices sólidas [Concha-Graña *et al.*, 2015 y Hoff y Pizzolato, 2018], pero es importante acotar que aparecen muy pocos reportes en literatura acerca de la aplicación a matrices de biomasa de microalgas [Olmos-Espejel *et al.*, 2012 y García de Llasera *et al.*, 2016].

Para el análisis de metabolitos y HAPs remanentes, los métodos cromatográficos por excelencia han sido los de mayor empleo, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección de fluorescencia (CLAR/FL) [Zhang *et al.*,2010; Denis *et al.*, 2012 y Pang *et al.*, 2018] y el empleo de fase reversa utilizando C18 como fase estacionaria y fases móviles polares tradicionales en la cromatografía de fase reversa como acetonitrilo, metanol y agua [Kayillo *et al.*, 2007 y Ncube *et al.*, 2018].

2. HIPOTESIS

Aprovechando la capacidad para la degradación de HAPs individuales y de bajo peso molecular que se ha evidenciado para la especie *S. capricornutum* en diferentes reportes, se propone evaluar la capacidad en la degradación de una mezcla de cuatro HAPs, uno de cuatro y tres de cinco anillos (BaA, BbF, BkF y BaP) que permita establecer la posible formación de metabolitos tipo dihidrodiol como productos debido a la acción metabólica de enzimas dioxigenasas presentes en las microalgas. El seguimiento de los HAPs remanentes en el medio líquido (contaminado con la mezcla de HAPs) y presentes en la biomasa (como resultado de la biosorción) se realizará empleando cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta (CLAR/UV) y complementariamente, el seguimiento de los metabolitos formados como resultado de la degradación de HAPs, en la biomasa y medio de cultivo por CLAR/FL, evaluando a diferentes tiempos de exposición. Por otra parte, teniendo en cuenta las diversas respuestas metabólicas de las especies de microalgas con los HAPs, se plantea realizar la comparación entre la *S. capricornutum* y la *S. acutus* al degradar una mezcla de BbF y BkF, realizando el seguimiento en la formación de metabolitos tipo dihidrodiol en función del tiempo. Para lograr la separación de los HAPs y los metabolitos se emplean metodologías de extracción de fase sólida (EFS) para el medio de cultivo y dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) para la biomasa, con el fin de obtener el porcentaje de bioremovición (relacionado con el HAP removido del medio de cultivo) y de biodegradación (relacionado con la diferencia entre HAP adicionado al inicio y el encontrado en medio líquido y biomasa en función del tiempo). Con esta información finalmente se espera aportar en el entendimiento del proceso metabólico de la degradación de HAPs de cinco anillos por microalgas.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo tiene como objetivo principal:

1. Desarrollar y validar métodos analíticos para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) prioritarios de 4 y 5 anillos y sus metabolitos del tipo dihidrodiol en cultivos de microalgas, empleando técnicas de extracción basadas en el uso de adsorbentes y cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (CLAR/FL) y espectrofotométrica UV de arreglo de diodos (CLAR/UV). Posteriormente, realizar bioensayos de exposición a los HAPs en mezclas en cultivos de microalgas a diferentes tiempos para elucidar parte del proceso de degradación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Los objetivos específicos planteados son:

1. Implementar y validar un método de extracción en fase sólida y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (EFS-CLAR/FL) para la determinación de metabolitos y con detección por ultravioleta (EFS-CLAR/UV) para HAPs en medio de cultivo contaminado.
2. Verificar la aplicación de un método de extracción por dispersión de matriz en fase sólida y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (DMFS-CLAR/FL) para la determinación de metabolitos y con detección por ultravioleta (DMFS-CLAR/UV) para HAPs en biomasa obtenida de microalgas contaminadas con HAPs.
3. Realizar exposiciones a diferentes tiempos, de medios de cultivo de microalgas *S. capricornutum* y *S. acutus* a una concentración de HAPs para realizar el seguimiento de su disminución y la formación de metabolitos tipo dihidrodiol.

4. ANTECEDENTES

4.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

4.1.1 Importancia Ambiental.

La información asociada a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) es extensa y diversificada, por lo que principalmente se hará mención a los aspectos más relevantes y que se encuentren relacionados con la presente investigación. Los HAPs constituyen una familia de más de 100 compuestos orgánicos diferentes formados por dos ó más anillos bencénicos y en algunos casos unidos a anillos de cinco carbonos, con ó sin sustituyentes sobre sus átomos, sin incluir la presencia de heteroátomos en su estructura. Su efecto perjudicial a nivel ambiental y sobre la salud ha provocado que sean considerados altamente peligrosos y por ello la USEPA [Yan *et al.*, 2004 y Idowu *et al.*, 2019] ha seleccionado 16 (figura 1) como contaminantes cuyo estudio debe considerarse prioritario (en <http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf>). Entre ellos, destacan por sus características altamente cancerígenas el Benzo(a)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Indeno(1,2,3-cd), Pireno, Benzo(k)fluoranteno, Criseno y Benzo(ghi)perileno, los cuales han sido objeto de estudios alrededor del mundo sobre su efecto nocivo [Yang *et al.*, 2014, Bandowe y Nkkansah, 2016 y Meng *et al.*, 2019].

4.1.2 Formación de los HAPs.

Se ha establecido, que los HAPs se producen de tres formas, a saber, los procesos de origen diagenético (como la petrogénesis de la materia orgánica y la formación de carbón), el origen pirolítico (combustión incompleta de compuestos orgánicos) y la biogénesis [Wang *et al.*, 2017 y Adánez *et al.*, 2018]. Generalmente los HAPs debido a su carácter hidrofóbico se encuentran en fases no acuosas, como por ejemplo el petróleo y sus derivados, en la madera ó en actividades antropogénicas como cocinar y fumar, incluso los procesos naturales tales como la carbonización. La presencia en medios acuosos en concentraciones relevantes, es debido a su interacción con materia orgánica [Zhang *et al.*, 2019]. A nivel estructural, se ha encontrado que los HAPs pirogénicos (producidos por combustión) poseen estructuras con un mayor número de sistemas de anillos, que los

petrogénicos (presentes en el petróleo) y generalmente no presentan grupos alquilo en su estructura.

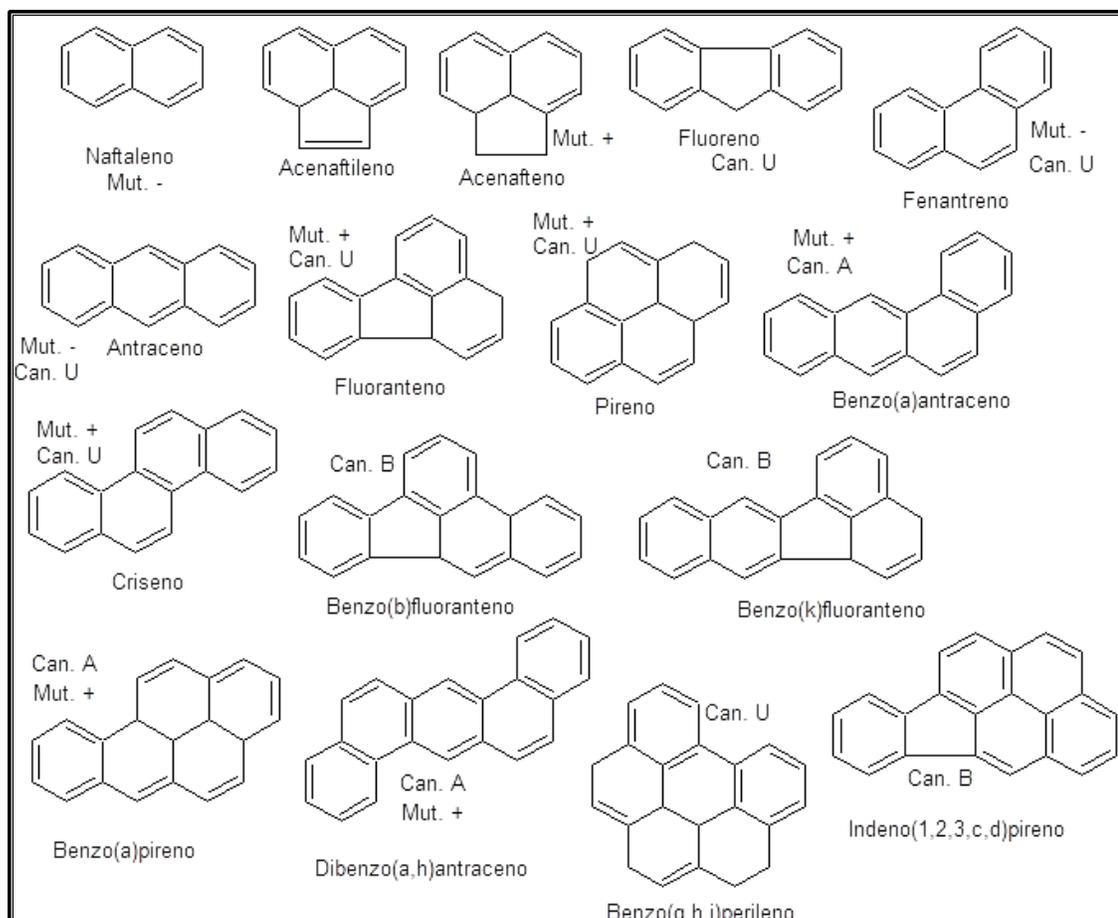


Figura 1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) considerados cancerígenos por la EPA, Mut (Mutagenicidad), + Prueba de Ames positiva, - Prueba de Ames negativa, Can. (Cancerogenicidad) U. No clasificado, A. Probable cancerígeno, B. Posible cancerígeno (adaptado de Sims y Overcash, 1988).

Las fuentes de contaminación de HAPs pueden clasificarse como endógenas, las cuales aparecen como resultado de la rápida aromatización de compuestos durante procesos biológicos de humificación, y reflejan la contribución de fuentes de hidrocarburos como residuos de carbón, y las fuentes exógenas, que incluyen entradas naturales, por ejemplo, la migración del petróleo hacia horizontes más profundos, ó los aportes antropogénicos tales como derrames de combustibles fósiles ó la deposición de partículas del aire que

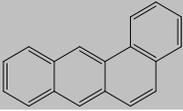
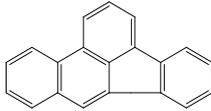
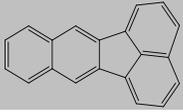
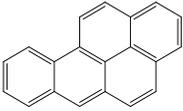
contienen HAPs producidos por el escape de los coches. Además de la influencia de las fuentes de emisión, la temperatura ambiente fue otro factor importante para la concentración y el destino de los HAPs atmosféricos. Generalmente, cuando la temperatura aumenta, las concentraciones en el aire de compuestos orgánicos semivolátiles (VOCs de sus siglas en inglés) aumentan como resultado de una mayor volatilización de las superficies, como el suelo, el agua y la vegetación [Ma *et al.*, 2018].

El transporte y distribución de los HAPs en el medio ambiente depende en gran medida de sus propiedades físico-químicas, tales como su solubilidad en agua, presión de vapor y coeficientes de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) y carbón-agua ($\log K_{oc}$). Los HAPs son estables respecto a la hidrólisis y no poseen grupos reactivos, lo que los convierte en contaminantes altamente persistentes [Kang *et al.*, 2016]. Debido a sus bajas constantes de la ley de Henry [Parnis *et al.*, 2015], la volatilización desde la fase acuosa es un proceso poco común, los elevados valores de $\log K_{oc}$ indican una fuerte adsorción a la materia orgánica en los suelos, así que la migración tampoco es un proceso habitual y finalmente los elevados valores de K_{ow} indican alta bioacumulación. En general, son biodegradables bajo condiciones aeróbicas, pero la velocidad de biodegradación disminuye drásticamente a medida que se incrementa el número de anillos aromáticos en la molécula. Algunas de las propiedades fisicoquímicas importantes de los HAPs que hacen parte de la presente investigación se presentan en la tabla 1.

4.1.3 HAPs y su relación con el cáncer.

La información disponible del mecanismo de contaminación de los HAPs es diversa y para algunos aspectos escasa. Los estudios han logrado determinar que los efectos tóxicos de algunos HAPs sobre la piel están asociados con dermatitis aguda y crónica. La exposición prolongada causa pigmentación, irritación de las vías aéreas superiores [Sarigiannis *et al.*, 2015]. Otros síntomas son lagrimeo, fotofobia, e hiperemia conjuntival [Bortey-Sam *et al.*, 2017], si la exposición es prolongada producen cáncer cutáneo broncogénico, en vejiga; leucemia y linfoma [Ellenhorn, 1997; Bortey-Sam, *et al.*, 2017 y Carrat, *et al.*, 2019].

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs involucrados en la presente investigación.

Compuesto	Fórmula Molecular	Número anillos	P.F. (°C)	P. E. (°C)	Solubilidad agua (µg/L)*	Log Kow	Peso molecular (g/mol)
BaA 	C ₁₈ H ₁₂	4	159	435	14	5.76	228
BbF 	C ₂₀ H ₁₂	5	168	---	1.2	5.78	252
BkF 	C ₂₀ H ₁₂	5	217	480	0.55	6.11	252
BaP 	C ₂₀ H ₁₂	5	179	495	3.8	5.97	252

* 20°C

Son las propiedades de los HAPs, las responsables de la bioacumulación en tejidos grasos y causantes de la aparición de lesiones y tumores en ciertos peces, adicionado a esto, su capacidad de persistir en los sedimentos del lecho acuático ó ser transportados por partículas suspendidas en el agua los hace muy peligrosos [Almeida *et al.*, 2012 y Franco y Lavado 2019]. Se han reportado consecuencias de la interacción de HAPs con aves, plantas y en cultivos de alimentos [Dhananjayan, 2013 y Wang *et al.*, 2017], la capacidad de bioacumulación [Gao *et al.*, 2013] y su efecto en el crecimiento.

La toxicidad de los HAPs depende en gran medida de su estructura química, ya que ha sido asociada con el grado de no-planaridad debido al aumento del carácter olefínico de algunos enlaces aromáticos en la molécula. La presencia de la “región bahía” le confiere a la molécula unas propiedades electrofílicas elevadas que permiten interaccionar con los enlaces covalentes [Kim *et al.*, 2013 y Li *et al.*, 2018].

Como los compuestos originales, los derivados polares de PAH pueden formarse directamente a través de una combustión incompleta y también se pueden formar a través de una variedad de procesos bióticos y abióticos, que incluyen reacciones con los radicales NO_x, O₃ y OH[•] en la atmósfera [Cochran, *et al.*, 2016]. La capacidad de metabolización de los HAPs está ampliamente distribuida en el reino animal, pero suele ser mayor entre los organismos superiores. Una vez incorporados al organismo experimentan una oxidación enzimática, llevada a cabo por el sistema de oxidasas de función mixta (MFO de sus siglas en inglés), ubicado mayoritariamente en el hígado, que los convierte en epóxidos y en dihidrodioles.

Estas especies químicas constituyen la forma genotóxicamente activa de los HAPs, las cuales pueden formar aductos covalentes con proteínas y ácidos nucleicos celulares. Los aductos del ADN pueden provocar mutaciones que pueden resultar en carcinogénesis y teratogénesis. La activación bioquímica es un mecanismo de toxicidad altamente específico y crónico, limitado a un grupo específico de HAPs, además, no todos los organismos están equipados con el sistema enzimático para llevar a cabo la activación bioquímica. El metabolismo de los HAPs en los humanos es mediado por el citocromo P450 (CYP)1A1 en el paso de la oxidación inicial y por la *glutación transferasa* (GST)M1 en el paso de conjugación. Ambas enzimas son polimórficas y se encuentran disponibles para modular los niveles de aductos del ADN [Siddens *et al.*, 2015]. Los pasos de oxidación sucesiva producen predominantemente diol-epóxidos que pueden ser convertidos en carbocationes y unirse covalentemente al ADN. También se producen en estas conversiones enzimáticas especies de oxígeno reactivo (ROS de sus siglas en inglés), que causan daño oxidativo de la membrana celular [Yamazoe y Yoshinari, 2017] y ADN.

En presencia de BaP [Suter *et al.*, 2019] se registró un aumento de las roturas de una sola hebra de ADN en macrófagos alveolares, células pulmonares, linfocitos periféricos y hepatocitos de ratas. Estos aductos de HAP-ADN y ROSs son los sospechosos de origen de toxicidad, carcinogénesis y mutagénesis causada por HAPs. Los HAPs también muestran fototoxicidad cuando se exponen a luz ultravioleta (UV) y la energía de los HAPs activados puede transferirse al oxígeno y generar ROSs, lo que lleva a la alteración de la

membrana celular a través de la peroxidación lipídica [Sen y Field, 2013]. Algunos productos de oxigenación de los HAPs formados en presencia de luz UV son aún más tóxicos que los compuestos progenitores correspondientes [Vázquez-Gómez *et al.*, 2016; Gao P. *et al.*, 2018]. En la figura 2, se muestra un ejemplo de la oxidación del BaP donde se observa la formación de 7,8-epóxidos el cual es transformado en *trans*-dihidrodiol por una epoxi-hidrolasa, este 7,8-*trans*-dihidrodiol puede ser epoxidado en otras posiciones, resultando en algunos casos en diol-epóxidos los cuales tienen un alto potencial cancerogénico y mutagénico. Estos a su vez pueden ser combinados con una glutatona por una glutatión-transferasa, con lo cual ocurre su desintoxicación. Los epóxidos que no son combinados con la glutatona son convertidos a los correspondientes fenoles y dioles ó combinarse con ácido glucurónico ó sulfúrico y posteriormente ser excretados [Mastrangelo *et al.*, 1996 y Vázquez-Gómez *et al.*, 2016].

4.1.4 Contaminación en aguas.

La contaminación por HAPs en aguas superficiales se debe principalmente al depósito atmosférico, escorrentía por suelos contaminados ó de forma directa por efluentes domésticos e industriales [Dos Santos *et al.*, 2018]. Por otra parte, los vertimientos de crudo a los océanos son la principal fuente de contaminación de éstos por HAPs [Lofthus *et al.*, 2018]. Si bien es cierto que la solubilidad en agua de los HAPs no es muy grande, su carácter hidrofóbico no es impedimento para estar presente en todo tipo de agua, algunos ejemplos aparecen en la tabla 2.

Otro aspecto importante es la especie que entra en contacto con estos contaminantes, ya que las que presentan una menor capacidad metabólica hacia los HAPs, como algunas algas mayores, moluscos, mariscos y organismos más primitivos, acumulan grandes cantidades de HAPs a diferencia de especies superiores como pescados y especies mayores, que gracias a su capacidad metabólica les permite excretarlo por la bilis [Wiltse y Dellarco, 1996 y Kammann *et al.*, 2017].

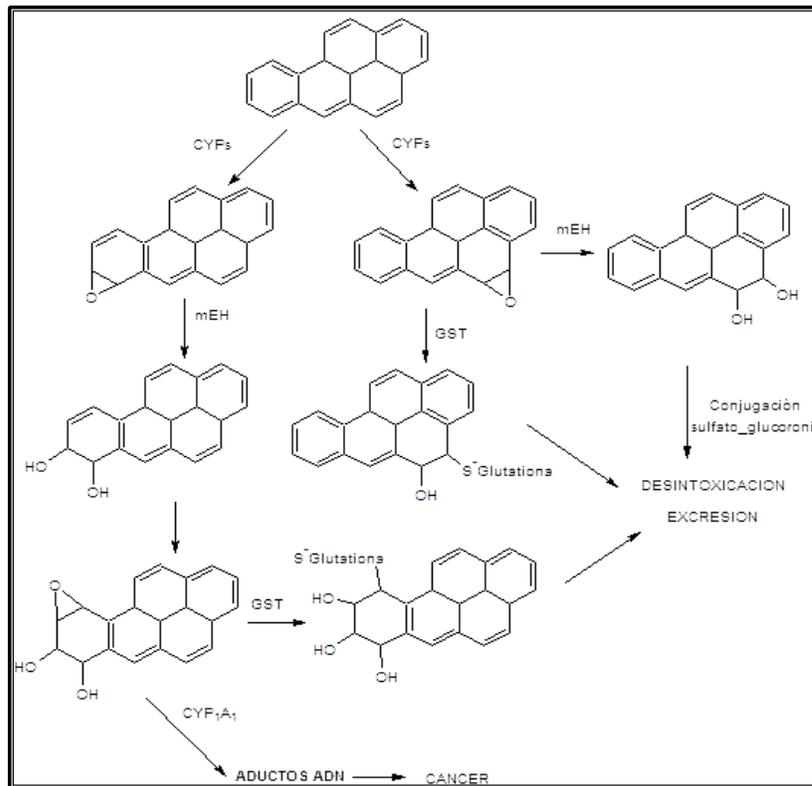


Figura 2. Mecanismo de mutagenicidad de los HAPs, CPYs (citocromo P₄₅₀) mEH (hidrolasa epóxido mitocondrial) GST (glutaciona S-transferasa) (adaptado de Eaton *et al.*, 1998).

Los límites máximos permisibles de HAPs en medios acuosos dependerán del tipo de ambiente en el que se pretenda regular. La USEPA, contempla sólo al BaP para muestras de agua potable con un límite máximo de 0.2 µg/L (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 1995). En México, para el tipo de uso del agua se cuenta con la Ley Federal de Derecho/Disposiciones aplicables en materia de Aguas Nacionales, que establece en la tabla de lineamientos de calidad del agua que el contenido de HAPs dependerá del uso del agua (Comisión Nacional del Agua, CONAGUA, 2014). De manera general los valores de HAPs en aguas superficiales se encuentran entre 0.1 y 830 ng/L, siendo esta mayor que la concentración de aguas de bebida ó subterráneas. Esencialmente, debido a la presencia de sólidos suspendidos que es donde los HAPs tienden a absorberse, los tratamientos de sedimentación y decantación son

fundamentales para disminuir la concentración de estos compuestos, en aguas cuya disposición sea el consumo humano.

Tabla 2. Reporte de concentraciones de HAPs en diferentes aguas.

Tipo de Agua	País	Concentración (ng/L)	N° HAPs ¹	Referencia
Agua bebida	Polonia	50-4200	16	Pogorzelec y Piekarska , 2018
	China	715-15831	16	Liu <i>et al.</i> , 2016
Agua superficial	Brasil	4-119	16	Santos <i>et al.</i> , 2018
	Brasil	260-2100	23	Dos Santos <i>et al.</i> , 2018
Agua de embalse	China	282-427	16	Tan <i>et al.</i> , 2019
Agua subterránea	Brasil	700	16	Santos <i>et al.</i> , 2017
Agua lluvia	China	1264-6614	6	Huang <i>et al.</i> , 2009
	Colombia	4476 ²	16	Sarria-Villa <i>et al.</i> , 2016
Agua de mar	Argentina	12.3- 58	16	Wu <i>et al.</i> , 2011

¹ número de HAPs encontrados en el estudio y reportados por la USEPA

² cantidad total de HAPs

4.1.5 Métodos tradicionales de remediación de HAPs.

En primera instancia, los métodos reportados para remediación de HAPs, tienen relación con la matriz a tratar, para contaminación gaseosa, se han desarrollado técnicas físicas de descargas por arco [Du *et al.*, 2006 y Yu *et al.*, 2010], que han permitido remover HAPs presentes en gases de combustión, reportándose remociones entre el 70 y 98% y de acuerdo con los autores la tasa de destrucción puede alcanzarse al máximo con el gas portador de oxígeno y la resistencia externa de 50 kΩ independientemente del tipo de HAP. El empleo de la tecnología de reactores de plasma, [Chang, 2011 y Wu *et al.*, 2018], para eliminar HAPs producidos de procesos de cocción en hornos eléctricos, ha logrado eficiencias altas con una clara dependencia de la potencia de salida del plasma, esta última aplicación también ha sido empleada en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con HAPs. En la remediación de suelos, los métodos y las estrategias dependerán de la extensión de la contaminación, así como de la concentración y tipos de

contaminantes, por ejemplo, se incluyen la incineración, radiación microondas y desorción térmica, los cuales tienen un costo relativamente alto porque implican la excavación del suelo y el transporte hasta el sitio de la remediación de fuentes que proporcionen el calor necesario para el proceso de eliminación, aunque de acuerdo con varios autores estas metodologías pueden emplearse desde tres enfoques diferentes para la remediación: 1) calentamiento de material contaminado en un horno, 2) calentamiento *in situ* de superficies contaminadas y 3) calentamiento *in situ* del suelo debajo de la superficie [Falciglia *et al.*, 2016 y Krouzek *et al.*, 2018].

Otro tipo de métodos empleados para la eliminación de los HAPs son los métodos químicos y físicos, en cuyos casos primero se extraen, se transfieren a fase gaseosa ó líquida y por último son tratados puntualmente. Por ejemplo, los volátiles se pueden extraer con vacío, aire ó agua en condiciones subcríticas, [Rivas *et al.*, 2009 y Islam *et al.*, 2013], los compuestos no solubles ó no volátiles de alto peso molecular se extraen con la ayuda de agentes tensoactivos [Bouzid *et al.*, 2017], ácidos, ó por oxidación química [Peluffo *et al.*, 2018]. Han sido reportados tratamientos físicos, como lavado de suelo empleando surfactantes no-iónicos [Hahladakis *et al.*, 2013], materiales adsorbentes [Nkansah *et al.*, 2012] ó alternativamente, el uso de corriente eléctrica para favorecer la migración de contaminantes por electro-ósmosis [Lima *et al.*, 2012]. El empleo de técnicas de ultrasonido combinados con procesos de oxidación, como el fenton, han logrado degradaciones hasta del 75% en mezclas de los 16 HAPs reportados por USEPA [Lin *et al.*, 2016]. También el empleo de modificadores como NaCl, CCl₄ ó variaciones de pH [Sponza y Oztekin, 2011], ozonólisis [Yao *et al.*, 1998 y Sakulthaew *et al.*, 2015], fotoquímica y fotocátalisis [Vela, 2012], entre otros, han sido reportados. Por ejemplo, en el caso de los procesos de oxidación, los HAPs reaccionan con oxígeno y ozono y se oxidan en presencia de luz generando comúnmente endoperóxidos que pueden llegar a convertirse en quinonas, dependiendo de la presencia o no, de impedimentos estéricos. El posible mecanismo de la reacción se continúa estudiando ya que el oxígeno en su estado fundamental es una molécula en estado triplete, mientras el hidrocarburo aromático policíclico (HAP) está en estado singulete, lo que supondría una interacción prohibida. En la figura 3, se presenta el mecanismo de oxidación del antraceno (I) con el oxígeno

singlete para generar 9,10-endoperóxidos (II) de donde puede resultar la formación de antraquinona (A), diantracenediona (B) y 1-hidroxiantraquinona (C), los cuales son agentes tóxicos por ingestión y nocivos al contacto.

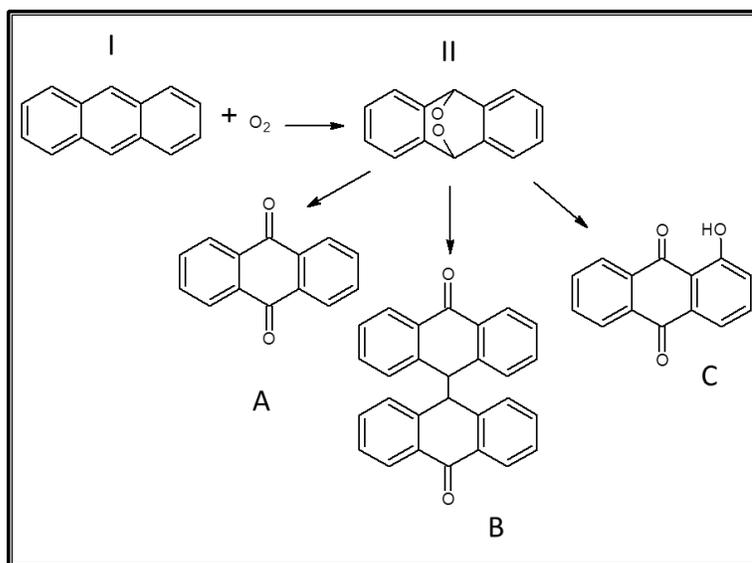


Figura 3. Oxidación del BaA con oxígeno singlete y generación de endoperóxidos.

La reacción del HAP con ozono es conocida y genera diferentes productos, por ejemplo, el BaA puede generar un diácido a través de un ozónido intermediario (figura 4). También han sido reportadas la formación de quinonas al igual que en la oxidación parcial con oxígeno.

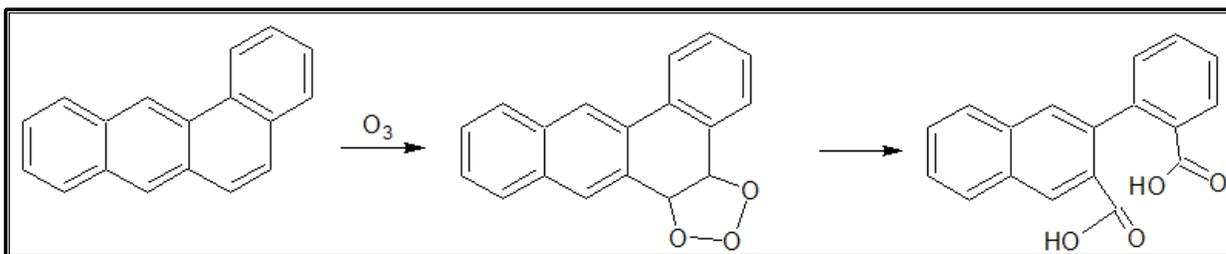


Figura 4. Mecanismo de la oxidación del BaA con ozono.

Se observa que la principal desventaja de estos procesos es la generación de posibles productos que pueden resultar más tóxicos que el mismo HAP padre, es por eso, que en los últimos años el mayor interés de las investigaciones se ha centrado en el empleo de

métodos de biodegradación, inicialmente empleados en el tratamiento de suelos [Kuppusamy *et al.*, 2016 y Liao *et al.*, 2019] y aplicado a HAPs de 3 y 4 anillos. Estos métodos serán objeto de una descripción detallada porque representan la base de nuestro estudio para su posible aplicación en aguas.

4.2 Procesos de biorremediación aplicados a HAPs

Hay un considerable interés en el uso de sistemas biológicos para remediar ambientes contaminados con HAPs. El término biorremediación, se utiliza para denominar procesos que empleando la actividad ó capacidad biológica natural que los organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) poseen para degradar contaminantes, permiten transformar (biotransformación), eliminar o disminuir la toxicidad de contaminantes orgánicos ó inorgánicos, siendo principalmente utilizados microorganismos, porque están ampliamente distribuidos en el ambiente [Das y Dash, 2014]. La biodegradación implica básicamente la conversión de moléculas orgánicas complejas a otras más simples (y en su mayoría no tóxicas). El término biotransformación se utiliza para la biodegradación incompleta de compuestos orgánicos que implican una ó pocas reacciones. Los otros nombres utilizados (por algunos autores) para la biorremediación son el bio-tratamiento, la bio-recuperación y la bio-restauración. Esta estrategia depende de las actividades catabólicas de los organismos y, por tanto, de su capacidad para usar los contaminantes como fuente de carbono y energía [Zouboulis *et al.*, 2018].

4.2.1 Mecanismo de remoción de contaminantes por microorganismos.

Se ha establecido que los microorganismos remueven los contaminantes a través de 3 mecanismos diferentes que son la adsorción (biosorción), absorción (bioacumulación) y la degradación (biodegradación ó biotransformación), las dos primeras ayudan en la remoción del contaminante, y la tercera ofrece una forma de eliminarlos.

4.2.1.1 Adsorción y absorción.

La adsorción es el proceso de asociación fisicoquímica del contaminante a la superficie celular ó paredes celulares, generalmente rápido y tanto células vivas como muertas están disponibles para llevar a cabo adsorción ya que es independiente del metabolismo [Luo *et*

al., 2014]. Existen varios tipos de grupos funcionales en las superficies y paredes celulares que actúan como sitios de adsorción para diferentes contaminantes, específicamente la presencia de grupos como carboxilo, hidroxilo, sulfonato y grupos aminos permiten esta interacción con los contaminantes por medio de intercambio protónico ó iónico [Crist *et al.*, 1981 y Belles *et al.*, 2016]. Los mecanismos más estudiados han sido en metales donde por ejemplo Adhiya *et al.*, (2002) y Birungi y Chirwa, (2015), al estudiar el mecanismo de remoción para cadmio y talio en *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris*, respectivamente establecen que la remoción se llevó a cabo por la presencia de grupos carboxilo y fenol como enlazantes de los metales sobre la pared celular. Por otra parte, los polisacáridos secretados por microorganismos están también involucrados en la adsorción de diferentes contaminantes. Noghabi *et al.*, (2007) reportaron la presencia de contaminantes presentes en la bacteria *Pseudomona fluorescens* al realizar la adsorción de cadmio y mercurio.

En los procesos de absorción, por ejemplo, los contaminantes como metales pesados y compuestos de organoestaño pasan a través de la membrana celular a través de canales y/o portadores y se acumulan dentro de la célula y donde factores como pH y salinidad afectan la velocidad de absorción [White *et al.*, 1999 y Shi *et al.*, 2018]. El transporte activo está a menudo involucrado en este mecanismo de absorción y por lo tanto sólo los sistemas vivos son capaces de absorber contaminantes, es así como por ejemplo se reporta una rápida acumulación de fenantreno en una bacteria *Pseudomonas fluorescens* LP6a al ser tratada con inhibidores de transporte de membrana con el objetivo de que éstos contaminantes lipófilos (como los HAPs) pudieran difundirse pasivamente a través de la pared celular y la membrana celular [Bugg *et al.*, 2000].

4.2.1.2 Transformación y degradación.

Una vez dentro de la célula, el contaminante orgánico es transformado en otras especies químicas producto de rompimientos enzimáticos ó sustituciones con grupos funcionales, por lo que los procesos de degradación solo ocurren en organismos vivos. Para el presente trabajo, el conocimiento de las rutas metabólicas por las cuales las microalgas degradan los HAPs es escaso [Warshawsky *et al.*, 1995; Thies *et al.*, 1996 y Luo *et al.*,

2014]. Sin embargo, el metabolismo de los contaminantes en plantas tal vez pueda dar algunas pistas para entender en algún momento el de las algas (figura 5). Komoβa *et al.*, (1995), establecieron que pueden entenderse diferentes fases asociadas, de tal manera que en la fase I, grupos funcionales como hidroxilo, amino y tiol son introducidos en los contaminantes orgánicos, generando con ello metabolitos más hidrofílicos que posteriormente reaccionan con conjugados como los glucósidos, glutatona ó aminoácidos durante la fase II, y finalmente son asimilados ó separados en la fase III.

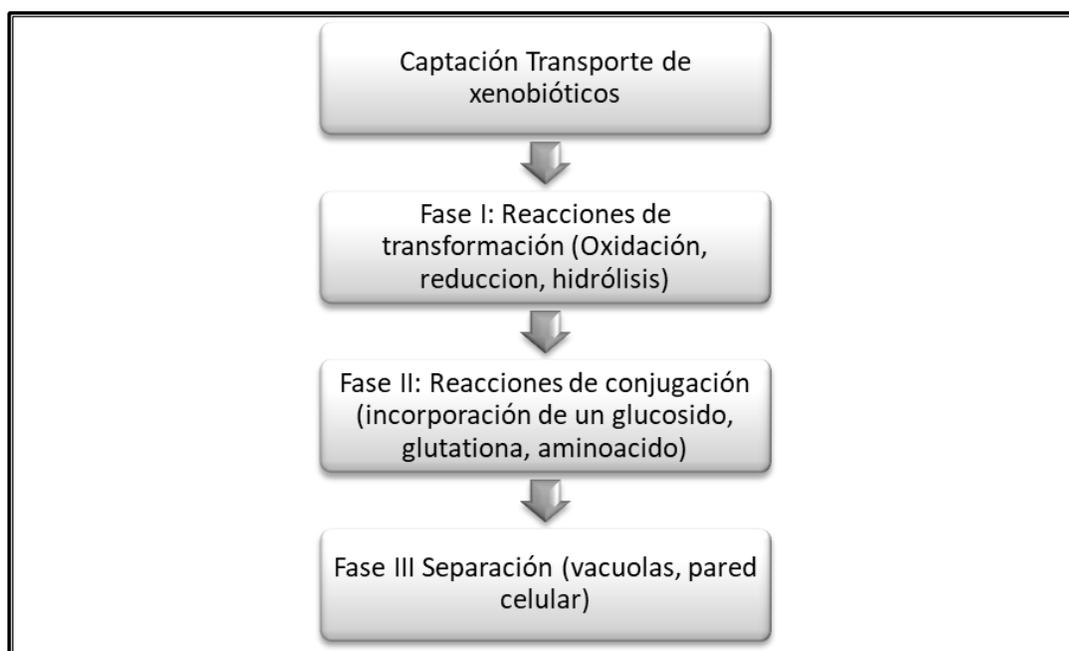


Figura 5. Metabolismo general de xenobióticos por plantas (adaptado de Komoβa *et al.*, 1995).

4.2.2 Factores que afectan a la biodegradación de HAPs.

Hay varios factores que pueden alterar el resultado de los procesos de biorremediación al afectar directamente al microorganismo y la forma en la que degrada el contaminante. Entre los más destacados, se encuentran las condiciones medioambientales, como la presencia de otros tóxicos, pH, temperatura, y humedad (en el caso de suelos), presencia de microorganismos adecuados y la estructura molecular del contaminante y su concentración. A continuación, se menciona al respecto de estos factores.

4.2.2.1 Condiciones ambientales.

La biorremediación de hidrocarburos puede estar asociada a la presencia de altos niveles de otros contaminantes, por ejemplo, la presencia de metales pesados puede volver aún más lento los procesos metabólicos e incluso impedir el crecimiento microbiano ó ser tóxico para el microorganismo [Ke *et al.*, 2010 y Gojkovic *et al.*, 2015]. Por otro lado, se conoce que en condiciones aeróbicas la degradación es un proceso más rápido que en condiciones anaeróbicas [Jones *et al.*, 2008 y Sayara *et al.*, 2010].

La temperatura afecta el crecimiento microbiano, es así como a bajas temperaturas la tasa de degradación es más lenta. La mayoría de los estudios de biodegradación han sido realizados a temperaturas mesofílicas (20-30°C) [Olmos-Espejel *et al.* 2012 y Kadri *et al.*, 2017]. Aunque también hay resultados que han mostrado biorremediaciones exitosas a temperaturas extremas empleando organismos resistentes a estas temperaturas [Whyte *et al.*, 1999 y Pugazhendi *et al.*, 2017]. Para el caso de la *Selenastrum capricornutum*¹ y *Scenedesmus acutus*² el proveedor ha establecido 20°C como la temperatura apropiada para su cultivo.

En cuanto al pH y la salinidad, los valores óptimos para estos procesos dependerán de las condiciones de crecimiento del microorganismo. Una gran cantidad de reportes indican el pH neutro (7.4-7.8) como el más efectivo [Li *et al.*, 2016 y Rios *et al.*, 2017], aunque también a otros pHs se reportaron resultados favorables [Verstraete *et al.*, 1976]. En cuanto a la salinidad dependerá del tipo de microorganismo empleado, se han aislado organismos degradadores en ambientes altamente salinos y que no funcionan en agua dulce.

4.2.2.2 Factores dependientes del contaminante.

Se ha determinado que la biodegradación de HAPs disminuye al aumentar el peso molecular y el número de anillos, debido a un considerable aumento en la hidrofobicidad

¹ Universidad de Texas, <https://utex.org/products/utex-1648>

² Universidad de Texas, <https://utex.org/products/utex-b-0072>

y estabilidad [Cofield *et al.*, 2007]. La concentración del contaminante afecta la biodegradación por dos aspectos, toxicidad e inducción, ésta última referida a la concentración mínima requerida para que el microorganismo realice el proceso de biodegradación [Rodríguez *et al.*, 2013].

Paliwal *et al.*, (2017), establecen en el caso de las microalgas específicamente que los cambios en las condiciones mencionadas inducen que estos microorganismos sintonicen constantemente los mecanismos celulares para hacerle frente a los contaminantes, y que son estos cambios abióticos los responsables de la biosíntesis de los metabolitos. Los autores establecen que las condiciones de crecimiento de cualquier organismo aislado de su hábitat son específicas de la especie ó la cepa, pero en circunstancias extremas producen ciertos metabolitos para superar y aclimatar las condiciones de estrés, que podrían ser bióticas ó abióticas. Las microalgas muestran una gran adaptabilidad hacia los factores de estrés abióticos y producen valiosos metabolitos. Esta característica única de las microalgas puede ser explotada para la producción de los metabolitos deseados a través del estrés abiótico.

4.2.3 Uso de microorganismos en degradación de HAPs: Hongos y Bacterias.

Los microorganismos juegan un papel importante en la eliminación de HAPs en los ecosistemas terrestres y acuáticos, siendo la degradación microbiana el principal proceso de descontaminación natural [Zafra *et al.*, 2017], por lo tanto, es necesario un buen conocimiento y control de este proceso natural para aplicarlo a tecnologías de biorremediación [Xu *et al.*, 2019].

Hay gran variedad de procesos de biorremediación, lo cual ofrece gran versatilidad y flexibilidad, ya que pueden realizarse de manera espontánea ó dirigida. Los procesos de biorremediación de HAPs se han enfocado principalmente a suelos, empleando diferentes tipos de microorganismos (hongos y bacterias) [Kim *et al.*, 2008 y Quintella *et al.*, 2019] y plantas [Talano *et al.*, 2012 y Lu *et al.*, 2019]. Los hidrocarburos son empleados como fuente de carbono para el crecimiento de los microorganismos, lo cual implica una degradación gradual de la molécula para formar al final uno o más fragmentos capaces de entrar en el metabolismo.

De hecho, el uso de microorganismos para la remediación de suelos y lodos contaminados, fue una de las primeras aplicaciones de biorremediación como técnica promisoría, aplicada junto con prácticas convencionales como el relleno en tierra, la incineración ó la extracción con peróxidos y/o aplicando procesos de calentamiento [Rivas *et al.*, 2009 y Gaur *et al.*, 2018]. La aplicación de la biorremediación exige demostrar eficiencia, confiabilidad, predictibilidad de su desempeño en campo y efectividad. En el empleo de bacterias y hongos algunas generalidades para la biodegradación de HAPs fueron reportadas por Cerniglia, 1993 y son resumidos a continuación:

- La velocidad de degradación de los HAPs es inversamente proporcional al número de anillos de la molécula de HAP [Cerniglia y Heitkamp, 1989].
- La degradación microbiana de algunos HAPs de bajo peso molecular como naftaleno, fenantreno, fluoranteno (figura 6), antraceno y acenafteno han sido estudiados y las rutas bioquímicas han sido elucidadas [Gibson y Subramanian, 1984 y Stingley *et al.*, 2004] pero se tiene menos información sobre los microorganismos capaces de utilizar los HAPs de alto peso molecular como fuente de carbono y energía [Barnsley, 1975; Mueller *et al.*, 1990].

Los mecanismos de biodegradación de células procariotas y eucariotas, requieren la presencia de oxígeno molecular para iniciar el ataque enzimático en los anillos de HAPs [Gibson *et al.*, 1975]. También son importantes en el catabolismo de HAPs, otros sistemas de enzimas, tales como las mono-oxigenasas y peroxidases de lignina [Bumpus *et al.*, 1989 y Da Silva *et al.*, 2004].

Existe un gran número de hongos y bacterias que poseen la capacidad de degradar hidrocarburos (tabla 3), reiterando que su empleo ha sido reportado mayormente en hidrocarburos de bajo peso molecular y solo el estudio en el BaP como molécula modelo de estructuras de más de 5 anillos. Los estudios han mostrado la capacidad de degradar estos hidrocarburos de bajo peso molecular en condiciones anaerobias en presencia de aceptores de electrones apropiados (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Fe^{3+} entre otros) [Rainer y Housna, 2011 y Boopathy, 2017], pero se ha establecido que la degradación en presencia de oxígeno es más rápida y extensa. En resumen, los mecanismos bioquímicos involucrados

en la biodegradación de los HAPs empleando hongos y bacterias son conocidos y han sido estudiados, estableciendo que, para los hongos, la biodegradación ocurre por monooxigenasas resultando en la formación de hidroxi-HAPS y en menor cantidad *trans*-dihidrodiol, mientras para las bacterias es a través de di-oxigenasas obteniendo *cis*-dihidrodiol.

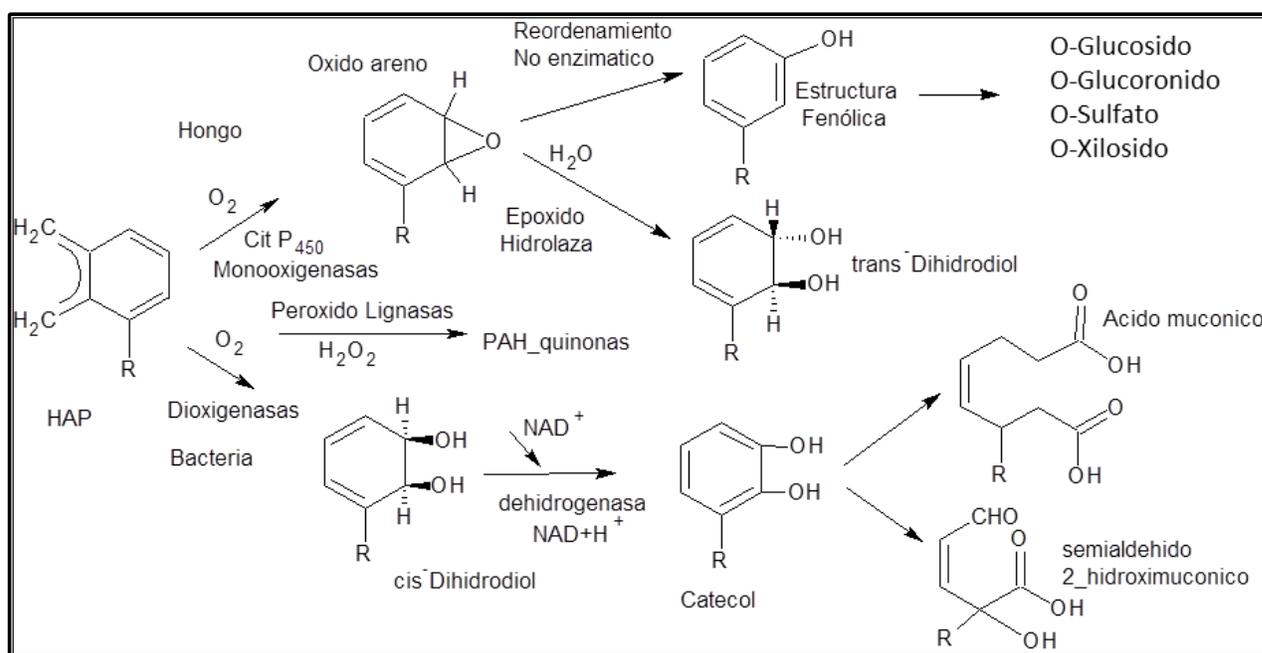


Figura 6. Mecanismo general de biodegradación de un HAP por hongos y bacterias (adaptado de Haritash y Kaushik, 2009).

Los procesos metabólicos están influenciados fuertemente por una amplia variedad de factores abióticos y bióticos, por ejemplo, temperatura, pH, aireación, difusión, salinidad, adaptación microbiana, disponibilidad, concentración y propiedades fisicoquímicas de los HAPs, entre otras [Manilal y Alexander, 1991; Wang *et al.*, 1990 y Atlas, 1981].

Tabla 3. Aplicación de hongos y bacterias en la biodegradación de HAPs.

HAP	Hongos	Matriz	Ref.	Bacteria	Matriz	Ref.
Naf.	<i>Aspergillus</i> sp.,	Suelo	Silva <i>et al.</i> , 2009	<i>Burkholderia fungorum</i>	Suelo	Andreolli <i>et al.</i> , 2013
	<i>Trichocladium canadense</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizophagus irregularis</i> .	Medio líquido	Farnet <i>et al.</i> , 2009			
Ant.	<i>Marasmius quercophilus</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Absidia cylindrospora</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Ulocladium chartarum</i> , <i>Cryphonectria parasitica</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> , <i>Oxysporus</i> sp., <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Drechslera spicifera</i> , <i>Verticillium lecanii</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> var, <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Cladosporium</i> sp.	Medio líquido	Zhang <i>et al.</i> , 2015.	<i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Betaproteobacteria</i> , <i>Marteella</i> sp., <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp	Medio líquido	Ntougias <i>et al.</i> , 2015
		Medio líquido	Pozdnyakova <i>et al.</i> , 2018. Birolli <i>et al.</i> , 2018		Medio líquido	Cui <i>et al.</i> , 2014 Swaathy <i>et al.</i> , 2014
Pir.	<i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Cylindrocarpon didymum</i> , <i>Penicillium variabile</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> , <i>Mucor racemosus</i> , <i>M. racemosus</i> var. <i>Sphaerosporus</i> , <i>Gliocladium virens</i> , <i>Penicillium simplicissimum</i> , <i>P. janthinellum</i> , <i>Phialophora alba</i> , <i>P. hoffmannii</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>	Medio líquido	Zhang <i>et al.</i> , 2015	<i>Mycobacterium gilvum</i> , <i>Pseudomonas taiwanensis</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Mycobacterium</i> sp	Agua	Deng <i>et al.</i> , 2016
		Medio líquido	Romero <i>et al.</i> , 2012		Suelos	Huang <i>et al.</i> , 2016
BaP	<i>Phanerochaete velutin</i> , <i>Aspergillus sclerotiorum</i> , <i>Mucor racemosus</i> , <i>Ascomycota</i> , <i>Zygomycota</i> phylum, <i>Trichoderma viride</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Suelos	Winqvist <i>et al.</i> , 2014	<i>Altererythrobacter epoxidivorans</i> , <i>Mycobacterium gilvum</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Ochrobactrum</i> sp <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Agua de mar	Li <i>et al.</i> , 2016
		Medio líquido	Passarini <i>et al.</i> 2011		Medio líquido	Chen <i>et al.</i> , 2014
BaA	<i>Candidakrusei</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phanerochaete laevis</i> , <i>Pleurotostreatatus</i> , <i>Rhodotorula minuta</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Trametes versicolor</i>	Suelos	Bogan <i>et al.</i> , 1996 Li <i>et al.</i> , 2018		Agua de mar	Wu <i>et al.</i> , 2009

Es conveniente hacer una mención especial en los HAPs metilados, que son los componentes mayoritarios de la fracción aromática de los derivados del petróleo, y que debido a la presencia de grupos metilo en este tipo de moléculas, aumenta su resistencia a la biodegradación, siendo más recalcitrantes al aumentar el número de sustituyentes. La distribución de los grupos metilo en la molécula al parecer condiciona su biodegradabilidad, observándose en algunos casos un ataque selectivo a diferentes isómeros, por ejemplo, las *Pseudomonas* pueden degradar naftaleno y 2-metilnaftaleno, pero no 1-metilnaftaleno.

4.2.3.1 Biodegradación por bacterias.

Las bacterias inician la oxidación del anillo aromático mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno y dos electrones, proceso catalizado por una dioxigenasa, generalmente compuesta de tres partes, una reductasa, una ferredoxina y una proteína que contiene hierro y azufre y que catalizan la formación de intermediarios. A partir de esta reacción, las bacterias predominantemente forman *cis*-dihidrodiolés de acuerdo con reportes en la biodegradación de BaP [Lindquist y Warshawsky; 1985 y Wang *et al.*, 2017] y como resultado el anillo pierde aromaticidad. A continuación, una deshidrogenasa NAD⁺ reconstituye el anillo aromático formando un catecol y a partir de la formación de éstos y mediante di-oxigenasas estereoselectivas, puede producirse la ruptura del anillo, la cual puede presentarse entre los dos grupos hidroxilos denominándose *orto*-ruptura, ó adyacente a estos grupos denominado *meta*-ruptura. El ejemplo de la degradación de un HAP por bacterias es del fenantreno en la figura 7, donde se han reportado como productos del metabolismo compuestos como 9-hidroxifluoreno, 9-fluoreno y 1-acenaftenona. Los estudios han llevado a proponer posibles rutas metabólicas para explicar la formación de estos compuestos como se resume a continuación.

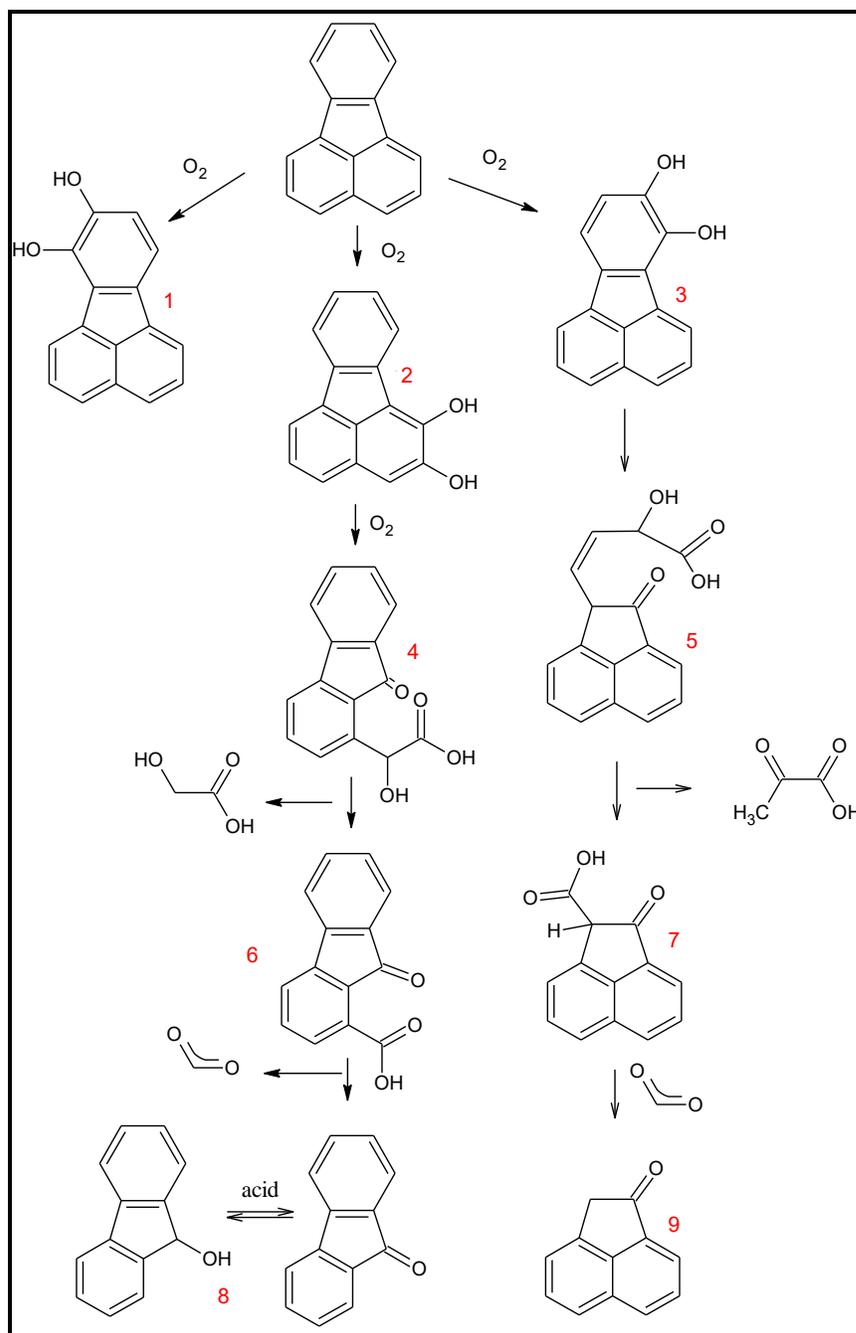


Figura 7. Mecanismo propuesto para el metabolismo del fluoranteno por bacteria con la formación de dihidrodioles a) 7,8- b)1,2- c)9,10- del fluoranteno; d) 9-fluoronona-1-acido-(2-hidroxi)-propanoico; e) 2-acenaftilenona-1-acido-(3z)-2-hidroxi-pent-3-enoico; f) 9-fluoronona-1-acido-propanoico; g) acido 2-oxo-1,2-dihidroacenaftilen-1-acetico; h) 9-fluorenol y 9-fluorenona; i)2-acenaftilenona (adaptado de Gordon y Dobson, 2001).

Acción de las di-oxigenasas en el anillo aromático. Las di-oxigenasas constan de tres dominios distintos solubles y que no están vinculados a la membrana como se mencionó anteriormente, la forma en la que NADH transfieren electrones a ésta es: La reductasa es una flavoproteína que contiene FAD como centro redox y que oxida el NADH transfiriendo los electrones a la ferredoxina, una proteína de bajo peso molecular que contiene un núcleo de hierro-azufre (2Fe-2S), la cual contiene dos ligantes cisteína y dos histidinas, contrario a las ferredoxinas de tipo vegetal que contienen cuatro ligantes cisteína [Cammack, 1992]. La ferredoxina reducida transfiere los electrones a la hidroxilasa, que contiene sitios de unión para el oxígeno molecular y el sustrato y así se lleva a cabo posteriormente la incorporación de los dos átomos de oxígenos.

A nivel bacteriano del tipo *gram*-negativas, los genes asociados a la degradación de los HAPs fueron estudiados en *pseudomonas* y su función es codificar para que las enzimas que catalizan la posterior oxidación del naftaleno conviertan el salicilato resultante a intermediarios del ciclo de Krebs (figura 8). En el caso de las bacterias *gram*-positivas degradadoras de HAPs, por ejemplo, en la degradación de pireno con *mycobacterium sp.*, se establece la participación hasta de 14 genes, concluyéndose que los genes involucrados son muy diferentes a los de las bacterias *gram*-negativas, pero con la misma actividad metabólica (figura 9). Esta capacidad se atribuye a la presencia de múltiples copias de oxigenasas distintas e incluso mono-oxigenasas dependientes del citocromo P450. Larkin *et al.*, 2010, describieron la presencia de di-oxigenasas con diferentes preferencias de sustrato en cepas de *Mycobacterium*, lo que explica la versatilidad de estas bacterias en la degradación de HAPs y su presencia frecuente en suelos contaminados. Observaciones similares se han encontrado con especies de la *Rhodococcus* en la que se ha encontrado una mono-oxigenasa y una di-oxigenasa de naftaleno, además una enzima tolueno di-oxigenasa. Finalmente, en la figura 10, se presenta una propuesta para el mecanismo de degradación del BaP por bacterias, este mecanismo es importante mostrarlo ya que al parecer también es la ruta de metabolización seguida por las microalgas de acuerdo con reportes en literatura.

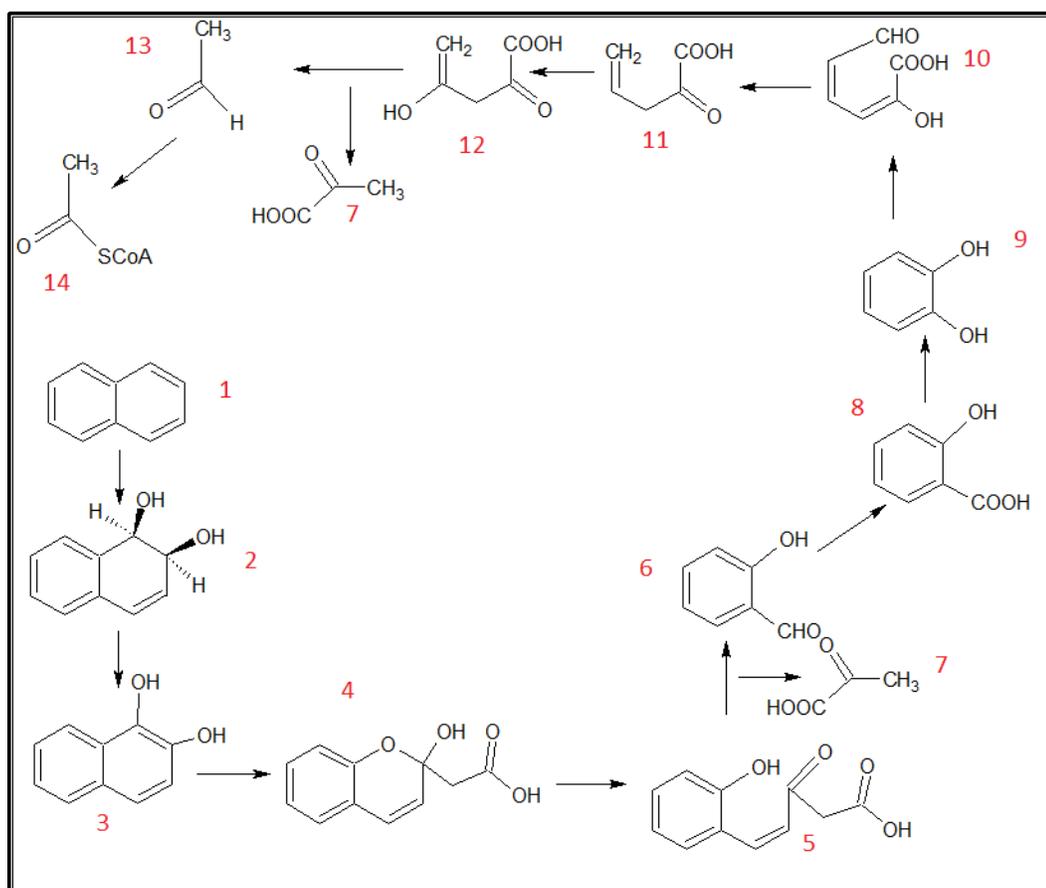


Figura 8. Ruta catabólica de degradación del naftaleno en *Pseudomonas putida* (1) Naftaleno; (2) *cis*-1,2-dihidro-1,2-dihidronaftaleno; (3) 1,2-dihidroxi-naftaleno; (4) ácido 2-hidroxicromeno-2-carboxílico; (5) *cis*-*o*-hidroxibenzilpiruvato; (6) salicilaldehído; (7) piruvato; (8) salicilato; (9) catecol; (10) 2-hidroximucónico semialdehído; (11) 2-oxopenta-4-dienato; (12) 4-hidroxi-2-oxovalerato; (13) acetaldehído; (14) Acetil Co-A; (adaptado de Suenaga *et al.*, 2009).

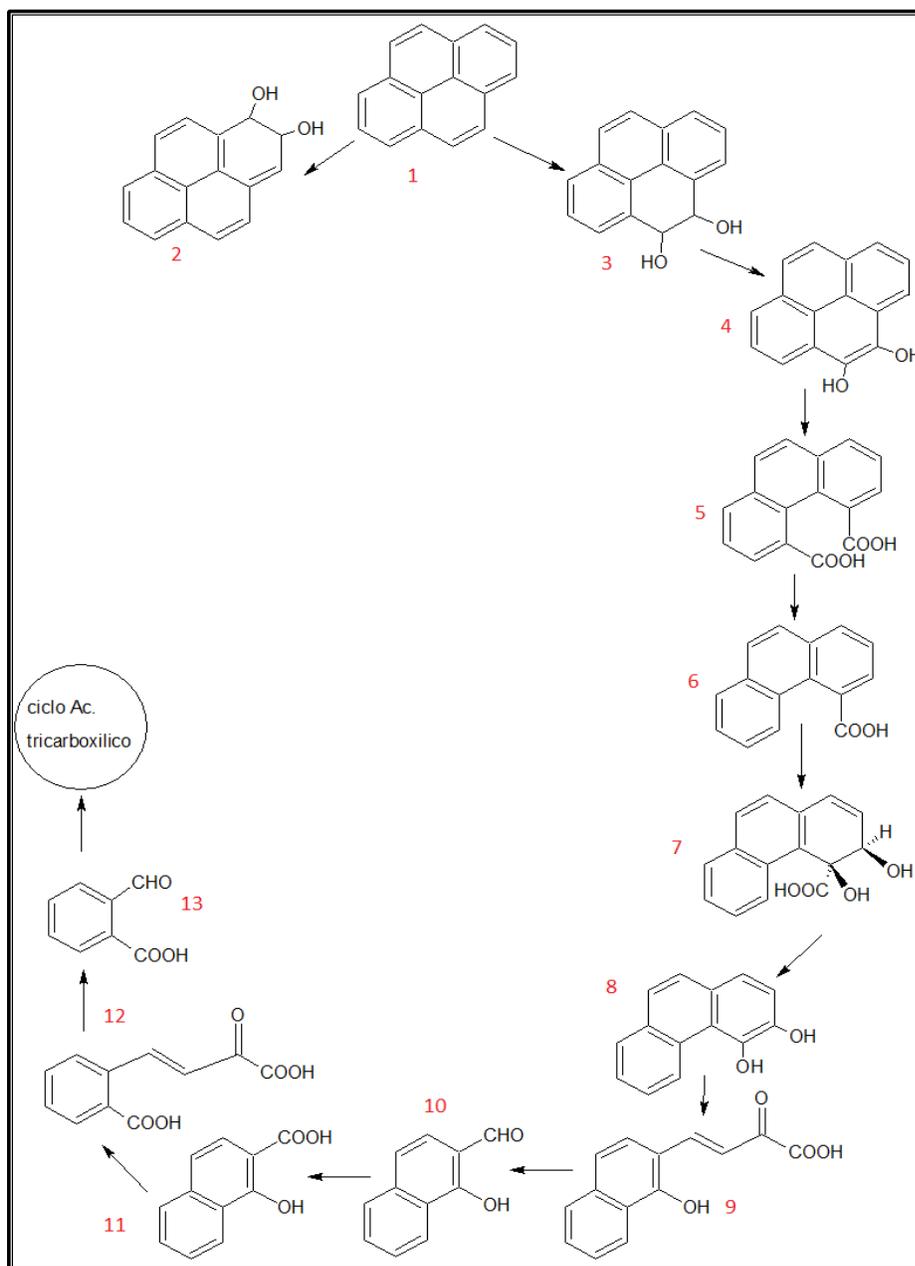


Figura 9. Ruta de degradación del pireno en *M. vanbaalenii* (1) pireno; (2) *cis*-1,2-dihidrodiol-pireno; (3) *cis*-4,5-dihidroxi-4,5-dihidro-pireno; (4) 4,5-dihidroxi-pireno; (5) ácido-fenantreno-4,5-dicarboxílico; (6) ácido fenantreno-4-carboxílico; (7) ácido *cis*-3,4-dihidroxifenantreno-4-carboxílico; (8) 3,4-dihidroxifenantreno; (9) ácido 2-hidroxi-2H-benzo[h]cromeno-2-carboxílico; (10) 1-hidroxi-2-naftaldehído; (11) ácido 1-hidroxi-2-naftoico; (12) *trans*-2-carboxybenzal piruvato; (13) ácido 2-carboxibenzaldehído, (adaptado de Kweon *et al.*, 2010).

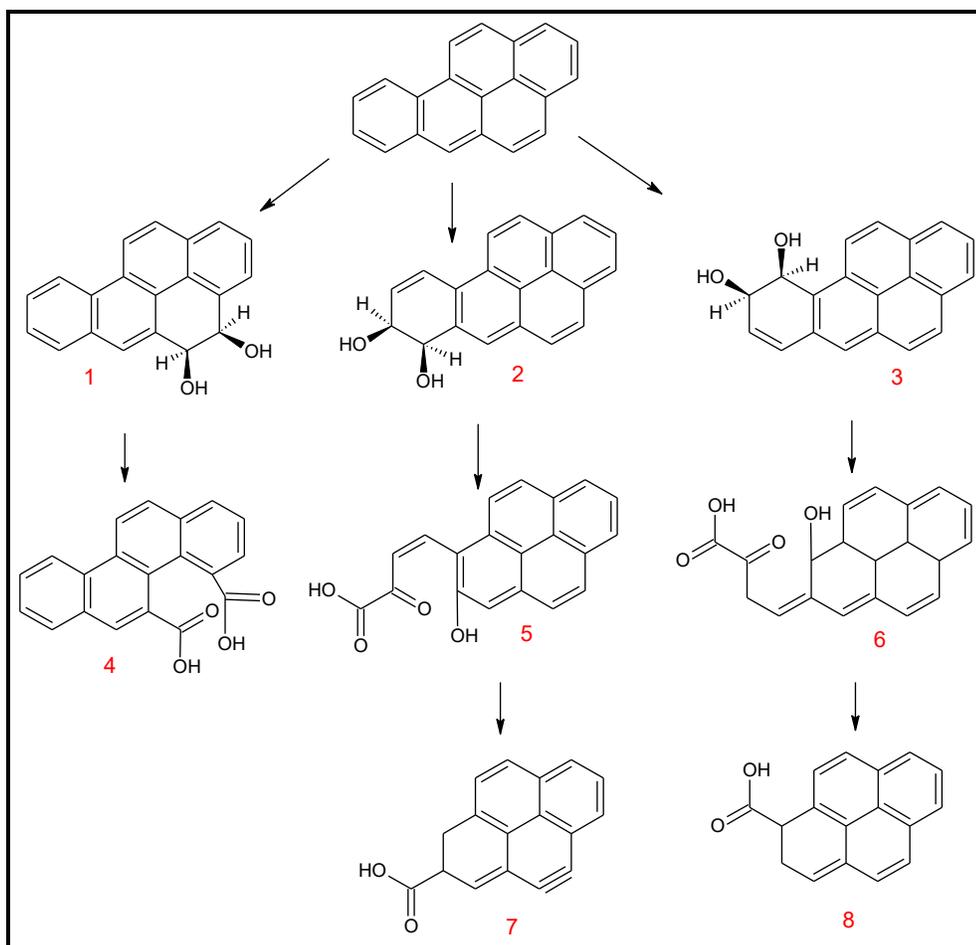


Figura 10. Mecanismo propuesto para la degradación del BaP por bacterias. 1) *cis*-4,5-dihidrodiol-BaP; 2) *cis*-7,8-dihidrodiol-BaP; 3) *cis*-9,10-dihidrodiol-BaP; 4) ácido 4,5-criseno dicarboxílico; 5) ácido *cis*-4-(8-hidroxi-piren-7-il)—2-oxobut-3-enoico; 6) ácido *cis*-4-(7-hidroxi-piren-8-il)—2-oxobut-3-enoico; 7) ácido 7,8-dihidropireno-7-carboxílico; 8) ácido 7,8-dihidropireno-8-carboxílico (Adaptado de Gibson *et al.*, 1975)

4.2.3.2 Biodegradación por hongos.

Los hongos pueden degradar e incluso mineralizar los HAPs ligeros por medio de un conjunto de enzimas extracelulares (lignolíticas) con muy baja especificidad hacia el sustrato, haciéndolos también adecuados para la degradación de otros compuestos diferentes [Cajthaml *et al.*, 2002]. Los sistemas lignolíticos consisten de tres grupos principales de enzimas: peroxidasa de lignina, fenoloxidasas (lacasas, tirosinasas) y peroxidadas, donde, los experimentos con enzimas purificadas demostraron que éstas son

capaces de degradar los HAPs [Hofrichter *et al.*, 1998 y Mori *et al.*, 2015]. Se ha observado que las enzimas lignolíticas realizan una oxidación por medio de radicales generando un catión radical del contaminante seguido por la aparición de quinonas [Vyas *et al.*, 1994]. El hongo emplea mono-oxigenasas del citocromo P450 para atacar los HAPs y generar óxidos de areno y después *trans*-dihidrodiol [Bezalel *et al.*, 1997 y 1996]. Por ejemplo, en la figura 11 se aprecia como el BaP puede ser transformado por *Cunninghamella elegans* en *trans*-7,8-dihidrodiol y *trans*-9,10-dihidrodiol [Cerniglia y Gibson, 1980 y Canet *et al.*, 2001]. La degradación del BaA principalmente ha reportado *trans*-dihidrodiol (3,4-; 8,9-; 10,11-) y tetrahidroxo sustituidos [Cerniglia *et al.*, 1985 y 1980], mientras para el BaP además de los mencionados anteriormente *trans*-dihidrodiol (4,5 y 11,12), quinonas (1,6; 3,6; 6,12) y tetrahidroxilados [Haemmerli *et al.*, 1986], no se encuentran reportes para BbF y BkF.

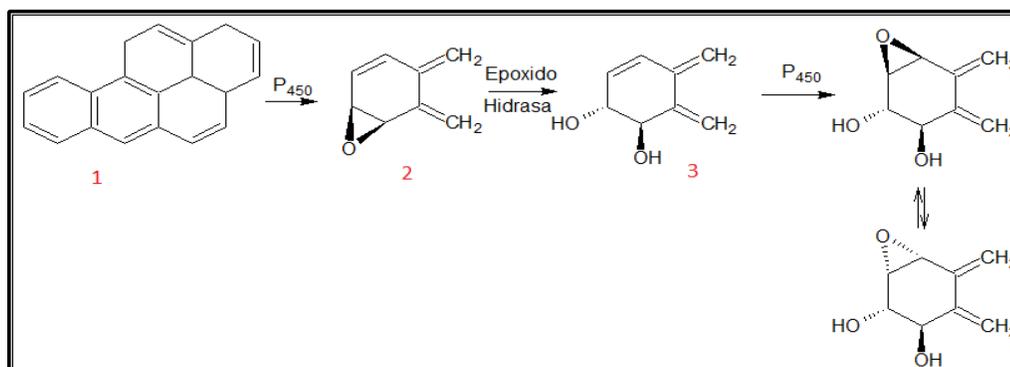


Figura 11. Activación metabólica del BaP (1), para generar por intermediación del óxido de areno (2), para generar *trans*-7,8-dihidrodiol (3) (adaptado de Cerniglia y Gibson, 1980)

Por otra parte, la lignina peroxidasa segregada por el *Irpex lacteus* puede convertir el antraceno a 9,10-antracenediona y antrona como lo reporta Cajthaml *et al.*, (2002), el cual se muestra en la figura 12, donde el ácido ftálico (1) y el ácido 2-hidroximetil benzoico (2) son las estructuras que típicamente sufren deshidratación durante el análisis por CG-EM.

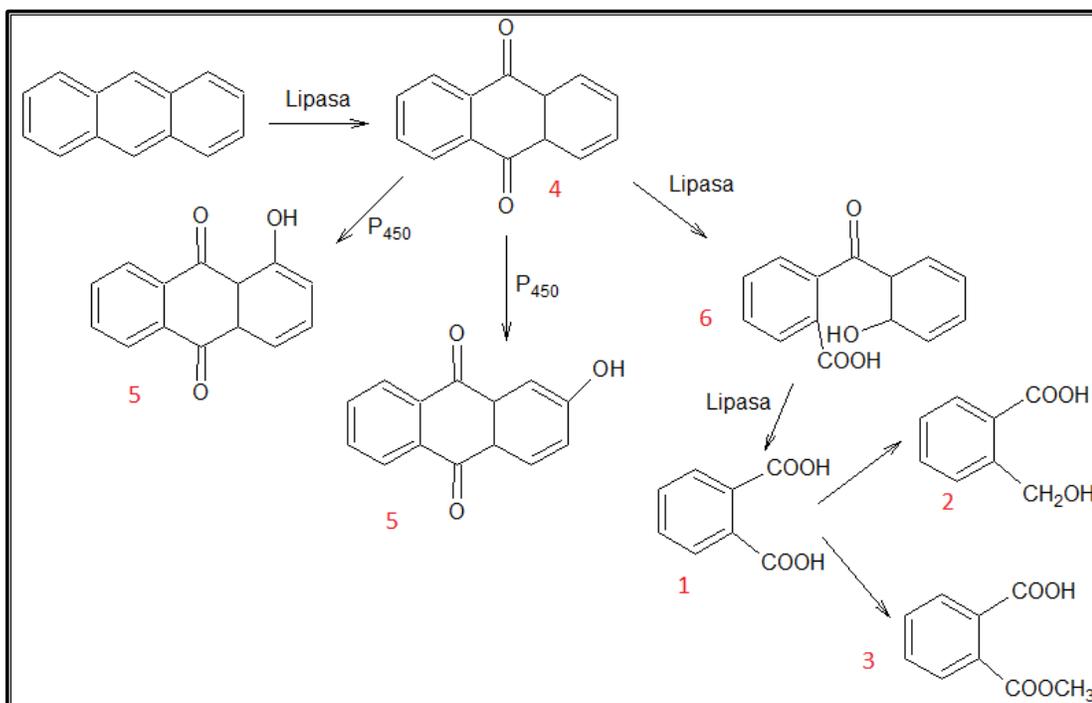


Figura 12. Mecanismo propuesto para la degradación del antraceno por *I. lacteus* formando ácido ftálico (1) y el ácido 2-hidroximetil benzoico (2), ftalida (3), 9,10-antranecenodiona (4) hidroxi-antranecenodiona (5) y ácido 2-(2'-hidroxibenzoil) benzoico (6). (adaptado de Cajthaml *et al.*, 2002).

4.2.4 Empleo de microalgas para la biodegradación de HAPs

Hay muchos ejemplos de degradación por microalgas de sustancias orgánicas tóxicas tales como colorantes azoicos [Liu y Liu, 1992], DDT [Megharaj *et al.*, 2000], aceite de motor y petróleo crudo [Walker *et al.*, 1975] y fenoles entre otros [Lika y Papadakis, 2009]. Se han descrito especies de *Chlorella* por su capacidad para degradar el TBT [Tam *et al.*, 2002], 2,4-diclorofenol [Scragg *et al.*, 2003] y pentaclorofenol [Tikoo *et al.*, 1997]. Las especies de *Scenedesmus* fueron capaces de degradar el flazasulfurón [Couderchet y Vernet, 2003], TBT [Tam *et al.*, 2002] y fenol [Pinto *et al.*, 2002]. Un alga eucariótica *Ochromonas danica* pudo degradar tanto fenol y varios derivados en una mezcla con *o*-cresol, *p*-cresol, 2,5-, 2,6-, 3,4- y 3,5-xilenoles [Semple *et al.*, 1998]. Estos estudios muestran claramente que las microalgas deben tener un alto potencial para eliminar y

degradar los contaminantes orgánicos tóxicos y persistentes, incluyendo los productos químicos alifáticos y aromáticos con diferentes grupos funcionales.

Las microalgas como organismos remediadores, se encuentran identificadas en menor número de especies que hongos y bacterias; su empleo se ha orientado en aplicaciones en la biorremediación de HAPs de 2 y 3 anillos aromáticos al igual que con los microorganismos anteriormente mencionados [Semple *et al.*, 1999]. Se han estudiado *Chlorella vulgaris* [Kong *et al.*, 2010], *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* [DeBashan *et al.*, 2010], y *Selenastrum capricornutum* [Lei *et al.*, 2007], siendo ésta última la especie con mayor efectividad en los reportes estudiados, en la tabla 4 se presentan otros resultados obtenidos empleando microalgas en la remediación de HAPs de 2 y 3 anillos.

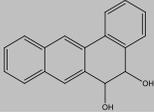
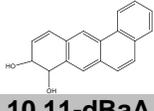
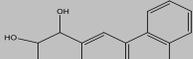
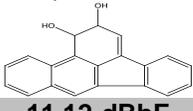
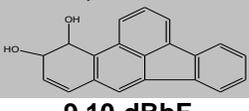
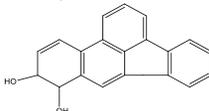
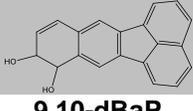
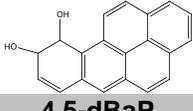
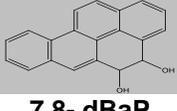
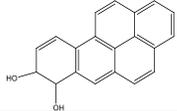
En cuanto a HAPs de mayor tamaño (más de 4 anillos) no se ha reportado su estudio de biodegradación por microalgas, salvo para el Benzo(a)pireno (BaP), donde se reportó que su oxidación por la alga verde *S. capricornutum* resulta en la formación de los dihidrodioles *cis*-4,5-; 7,8-; 9,10- y 11,12-benzo[a]pireno, por lo cual se ha establecido que la biotransformación del BaP se produce por la ruta de las enzimas di-oxigenasas [Warshawsky *et al.*, 1995]. En la tabla 5 se presentan algunas propiedades de los metabolitos estudiados en el presente trabajo.

Tabla 4. Reportes del empleo de microalgas en la remoción de HAPs.

HAP	Concentración y matriz	Microalga	% Remoción	Referencia
Pireno	50 µM	<i>Chlorella sp.</i>	70	Subashchandra et al., 2017
	Medio líquido			
	0.1 mg/L*	<i>Chlamydomonas sp.</i> , <i>Chlorella miniata</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus platydiscus</i> ,	70.6 82.6 66	Lei et al., 2003
	Medio líquido	<i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Selenastrum capricornutum</i> ,	96.4 82.2	
	1.0 mg/L*	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus platydiscus</i> ,	47.8 50.4	Lei et al., 2007
	Medio líquido	<i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Selenastrum capricornutum</i>	50.5 77.5	
	1.0 mg/L	<i>Selenastrum capricornutum</i>	100	Chan et al., 2006
Medio líquido				
Fluoranteno	1.0 mg/L	<i>Selenastrum capricornutum</i>	100	Chan et al., 2006
	Medio líquido			
Fenantreno	1.0 mg/L	<i>Selenastrum capricornutum</i>	96	Chan et al., 2006
Naftaleno	No reporta	<i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Chlorella autotrophica</i> <i>Dunaliella tertiolecta</i>	No reporta	Cerniglia et al., 1980
	Medio líquido	<i>Chlamydomonas angulosa</i> <i>Ulva fasciata</i>		

* La remoción medida al séptimo día de exposición.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos estudiados en este trabajo.

Compuesto	Fórmula molecular	P.F. (° C)	P.E. (° C)	Solubilidad en agua (µg/L) ¹	Log Kow*	Peso molecular (g/mol)
5,6- dBaA 	C ₁₈ H ₁₄ O ₂	198	460	2.05	4.56	262.32
8,9- dBaA 	C ₁₈ H ₁₄ O ₂	178	496	1.87	3.25	262.32
10,11-dBaA 	C ₁₈ H ₁₄ O ₂	178	475	1.87	3.42	262.32
1,2- dBbF 	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	200	470	0.214	2.53	286.32
11,12-dBbF 	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	200	470	0.214	2.53	286.32
9,10-dBbF 	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	202	478	0.67	4.39	286.32
8,9-dBkF 	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	212	498	0.43	4.01	286.32
9,10-dBaP 	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	210	499	0.43	4.01	286.32
4,5-dBaP 	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	218	512	0.61	3.83	286.32
7,8- dBaP 	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	218	512	0.42	4.01	286.32

¹ 20°C

*Los valores estimados para los metabolitos fueron realizados con US EPA software [2012] *Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows v 4.10 United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.*

Olmos-Espejel *et al.*, 2012 reportó que la degradación de BaP por *S. capricornutum* en presencia de luz amarilla, genera principalmente dihidrodioles, al igual que la *S. acutus*, otra microalga verde estudiada [García de Llasera *et al.*, 2016]. En este trabajo se empleó la *S. capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*) y la *S. acutus*, de la familia de las *Selenastraceae* y *Scenedesmaceae*, respectivamente (figura 13), para llevar a cabo los procesos de exposición y de las cuales a continuación se profundiza.

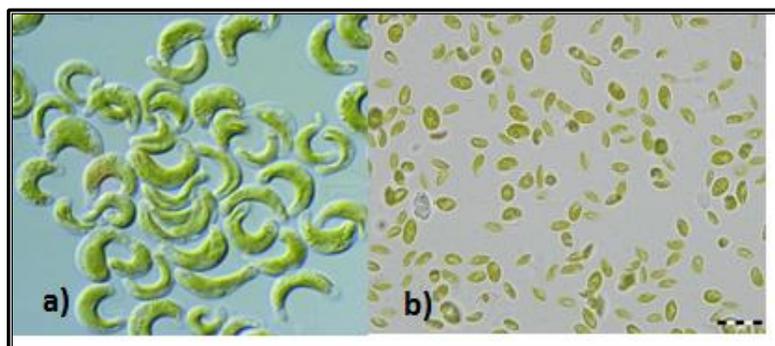


Figura 13. Microalgas *S. capricornutum* (a) y *S. acutus* (b) empleados en la biodegradación de HAPs.

Para la *S. capricornutum*, se conoce que el género y especie fueron formalmente modificados a *Pseudokirchneriella subcapitata*; es una alga verde unicelular (clorofita) con forma de media luna, y un volumen aproximado de 40 a 60 μm^3 que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos, ha sido empleada sola ó haciendo parte de un grupo por ejemplo para estimar el potencial de fitotoxicidad de aguas dulces superficiales ó subterráneas [Fawley *et al.*, 2006] debido a su alta resistencia a contaminantes en aguas. Por otra parte, actualmente, hay 74 especies taxonómicamente aceptadas de *Scenedesmus* [Guiry, 2015], se han identificado varios subgéneros y varían según la fuente. Hegewald (1995), estableció que *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, y *Scenedesmus* son las tres categorías principales de este género, *Acutodesmus* se caracteriza por tener polos celulares agudos, mientras que *Desmodesmus* y *Scenedesmus* tienen polos obtusos/truncado (diferenciados por la presencia o ausencia de espinas, respectivamente). *Scenedesmus* es un alga cenobial muy común, que frecuentemente se presenta casi como un cultivo puro. Las células en la colonia se

organizan en múltiplos de dos, las especies más comunes presentan cuatro u ocho células [Lee, 2008]. Las células son elipsoides, ovoides ó en forma de media luna, la pared celular es lisa y no presenta espinas. Ambas especies han sido empleadas en los procesos de degradación de HAPs algunos de ellos se reportan en la tabla 6.

Tabla 6. Estudios realizados con *S. capricornutum* y *S. acutus* en la biodegradación de HAPs.

Especie	HAPs	Concentración de exposición y técnica extracción	Productos degradación	% Remoción y tiempo exposición	Referencia
<i>S. capricornutum</i>	BaP	0.16 µg/mL ELL (Acetato etilo)	Dihidrodióles, Hidroxi-BaP	50% (6-7% mineraliz.) 14 días	Warshawsky <i>et al.</i> , 2007
<i>S. capricornutum</i>	Flu, Fen, Pir, BaP	0.10-1.0 µg/mL ELL (Acetato etilo)	Ácido. aromáticos Hidroxi-HAPs Benzopiranona	40-90% 7 días	Lei <i>et al.</i> , 2007
<i>S. capricornutum</i>	Pir	0.1 µg/mL	No reporta	88.4% 0.5 días	Lei <i>et al.</i> , 2003
<i>S. capricornutum</i>	Flu Fen Fluoreno BaP Pir	0.25 µg/mL 1.0 µg/mL 1.0 µg/mL 0.10 µg/mL 0.15 µg/mL	Hidroxi HAPs Quinonas Dihidroxi-HAPs	75% 60% 78% 80% 92%	Ke <i>et al.</i> 2010
		Centrifugación		7 días	
<i>S. capricornutum</i>	BaP	40 a 1200 µg/L ELL (Acetato etilo)	Dihidrodióles- HAPs Quinonas Hidroxi-HAPs	99% 97.4% 4 días	Warshawsky <i>et al.</i> , 1995
<i>S. acutus</i>					
<i>S. capricornutum</i>	Pir Fen Flu BaP	0.1 µg/mL 1.0 µg/mL 0.25 µg/mL 0.26 µg/mL	Dihidrodióles, Hidroxi-HAPs Dihidrodióles	100% 96% 100%	Chan <i>et al.</i> , 2006
		EFS y DMFS		7 días 99% 0.67 días	Olmos-Espejel <i>et al.</i> , 2012
<i>S. acutus</i>	BaP	0.26 µg/mL EFS y DMFS	Dihidrodióles	95% 3 días	García de Llasera <i>et al.</i> , 2016

4.3 EFS y DMFS aplicadas a la extracción de HAPs

Los reportes de técnicas tradicionales empleadas para la extracción de HAPs de diferentes matrices son numerosos, sin embargo, el empleo de técnicas minimizadas ha tomado gran importancia debido a las ventajas que ofrecen el ahorro de solvente, menor cantidad de matriz, menores tiempos de extracción, y recobros altos. En el presente trabajo se emplearon dos técnicas de extracción que cumplen con las ventajas anteriormente descritas, para la separación de metabolitos y HAPs remanentes en el medio de cultivo y la biomasa, la extracción en fase sólida (EFS) para medio líquido y la dispersión de matriz en fase sólida para la biomasa que a continuación se describirán.

4.3.1 Extracción en fase sólida (EFS).

El uso de la EFS para el aislamiento de los HAPs por su ahorro en disolvente y el proceso simultáneo de extracción y concentración de los analitos, ha incrementado su popularidad y aplicaciones en el manejo de muestras acuosas y la limpieza de extractos. Cuando se aplica a soluciones líquidas, esta técnica tiene varias similitudes con la cromatografía líquida (CL) ya que podría considerarse que tienen un procedimiento similar con el empleo de materiales comunes para la fase sólida seleccionada para retener compuestos específicos de interés. La columna puede contener desde 50 mg hasta 10 g de material adsorbente (sorbente), aunque pueden usarse procedimientos con menos ó con materiales adsorbentes diferentes ó de intercambio iónico. La fase móvil (solventes de elución) puede fluir libremente ó con el empleo de un pequeño diferencial de presión, el cual es suficiente ya que el sorbente tiene un tamaño de partícula mayor que el empleado en cromatografía líquida, además el hecho de que las columnas son más cortas (1 a 5 cm de longitud ó menos). La diferencia de presión se puede conseguir aplicando una pequeña presión de gas en la parte superior de la columna ó usando un vacío débil en la base de la columna.

La técnica de EFS se puede emplear para la extracción y la concentración simultánea dando como resultado altos recobros y límites de detección a nivel de ng/L [Cardoso *et al.*, 2008], aunque también se puede aplicar como una etapa de limpieza posterior a la extracción del analito realizada por otros procedimientos como la extracción líquido-líquido [Huang *et al.*, 2010]. Se ha empleado la EFS en el análisis de HAPs a nivel de trazas en

aguas naturales (Naftaleno, Antraceno, Fluoranteno y Fluoreno) [He *et al.*, 1998], lográndose recobros mayores al 80%. Otros reportes indican para el mismo tipo de matriz recobros entre del 60 al 80% para HAPs de 5 y 6 anillos como benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno y benzo(g,h,i) perileno empleando como fase sólida LC-18 y ENVI-18 [Kanchanamiayoon y Tatrahun, 2009]. Otros empleos de la EFS como técnica aplicada al análisis de HAPs incluyen matrices biológicas como sangre [Grova *et al.*, 2005], con muy buenos resultados. A continuación, en la tabla 7 se presenta una comparación entre la extracción de HAPs por extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida, donde se resaltan los volúmenes empleados de solvente, el tiempo extracción y los recobros.

Es pertinente tener en cuenta que, en el caso concreto de los HAPs, presentan el inconveniente de sufrir pérdida de analito a causa de la adsorción en las paredes de los recipientes, por lo que es importante el considerar la adición a las muestras de compuestos que ayuden en su solubilización, junto con el empleo de nuevos materiales como sorbentes (magnéticos, polímeros impresos molecularmente, nanomateriales, entre otros) [Andrade-Eiroa *et al.*, 2016]. Sin embargo, la EFS permite lograr recobros cuantitativos y reproducibles de los HAPs cuando se aíslan de matrices complejas, como lo son las muestras biológicas.

4.3.1.1 Equilibrio en EFS.

Un gran número de materiales son empleados como sorbentes en fase sólida con el objetivo de retener los analitos ó limpieza y dependiendo de la naturaleza de esta fase sólida, se puede asumir que existen diferentes mecanismos de retención del soluto. Ahora bien, aunque el nombre de la técnica indicó el empleo de una fase sólida, ésta puede considerarse como una fase estacionaria (un líquido inmovilizado sobre un soporte sólido), asemejándose así, al equilibrio de la cromatografía líquida (CL), en el cual se presenta un intercambio de una especie molecular X, entre dos fases, la móvil (X_{mo}) y la estacionaria (X_{es}). De esta forma se puede establecer que los mecanismos de retención para describir el proceso EFS son similares a la CL, la partición, la adsorción líquida/sólida y el intercambio iónico.

Tabla 7. Comparación de las condiciones de extracción (tiempo, cantidades, LD y LC) entre la extracción fase sólida y la extracción líquido-líquido.

Técnica	Matriz	Analito	Especificación	Referencia
Extracción Líquido-Líquido	Rio	16 HAPs USEPA	300 mL solv 2h % Rec 90% (14% CV), LD 0.1-0.15 ng/mL, LC 0.20-0.50 ng/mL HPLC-FL	Brum <i>et al.</i> , 2008
	Lluvia	14 HAPs (excep. Naf y Acenaftil)	100 mL solv. 3h % Rec 91-113% (4-8% CV), LD 0.1-0.6 ng/mL HPLC-FL	Motelay-Massei, <i>et al.</i> , 2003.
	Lago	16 HAPs - USEPA	250 mL solv. 4h, Conc muestr 3-47 µg/L CG-FID	Kwach y Lalah, 2009
Extracción Fase sólida	Aguas de bebida	9 HAPs entre 5 y 6 anillos.	360 mg de C ₁₈ eluidos 5 mL C6 y redisoluto en 0,5 de ACN. % Rec 95-100% (5-8% CV), LD 0.05-0.6 ng/mL, LC 0.15-1.00 ng/mL HPLC-FL	García-Falcón <i>et al.</i> , 2004.
	Lluvia	16 HAPs USEPA	500 mg de Oasis-HLB eluidos 5 mL C6 – ACN (50:50). % Rec 90-98% (2-5% CV), LD 0.2-3.0 ng/mL, LC 0.7-10.0 ng/mL HPLC-FL	Delhomme, <i>et al.</i> , 2007
	Residuales y lodos	16 HAPs USEPA	500 mg de C ₁₈ eluidos 4 mL C6, 2-OH, ACETONA (90:5:5). % Rec 73-92% (7-13% CV), LD 0.5-1.2 ng/mL, LC 4.0-12.0 ng/mL HPLC-FL	Busetti <i>et al.</i> , 2006

El equilibrio generado en el intercambio puede ser representado por una constante de equilibrio $K(X)$ que describe la relación entre la concentración molar en las dos fases $K(X) = \frac{C_{xes}}{C_{xmo}}$, y de forma similar a la separación cromatográfica se determina el factor de capacidad ó factor de retención como $k(X) = \frac{t_R - t_0}{t_0}$ donde t_R es el tiempo transcurrido desde el momento en que se aplica el compuesto X a la fase estacionaria para su elución y el t_0 es el tiempo de elución de un analito no retenido [Moldoveanu and David, 2015].

Teniendo en cuenta lo anterior, se define el volumen de retención $V_R(X)$ para EFS como el volumen de la fase móvil que fluye entre el tiempo de aplicación de una muestra pequeña y el tiempo de retención correspondiente $t_R(X)$ de la especie molecular X, donde el V_R y t_R están relacionadas por $V_R = t_R U$, donde U es el flujo volumétrico a través del dispositivo SPE. V_R es un parámetro que permite determinar el volumen de disolvente necesario para recuperar el cartucho y puede ser determinado empleando el k'_w mediante la ecuación $V_R = V_0(1 + k'_w)$ donde k'_w es el factor de retención cuando la fase móvil es agua y V_0 es un volumen dependiente de la porosidad del soporte y del volumen geométrico de la columna.

Cuando un analito que puede ser retenido en el cartucho de EFS no se retiene, puede ser debido a factores tales como la adición de demasiado analito (que excede la capacidad de carga) ó por el flujo rápido de una solución a través del cartucho, que no permite alcanzar el equilibrio. Cuando una solución de un compuesto que puede ser retenido cuya concentración es C_0 , es adicionada continuamente, inicialmente se retendrá completamente en el cartucho (siempre que la concentración C_0 y el caudal no sean demasiado altos y el factor de retención k sea alto), pero como la solución que actúa como fase móvil (y que contiene el soluto) fluye a través de la columna EFS, el soluto seguirá migrando (similar a un proceso de cromatografía líquida), aquí entra otro parámetro importante en el mecanismo EFS, es el volumen de fuga, V_B (del inglés *breakthrough volumen*).

Para entender el mecanismo se analizará la figura 14, donde se muestra la variación de la concentración del efluente (C/C_0) en función del volumen de solución añadido, allí se observa que siempre se va a presentar un ensanchamiento de la distribución de la concentración del analito en el lecho de retención y es por esta razón, que un compuesto adicionado a través del cartucho de EFS empieza a estar presente en el efluente antes de alcanzar el volumen de retención (V_R), pero en concentraciones más bajas que la inicial, de tal forma que en la figura 14, la curva de fuga representa como sería la variación real de la concentración del analito en el efluente dependiendo del volumen de solución adicionado [Rachinskii V., 1969].

Dado que la fuga está relacionada con la pérdida de soluto del cartucho de EFS, lo más deseado es que se requieran grandes volúmenes para ésta, la concentración de soluto en el efluente empieza a aumentar en el punto V_B (volumen de fuga), el cual se debe a la elución del analito a medida que se pasa más solución sobre el sorbente y no debido a la sobrecarga del mismo. La concentración correspondiente para la medición de V_B es tomado usualmente como el 1% de la concentración inicial ($\%C/C_0$) [Hennion, 1999], sin embargo, éste valor es arbitrario y de acuerdo con Larrivee y Poole, 1999, puede ser calculado por un modelo teórico que permite otros valores, pero lo que es claro es que independientemente de éste valor, se puede definir el volumen de fuga como el volumen de una muestra, que asumiendo tiene una concentración constante suficientemente baja para no saturar el sorbente, que puede pasar a través del cartucho EFS hasta que la concentración del analito en la salida alcanza un cierto valor de $\% C/C_0$.

En la figura 14, también se muestra el volumen necesario para eluir el 99% del soluto, representado como V_M , y que se establece en la medida que la solución continúa pasando a través del sorbente y donde la concentración del soluto C en el eluato tiende a alcanzar el máximo de la concentración (C_0).

Las diferencias con la técnica cromatográfica son evidentes, la EFS puede ser empleada con el objetivo de retener o no (cuando el interés es retener las impurezas) los analitos de interés, por lo que la separación no se basa en la elución gradual de los analitos como en una columna cromatográfica. El disolvente de elución en EFS debe ser lo suficientemente fuerte como para eliminar completamente los analitos adsorbidos con un pequeño volumen de fase móvil, ya que la retención en EFS requiere valores de $k(X)$ superiores a 100, mientras que en CLAR los valores comunes para $k(X)$ están entre 0 y 100. La columna EFS (o cartucho) tiene alrededor de 20 platos teóricos, mientras que las columnas de CLAR pueden tener 10,000 platos ó más. Los valores de selectividad en CLAR pueden tener valores de $\alpha > 1.05$, y todavía se puede obtener una cierta separación, mientras en EFS se requiere valores de α entre 4 y 5 ó más.

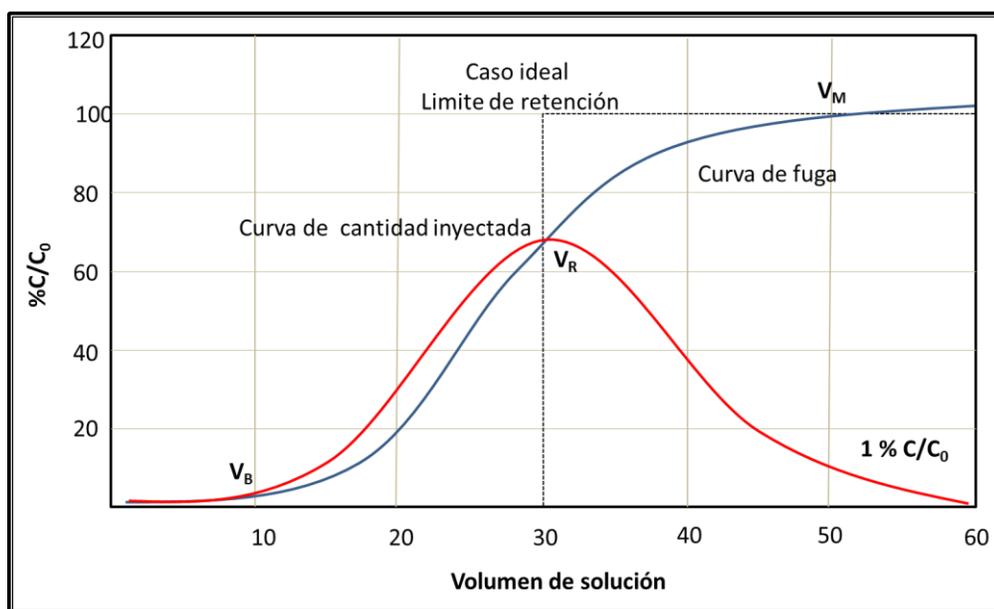


Figura 14. Influencia de la concentración del analito en el efluente sobre la adición de volumen de solución (curva de fuga) [Adaptado de Hennion, 1999].

4.3.1.2 **Parámetros que son característicos en el rendimiento de la EFS.**

El rendimiento de la EFS es determinado por la adecuación correcta de parámetros que dependerán estrictamente del soluto, y del propósito en el que se emplee la metodología. Son varios los parámetros a tener en cuenta para realizar la elección apropiada y algunos de ellos se resumen a en la tabla 8.

4.3.1.3 **Procedimiento de la extracción en fase sólida.**

En la figura 15 se presenta el procedimiento general de la extracción en fase sólida. Se puede dividir el proceso de extracción por fase sólida en diferentes etapas como se muestran en la figura 15 y se explican a continuación:

Tabla 8. Algunos parámetros de caracterización para dispositivos de extracción en fase sólida (EFS) (Adaptado de Simpson, 2000).

Propiedad	Influenciada por	Resultado afectado
-----------	------------------	--------------------

Área superficial 50-600 m²/g	Naturaleza del material de base. Reticulación en el caso de polímeros sintéticos	Capacidad y Recobro
Tamaño de partícula	Forma irregular ó esférica del material inicial	Permeabilidad Puede influir en el número de platos teóricos
Dimensiones de partícula (30-150 μm de diámetro)	Selección del material base	Permeabilidad Puede influir en el número de platos teóricos Caudal a través del lecho de sorbente
Capacidad/g de sorbente (50 mg/g de base de sílice, 250 mg/g de polímeros sintéticos)	Tipo de sorbente, poros y propiedades físicas de las partículas.	Cantidad máxima de analito / g de sorbente
Reproducibilidad	Homogeneidad del material Estabilidad física y química del sorbente	Precisión de los resultados Exactitud de las mediciones
Diámetro de poro (50-500 Å)	Naturaleza del material de base, tipo de derivatización de la superficie, reticulación en polímeros sintéticos, eliminación de agua	Permeabilidad, capacidad de unión, recobros

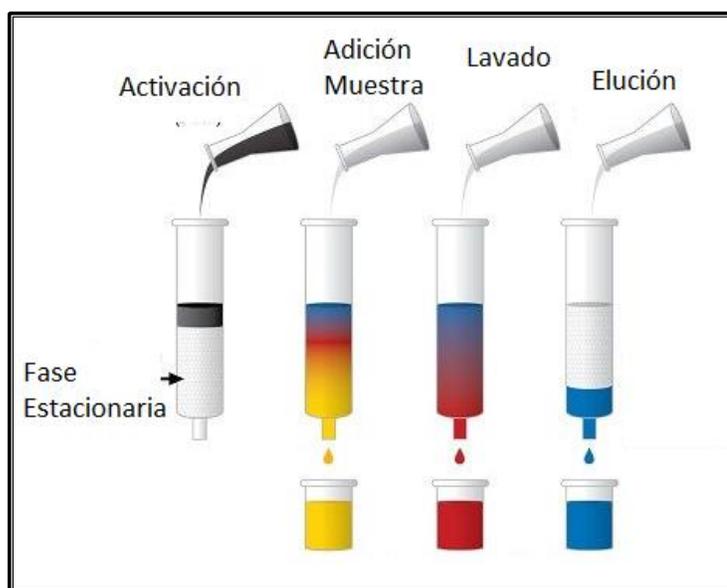


Figura 15. Procedimiento general de la EFS (adaptado de beginner's guide to SPE en <http://www.waters.com/waters>)

- El *acondicionamiento* es el proceso por el cual el adsorbente es activado para ser compatible con la muestra, generalmente se adiciona un disolvente de polaridad contraria al adsorbente para activarlo y posteriormente un volumen de un disolvente de polaridad similar a la matriz. Es posible que el disolvente de la muestra actúe como un agente acondicionador, pero no siempre es así, en muchas situaciones, un disolvente específico ó incluso dos ó tres disolventes son necesarios para acondicionar la columna. Esto se hace con un volumen de disolvente de al menos 6 a 8 veces el del lecho sorbente.
- *La elección del disolvente para favorecer la retención del analito.* Se basa en las mismas reglas que para la CLAR, el principio de "similar a similar" aplicado a la solubilidad es una buena guía para determinar dónde es probable que un soluto específico permanezca. Un disolvente polar tal como la mezcla agua+metanol ó agua+acetonitrilo que contiene como solutos compuestos orgánicos con grandes cadenas hidrófobos y con una fase estacionaria no polar (C18, C8, etc.) tendrá buen resultado de retención. Lo contrario, es aplicable para compuestos con grupos polares disueltos en un disolvente orgánico, los cuales pueden ser retenidos sobre sílice ó alúmina y eluidos con mezcla metanol + agua

- La *adición de la muestra* es una etapa importante del proceso de extracción en fase sólida, ya que la buena elección del volumen de muestra líquida y la cantidad de soporte a utilizar, permite la disminución de pérdidas del analito por fuga ó saturación del adsorbente. Algunos parámetros físicos como el flujo de muestra ó químicos como el pH, entre otras, pueden afectar la adición de la muestra. La retención en la EFS se produce debido a la interacción entre el adsorbente y el analito, quedando inmovilizado en la superficie del adsorbente cuando la disolución de la muestra pasa a través del lecho del adsorbente.
- La *limpieza* permite obtener la mejor selectividad en la extracción de un analito, su objetivo es la eliminación de posibles interferencias de la matriz, así que la selección de los disolventes y volúmenes de éstos deben lograr la eliminación de la mayor cantidad de interferentes y la menor posibilidad de fuga de analitos.
- Con la *elución* se realiza la separación de los analitos del resto de componentes de la matriz, el volumen de disolvente para obtener el máximo recobro. El paso de un disolvente apropiado a través del cartucho, se elige específicamente para eluir los analitos. El recobro de un analito depende de las propiedades del disolvente y de la interacción específica del analito con el sorbente. Una alta afinidad del analito para la superficie sorbente implica una alta retención, que es inicialmente deseable, pero puede influir negativamente en la elución y puede conducir a un valor bajo de la recuperación final. El volumen de disolvente empleado para la elución normalmente debe seleccionarse entre 4 y 8 volúmenes de sorbente, en el caso de resinas poliméricas pueden tener áreas superficiales mayores que los adsorbentes a base de sílice y requieren un poco más de disolvente (por gramo) para la elución. Un procedimiento útil para eluir solutos con propiedades ácidas ó básicas es el cambio de pH de la solución de elución.

4.3.2 Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS).

La DMFS es un proceso analítico patentado para la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras biológicas sólidas y/o viscosas. La DMFS se considera una técnica de preparación de muestras que permite un aislamiento muy rápido y eficiente del analito de la matriz sólida. El hecho de que no se aplique calor en esta metodología,

excluye el riesgo de degradación química de los compuestos extraídos y aumenta el atractivo de su aplicación.

La DMFS, combina aspectos de la EFS, podría definirse como una técnica alternativa a la extracción en fase sólida descrita en el apartado anterior, desarrollada por Steven Barker y colaboradores en 1989. En un principio, este procedimiento se había aplicado sobre todo en la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras biológicas sólidas, semisólidas ó altamente viscosas [Barker, 2007]. La DMFS se basa en mezclar la muestra con un soporte sólido abrasivo en un mortero. En este proceso se lleva a cabo la disrupción de la muestra a la vez que se crea una nueva fase de carácter único. Los soportes sólidos empleados generalmente son obtenidos de la modificación química de la superficie de la sílice, como es el caso del C18 y C8, aunque otros autores emplean en la DMFS otros materiales abrasivos. Entre estos últimos se encuentran la sílice y el sulfato sódico anhidro que actúan a su vez como agentes desecantes lo que permite obtener un material finamente dividido y bastante seco. La DMFS ofrece, además, la posibilidad de realizar un fraccionamiento completo de los componentes de la matriz, así como la capacidad de eluir selectivamente un único compuesto ó varias clases de compuestos, de una misma muestra. La tabla 9 presenta comparaciones entre los diferentes parámetros empleados por técnicas tradicionales para la extracción de muestras sólidas y los resultados obtenidos para en la aplicación de la dispersión de matriz en fase sólida.

El hecho de llevar a cabo la extracción y limpieza en una única etapa, conduce a una reducción del tiempo de análisis y del consumo de disolventes. Es necesario establecer que los pocos reportes en literatura de su empleo en la extracción de HAPs presentan muy buenos resultados en plantas y suelos [Sánchez-Brunete *et al.*, 2007] encontrándose por ejemplo mayores concentraciones de fenantreno, benzo(a)antraceno y benzo(b)fluoreno en suelos, mientras la presencia de naftaleno y fenantreno fue mayor en plantas aéreas. Por otra parte, el análisis de lodos para la determinación de 17 HAPs reportan rendimientos altos [Pena *et al.*, 2008] aplicando la DMFS como técnica de extracción. Sin embargo, no se encuentran en literatura reportes en la matriz propuesta en el presente trabajo (cultivos de microalgas), solamente se ha usado esta técnica de extracción para el análisis de cuatro de los HAPs pesados retenidos por la microalga, la

cual se desarrolló previamente en el grupo de investigación [Olmos-Espejel *et al.*, 2012 y García de Llasera *et al.*, 2016].

Tabla 9. Comparación entre diferentes metodologías para la extracción de HAPs en matrices sólidas.

Técnica	Matriz	Analito	Detalles metodología	Referencia
Soxhlet	Tejido de pescado	14 HAPs	350 mL n-Hex.-CH ₂ Cl ₂ (24h extrac.) 20g muestra Cromatog columna con Na ₂ SO ₄ y Alúmina Elución 12 mL de mezcla n-hex-dicloro . % Rec 70-130, CLAR/FL	Vassura <i>et al.</i> , 2005
Ultrasonido	Tejido de mejillones	Criseno	9 mL n-Hex.-CH ₂ Cl ₂ (7 extrac. De 10 min), 35KHz, % Rec 98-105% (5-7%CV) 12 g muestra Espectrofluorescencia	Rodríguez-Sanmartín <i>et al.</i> , 2005
Fluidos supercríticos	Simulada	8 HAPs	Limpieza con columna sílica eliminar grasas 2 g (30 min extrac) a 100°C y 350 Bar, %Rec 80-90 (3-7% CV)	Ali y Cole, 1998
Microondas	Pescado ahumado	16 HAPs	1 g muestra dopada con 10 µg/mL, extraída con 22 mL de KOH y etanol-agua (50%) pot. 500 MHz tiempo 2 min. Posterior extracción líquido-líquido dispersiva. %Rec 82 - 105 CV (2-9%) GC-MS	Ghasemzadeh-Mohammadi <i>et al.</i> , 2012
Dispersión de matriz en fase sólida	Pescado	BaP	0.5 g de muestra en 2 g de sílica-C18 2g de florisil, diluido con 8 mL de CH ₃ CN, %Rec 74-111% GC-MS	Crouch y Barker, 1997.
	Músculo de Pescado	16 HAPs	0.2 g de muestra con 2 g C18/0.5 g Na ₂ SO ₄ anh. 2 g Flo/1 g C18, 10 mL ACN %Rec 80-105%, CLAR/FL	Pensado <i>et al.</i> , 2005
	Microalga <i>S. capricornutum</i>	BaP	0.005 g de muestra con 0.1 g C18/ 1.0 mL ACN 85% %Rec >90%, CLAR/FL	Olmos-Espejel <i>et al.</i> , 2012
	Microalga <i>S. acutus</i>	BaP	0.005 g de muestra con 0.1 g C18/ 1.0 mL ACN 85% %Rec >90%, CLAR/FL	García de Llasera <i>et al.</i> , 2016

La DMFS es físicamente y funcionalmente diferente a la EFS clásica, por las siguientes razones: (1) La DMFS es un proceso que realiza la disrupción de la muestra y la dispersión en partículas de tamaño muy pequeño, proporcionando una superficie mejorada para la extracción posterior, mientras que en la EFS la disrupción debe llevarse a cabo como una etapa separada en la preparación de muestra; (2) Las muestras de EFS deben estar en forma líquida, relativamente libres de sólidos y de viscosidad moderada antes de su adición a la columna, mientras que en la DMFS maneja muestras líquidas sólidas ó viscosas; y (3) Las interacciones físicas y químicas de los componentes del sistema son diferentes y posiblemente más fuertes en algunos aspectos en la DMFS, que en la EFS clásica.

Al aplicar el procedimiento DMFS a una muestra, las interacciones observadas entre los componentes individuales y el ó los analitos implican (1) los componentes de la muestra con el soporte sólido, (2) los componentes de la muestra con la fase enlazada, (3) Analito con el soporte sólido, (4) el analito con la fase unida, (5) el analito con los componentes dispersos de la muestra, (6) todos los anteriores interactuando con el ó los disolventes de elución y estas interacciones dinámicas de todo lo anterior ocurren simultáneamente. Sin embargo, los principios químicos generales implicados en la realización de EFS también son importantes en la aplicación de DMFS, por lo tanto, se espera que la composición química y las características del soporte sólido y de la fase unida afecten a la retención y la elución de los analitos.

4.3.2.1 Procedimiento de la dispersión de matriz en fase sólida.

El procedimiento implica:

- a) La adición de la muestra (líquida, sólida, líquido viscoso) junto con el adsorbente en un mortero de ágata ó vidrio (en relación 1:1 a 1:4 adsorbente: muestra) y someterlo a un proceso de maceración en el cual la matriz sufre un proceso de disrupción y los analitos son dispersados y adsorbidos por el adsorbente (figura 16).
- b) Una vez que se completa la dispersión de la matriz en la fase sólida, el nuevo material se transfiere a una columna. Existen dos posibilidades en la etapa de elución, una en la que los analitos son retenidos en la columna y las interferencias se eliminan en

una etapa inicial de lavado para a continuación eluir los analitos con un disolvente, adecuado, ó aquella en la que las sustancias que interfieren quedan retenidas en la columna y los analitos se eluyen directamente. Se pueden realizar procesos de limpieza antes de la elución como en el caso de la EFS.

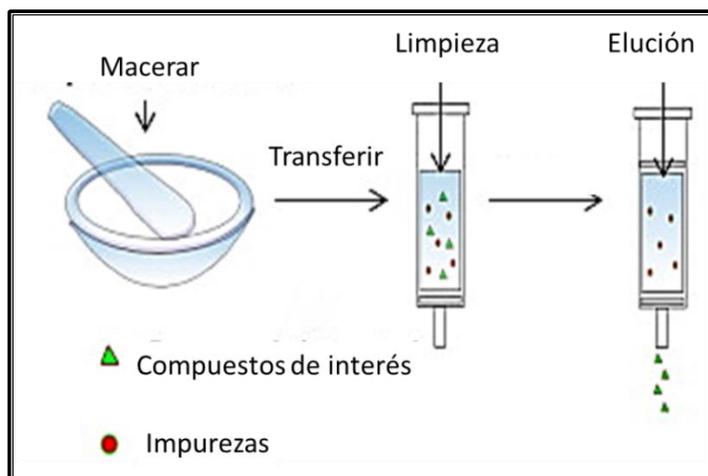


Figura 16. Procedimiento de extracción por DMFS (adaptado de Liu *et al.*, 2014)

4.3.2.2 **Parámetros importantes en el proceso de DMFS.**

Existen varios factores que influyen en la extracción mediante DMFS.

- El tamaño de partículas: El uso de tamaños de partícula muy pequeños (3-10 μm) conduce a tiempos de elución de disolvente prolongados para una columna DMFS, requiriendo presiones excesivas para obtener un flujo adecuado. Sin embargo, los materiales de tamaño de partícula de 40 μm (60 Å como diámetro medio de poro) se han usado con mayor frecuencia al igual que mezcla de sílices del mismo tamaño y tales materiales también tienden a ser menos costosos. La cantidad de adsorbente en relación a la cantidad de muestra es otro parámetro que hay que tener en cuenta, la cantidad más utilizada son 0.5 g de muestra y la relación con el soporte es 1:1 ó 4:1 respectivamente.

- El tipo de disolvente y el volumen del eluyente son otros de los parámetros que influyen en la eficiencia del proceso de extracción mediante esta técnica. El empleo de ácidos, bases, sales, surfactantes y agentes quelantes también ha sido empleado.
- El material del mortero en el cual se realiza el proceso de dispersión debe ser un material inerte, la mayoría de las veces de ágata y en algunas ocasiones de vidrio.

4.3.2.3 Diferencias entre DMFS y EFS.

La DMFS es física y funcionalmente diferente a las EFS bajo los siguientes aspectos:

- La DMFS realiza la disrupción completa de la muestra con la dispersión en partículas de tamaño muy pequeño, proporcionando una superficie mejorada para la extracción posterior de la muestra. En la EFS, la disrupción de la muestra debe realizarse como una etapa separada en la preparación de muestras y con ello muchos de los componentes de la muestra se descartan en el proceso de hacer la muestra adecuada para la adición a una columna EFS.
- En EFS la muestra se suele absorber en la parte superior del material de relleno de la columna, no en toda la columna como en DMFS.
- Las interacciones físicas y químicas de los componentes del sistema son mayores en DMFS y diferentes, en muchos aspectos, de las observadas en la EFS clásica u otras formas de cromatografía líquida. Lo anterior incluye por ejemplo las interacciones entre a) los componentes de la muestra con el soporte sólido, b) los componentes de la muestra con la fase enlazada, c) el analito con el soporte sólido, d) el analito con la fase enlazada, e) el analito con los componentes dispersos de la muestra, f) todos los anteriores interactuando con el ó los disolventes de elución y su secuencia de adición y g) las interacciones dinámicas de todas las anteriores que ocurren simultáneamente.

Sin embargo, los principios químicos generales implicados en la realización de EFS y otras formas de cromatografía también son operables en la aplicación de DMFS. Por lo tanto, se espera que la composición química y las características del soporte sólido y de la fase

enlazada afecten a la retención ya la elución de los analitos. Estas mismas propiedades también se aplican a los componentes dispersos de la muestra y la fase única que se crea.

4.4 Métodos de análisis de HAPs

Los métodos cromatográficos por excelencia han sido los de mayor empleo en la determinación de HAPs. La selección de la técnica, disolventes, fases móviles y estacionarias dependen esencialmente de las propiedades fisicoquímicas de los analitos, pero también es importante el tipo de matriz y la concentración de los componentes en la misma. Al establecer los antecedentes de las metodologías de análisis de HAPs se debe mencionar la Cromatografía de Gases (CG) y la Cromatografía Líquida alta resolución (CLAR), de las cuales en el presente proyecto se empleó la CLAR. Aunque las cromatografías son las más empleadas, también en la literatura se reportan otras técnicas como la electroforesis capilar [Graupner *et al.*, 2014], espectrofotometría [Dissanayake, 2012], o métodos semicuantitativos como los fluorimétricos [Greene *et al.*, 2017].

4.4.1 Cromatografía de Gases (CG)

La CG es una técnica utilizada para la separación de los HAPs, debido principalmente a su buena resolución. La detección se lleva a cabo habitualmente mediante ionización por llama (FID-Flame Ionization Detector) ó mediante espectrometría de masas (EM), siendo este último el más utilizado, debido a la gran sensibilidad asociada a la técnica [Mebarka *et al.*, 2017]. La retención y separación de los HAPs está afectada por el tipo y la cantidad de disolvente, las condiciones de inyección (velocidad, tamaño de “liner”, tamaño de muestra y temperatura) y el programa de temperatura [Trevelin *et al.*, 1992]. En la actualidad la cromatografía bidimensional ha permitido lograr separaciones isométricas [Visser *et al.*, 1998] muy útiles en la determinación de los metabolitos generados por su degradación.

4.4.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) es la técnica de separación más utilizada en la determinación de HAPs y su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente. La detección de FL presenta dos ventajas sobre la detección UV, la gran selectividad y mayor sensibilidad. Ambos aspectos son cruciales puesto que las muestras medioambientales y en especial las biológicas, que son el objeto de la presente investigación, pueden contener bajos niveles de HAPs y gran cantidad de compuestos que pueden interferir en el análisis [Denis *et al.*, 2012 y Olmos-Espejel *et al.*, 2012]. El detector de fluorescencia se caracteriza tanto por su elevada selectividad (pocas son las moléculas que exhiben fluorescencia, aunque el número aumenta por formación de derivados fluorescentes pre ó post-columna) como por su gran sensibilidad, por lo que resultan muy útiles en el análisis de compuestos a niveles traza. Por su parte, la detección por UV cuando se emplea arreglo de diodos (DAD), ofrecen límites de detección altos y la información es muy útil a la hora de confirmar identidades. La cromatografía en fase inversa, utilizando C18 como fase estacionaria, es el método más habitual para llevar a cabo la separación y determinación de los HAPs. El principal requisito es que los compuestos se solubilicen en los disolventes utilizados como fase móvil, se ha estudiado la retención y la selectividad de un grupo de HAPs en cinco tipos de columnas en fase inversa (C18, C18 aqua, propil-fenil, Synergi polar-RP y Cosmosil 5PBB) [Kayillo *et al.*, 2007].

4.4.3 Acoplamiento CLAR/CGAR-EM

La técnica de CLAR-EM ha permitido el estudio de los probables mecanismos bioquímicos asociados a la biodegradación de los HAPs, lo cual es importante debido a la dificultad que presenta la identificación de metabolitos debido a efecto matriz ó al pretratamiento de la muestra, aunque también podría creerse que la presencia de metabolitos puede inhibir significativamente la degradación de otros HAPs padre [Kuusimäki *et al.*, 2004]. Los reportes para esta técnica en el análisis de HAPs indican que los sistemas de ionización más empleados para el acoplamiento CLAR-EM son la ionización electro-espray (ESI-

Electrospray Ionization) y la desorción por láser (MALDI-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), los cuales conducen a la obtención de un ión molecular que permite la identificación de estos compuestos [Zhang *et al.*, 2010]. Sobre los metabolitos no se encuentran reportes en la literatura debido a que son ionizaciones suaves que no permiten la identificación de isómeros estructurales como es el caso de los metabolitos objeto del presente estudio, aunque la técnica CG-EM puede ser altamente sensible para el seguimiento de la formación de metabolitos especialmente en el modo de monitoreo del ion seleccionado (SIM-Selected ión Monitoring) [Yang *et al.*, 2014 y Saija *et al.* 2016].

La fragmentación de los HAPs con las fuentes de ionización comunes suele ser baja, en consecuencia, el pico correspondiente al ión molecular presenta generalmente gran intensidad [Possanzini, 2004]. El aspecto a tener en cuenta es la derivatización del analito en caso de los metabolitos formados (mono-hidroxilados, dihidrodioles, quinonas, entre otros), donde uno de los avances recientes permite recobrar los metabolitos de HAPs por microextracción fase sólida (SPME-Solid Phase Micro Extraction) y realizar la derivatización en fibra, permitiendo un aumento en la sensibilidad [Luan *et al.*, 2007]. En la tabla 10 se presentan algunas aplicaciones de las diferentes técnicas analíticas para la determinación de HAPs y sus metabolitos. Es más empleada que la CLAR-EM e incluso varios métodos de la USEPA emplean como técnica de identificación y cuantificación CG-EM como ejemplo el método 525.5 para la determinación de compuestos orgánicos semivolátiles en aguas de bebida empleando EFS como técnica de extracción, para 11 HAPs. El método 8270D para el análisis de compuestos orgánicos semivolátiles donde se incluyen 15 HAPs, entre otros.

4.5 Validación de métodos analíticos

El proceso de validación de un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el usuario para poder resolver un problema analítico particular, mediante el cual se establece por medio de estudios de laboratorio que las características representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su aplicación.

Los experimentos de validación de métodos pretenden demostrar que un método analítico producirá un rendimiento aceptable del método. Existen varias directrices que describen los requisitos para la validación del método [Barnett *et al.*, 2017 y Sahu *et al.*, 2018]. También están disponibles numerosos artículos de literatura que demuestran cómo realizar la validación del método de cromatografía líquida (LC) según estas directrices [Serpe *et al.*, 2010 y McMillan, 2016]. Aunque los experimentos de validación tradicionales proporcionan información útil sobre las características del método, representan un evento único que puede no predecir el rendimiento futuro del método. Por otra parte, la verificación es la confirmación mediante el aporte de evidencia objetiva que se han cumplido los requisitos especificados con el fin de demostrar su capacidad para ejecutar correctamente un método normalizado.

Tabla 10. Reportes sobre el empleo de sistemas cromatográficos en el análisis de HAPs.

Método	Analitos	Fase estacionaria	Fase móvil	Matriz	Referencia
CCDA* CLAR/FL	16 HAPs EPA	ChromSpher Pi 80 x 3.0mm C18 (limpieza) Agilent Pursuit 3 PAH 100 x 4.6mm C18 (separación)	Gradiente diclorometano- isopropanol	Aceite y plantas secas	Windal <i>et al.</i> , 2008
CLAR/FL	12 HAPs EPA	Hanban Science & Technology C18 column x 260 mm	Gradiente Acetonitrilo-Agua	Aguas consumo	Zhang <i>et al.</i> 2010
CLAR/FL	12 monohidrox- HAPs	Discovery RP-Amide C16, 250 mm (Discovery RP-Amide C16, 100 mm)	Isocrático Acetonitrilo:buffer fosfatos Metanol/Agua	Orina	Toriba <i>et al.</i> , 2003
CLAR/FL	15 HAPs EPA	Vydac 201TP54 x 250 mm; C18	Gradiente Acetonitrilo:agua	Agua de Rio	Brum <i>et al.</i> , 2008
CLAR/UV	Fen, Ant, Fluo	Dr Maisch C18 column x 260 mm	Isocrático metanol:agua	Agua destilada	Fatemi <i>et al.</i> , 2012
CG-EM	18 HAPs	5% phenyl-95% dimethyl polysiloxane 30m	Helio	No aplica	Pyle <i>et al.</i> , 1997
CG-EM/EM CLAR-DAD	Ant, Fen, Flu, Pir y derivados	HP-5MS column x 30m Licosphere C18 x 250 mm	Helio Isocrática Metanol:Agua	Medio de Cultivo	Cajthaml <i>et al.</i> , 2002

*CCDA Cromatografía de complejos donador-aceptor

4.5.1 Clasificación de los métodos analíticos

- **Métodos Normalizados:** Método analítico desarrollado por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente. El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.
- **Métodos No-Normalizados:** Método analítico desarrollado por un tercero ó que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado. El desarrollo del método, así como su adaptación, incluyen la etapa de su validación.
- **Métodos desarrollados por el laboratorio:** Método analítico que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollado por el propio laboratorio. El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.

De acuerdo a la anterior clasificación se llevan a cabo procesos de validación en los métodos no normalizados, en aquellos diseñados por el laboratorio y en todo método normalizado que ha sido modificado por el laboratorio ó utilizado fuera del alcance previsto por éste. No se realiza validación en métodos normalizados, en métodos oficiales ó en métodos desarrollados por organizaciones internacionales reconocidas.

4.5.2 Características del proceso de validación.

A continuación, se definen las características requeridas y examinadas al llevar a cabo la validación. Cuando sea apropiado, se realizará una discusión junto con los típicos criterios de aceptación para las diferentes características de validación.

4.5.2.1 Especificidad.

La especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes, que se puede esperar que estén presentes. Típicamente, éstas pueden incluir impurezas, productos de degradación, matriz, etc. La falta de especificidad de un método analítico individual puede ser compensada por un método analítico adicional. En esta etapa el análisis del blanco es esencial ya que debe estar libre de señales que puedan interferir con los analitos de interés [ICH Q2A, 1995].

4.5.2.2 Exactitud.

La exactitud de un método analítico expresa la proximidad de acuerdo entre el valor obtenido (por experimentos prácticos) y el valor que se acepta como un valor verdadero convencional ó como un valor de referencia aceptado. La exactitud puede ser expresada como porcentaje (%) de recuperación. Normalmente, se solicita que se prueben tres repeticiones por nivel a un mínimo de tres niveles de concentración a lo largo del intervalo experimental especificado. Los criterios de aceptación se fijan para el intervalo de ensayo del compuesto principal y para el intervalo de las impurezas.

4.5.2.3 Precisión.

La precisión de un método analítico expresa la proximidad entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas en el método de ensayo. La precisión se determina generalmente a diferentes niveles: repetibilidad (repetibilidad del sistema, repetibilidad del análisis), precisión intermedia y reproducibilidad [Center for Drug Evaluation and Research-CDER, 1994 y Food & Drug Administration-FDA, 2000,]. El término precisión describe la distribución de los resultados individuales alrededor de su promedio. La desviación estándar, la desviación típica relativa (coeficiente de variación) y el intervalo de confianza deben ser reportados para cada tipo de precisión investigado además de los resultados individuales obtenidos y la media.

La repetibilidad del sistema se mide por inyecciones múltiples de la misma solución de referencia y se expresa como la desviación estándar relativa en las áreas de los picos medidos.

La repetibilidad del análisis (dentro de la precisión diaria ó intra-ensayo) se determina analizando un lote de muestra representativo a la concentración nominal de la muestra seis veces determinaciones que cubran el intervalo especificado del método de ensayo.

La precisión intermedia expresa las variaciones de laboratorio (efectos de sucesos aleatorios sobre la precisión del método analítico), a diferentes días, diferentes analistas,

diferentes equipos, etc. Si se dispone de datos para apoyar la reproducibilidad, no es necesario realizar una evaluación de precisión intermedia.

4.5.2.4 Reproducibilidad.

La reproducibilidad expresa la precisión entre los laboratorios. La reproducibilidad permite la reducción de la incertidumbre en el sistema de medidas, por lo que busca la máxima exactitud. Como se vale de la reproducción de un mismo resultado en varias condiciones, depende de que los estudios realizados se realicen en un periodo determinado de tiempo

4.5.2.5 Linealidad.

La linealidad de un método analítico es su capacidad (dentro de un rango dado) para obtener resultados de prueba, que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra. Se requiere tener al menos cinco niveles de concentración (puntos de datos) para determinar la linealidad.

4.5.2.6 Rango dinámico lineal

El rango de un método analítico es el intervalo entre la concentración (cantidades) superior e inferior de analito en la muestra (incluidas estas concentraciones) para las que se ha demostrado que el método analítico tiene un nivel adecuado de exactitud, precisión y linealidad.

4.5.2.7 Límites de detección y cuantificación.

El límite de cuantificación (LC) es la cantidad más baja de analito en una muestra, que puede determinarse cuantitativamente con un nivel adecuado de precisión y exactitud. El límite de detección (LD) de un método analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto [CDER, 1994 y FDA, 2000].

Para el cálculo se consideran dos métodos, el primero con el promedio de la señal de ruido y se determina como 3 veces la relación señal/ruido para la señal del límite de detección y 10 veces para el límite de cuantificación; El segundo método es empleando

la curva de calibración y el método de mínimos cuadrados para el cálculo, las ecuaciones utilizadas se muestran a continuación de donde se establece $S_{y/x}$ como la desviación estándar del intercepto de las curvas de calibración y \bar{m} es el valor de la pendiente media.

$$LD = \frac{3 S_{y/x}}{\bar{m}} \quad (Ec. 1) \quad ; \quad LQ = \frac{10 S_{y/x}}{\bar{m}} \quad (Ec. 2)$$

4.5.2.8 Robustez

Se considera que un método es robusto cuando se demuestra que el efecto de fluctuaciones típicas en los parámetros del método sobre el resultado del procedimiento es insignificante. La robustez se demuestra mediante una prueba en la que el efecto de cambios deliberados en los parámetros del método se estudia en un número de respuestas de método.

4.5.3 Empleo de la revalidación ó verificación de un método analítico.

La revalidación se refiere al acto de realizar el proceso de validación en un dispositivo nuevamente, ya sea porque las especificaciones de las etapas del método, el equipo, ó los parámetros de los procesos validados ó los materiales empleados han cambiado. Mientras la verificación de un método es el proceso realizado cuando en un laboratorio se está utilizando un método que ya ha sido validado, y que no es necesario volver a validar en su totalidad después de un tiempo ó al aplicarlo en campo, dicho método debe verificarse bajo el establecimiento del cumplimiento de los parámetros mínimos de la validación. Normalmente la verificación supone determinar el cumplimiento de menos parámetros y hacer menos mediciones de cada parámetro que si se tratara de una validación.

5. METODOLOGÍA

5.1. Materiales y equipos

Disolventes

- a) Disolventes grado cromatográfico, marca J.T Baker (Philipsburg, NJ, USA) metanol, isopropanol, acetonitrilo.
- b) Agua ultrapura tipo I obtenida de un desionizador Millipore modelo Simplicity UV (Bedford, Ma, USA)
- c) Reactivos marca J. T. Baker: Nitrato de sodio (NaNO_3), Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) para la preparación del medio Bristol.
- d) Reactivos marca MCD LAB (Tlalnepantla, MEX, México) Peptona proteosa y agar bacteriológico.
- e) Estándares marca Chem Service Standards (West Chester, PA, USA) de los cuatro HAPs estudiados (BaA, BbF, BkF y BaP), y los empleados en el estudio de crecimiento del alga: fenantreno (Fen), antraceno (Ant), pireno (Pir) y dibenzo(a,h)antraceno (DBA).
- f) Estándares de metabolitos obtenidos de National Cancer Institute-NCI (Chemical Carcinogen Reference Standards Repository) (Kansas, MO, USA), de Benzo(a)pireno: 4,5-dihidrodiol (4,5-dBaP), 7,8-dihidrodiol (7,8-dBaP), 9,10-dihidrodiol (9,10-dBaP); de Benzo(a)antraceno: 5,6-dihidrodiol (5,6-dBaA), 8,9-dihidrodiol (8,9-dBaA), 10,11-dihidrodiol (10,11-dBaA); de Benzo(b)fluoranteno: 1,2-dihidrodiol (1,2-dBbF), 9,10-dihidrodiol (9,10-dBbF), 11,12-dihidrodiol (11,12-dBbF) y del Benzo(k)fluoranteno el 8,9-dihidrodiol (8,9-dBkF).

Sistema cromatográfico

- a) Cromatógrafo líquido de alta resolución Varian modelo 210 acoplado a un detector de fluorescencia (DF) Varian modelo 363 y a un detector de DAD/UV Varian modelo polychrom 9065 (Palo Alto, CA, EUA) con un software de

procesamiento de datos “Star Workstation” Varian multi instrumento versión 6.20. para el análisis de metabolitos de HAPs y HAPs, respectivamente.

- b) Columna analítica de acero inoxidable, Hichrom spherisorb S5ODS2, marca Waters (Milford, MA,EUA) de 250 mm x 4.6 mm I.D., para la separación de los metabolitos y una columna analítica de acero inoxidable Hypersil Green PAH (150 mm x 4.6 mm) marca Thermo Scientific (Dubuque, IA, EUA) para la separación de HAPs.
- c) Columnas de guarda de acero inoxidable, marca UPCHURCH SCIENTIFIC (Oak, WA, EUA) de 13 mm x 4.5 mm I.D.) empacadas con sílice fase inversa Nucleosil C18 Phenomenex (Torrance, CA, EUA) de 10 µm de tamaño de partícula.
- d) Jeringas de 50 µl, marca Hamilton (Reno, NV, EUA).
- e) Micropipetas de volumen variable de 2-20 µl, 50-200 µl y 100-1000 µl, marca transferpette Brand (Alemania)

Cultivos de microalgas, técnicas de extracción de HAPs y metabolitos

- a) Cepas puras de *S. capricornutum* y *S. acutus* obtenida de The Culture Collection of Algae (UTEX) de la Universidad de Texas (Austin, TX, USA).
- b) Balanza analítica marca OHAUS (Pine Brook, NJ, EUA) modelo Adventurer Pro AV114C.
- c) Balanza semi-microanalitica OHAUS (Pine Brook, NJ, EUA) modelo Discovery DV215CD.
- d) Agitador orbital marca Thermo Scientific Model 2346 (Dubuque, IA, EUA).
- e) Incubadora con agitación Lab companion, marca Jeiotech (Seoul, Korea) modelo SI-600R.
- f) Autoclave semi-automática marca tuttner (Hauppauge, NY, EUA) modelo 2540EL.
- g) Centrífuga marca Sigma (Osterode am, Alemania) modelo 2-5.
- h) Espectrofotómetro UV/Vis marca Thermo Scientific (Dubuque, IA, EUA) modelo Genesys 10S.

- i) Mortero de ágata con pistilo, espátula, asa bacteriológica, matraces de 250 mL, mecheros bunsen, tubos de centrifuga, matraces aforados de 1, 5, y 10 mL, pipetas pasteur, frascos de vidrio transparentes y ámbar de 1, 3, 10 y 15 mL.

5.2. Cultivos de microalgas

Se preparó medio Bristol líquido, en un frasco de 1L de capacidad, se adicionaron 10 mL de una mezcla de sales: NaNO_3 (2.94 mM), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.17 mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.30 mM), K_2HPO_4 (1.29 mM), NaCl (0.43 mM), y KH_2PO_4 (1.29 mM); 1 g de proteosa peptona y completó el volumen con agua destilada. Para el medio sólido se adicionó el medio Bristol y agar bacteriológico en relación porcentual 1.5% p/v. Las cepas de microalgas *S. capricornutum* y *S. acutus* se sembraron en tubos que contenían aproximadamente 10 mL de medio brístol sólido y eran resembrados periódicamente para mantener la cepa.

Los medios de cultivos con microalgas empleados en los ensayos, se mantuvieron en crecimiento empleando 150 mL de medio brístol líquido colocados en matraces erlenmeyer, de 250 ml. El procedimiento de siembra consistió en tomar con el asa bacteriológica una cantidad de microalgas del medio de cultivo sólido y transferirlo al medio líquido. Posteriormente se colocaron a temperatura ambiente y bajo iluminación con lámparas fluorescentes de luz fría, con periodos de luz/oscuridad de 16/8h y agitación orbital durante 2 h/día y agitación manual durante 15 min, cuatro veces al día.

En diferentes periodos de tiempo de las cepas para comprobar el crecimiento de las mismas se tomaron 5 mL del medio de cultivo y se le midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV/Vis a 685 nm, usando como blanco medio Brístol. Cuando el cultivo alcanzaba la absorbancia de 1.0 con una densidad entre 5×10^6 a 6×10^6 células mL^{-1} fue posible emplearlo en los ensayos de exposición por encontrarse en el punto más alto de la tasa de crecimiento, de tal forma que con un volumen de 15 mL de cultivo se obtuvieron aproximadamente 5 mg de biomasa.

5.3. Desarrollo del sistema cromatográfico para el análisis de metabolitos de HAPs

Para el desarrollo de la metodología instrumental, se tuvo en cuenta los siguientes aspectos:

5.3.1. Factores de retención.

El primer paso fue la determinación de los factores de retención para todos los estándares de metabolitos de HAPs. Para el procedimiento experimental se empleó una columna C18 Hichrom spherisorb S5ODS2 de 250 mm × 4.6 mm DI x 5 µm, y un cromatógrafo líquido modelo Varian 210 acoplado a un detector de fluorescencia modelo Varian 363 (Palo Alto, CA, EUA) y conectado a una estación de trabajo Workstation Multi-instrument versión 6.20. A continuación, se preparó una dilución de cada estándar de dihidrodioles de 10 µg/L (9,10-; 4,5-; 7,8-dihidrodioles del BaP, 5,6-; 8,9-; 10,11-dihidrodioles del BaA, 1,2-; 11,12-; 9,10-dihidrodioles del BbF y 8,9-dihidrodiol del BkF) y variando los porcentajes de metanol en una fase móvil isocrática, se determinó el log k'. El tiempo muerto fue estimado por el tiempo de retención de un soluto no retenido, empleando una solución de 10 µg/L de nitrato de sodio estimando este tiempo en 1.99 min.

5.3.2. Condiciones de elución.

Teniendo en cuenta los valores de log k' encontrados se procedió a realizar la implementación de la metodología para la separación cromatográfica de los metabolitos empleando la elución por gradiente con mezcla metanol:agua.

5.3.3. Longitudes de onda de trabajo.

Se encontraron las longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas para los metabolitos de BaA, BbF y BkF. Para el procedimiento se empleó una solución de cada metabolito y se determinó los espectros de excitación y emisión (fluorescencia) bajo los siguientes parámetros: Longitud de inicio 200 nm (excitación) y 350 nm (emisión)

Velocidad de barrido 40 nm/min

5.4. Validación del sistema cromatográfico para los metabolitos de los HAPs

5.4.1. Límites de detección y cuantificación

Para el cálculo se consideraron dos métodos, el primero con el promedio de la señal de ruido de 7 inyecciones de solvente, y el segundo realizando inyecciones de la mezcla de metabolitos disminuyendo la concentración hasta alcanzar experimentalmente los valores calculados.

5.4.2. Repetibilidad y rango dinámico lineal.

El rango dinámico lineal para los metabolitos se estableció entre valores cercanos al límite de cuantificación y 10 µg/L para el método 1 (cuantificación de metabolitos del BaP y BaA) y de 16 µg/L para el método 2 (cuantificación de metabolitos del BbF y BkF). La repetibilidad se evaluó realizando 3 inyecciones de 3 concentraciones diferentes en diferentes días para cada método.

5.4.3. Curva de calibración.

Se prepararon tres curvas de calibración en un intervalo de concentraciones de 0.26, 0.64, 0.96, 1.60, 2.40, 3.20, 4.80, 6.40 y 9.60 µg/L (método 1- cuantificación de metabolitos de BaP y BaA) y a las anteriores se sumó 12.80 y 16.00 µg/L para el método 2 (cuantificación de metabolitos del BbF y BkF), se determinó la repetibilidad en cada nivel de concentración y el cálculo de los límites de detección y cuantificación teóricos.

Por otra parte, previamente en el laboratorio se llevó a cabo la validación del sistema cromatográfico para los cuatro HAPs de estudio (BaA, BaP, BkF y BbF) empleando un cromatógrafo líquido conformado por una bomba ProStar 210 (Varian) y un detector UV-DAD polychrom 9065 (Varian) a longitud de 254 nm para la detección de los HAPs. En el presente trabajo se partió de esas condiciones para optimizar la selección de columna cromatográfica y posteriormente realizar la verificación del sistema cromatográfico mediante la determinación de límites de detección y cuantificación, creación de la curva de calibración para la nueva columna empleada.

- Selección de la columna cromatográfica.

Se evaluaron 5 columnas cromatográficas de 15 cm (2 columnas Eclipse XDBC18, 1 columna Hypersil ODS, 1 columna Envirosep HAP, 1 columna Hypersil green HAP) para la separación de los 4 HAPs, benzo(a)pireno -BaP, benzo(a)antraceno- BaA, benzo(b)fluoranteno- BbF y benzo(k)fluoranteno- BkF. Se preparó un estándar de concentración de 2 µg/mL de cada HAP a evaluar y se realizó la determinación de los tiempos de retención, eficiencia y resolución (entre el BkF y BbF), la fase móvil empleada fue metanol 85% y agua 15% en modo isocrático y con un flujo de 1 mL/min.

5.5. Verificación del sistema cromatográfico para la determinación de los HAPs

5.5.1. Repetibilidad y reproducibilidad.

Se evaluó la repetibilidad del sistema cromatográfico, empleando el estándar de 1.33 µg/mL (concentración correspondiente a 0.266 µg/mL en 15 mL de medio), el cual se inyectó 5 veces en el cromatógrafo determinando la variabilidad en los tiempos de retención y área para cada uno de los 4 HAPs.

5.5.2. Curva de calibración.

Se prepararon tres curvas de calibración en un intervalo de concentraciones de 0.11, 0.22, 0.43, 0.64, 1.07, 1.28, 2.0 y 4.0 µg/mL, se determinó la repetibilidad en cada nivel de concentración y se calcularon los límites de detección y cuantificación teóricos.

5.6. Métodos EFS-CLAR/FL/UV y DMFS-CLAR/FL/UV

5.6.1. Metabolitos de los HAPs por EFS-CLAR/FL y DMFS-CLAR/FL.

5.6.1.1. Revalidación del método EFS-CLAR/FL.

Se tuvo en cuenta una metodología previamente validada en el laboratorio para la extracción en fase sólida de 4 metabolitos del BaP, en el medio de cultivo (por medio de EFS) y biomasa (utilizando DMFS) empleando sílice Chromabond C₁₈ [Olmos-Espejel et

al., 2012]. En el presente estudio se realizó la optimización y validación de esta metodología al incluir 10 metabolitos y emplear otra sílice C₁₈ diferente al método previamente mencionado. Para ello, se preparó un estándar que contenía 3 metabolitos de diferentes polaridades (de acuerdo con el orden de elución de la corrida cromatográfica), y provenientes de diferente HAP, los cuales fueron, el 9,10-dihidrodiol del BaP, el 8,9-dihidrodiol BaA y el 9,10-dihidrodiol del BbF. Se procedió a evaluar la repetibilidad y reproducibilidad realizando la extracción por triplicado durante 3 diferentes días. Se empleó la sílice Supelclean C-18, para la extracción en fase sólida, con la cual se recuperaron metabolitos y HAPs del medio de cultivo y se inició evaluando para los tres metabolitos mencionados los porcentajes de recobro del método. Posteriormente, se evaluaron los aspectos relacionados con el cambio de la fuerza de la fase eluyente, específicamente porcentajes de acetonitrilo en la mezcla a 60 y 70% y volumen de eluyente de 3 y 4 ml.

Los parámetros de calidad para la validación del método EFS-CLAR/FL se realizaron empleando la metodología de curva de calibración con diferentes concentraciones de metabolitos (0.85, 1.28, 2.13, 4.27, 6.40, 12.80 y 15 µg/L) que fueron adicionadas al medio de cultivo de microalgas y a las cuales posteriormente se procedieron a extraer (n=3). Para la determinación del LD y LC se adicionaron concentraciones equivalentes a 0.85, 0.5, 0.3, 0.1 y 0.05 µg/L, se realizó la extracción y analizó empleando un cromatógrafo de líquidos.

El análisis de los extractos se realizó a la longitud de absorción de fluorescencia de 260 y emisión de 410, característica para los metabolitos del BaP y BaA, los metabolitos del BbF y BkF fueron analizados a las longitudes de onda de 270 y 438 para absorción y emisión, respectivamente. En todos los casos se utilizó un medio proveniente de un cultivo de microalgas con absorbancia de 1.0 (medida por espectroscopia UV). El procedimiento de extracción para metabolitos y HAPs se presenta en la figura 17.

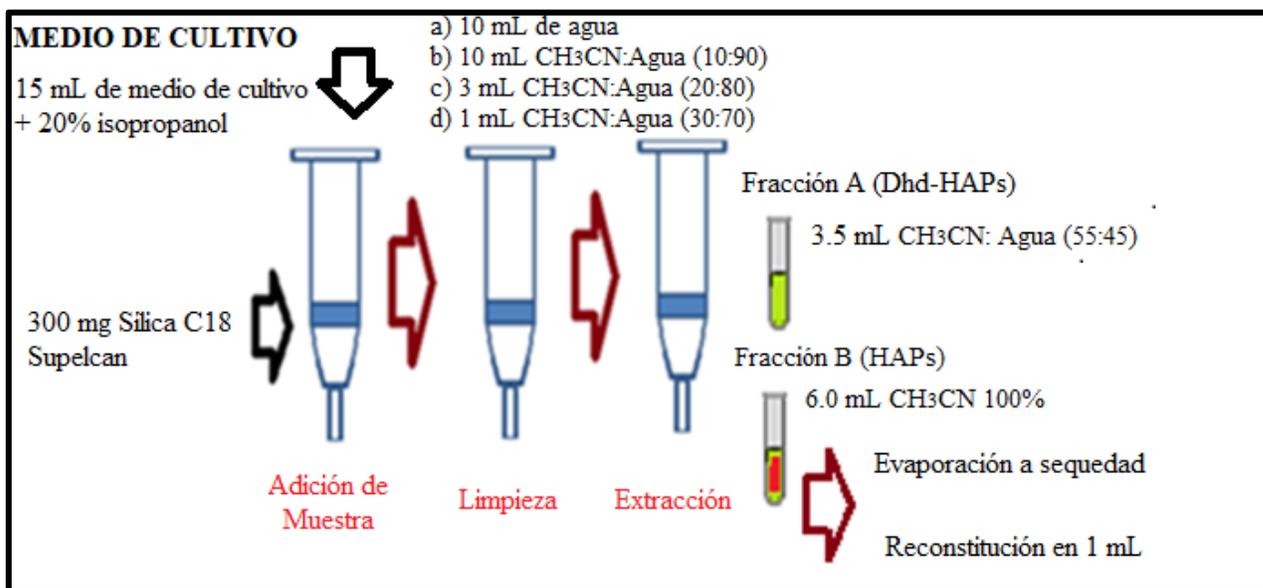


Figura 17. Metodología de extracción en fase sólida de metabolitos y HAPs del medio de cultivo.

5.6.1.2. Revalidación del método DMFS-CLAR/FL.

Basado en el método validado previamente se realizó la revalidación del método para los 10 metabolitos objeto de este estudio. Se inició empleando los 3 metabolitos 9,10-dihidrodiol del BaP, 8,9-dihidrodiol del BaA y 9,10-dihidrodiol del BbF para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad del mismo, se adicionó el estándar preparado a 100 mg de sílice Chromabond C18, se realizó la extracción por dispersión de matriz en fase sólida y se varió el volumen de fase eluyente (1.5, 2 y 2.5 mL). Se prepararon tres series de muestras de biomasa fortificadas con estándares de concentraciones entre 0.5 y 6.0 ng/mg y se realizó la extracción siguiendo el procedimiento de la figura 18. Para determinar los límites de detección y cuantificación del método DMFS-CLAR/FL se adicionaron concentraciones equivalentes a 0.75, 0.5, 0.3, 0.1 ng/mg de biomasa, el límite de detección se calculó como 3 veces la relación señal/ruido y el de cuantificación como 10 veces esta relación. En todos los casos se emplearon 100 mg de sílice ChromabondC18 y 5 mg de biomasa seca.

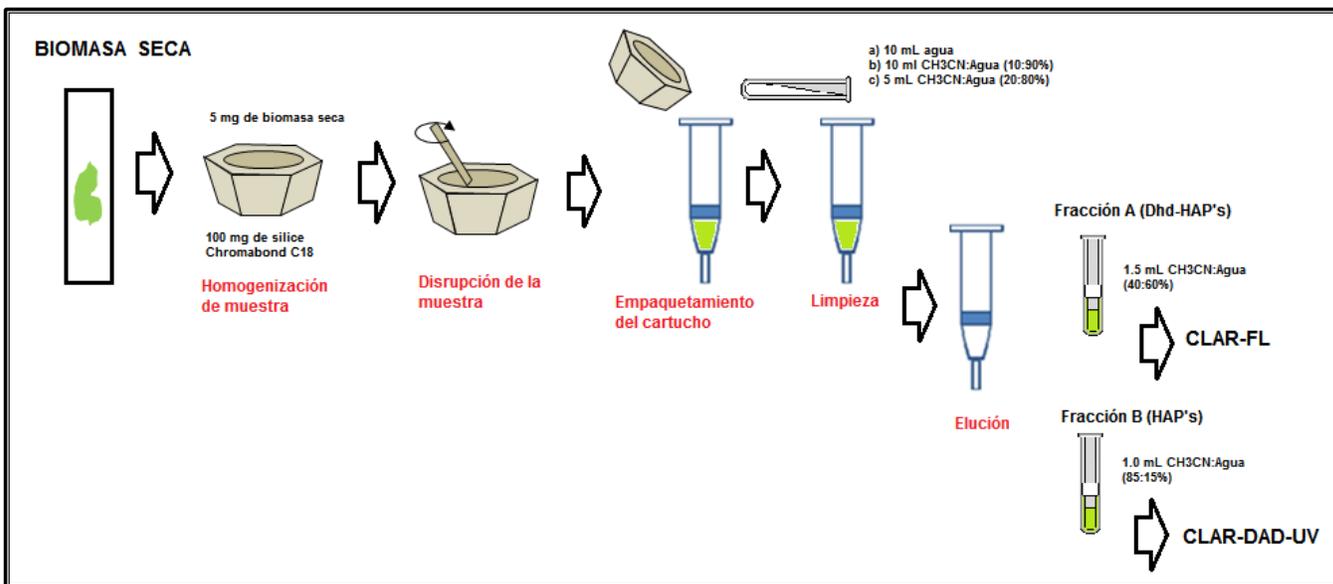


Figura 18. Metodología de dispersión de matriz en fase sólida para la extracción de metabolitos y HAPs de la biomasa.

5.6.2. Método para HAPs por EFS-CLAR/UV y DMFS-CLAR/UV.

5.6.2.1. Revalidación del método EFS-CLAR/UV.

Para la extracción de los HAPs se empleó el método creado por Olmos-Espejel *et al.*, (2012), y se realizó la revalidación al realizar el cambio de sílice como se mencionó en 5.5.1.1. A continuación, se prepararon 5 muestras con una concentración final de 266 $\mu\text{g/L}$ de HAPs en 15 mL de medio de cultivo sin microalgas para someterlas al proceso de extracción en fase sólida, la figura 16 muestra el procedimiento de EFS realizado. Se analizó el extracto obtenido para la elución de los dihidrodioles (fracción A) con el fin de identificar la posible elución de alguna fracción de los HAPs. Se evaluó los recobros en función del volumen de fase extrayente adicionada para 4, 5 y 6 mL.

5.6.2.2. Verificación del método DMFS-CLAR/UV.

Empleando 100 mg de sílice Chromabond C-18 para la extracción, se tomaron 5 mg de biomasa seca y se adicionó una alícuota de solución de HAPs hasta una cantidad final de 4 μg , se realiza el procedimiento reportado en la figura 17 y se obtienen las dos fracciones, la de elución de los metabolitos y la de los HAPs, los cuales se analizan por el método

cromatográfico para determinar la presencia de HAPs en la fracción de metabolitos y la que contiene los HAPs para la determinación de porcentajes de recobro.

5.7. Ensayos de exposición

5.7.1. Crecimiento de la microalga en medio líquido contaminado

Antes de los ensayos de exposición se realizó el estudio del crecimiento de la especie *Selenastrum capricornutum* en un medio contaminado, para evaluar si su desarrollo continuaba aún después de ser sometida a un estrés con la cantidad de HAPs adicionada ó si por el contrario se presenta inhibición ó muerte. Se realizó este procedimiento empleando 100 mL de medio de cultivo Bristol con 1% en peso de proteosa, a la cual se agregó:

- a. Alícuotas de solución de BaP hasta tener en el medio de cultivo concentraciones de 100 µg/L, 266 µg/L y 4 mL de un cultivo en crecimiento (absorbancia de 0.700) con una cantidad inicial de especies 2×10^5 células por mililitro.
- b. Alícuotas de una mezcla de 8 HAPs (fenantreno, antraceno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y dibenzo(a,h)antraceno) necesario para obtener una concentración en el medio de 100 y 266 µg/L respectivamente y 4 mL de un cultivo en crecimiento (absorbancia de 0.700) con una cantidad inicial de especies 2×10^5 células por mililitro.
- c. Alícuota de 4 mL de un cultivo en crecimiento (absorbancia de 0.700) con una cantidad inicial de especies 2×10^5 células por mililitro que se tomó como cultivo de control.

Se empleó luz blanca para el crecimiento de la especie *S. capricornutum* siguiendo las condiciones de crecimiento estandarizadas en el laboratorio, descritas a continuación:

Temperatura de incubación: Ambiente

Agitación: 100 rpm

Medio de cultivo: Bristol + 1 g de proteosa peptona

Iluminación: Luz fría (16h/8h)

Tiempo de crecimiento: entre 20 a 25 días

El seguimiento del crecimiento de la especie por la adición de los contaminantes se realizó tomando muestra del cultivo a diferentes tiempos de crecimiento y analizando por medio de los valores de absorbancia empleando espectrofotometría UV-Vis a una longitud de onda de 684.5 nm, el momento inicial cuando se mezcla la alícuota de cultivo de microalgas con el medio contaminado fue establecido como el tiempo cero del experimento y se realizó la medición de absorbancia y el conteo empleando la cámara de Neubauer. Se realizó la comparación con un cultivo control sin someterse a estrés por la presencia de contaminantes y el cual creció en condiciones normales de laboratorio.

5.7.2. Ensayos de exposición con mezcla de HAPs (BaA, BbF, BkF, BaP) a concentración de 266 µg/L con la microalga *Selenastrum capricornutum* (3×10^6 células/mL) en función del tiempo (0.75, 1, 3, 8, 16, 24 y 48 h) a 25°C.

Para el ensayo de exposición se empleó una mezcla los 4 HAPs (BaA, BbF, BkF y BaP) se adicionó en el medio de cultivo que contenía 15 mL de un cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum* (5×10^6 células mL⁻¹) hasta alcanzar una concentración final de 266 µg/L (figura 18). Se empleó un sistema de agitación con control de temperatura a 25°C y agitación constante de 60 rpm, se utilizó una lámpara de luz amarilla de 40 watt y se realizaron exposiciones durante diferentes periodos de tiempo (0.75, 1, 3, 8, 16, 24 y 48 h), estableciendo el tiempo inicial la adición de la concentración de HAPs al medio de cultivo. Una vez cumplido el tiempo de exposición se realizó la centrifugación del medio con microalgas a 2000 rpm durante 25 min con el fin de separar el medio líquido de la biomasa, después se procedió con la extracción EFS para el medio de cultivo (ME medio líquido) y DMFS para la biomasa (ME Biomasa), como se muestran en las figuras 17 y 18. Se evaluó empleando CLAR/FL/UV la formación de metabolitos y la disminución de HAPs presentes en el medio líquido y en la biomasa, respectivamente, todos los ensayos de exposición y extracciones se realizaron por triplicado. En todos los ensayos de exposición se empleó una muestra control (MC) que consistía en la adición sobre 15 mL de cultivo

sin algas de la concentración de exposición, 266 ngmL⁻¹ de HAPs y un blanco consistente en 15 mL de medio líquido con microalgas sin HAPs con el fin de identificar posibles interferencias.

5.7.3. Ensayos de exposición con mezcla de HAPs (BbF, BkF) a concentración de 266 µg/L con la microalga *Scenedesmus acutus* (5x10⁶ células mL⁻¹) en función del tiempo (16, 24, 48 y 76h) a 25°C.

Se evaluó la formación de metabolitos y la disminución de la mezcla de HAPs presentes en el medio líquido y en la biomasa, realizándose los ensayos de exposición por triplicado. Se empleó una mezcla de BbF y BkF, se adicionó en el medio de cultivo que contenía la microalga *Scenedesmus acutus* (5x10⁶ células mL⁻¹) hasta alcanzar una concentración final de 266 µg/L. Se empleó un sistema de agitación con control de temperatura a 25°C y agitación constante a 60 rpm, se utilizó una lámpara de luz amarilla de 40 watt y se realizaron exposiciones durante diferentes periodos de tiempo (16, 24, 48, 72 y 96 h) realizándose los ensayos de exposición por triplicado (figura 19). Se estableció el tiempo inicial (tiempo cero) la adición de la concentración de HAPs al medio de cultivo. Una vez cumplido el tiempo de exposición se realizó la centrifugación del medio con microalgas a 2000 rpm durante 25 min con el fin de separar el medio líquido de la biomasa, después se procedió con la extracción EFS para el medio de cultivo (ME medio líquido) y DMFS para la biomasa (ME Biomasa) al igual que en el ensayo anterior. En todos los ensayos de exposición se empleó una muestra control (MC) que consistía en la adición sobre 15 mL de cultivo sin algas de la concentración de exposición, 266 ngmL⁻¹ de HAPs y un blanco consistente en 15 mL de medio líquido con microalgas sin HAPs con el fin de identificar posibles interferencias.

La elección de los tiempos de exposición estuvo basada en antecedentes observados que indican una menor velocidad en procesos de remoción y biodegradación de la *Scenedesmus acutus* con respecto a la *Selenastrum capricornutum* [García de Llasera, 2016].

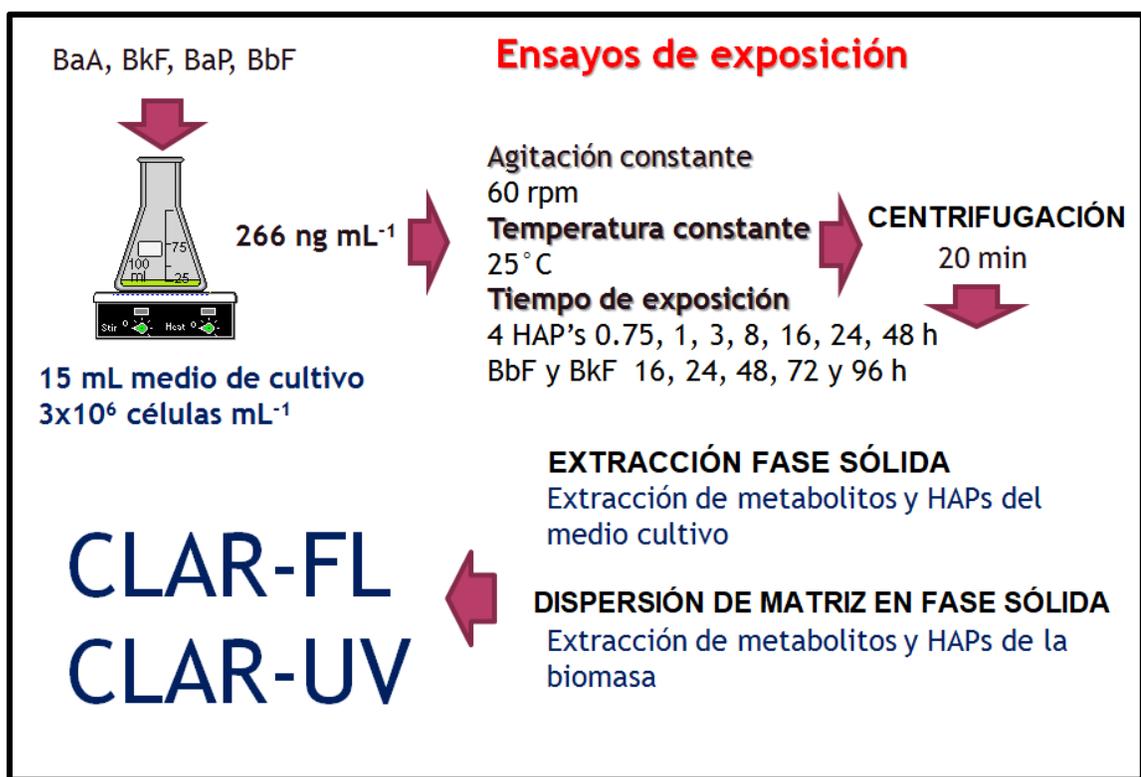


Figura 19. Procedimiento de exposición de HAPs a las microalgas de estudio.

5.8. Análisis por CLAR-EM

Se utilizó CLAR-EM para confirmar la presencia de metabolitos formados durante la biodegradación. Se analizaron los estándares de metabolitos y se compararon los fragmentogramas obtenidos con los de las muestras de medio líquido y biomasa de exposiciones a 24 y 48 h. Se empleó un cromatógrafo de líquidos serie 1200 con detector de arreglo de diodos (DAD-Diode Array Detector), ALS Therm, inyector automático, bomba binaria, y acoplado a un espectrometro de masas serie 6410 de triple cuadrupolo con fuente de ionización por electrospray (ESI) en el modo negativo (Agilent Technologies, Santa Clara-CA). Se empleó el sistema ChemStation y se estableció un rango de exploración de masa entre 50 (salida en masa) y 1,650 m/z (masa final) y para ajustar la presión del nebulizador a 30 psi. Para la fuente de ESI, el voltaje del capilar se fijó en 5 kV; El voltaje del cono, 167 V; y la temperatura del nitrógeno adicional, 350°C. Los

metabolitos fueron separados utilizando un 5 mm Hichrom spherisorb S5ODS2 columna analítica (250 mm, 4.6 mm de diámetro interno) de Waters (Milford, MA, EE.UU.). Para el análisis de masas se inyectó la muestra de estándares de metabolitos que contiene 3 del BaP (9,10-dBaP, 4,5-dBaP y 7,8-dBaP) 3 del BbF (11,12-dBbF, 1,2-dBbF y 9,10-dBbF), dos del BaA (5,6-dBaA, 8,9-dBaA y 10.11-dBaA) y uno del BkF (8,9-dBkF).

6. RESULTADOS

6.1. Desarrollo del sistema cromatográfico para el análisis de metabolitos de HAPs

6.1.1. Determinación de factores de retención (k').

La determinación se realizó por grupos de dihidrodioles dependiendo del HAP padre del que provenían, en el caso de los metabolitos del BaP, el cálculo del valor de la constante k' para los metabolitos tipo dihidrodiol (figura 20a) y los metabolitos tipo mono-hidroxi (figura 20b) permitieron establecer que había la posibilidad de separar los dihidrodioles pero presentaría dificultad para los mono-hidroxi-HAPs, debido a un comportamiento similar al cambio de la polaridad de la fase móvil, y la cercanía de los valores de k'_w experimentales. El orden de elución de la columna cromatográfica para los metabolitos del BaP fue 9,10-dBaP, 4,5-dBaP y 7,8-dBaP respectivamente, mientras para los mono-hidroxi-HAPs se logró la separación del 9-OH y solapamiento para el 7-OH y 3-OH.

La determinación de k' para diferentes relaciones de metanol en la fase móvil y el cálculo de $\log k'$ en función del porcentaje de metanol, permitieron determinar por extrapolación (porcentaje de cero en el contenido de metanol en la fase móvil), el factor k'_w . Se pudo apreciar que para los metabolitos dihidrodioles del BaP estudiados, la separación se logró con porcentajes de agua en la mezcla de la fase móvil no mayores al 30% (65-70% metanol), mientras para los hidroxi-BaP, la separación entre el 3- y 7-hidroxi-BaP no fue posible, aún si se empleaban porcentajes mayores de agua (una fase con mayor polaridad), finalmente para el 9-hidroxi-BaP se logró la separación a las condiciones de los dihidrodioles antes establecidas.

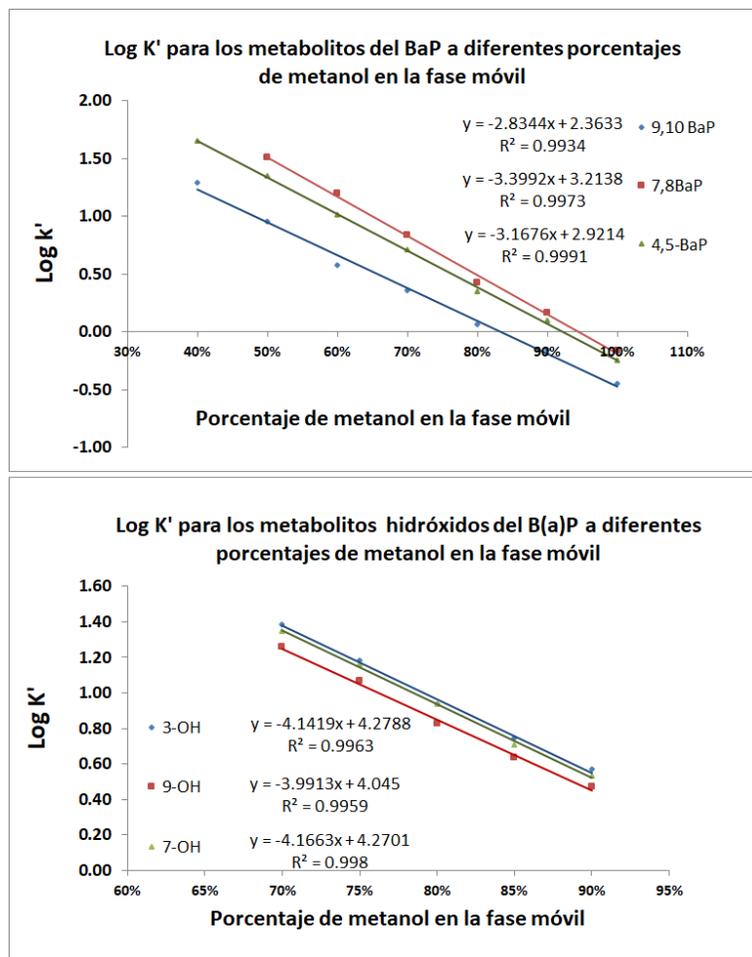


Figura 20. Estimación de los valores de $\log k'_w$ y tendencia lineal para a) los metabolitos dihidrodioles y b) hidroxilo del BaP con diferente relación de metanol en la fase móvil.

Para los metabolitos del BaA (figura 21a), se observó una separación del 5,6-BaA de los otros tres metabolitos, sin embargo, no se logró con la fase móvil empleada para los dihidrodioles del BaP (mezcla metanol:agua 30:70%) la separación entre el 8,9- y el 10,11-dihidrodioles del BaA, tampoco fue evidente que se pudiera lograr la separación empleando mayor porcentaje de agua en la fase móvil, además, el empleo de éstas fases establecería un tiempo de análisis mayor y con ello los inconvenientes como ensanchamiento del pico cromatográfico y pérdida de la sensibilidad del método. También fueron probadas fases móviles de composición ternaria (metanol: acetonitrilo: agua) con el fin de disminuir el índice de polaridad de la fase móvil pero tampoco se logró la separación. El 3,4-dBaA finalmente no fue incluido dentro del estudio de los metabolitos,

ya que no hay reportes de su formación como resultado de la metabolización por microalgas, y al realizar experimentos preliminares tampoco se observó su aparición, con lo cual se estudiaron tres metabolitos para el BaA.

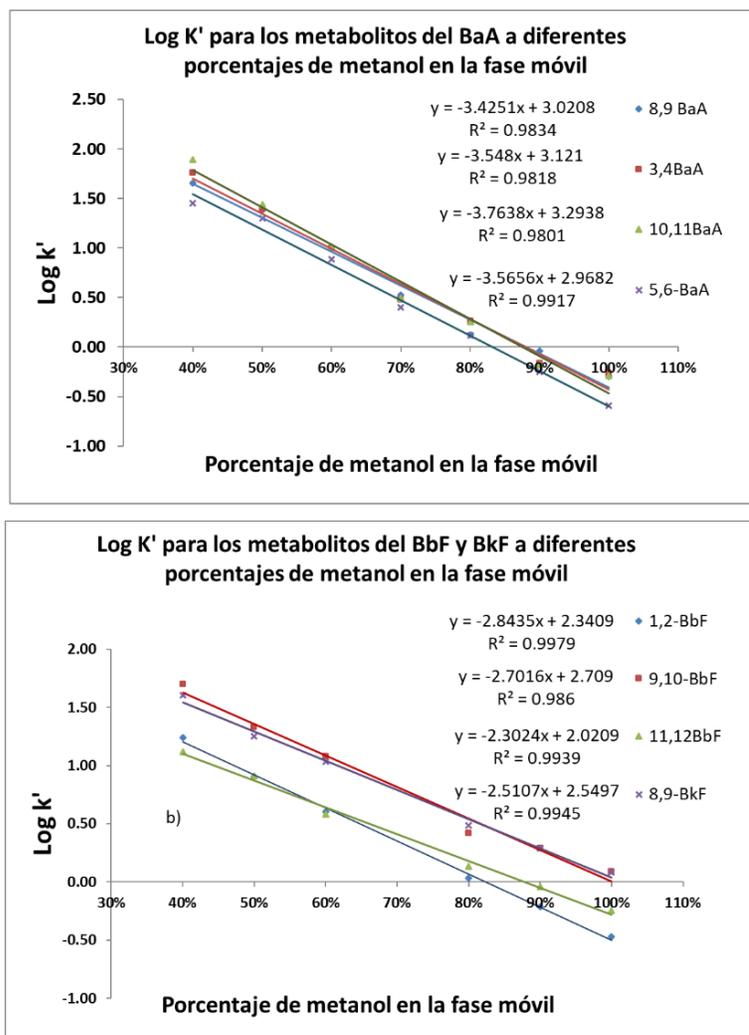


Figura 21. Estimación de los valores de $\log k'_w$ y tendencia lineal para los metabolitos dihidrodioles del BaA, BbF y BkF con diferente relación de metanol en la fase móvil.

Finalmente, los metabolitos del BbF (figura 21b), mostraron la posibilidad de separación del 9,10- pero con mayor dificultad para la resolución entre el 1,2- y el 11,12- dihidrodiole, aún a porcentajes altos de agua ó con mezclas ternarias como en los casos anteriores. Por otra parte, se determinó que el 8,9- del BkF podría coeluir con el 9,10- del BbF por los valores cercanos de sus k'_w . Los valores obtenidos teóricamente para el k'_w se presentan

en la tabla 11, estos resultados muestran la cercanía en polaridad de metabolitos de diferente HAP padre y lo cual resultó en una desventaja al emplear un método isocrático para su separación. Por todo lo anterior se consideró una metodología en modo gradiente con el fin de lograr una mejor separación de los metabolitos estudiados.

Tabla 11. Valores de k'_w y k_{ow} para los metabolitos de interés.

Metabolito	Log k_{ow} Teórico*	Log k'_w Estimado	Metabolito	Log k_{ow} Teórico*	Log k'_w Estimado
Dhd-BaP			Dhd-BbF		
9,10	4.01	2.36	1,2	2.53	2.34
4,5	3.83	2.96	9,10	4.01	2.70
7,8	4.01	3.21	11,12	4.01	2.62
OH-BaP			Dhd-BkF		
3-OH	5.63	4.28	8,9	3.52	2.55
7-OH	5.63	4.27			
9-OH	5.63	4.04			
Dhd-BaA					
3,4	3.42	3.12			
5,6	3.25	2.97			
8,9	3.25	3.02			
10,11	3.42	3.30			

* Los valores teóricos fueron estimados con el software US EPA, 2012, *estimation programs interface suite*TM for Microsoft, Windows v. 4.10., United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, EUA

La comparación entre los valores teóricos y experimentales se debe a las aproximaciones matemáticas empleadas en el cálculo del coeficiente de partición. El software *estimation programs interface suite*TM utiliza el modelo KOWWINTM para la estimación del coeficiente de partición octanol/agua, el cual emplea el método de contribución de átomo/fragmento. En este tipo de métodos, la estructura se divide en fragmentos (átomo o grupos funcionales más grandes) y los valores de cada grupo se suman (a veces con factores de corrección estructural) para obtener el log P estimado. Lo importante del cálculo de los

coeficientes teóricos era conocer de forma preliminar la hidrofobicidad de los metabolitos y estimar su posible separación.

6.1.2. Condiciones de elución.

La separación de los metabolitos se realizó empleando la fase móvil en modo gradiente, ya que los resultados obtenidos de las constantes k'_w indicaron que la separación con un método isocrático no sería completa. La composición final del gradiente está conformada por metanol:agua en las siguientes proporciones: inicialmente 30%:70% (metanol:agua) durante 15 min, seguido de un aumento hasta alcanzar una proporción de metanol:agua 50%:50% en 5 min y un tiempo constante de 10 min, posteriormente hasta metanol:agua 70%:30% en 20 min y un tiempo constante de 5 min y finalmente al 100% metanol en 10 min y un tiempo final de 10 min.

En la figura 22, se observan los cromatogramas obtenidos para el análisis por grupos de metabolitos de acuerdo con el HAP padre, con el fin de realizar una mejor identificación y establecimiento de los tiempos de retención para la posterior cuantificación. Se observó una separación completa de los metabolitos del BaP, un solapamiento de dos de los metabolitos del BaA y la separación de los metabolitos del BbF y BkF. Se decidió no separar los metabolitos del BaA que coinciden en el tiempo de retención, debido a que el tiempo de la corrida cromatográfica ya era de 60 min y las pruebas preliminares sobre el estudio de estos dos metabolitos, establecían que era necesario aumentar el tiempo de corrida en 30 min adicionales con una fase isocrática, para lograr una separación con una resolución que nunca fue superior a 1.0.

6.1.3. Establecimiento de las longitudes de onda de trabajo.

La determinación de las k'_w para cada analito se realizó empleando las longitudes de onda de excitación (263 nm) y emisión (410 nm) reportadas para los metabolitos del BaP por Olmos-Espejel *et al.* 2012. Debido a que no se observó una respuesta apropiada para todos los metabolitos, se realizó la obtención de espectros de excitación y emisión de fluorescencia para los metabolitos restantes, como ejemplo, en la figura 23, se muestran los resultados obtenidos para el 1,2-dihidrodiol del BbF. Se observa en el espectro de

excitación una banda a los 2.282 min correspondiente a 291 nm y dos máximos para el espectro de emisión, la primera correspondiente a una longitud de onda de 400 nm (1.105 min) y la segunda de 438 nm (2.206 min). De la misma forma se procedió con los demás metabolitos para obtener las longitudes de onda de trabajo, los resultados obtenidos para los demás metabolitos se resumen en la tabla 12.

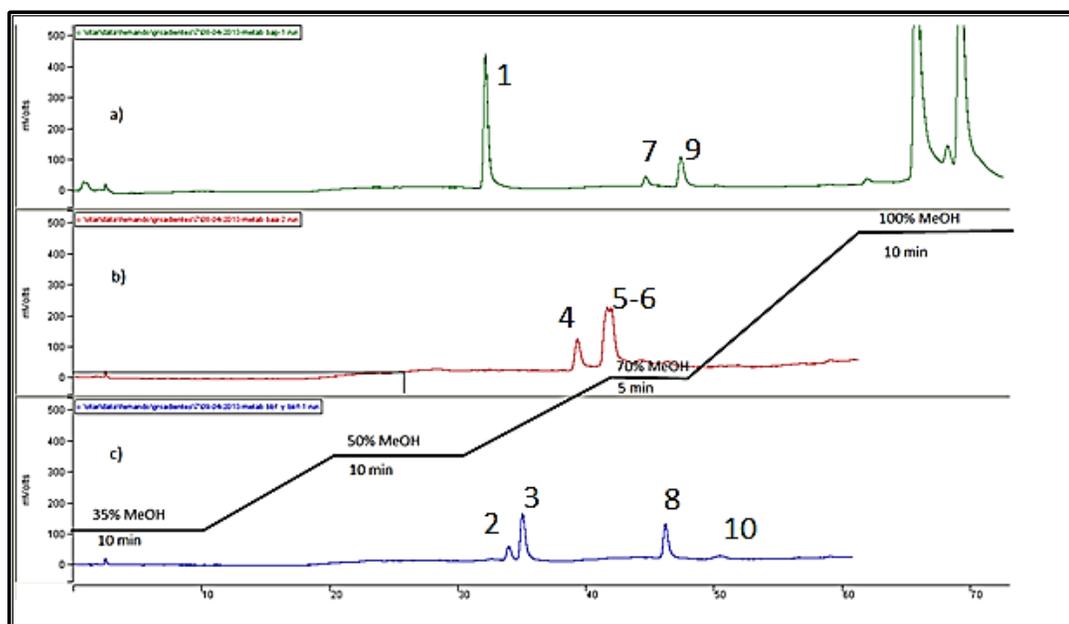


Figura 22. Cromatograma obtenido del estándar de la solución de metabolitos a una concentración de 12 µg/L ($\lambda_{ext.}$ 260 nm and $\lambda_{em.}$ 410 nm) con el gradiente final a) metabolitos del BaP (1) 9,10-dBaP, (7)4,5-dBaP, (9)7,8-dBaP, b) metabolitos del BaA (4) 5,6-dBaA (5) 8,9-dBaA, (6) 10,11-dBaA, c) metabolitos del BbF y BkF (2)11,12-dBbF, (3) 1,2-dBbF, (8)8,9-dBkF, (10)9,10-dBbF.

Tabla 12. Resumen de los resultados obtenidos de la determinación de espectros de fluorescencia.

Metabolitos del	Long. onda excitación	Long. onda de emisión
BaA	300 nm	380 nm
BbF y BkF	290 nm	438 nm
BaP	263 nm	410 nm

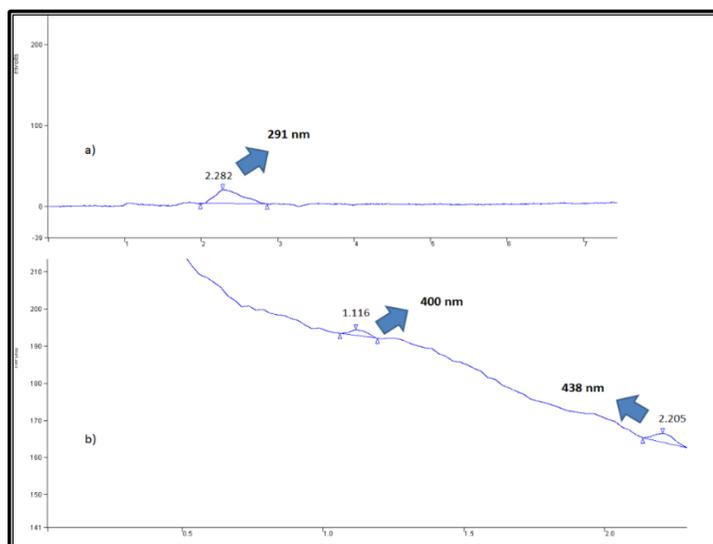


Figura 23. Espectros de fluorescencia obtenidos para el 1,2-dhd-BbF a) excitación b) emisión.

Los resultados no permitieron encontrar similitudes en las longitudes de onda máximas de excitación y emisión para los diferentes metabolitos, por lo que se procedió a establecer el comportamiento de cada grupo de metabolitos a las longitudes de onda máxima de los otros teniendo en cuenta el HAP padre, con el fin de encontrar la máxima respuesta, los resultados mostraron que:

- Los metabolitos del BbF y BkF no presentan una buena respuesta a las longitudes de excitación y emisión para los metabolitos del BaA (290 y 380 nm) y del BaP (263 y 410 nm).
- Los metabolitos del BaA presentan respuesta a la longitud de onda de emisión para los metabolitos del BaP (410 nm) (figura 23a) y menor respuesta a la longitud de onda de emisión para los metabolitos de los BFs (438nm) al igual que los metabolitos del BaP (figura 23b)

Por lo anterior, y debido a que no fue posible cuantificar los metabolitos de BbF y BkF a longitudes de onda diferentes a las de su máxima respuesta, se estableció que cada muestra sería analizada y cuantificada a dos longitudes de onda de trabajo, 260 y 410 nm

para los metabolitos del BaP y BaA, y para los metabolitos de BbF y BkF se empleó 270 y 438 nm para excitación y emisión respectivamente.

Como el tiempo de análisis de cada muestra se duplicaba, se trataron de implementar metodologías en las cuales se cambiará la longitud de onda durante el tiempo de análisis, pero como se observa en la figura 24, la aparición de metabolitos es de forma intercalada y no permitió un tiempo de estabilización óptimo para que el detector de fluorescencia diera una respuesta adecuada, generando errores en el análisis y desajustes en la línea base. Finalmente, el método cromatográfico permitió la separación de 10 metabolitos, 3 dihidrodioles del BaP, 3 dihidrodiol del BaA, 3 dihidrodioles del BbF y 1 dihidrodiol del BkF, aunque no se logra resolver el 8,9- y 10,11- dihidrodiol del BaA por lo que se decide cuantificarlos como mezcla. El tiempo de corrida cromatográfica establecido fue de 50 min con un tiempo de equilibrio posterior de 10 min.

6.2. Validación del sistema cromatográfico para los metabolitos de los HAPs

6.2.1. Límites de detección y cuantificación.

Los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación del sistema cromatográfico se presentan en la tabla 13. En el análisis a 260-410 nm se observaron valores más bajos para los metabolitos del BaP y BaA, mientras para los metabolitos del BbF y BkF no fueron detectados por debajo de 15 µg/L. El análisis a 270-438 nm muestra los valores encontrados principalmente para los metabolitos de los fluóratenos que no habían podido ser analizados a la otra longitud de onda, ratificando la necesidad de realizar la cuantificación de los metabolitos a las dos longitudes de onda.

Para las curvas de calibración de cada metabolito, se realizó la determinación de la regresión por el programa de SPSS, se encontró que por el test de Durbin-Watson el estadístico es menor a 2.5 (valores entre 1.500 y 1.950) lo cual indicó que no hay una dependencia entre los residuales, esto es, que no hay una dependencia en cuanto al orden de obtención de los datos, lo cual es lo esperado en una regresión lineal. Además, para la prueba de Anova el valor de la probabilidad de que no hubiese relación lineal entre las variables fue menor a 0.05, indicando que es posible establecer una regresión lineal entre el conjunto de datos (Anexo 1).

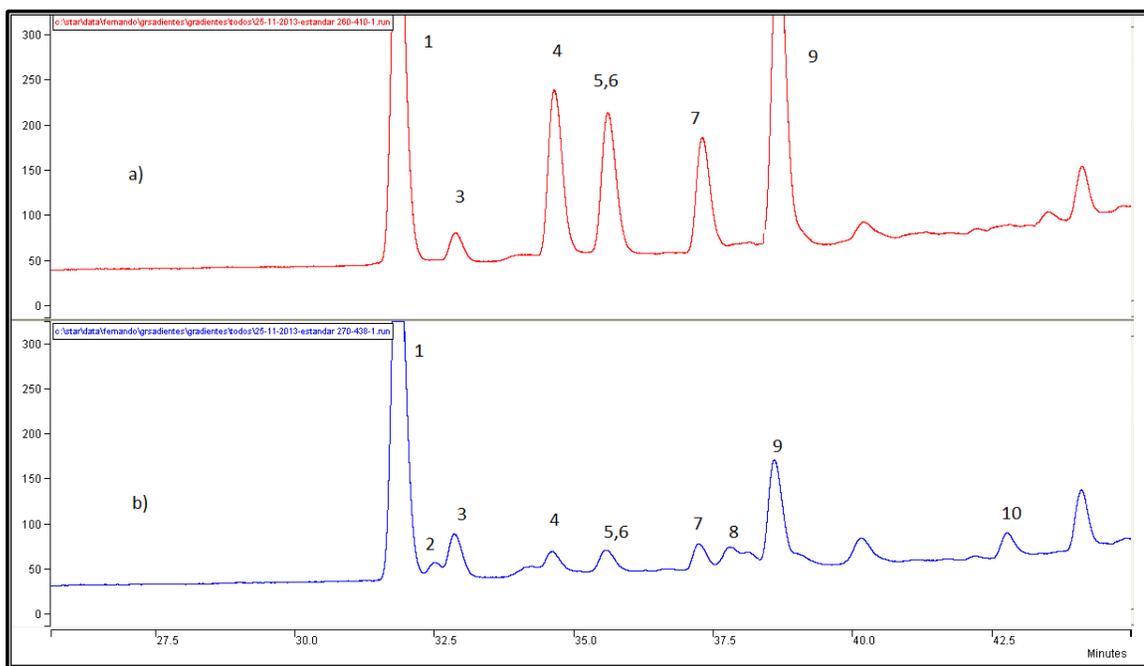


Figura 24. Cromatograma para un estándar de metabolitos de 12 µg/L analizado a a) 260-410nm b)270-438 nm, (1) 9,10-dBaP, (2)11,12-dBbF, (3) 1,2-dBbF, (4) 5,6-dBaA (5) 8,9-dBaA, (6) 10,11-dBaA, (7)4,5-dBaP, (8)8,9-dBkF, (9)7,8-dBaP (10)9,10-dBbF

Tabla 13. Límites de detección y cuantificación (µg/L) para los metabolitos estudiados de acuerdo con su orden de elución.

Metabolito	260-410 nm			270-438nm		
	LD _{teor} ¹	LC ¹	LD _{exp} ²	LD _{teor} ¹	LC ²	LD _{exp} ¹
1. 9,10-dihidrodiol BaP	0.38	1.75	0.26	0.40	1.22	0.18
2. 11,12-dihidrodiol BbF	ND	ND	12.8	0.43	1.31	0.26
3. 1,2-dihidrodiol BbF	0.71	2.15	0.64	0.39	1.18	0.18
4. 5,6-dihidrodiol BaA	0.30	1.82	0.36	0.45	1.37	0.26
5. 8,9-dihidrodiol BaA	0.85	2.57	0.36	1.86	5.64	0.96
6. 10,11-dihidrodiol BaA						
7. 4,5-dihidrodiol BaP	0.44	1.34	0.18	1.06	3.20	0.26
8. 8,9-dihidrodiol BkF	ND	ND	9,60	1.05	3.18	0.64
9. 7,8-dihidrodiol BaP	0.59	1.79	0.26	0.78	2.37	0.64
10. 9,10-dihidrodiol BbF	1.43	4.32	0.96	0.75	2.28	0.26

¹ calculado por el método de mínimos cuadrados con base en la pendiente e intercepto

² determinado como la concentración que da una respuesta de 3.3 veces la señal del ruido de fondo

ND No determinado por el equipo a las concentraciones empleadas (0.4-9.6µg/L)

6.2.2. Repetibilidad y linealidad.

En la tabla 14 se presentan los resultados obtenidos de la linealidad para las curvas de calibración de los metabolitos, junto con el coeficiente de variación y la relación de las pendientes obtenidas para cada metabolito a ambas longitudes de onda como un parámetro de evaluación del incremento ó disminución de la sensibilidad. Los coeficientes de variación son bajos, encontrándose entre el 1.0 y 2.9% para 260-410nm y entre el 2.8 y 4.6% (metabolitos del BbF y BkF) para 270-438nm. Las R^2 de las curvas de calibración indican un comportamiento lineal para los metabolitos del BaP y BaA a 260-410 nm y los metabolitos del BbF y BkF a 270-438 nm.

Tabla 14. Linealidad para la curva de calibración de los metabolitos y relación entre las pendientes de la curva a diferentes longitudes de onda.

Metabolito	260-410 nm		270-438 nm		$m_{270-438}/m_{260-410}$
	R^2	CV*	R^2	CV*	
1 9,10-dihidrodiol BaP	0.9971	1.0%	0.9987	1.4%	0.93
2 11,12-dihidrodiol BbF	ND	----	0.9985	3.9%	----
3 1,2-dihidrodiol BbF	0.9926	2.1%	0.9985	2.8%	1.30
4 5,6-dihidrodiol BaA	0.9944	2.6%	0.9913	3.0%	0.11
5 8,9-dihidrodiol BaA	0.9961	1.5%	0.9846	4.1%	0.12
6 10,11-dihidrodiol BaA					
7 4,5-dihidrodiol BaP	0.9981	2.9%	0.9950	4.9%	0.21
8 8,9-dihidrodiol BkF	ND	----	0.9857	4.6%	----
9 7,8-dihidrodiol BaP	0.9973	1.9%	0.9986	2.2%	0.32
10 9,10-dihidrodiol BbF	0.9883	1.5%	0.9966	4.1%	0.98

* Determinado como la relación entre la media de las medias de cada concentración y la media de las desviaciones estándar de cada concentración analizada.

Se realizó la prueba t para medias de muestras relacionadas, para comparar las pendientes de cada curva y se encontró que hay una diferencia significativa entre las pendientes obtenidas a ambas longitudes de onda, que permite demostrar la existencia de una diferencia en la sensibilidad para la determinación de cada compuesto a las

longitudes de onda evaluadas (Anexo 2). Sin embargo, también se muestra por medio de la prueba Duncan que cada área promedio para cada nivel de concentración son significativamente diferentes entre ellas y corresponden a uno y solo un nivel de concentración.

- Selección de la columna cromatográfica

Se realizó la modificación del sistema cromatográfico previamente validado en el laboratorio para el análisis de HAPs, realizando la selección de una nueva columna cromatográfica teniendo en cuenta la eficiencia y la resolución. Los resultados de la eficiencia medida como el número de platos teóricos permitió seleccionar la columna Hypersyl Green HAP como la mejor entre las evaluadas para realizar la cuantificación de los HAPs en el medio de cultivo y en la biomasa. La tabla 15 muestra los resultados obtenidos en el estudio de la separación de HAPs.

Tabla 15. Resultados obtenidos para la separación analítica de los HAPs de estudio.

Columna	Fase móvil y flujo	Tr compuesto menos retenido	Número de Platos teóricos para la columna	Resolución*
Eclipse XDBC18 (1)	MeOH:Agua (85% : 15%) 1 mL/min	12 min	B(a)A 2030 B(k)F 4128 B(b)F 2939 B(a)P 2080	0.765
Eclipse XDBC18 (2)	MeOH:Agua (85% : 15%) 1 mL/min	16 min	B(a)A 3136 B(k)F 3990 B(b)F B(a)P	Se interrumpió por exceder el tiempo del método
Hypersil ODS	MeOH:Agua (85% : 15%) 1 mL/min	9 min	B(a)A 779 B(k)F 4255 B(b)F 5091 B(a)P 1847	0.569
	MeOH:Agua (80% : 20%) 1 mL/min	15 min	B(a)A 2402 B(k)F 5704 B(b)F 4231 B(a)P 2149	0.779
Envirosep HAP	MeOH:Agua (85% : 15%) 1 mL/min	8 min	B(a)A 14655 B(k)F 15575 B(b)F 6898 B(a)P 14028	7.30
Hypersil green HAP	MeOH:Agua (85% : 15%) 1 mL/min	5 min	B(a)A 14817 B(k)F 15747 B(b)F 13553 B(a)P 14228	8.0

* La resolución se calculó solo para los compuestos del B(b)F y B(k)F los cuales eluyeron muy cercanos

6.3. Verificación del sistema cromatográfico para la determinación de los HAPs

6.3.1. Repetibilidad y reproducibilidad.

El orden de elución y la variación en los tiempos de retención fue BaA, 5.11 min (0.6%); BkF, 8.96 min (0.7%), BbF, 11.6 min (0.6%) y BaP 13.2 min (0.7%), se realizó la determinación de repetibilidad y los resultados de la variación con la concentración evaluada se observan en la tabla 16. Los resultados mostraron coeficientes de variación entre 1.4% y 3.1% con lo cual se estableció repetibilidad en la cuantificación de los HAPs.

Tabla 16. Resultados obtenidos para la repetibilidad del sistema cromatográfico.

	B(a)A	B(k)F	B(b)F	B(a)P
Tiempo de retención				
Promedio	5.11	8.96	11.7	13.2
Coef var	0.6%	0.7%	0.6%	0.7%
Área				
Promedio	15493	17965	13643	16650
Coef var	2.2%	1.4%	1.4%	3.1%

6.3.2. Curvas de calibración.

En la tabla 17 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de límites de detección, cuantificación, la linealidad de la curva de calibración y la repetibilidad para el método de los HAPs. Los resultados muestran coeficientes de linealidad y coeficientes de variación óptimos para la cuantificación de los HAPs remanentes del proceso de biodegradación con las especies de microalgas estudiadas. La prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene probabilidad menor a 0.05) indicó que las varianzas son iguales entre sí para los diferentes niveles de concentración. Para la regresión lineal, los valores del coeficiente de Pearson (R) son superiores a 0.995 con lo que es posible construir un modelo de regresión lineal, soportado por los valores de Anova (valor inferior a 0.05). De otro lado, el estadístico de Durbin-Watson y el Anova de un factor, mostraron que los residuales son independientes y que hay una correlación lineal entre los valores de la concentración y la señal (Anexo 3).

Tabla 17. Linealidad y límites de detección y cuantificación para los HAPs.

	BaA	BbF	BkF	BaP
Linealidad*	R ² = 0.9974	R ² = 0.9989	R ² = 0.9988	R ² = 0.9966
Límite de detección teórico	0.05 µg/mL	0.13 µg/mL	0.17 µg/mL	0.13 µg/mL
Límite de cuantificación teórico	0.16 µg/mL	0.40 µg/mL	0.53 µg/mL	0.38 µg/mL
Intervalo de coeficiente de variación por niveles de concentración*	5.65%	7.24%	6.06%	5.59%

* La linealidad fue obtenida con la curva de calibración del promedio del triplicado en cada nivel de concentración.

* El coeficiente de variación medio, establecido como el promedio de los coeficientes de variación en cada nivel.

6.4. Métodos EFS-CLAR/FL/UV y DMFS-CLAR/FL/UV

6.4.1. Metabolitos de los HAPs por EFS-CLAR/FL y DMFS-CLAR/FL.

6.4.1.1. Revalidación del método EFS-CLAR/FL.

Para la mezcla de los diez dihidrodioles objeto de estudio, inicialmente se determinó la pérdida de metabolitos por efecto de los diferentes lavados del método EFS (figura 17), se encontró que solo en el último lavado (acetoniitrilo al 30%) se presentó fuga de metabolitos con porcentajes de pérdida entre 0.7 y 6.4 %, siendo la mayor pérdida para el 11,12-dihidrodiol del BbF (6.2%) y del 8,9-dihidrodiol del BkF (6.4%), pero que finalmente no representan problemas en la determinación de las concentraciones de metabolitos formados. Los resultados de la revalidación del método de EFS-CLAR/FL son presentados en la tabla 18 y se observan porcentajes de recobro entre el 73 y el 94% y coeficientes de variación entre 2.3 y 8.4%.

Para las curvas obtenidas el estadístico de Durbin-Watson calculado es menor a 2.5 indicando una independencia entre los niveles de concentración. La prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene probabilidad menor a 0.05) indicó que las varianzas son iguales entre sí para los diferentes niveles de concentración. Para la regresión lineal los valores del coeficiente de Pearson (R²) son superiores a 0.995 con lo

que es posible construir un modelo de regresión lineal de acuerdo con los valores de Anova inferior a 0.05 (Anexo 4).

Tabla 18. Linealidad del método, límites de detección y cuantificación encontrados para EFS-CLAR/FL.

Metabolito	LD (µg/L)	LC (µg/L)	Ecuación*	R ²	%CV
1 9,10-dihidrodiol BaP	0.04	0.15	$y = 0.7861x + 0.4665$	0.9959	6.0
2 11,12-dihidrodiol BbF	0.27	0.9	$y = 0.8525x + 0.1405$	0.9927	3.4
3 1,2-dihidrodiol BbF	0.14	0.45	$y = 0.587x + 0.8493$	0.9880	2.4
4 5,6-dihidrodiol BaA	0.09	0.3	$y = 0.7908x + 0.2364$	0.9941	5.5
5 8,9-dihidrodiol BaA	0.25	0.75	$y = 0.7402x + 0.2696$	0.9953	8.4
6 10,11-dihidrodiol BaA	0.25	0.75	$y = 0.7532x + 1.2798$	0.9968	2.7
7 4,5-dihidrodiol BaP	0.27	0.9	$y = 0.9195x + 0.731$	0.9962	4.6
8 8,9-dihidrodiol BkF	0.09	0.3	$y = 0.9083x + 0.0847$	0.9970	3.6
9 7,8-dihidrodiol BaP	0.04	0.15	$y = 0.9321x + 0.2037$	0.9942	2.3
10 9,10-dihidrodiol BbF	0.27	0.9	$y = 0.6384x + 0.1831$	0.9943	4.5

*La pendiente multiplicada por 100 da el valor del porcentaje de recobro

6.4.1.2. Revalidación del método DMFS-CLAR/FL.

Para la mezcla de los diez dihidrodiolos objeto de estudio, se evaluaron las pérdidas de analito por los lavados (figura 18), se encontró que es menor al 3%, los resultados de la verificación del método DMFS-CLAR/FL se reportan en la tabla 19, los porcentajes de recobro se encuentran entre el 53 y el 98% y la variación entre 0.7 y 5.4% estableciendo porcentajes óptimos para la cuantificación de metabolitos.

Al igual que para el método anterior se efectuó el manejo estadístico de datos con las pruebas para homogeneidad de varianzas indicando que las varianzas son iguales, el análisis de la regresión obteniendo linealidades superiores a 0.984, el estadístico de Durbin-Watson para verificar la independencia de los datos de la curva de calibración con

valores menores a 2.5 y el Anova de un factor para establecer que si hay la relación lineal entre las concentraciones y la señal.

Tabla 19. Linealidad del método, límites de detección y cuantificación encontrados para DMFS-CLAR/FL.

	Metabolito	LD (µg/L)	LC (µg/L)	Ecuación*	R²	%CV
1	9,10-dihidrodiol BaP	0.09	0.30	$y = 0.8189x + 0.6175$	0.9902	0.70
2	11,12-dihidrodiol BbF	0.20	0.65	$y = 0.9114x - 0.5865$	0.9986	4.70
3	1,2-dihidrodiol BbF	0.16	0.53	$y = 0.9368x + 0.1735$	0.9838	0.40
4	5,6-dihidrodiol BaA	0.21	0.70	$y = 0.9433x + 0.0827$	0.9952	0.80
5	8,9-dihidrodiol BaA	0.15	0.50	$y = 0.8413x - 0.0772$	0.9901	0.70
6	10,11-dihidrodiol BaA	0.10	0.40	$y = 0.7256x - 3.0349$	0.9934	2.50
7	4,5-dihidrodiol BaP	0.20	0.66	$y = 0.908x + 0.3006$	0.9899	5.42
8	8,9-dihidrodiol BkF	0.20	0.68	$y = 0.9569x - 0.0206$	0.9977	1.60
9	7,8-dihidrodiol BaP	0.07	0.24	$y = 0.9276x + 0.2901$	0.9969	2.50
10	9,10-dihidrodiol BbF	0.35	1.18	$y = 0.7704x + 0.0176$	0.9970	1.20

*La pendiente multiplicada por 100 da el valor del porcentaje de recobro

Los reportes de literatura sobre la extracción de metabolitos de HAPs por EFS, se enfocan principalmente a hidrocarburos de 3 y 4 anillos, por ejemplo, Schedl *et al.*, (2001) realizaron la comparación de los recobros de hidroxi-fenantreno e hidroxi-pireno reportando recobros entre el 83 y 107%, mientras para hidroxi-BaP alcanzan un recobro entre 45-62%. Olmos-Espejel *et al.*, (2012), reportan recobros del 55 y 66% para dos metabolitos del BaP en el método EFS-*off-line*-CLAR/FL, con lo cual los porcentajes obtenidos en el recobro de los metabolitos en el presente trabajo se encuentran dentro de los porcentajes reportados en este tipo de extracción y que permitieron la cuantificación de metabolitos generados por el proceso de degradación. Se han obtenido recobros superiores en metodologías de EFS on-line donde por ejemplo You *et al.*, (2014) lograron recobros entre el 80 y 110% para siete metabolitos de tipo hidroxi en muestras de orina, mientras por otra parte, García de Llasera y García-Cicourel, (2017) obtuvieron entre el

84% y 90% en un sistema EFS/EFS on-line con cromatógrafo líquido para tres metabolitos del BaA. El empleo de la EFS con proceso de derivatización para el posterior análisis por CGAR también ha sido reportado [Luan *et al.*, 2017] donde los recobros encontrados estuvieron entre 24% y el 74% en medios de cultivo para metabolitos del tipo hidrox-HAP principalmente.

Para la extracción de metabolitos por DMFS la literatura es escasa, Olmos-Espejel *et al.* (2012), lograron recobros superiores al 90% para dos metabolitos del BaP por el sistema DMFS/EFS on-line y García de Llasera y García-Cicourel, (2017) empleando el mismo sistema reportan entre el 67% y el 78% en los recobros de los tres metabolitos del BaA. Los recobros obtenidos en la presente investigación estuvieron entre el 72% y el 94% con lo cual se garantizó la cuantificación de metabolitos en la biomasa.

6.4.2. Método para HAPs por EFS-CLAR/FL y DMFS-CLAR/FL.

6.4.2.1. Revalidación del método EFS-CLAR/UV.

Los porcentajes de recobro y coeficiente de variación obtenidos para la metodología de extracción EFS-CLAR/UV para los HAPs fueron: para el BaA 43.3% (7.1% CV), BkF 40.48% (4.8% CV), BbF 16.51% (10% CV) y del BaP 29.82% (10.1% CV) con un volumen de fase eluyente de 3 mL de CH₃CN. Con el fin de mejorar los recobros de los HAPs se evaluó la elución con volúmenes de 4, 5 y 6 mL de CH₃CN al 100%, encontrándose que con 6 mL se obtuvieron los recobros más altos, pero la alta dilución de éstos provocó que la señal cromatográfica disminuyera de manera significativa, afectando la sensibilidad, por lo que se decidió realizar una etapa de concentración del extracto llevándolo a sequedad y posteriormente la reconstitución del extracto a 1 mL, los resultados obtenidos para el método EFS-CLAR/UV se presentan en la tabla 20, donde se destaca recobros entre el 47.8 y el 67.3 con variaciones hasta del 13% en la concentración evaluada.

Se han reportado porcentajes superiores al 80% en la extracción de BbF en una mezcla de 11 HAPs con LC-18, empleando como fase eluyente mezcla de diclorometano: hexano: ciclohexano [Kanchanamiayoon y Tatrahun, 2009]. Por otra parte, Olmos-Espejel *et al.*, (2012), reporta recobros entre el 38 y el 49% para los mismo HAPs, empleando C18 Chromabond-PAH. De igual forma, He y Lee, (1998), reportan recobros superiores entre

el 52 y 67% para tres HAPs de 3 anillos (Fluoreno, Ant y Fluo) y el naftaleno empleando C18, Kootstra *et al.*, (1995) empleando el mismo tipo de sílice C18 reporta en la extracción de los 16 HAPs mencionados por la USEPA, específicamente para los 4 empleados en el presente trabajo recobros entre 51 y 68%, mientras para la C8 entre el 73 y 82%.

Tabla 20. Comparación de los porcentajes de recobro y coeficiente de variación de extractos de HAPs en agua y medio de cultivo de *S. capricornutum*.

	BaA	BbF	BkF	BaP
<i>En medio de cultivo de microalgas</i>				
266 µg/L	65.4%	55.2%	47.8%	67.3%
Coef. Var.	3.04%	6.12%	13.01%	8.71%
150 µg/L	56.4%	52.7%	47.4%	69.8%
Coef var	4.3%	5.6%	3.5%	6.7%
<i>En biomasa seca</i>				
4 µg/mg biomasa	92.8%	80.8%	77.2%	80.5%
Coef. Var.	2.6%	2.7%	5.1%	9.1%
2 µg/mg biomasa	89.9%	94.1%	75.2%	88.2%
Coef var	2.1%	2.0%	1.9%	1.9%

Empleando cartuchos de polietilvinilbenceno-divinilbenceno como fase extrayente para EFS, Siemers *et al.*, (2015) desarrollaron dos métodos diferentes para extraer simultáneamente un total de 86 sustancias que contenían HAPs heterocíclicos, alquilados, los 16 HAPs mencionados por la USEPA (EPA-HAP) y fenoles de muestras de agua, encontrando que los recobros medios para el método fueron de aproximadamente 80% para los EPA-HAP. El empleo de polímeros impresos constituidos de benzo [k] fluoranteno e indeno [1 2 3-cd] pireno mezclados al 1:1 (p/p) y empleados en la separación de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos prioritarios USEPA con una eficiencia de extracción media en una solución de ciclohexano de 65% [Ncube *et al.*, 2017]. Los recobros encontrados en el presente trabajo se encuentran entre los valores reportados en la literatura y permitieron el seguimiento de los HAPs remanentes en el proceso de biodegradación.

6.4.2.2. Verificación del método DMFS-CLAR/UV.

Al analizar la fracción A correspondiente a la elución de los dihidrodioles (1.5 mL MeCN: Agua 40:60%) se encontró fuga del BaA equivalente a un 0.8% (CV 11%) y la ausencia de los demás HAPs. Los resultados del análisis de la fracción B de la elución de los HAPs (1.0 mL de MeCN:Agua 85:15%) se reportan en la tabla 20, junto con los coeficientes de variación. La literatura referente al recobro de estos compuestos de matrices como la biomasa de microalgas son escasos, Sánchez-Brunete *et al.*, (2007), reportan la extracción por DMFS de 27 HAPs de los lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales donde obtuvieron recobros del 93.7%, 95.5%, 101.5% y 101.6% para BbF, BkF, BaP y BaA respectivamente; Otro estudio esta vez en lodos residuales [Pena *et al.*, 2008] reporta el análisis de 17 HAPs a dos niveles de concentración reportando de manera similar recobros entre 99 y 103%, lo anterior permite establecer que se logró un recobro óptimo para el método. Pensado *et al.*, (2005) describen el rendimiento de la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) para la extracción de HAPs en tejido de pescado evaluando diferentes soportes sólidos encontrando que el mejor fue el C18 (1 g de C18), y como disolvente de elución acetonitrilo, obteniendo recobros superiores al 80% para todos los compuestos. En otras matrices Concha-Graña (2015), reporta un estudio de HAPs en matrices de musgo empleando Supelclean-Envi-18, para la determinación de los porcentajes de recobro empleo estándares deuterados encontrando diferencias entre las especies así para *Sphagnum sp.* (43-90%), *Hypnum cupresiforme* (41-103%) y *Pseudevernia furfurácea* (41-102%). En matrices de microalgas, Olmos-Espejel *et al.*,(2012) y García de Llasera *et al.*, (2016) reportan el empleo de sílice C18 en la extracción de los 4 HAPs de estudio con recobros entre el 51 y 62%. Además, el método presentó buena repetibilidad y bajos coeficientes de variación que permitieron cuantificar la concentración de los HAPs remanentes del proceso de exposición y los recobros se encuentran dentro de lo esperado según los reportes de literatura.

6.5. ENSAYOS DE EXPOSICIÓN

6.5.1. Crecimiento de la microalga en medio líquido contaminado

Los resultados mostraron que no se encontró inhibición del crecimiento de la *S. capricornutum* por presencia de los HAPs comparado con el cultivo sin contaminar. En la figura 25, se presentan los resultados obtenidos en el estudio. Al realizar la comparación de la adición de 100 µg/L de BaP con la mezcla de HAPs se observa una mayor inhibición por la mezcla, la concentración de 100 µg/L de BaP poco efecto tuvo sobre el crecimiento, la reducción del número de células solamente en un 5% en comparación con el control sin HAP (5×10^6 células) al realizar la evaluación. En contraste, la concentración de 266 µg/L de BaP provoca una disminución en el crecimiento en un 30%. Por otra parte, después de 25 días de incubación, la concentración de 100 µg/L de la mezcla de HAPs disminuyen el crecimiento de la especie *S. capricornutum* un 37% mientras que la concentración más alta (la cual es también la concentración de exposición) de 266 µg/L de los 8 HAPs inhibe el crecimiento de la microalga en un 60% con respecto al control, pero en todos los casos sólo la tasa de crecimiento se vio afectada.

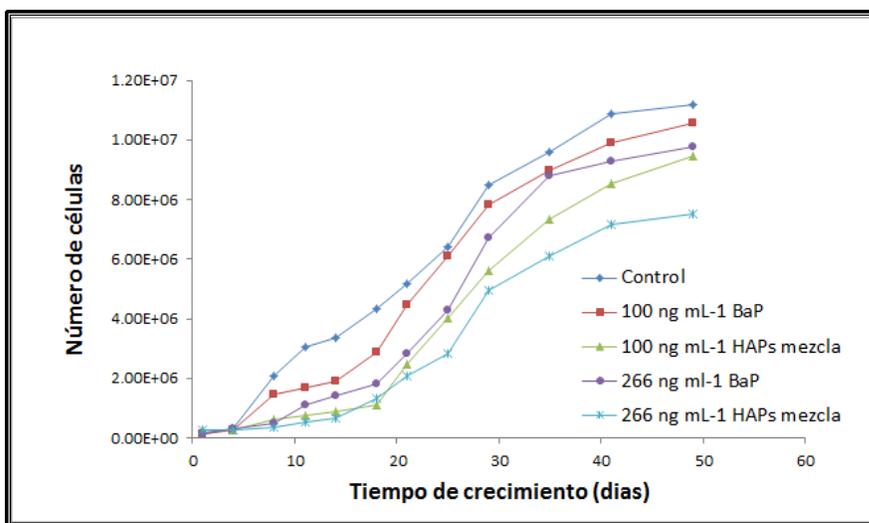


Figura 25. Efecto de la presencia de BaP y mezcla de HAPs en el crecimiento de la especie *S. capricornutum*.

La concentración de biomasa de trabajo alcanzó una absorbancia de 1.0 µA después de 27-29 días de incubación con la concentración más baja de BaP (100 µg/L) y después de

35 días de incubación de la mayor concentración de BaP (266 µg/L). Para las mezclas de HAPs el crecimiento para lograr la absorbancia de 1.0 µA, requirió más de 40 días, a diferencia del cultivo de control que al cabo de 25 días alcanzó la concentración de especies necesaria para la exposición. El análisis estadístico indicó (Anexo 5) que la correlación y la significación en la prueba t, el valor-p es menor que alpha (0.05), por lo que se acepta que la correlación es significativamente diferente de cero, es decir, existe relación entre las diferentes curvas de crecimiento. La diferencia de la media se encuentra dentro del intervalo, por tanto, se asume que las medias son diferentes, dado que el p-valor es menor que 0.025 y al ser un contraste bilateral se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias, indicando que hay una diferencia en la velocidad de crecimiento, pero no se ve afectado el comportamiento de la especie y su curva de crecimiento no se ve interrumpida en ninguno de los casos.

La explicación de este comportamiento se relaciona con los procesos de adaptación que son mencionados desde hace mucho tiempo, bajo la premisa que existe la posibilidad de una variación natural entre los individuos dentro de una especie, de acuerdo con Charles Darwin. Esa variación, permite la selección de los individuos más capacitados en un determinado ambiente dependiendo de su genética [Sniegowski y Lenski, 2005], de acuerdo con algunos autores, los microorganismos son favorables para estudios de adaptación y evolución por su corto tiempo de vida y las grandes poblaciones que permiten una mejor manipulación para establecer las diferentes generaciones [López-Rodas *et al.*, 2001 y Elena y Lenski, 2003]. Hay diferentes reportes en la literatura estableciendo procesos de adaptación de diferentes microorganismos a contaminantes con diferentes propiedades y toxicidad [Nagpal *et al.*, 2000; Scheible *et al.*, 2001 y Reboud *et al.*, 2007].

Romero-López *et al.*, (2012) establecieron en su estudio que la adaptación de una microalga de agua dulce (*Microcystis aeruginosa* y *Scenedesmus intermedius*) se logró cuando fueron sometidas a altas concentraciones de petróleo y diésel, aún cuando es conocida la capacidad del petróleo de inhibir la fotosíntesis y el crecimiento del microorganismo [Nayar *et al.*, 2005]. Por otra parte, la exposición prolongada a un contaminante de acuerdo con López-Rodas V. *et al.*, (2009) permitió que cuatro especies de microalgas *Symploca dubia*, *Chlamydomonas dinobryonis*, *Scenedesmus obtusus* y

Scenedesmus sp., pudieran desarrollar su crecimiento. Otros reportes sobre adaptación de microalgas incluyen otros contaminantes como la simazina y el herbicida diquat presentes en el medio de crecimiento [Marvá *et al.*, 2010]. Además, algunas cepas *Chlorophyta* y cianobacterias que al someterse a la adaptación en la presencia de lindano [González *et al.*, 2012] lograron desarrollarse de manera normal. Estos mecanismos de adaptación, sugieren que las microalgas pueden crecer y desarrollarse en ambientes no-específicos, en presencia de inhibidores de crecimiento y contaminantes. Lo anterior explica que las especies estudiadas presenten una resistencia a las concentraciones de HAPs. Se observó la afectación de la tasa de crecimiento y posiblemente se aumentó la posibilidad de mutaciones o la adaptación a las condiciones adversas. Estos mismos resultados han sido observados en estudios con metales, por ejemplo, con el cromo (VI) un conocido contaminante de aguas y que origina la muerte de cultivos de algas al actuar como inhibidor fotosintético [Sánchez-Fortún *et al.*, 2009].

Actualmente, no hay reportes en la literatura que evalúen la posible supresión del metabolismo por la presencia de HAPs durante el crecimiento de microalgas verdes, por el contrario, y de acuerdo con López-Rodas *et al.*, (2001) reportaron que hay aumento en la densidad celular después de la adición de contaminantes al medio de cultivo, y que son producidos por la aparición de una variante resistente al contaminante. Específicamente para la *S. capricornutum* [Gao y Tam, 2011] se estudió el efecto de nonilfenol (NP) en el crecimiento, fotoquímica y como afectó la capacidad de degradación. Se encontró que la microalga se adaptó a la presencia del NP, regulando sus actividades fotosintéticas, incluyendo el contenido de clorofila A. Finalmente, pudo establecerse que esta capacidad de adaptación puede ser empleada en beneficio de la detección de contaminantes, por ejemplo, se reportó la fabricación de un biosensor empleando *Scenedesmus subspicatus*, inmovilizada sobre papel filtro, cubierta con alginato y endurecida con cloruro de calcio para detección de atrazina y endrina en aguas [Frense *et al.*, 1998 y Perullini *et al.*, 2014]. Por otra parte, la *Chlorella vulgaris* fue inmovilizada en la punta de un haz de fibra óptica [Naessens *et al.*, 2000; Védrine *et al.*, 2003 y Chouler, *et al.*, 2019], para ser utilizado para la detección de herbicidas. Recientemente, los biosensores mixtos a partir de microalgas con otros microorganismos, han presentado un mayor interés en investigaciones, el empleo

de sistemas simbióticos microalgas-protozoos [Turemis *et al.*, 2018] para la detección en tiempo real de contaminantes marinos específicamente simazina, atrazina y diurón, solos o en combinación mediante análisis de fluorescencia.

6.5.2. Ensayos de exposición con mezcla de HAPs (BaA, BbF, BkF, BaP) a concentración de 266 µg/L con la microalga *Selenastrum capricornutum* (3x10⁶ células/mL) en función del tiempo (0.75, 1, 3, 8, 16, 24 y 48 h) a 25°C.

6.5.2.1. Cuantificación de HAPs.

En la figura 26, se muestra la cantidad de HAPs remanente encontrado en el medio de cultivo de la muestra de exposición (ME Medio líquido) y en la biomasa (ME Biomasa) en función del tiempo; Se realizó también el seguimiento de la Muestra Control (MC) consistente en una muestra que solo contiene HAPs disueltos en medio de cultivo sin microalgas, donde se encontró que no hubo diferencia significativa entre los diferentes tiempos en los que se estudió. Los porcentajes de remoción y biodegradación de los HAPs se calcularon teniendo en cuenta la cantidad agregada inicialmente y la cantidad de HAP remanente a las 48 h, los resultados se muestran en la tabla 20, las ecuaciones empleadas para ello se presentan a continuación:

$$\text{Remoción: } \frac{(M_i - ME_{liq})}{M_i} \qquad \text{Degradación } \frac{(M_i - (ME_{liq} + ME_{biom}))}{M_i}$$

M_i es 4 µg por ser la cantidad inicial de HAP agregado.

ME_{liq} la cantidad de HAP en µg determinada en el medio líquido después de cada tiempo de exposición.

ME_{biom} la cantidad de HAP en µg determinada en biomasa después de cada tiempo de exposición.

Las algas expuestas a una mezcla de HAPs en diferentes tiempos, mostraron la reducción de las cantidades de cada HAP tanto en medio líquido como en biomasa, (figura 26). La cantidad de HAP recuperados del medio líquido disminuyó rápidamente: en el 0.75h (entre el 9% y el 13% de la cantidad inicial con eliminación 87-91%). En contraste, la cantidad de HAPs recuperados de la biomasa en este tiempo fue mayor que en el medio líquido (entre 26% y 55% de la cantidad inicial), lo cual indicó un proceso de adsorción/absorción

del contaminante por parte de la especie. Después de 3h, la concentración del contaminante parece permanecer constante en la biomasa mientras va disminuyendo en el medio líquido y después de 16h la concentración ha disminuido en ambos. A las 24h de exposición, la remoción de HAPs alcanzó el 98.5% de BaA, el 97.5% de BkF y BaP y 96% de BbF.

Los estudios de García de Llasera *et al.*, (2016) para una solución de benzo(a)pireno, reportan la eliminación del 79% en medio líquido a 0.75 h, y en un estudio posterior García de Llasera y García-Cicourel (2017), reportan al mismo tiempo de exposición la remoción cercana al 75% de BaA para la misma especie, mientras para este trabajo se reportan valores superiores al 90% lo que indicó que la mezcla de HAPs favorece la remoción de los HAPs. En la biomasa Olmos-Espejel *et al.*, (2012), reportan un recobro del 30% del BaP a 0.75h contra un 55% encontrado en el presente estudio para el BaP, corroborando con este aumento en la biomasa, un efecto favorable de la presencia de la mezcla de HAPs en la remoción. Al cabo de las 48h de exposición la cantidad de HAPs en medio líquido (0.10-0.16 $\mu\text{g/L}$) y biomasa (0.22-0.76 $\mu\text{g/L}$) en todos los casos es menor que la cantidad adicionada inicialmente (266 $\mu\text{g/L}$), con lo que se mostró que hubo además de la remoción, la degradación por procesos metabólicos por parte de la microalga. Al realizar una prueba t de muestras correlacionadas (Anexo 6), se encontró que la diferencia entre medias en todas las combinaciones menos para BaA-BaP, se encuentran entre el intervalo del 95%. Con lo anterior se establece, que la acción de la microalga sobre los HAPs estudiados no es homogénea, depende de parámetros fisicoquímicos como la solubilidad del HAP en el medio de cultivo o la k_{ow} , que son determinantes para la degradación del HAP por la microalga, mostrando de acuerdo con los resultados de la tabla 21 que es mayor para el BaP y menor para el BbF. Puede establecerse en el anexo 6, que para la prueba t para una muestra, realizada a las cantidades encontradas en la muestra control indican que no hay diferencias significativas a lo largo del tiempo con lo que se descarta degradación abiótica durante el proceso de exposición a la microalga. Las diferencias de cantidades de cada HAP en el medio de control se pueden deber a la misma solubilidad de los HAPs en medio acuoso (en mg/L 0.01038 BaP, 0.0094 BaA, 0.0025 BbF y 0.0020 BkF).

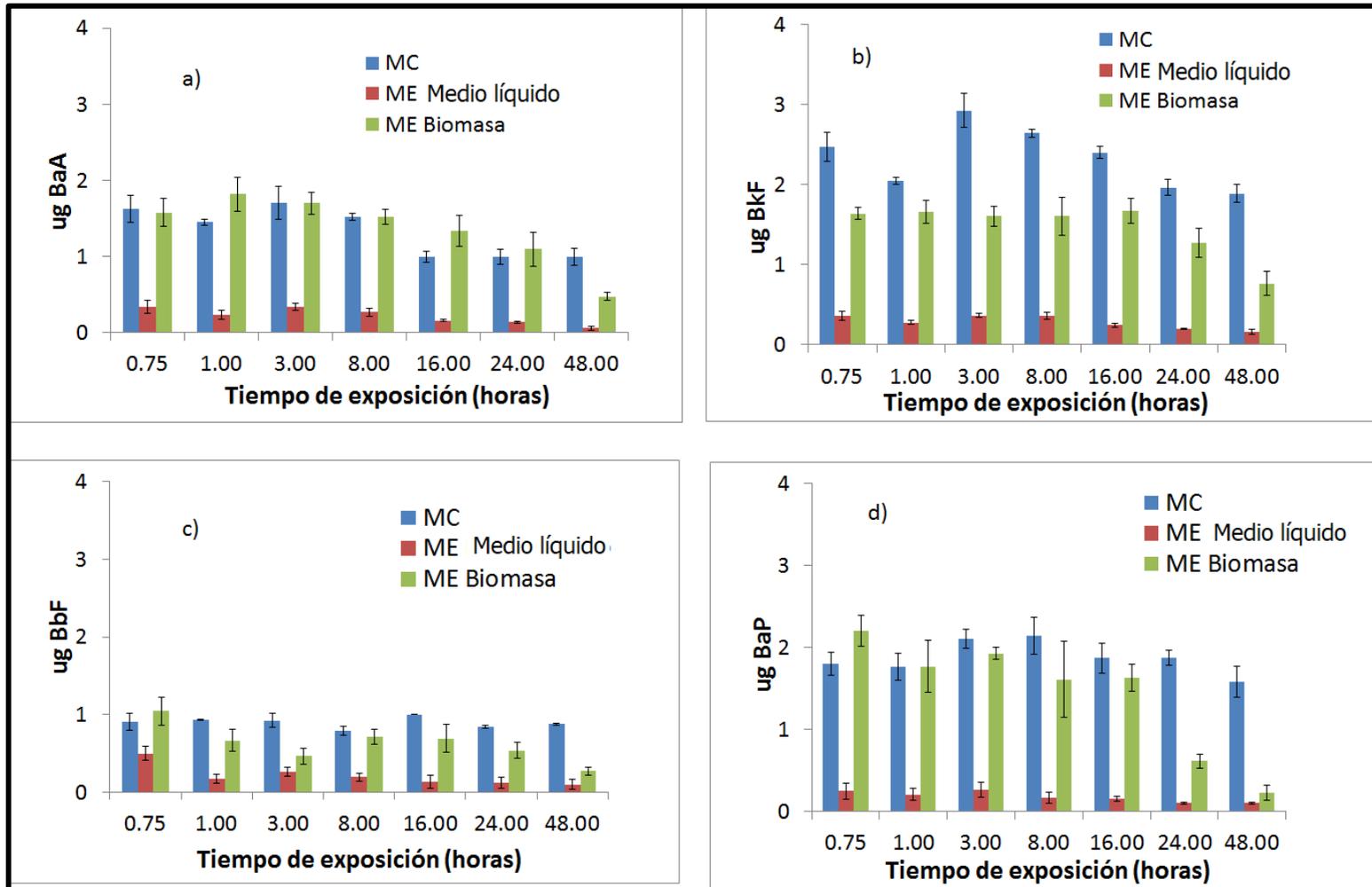


Figura 26. Cantidad remanente (μg) vs tiempo de exposición (h) en medio líquido y biomasa para A) BaA, B) BkF, C) BbF y D) BaP.

Tabla 21. Porcentaje de remoción y degradación de los HAPs expuestos a la especie *S. capricornutum* en función del tiempo

BaA		Cantidad de HAP (μg)		Porcentajes de recobro	
tiempo exp (h)	MC	ME Medio líquido	ME Biomasa	Remoción	Degradación
0.75	1.63 (± 0.2)	0.5 (± 0.05)	1.58 (± 0.2)	91.48 (± 4.5)	51.95 (± 6.5)
1	1.45 (± 0.04)	0.4 (± 0.06)	1.82 (± 0.2)	94.13 (± 1.1)	48.68 (± 2.5)
3	1.70 (± 0.2)	0.5 (± 0.04)	1.70 (± 0.1)	91.38 (± 5.4)	48.88 (± 6.4)
8	1.52 (± 0.05)	0.4 (± 0.02)	1.52 (± 0.1)	93.25 (± 1.2)	55.15 (± 2.5)
16	1.00 (± 0.07)	0.3 (± 0.02)	1.34 (± 0.2)	95.96 (± 1.8)	62.46 (± 2.1)
24	1.00 (± 0.1)	0.2 (± 0.01)	1.10 (± 0.2)	96.50 (± 2.5)	69.00 (± 2.8)
48	1.00 (± 0.1)	0.1 (± 0.01)	0.48 (± 0.05)	98.50 (± 2.8)	86.60 (± 3.6)
BkF		Cantidad de HAP (μg)		Porcentajes de recobro	
tiempo exp (h)	MC	ME Medio líquido	ME Biomasa	Remoción	Degradación
0.75	0.91 (± 0.1)	0.5 (± 0.09)	1.05 (± 0.2)	87.58 (± 2.8)	61.44 (± 6.7)
1	0.93 (± 0.01)	0.2 (± 0.05)	0.66 (± 0.1)	95.67 (± 1.3)	79.09 (± 4.8)
3	0.92 (± 0.1)	0.3 (± 0.05)	0.46 (± 0.1)	93.32 (± 1.4)	81.70 (± 3.8)
8	0.79 (± 0.06)	0.2 (± 0.06)	0.71 (± 0.2)	95.13 (± 1.4)	77.39 (± 6.5)
16	1.00 (± 0.01)	0.1 (± 0.08)	0.69 (± 0.2)	96.69 (± 2.0)	79.36 (± 4.3)
24	0.84 (± 0.02)	0.1 (± 0.07)	0.54 (± 0.1)	97.00 (± 1.8)	83.53 (± 2.3)
48	0.88 (± 0.1)	0.1 (± 0.06)	0.27 (± 0.05)	97.53 (± 1.6)	90.73 (± 2.8)
BaP		Cantidad de HAP (μg)		Porcentajes de recobro	
tiempo exp (h)	MC	ME Medio líquido	ME Biomasa	Remoción	Degradación
0.75	1.80 (± 0.2)	0.3 (± 0.09)	2.20 (± 0.2)	93.76 (± 2.4)	38.67 (± 7.1)
1	1.76 (± 0.2)	0.2 (± 0.07)	1.77 (± 0.4)	94.86 (± 1.7)	50.68 (± 9.7)
3	2.10 (± 0.2)	0.3 (± 0.07)	1.93 (± 0.1)	93.58 (± 2.3)	45.37 (± 4.2)
8	2.14 (± 0.2)	0.2 (± 0.07)	1.61 (± 0.4)	95.97 (± 1.8)	55.72 (± 10)
16	1.87 (± 0.2)	0.1 (± 0.03)	1.63 (± 0.2)	97.50 (± 0.8)	56.81 (± 4.9)
24	1.88 (± 0.2)	0.1 (± 0.01)	0.61 (± 0.1)	97.50 (± 0.3)	82.18 (± 2.4)
48	1.59 (± 0.2)	0.1 (± 0.01)	0.22 (± 0.1)	97.50 (± 0.3)	91.92 (± 2.8)
BbF		Cantidad de HAP (μg)		Porcentajes de recobro	
tiempo exp (h)	MC	ME Medio líquido	ME Biomasa	Remoción	Degradación
0.75	1.14 (± 0.15)	0.4 (± 0.06)	1.64 (± 0.1)	91.02 (± 1.4)	50.09 (± 3.3)
1	1.13 (± 0.2)	0.3 (± 0.02)	1.66 (± 0.1)	93.03 (± 0.6)	51.44 (± 4.2)
3	1.61 (± 0.1)	0.4 (± 0.04)	1.60 (± 0.1)	90.97 (± 0.6)	50.90 (± 2.8)
8	1.46 (± 0.2)	0.4 (± 0.03)	1.60 (± 0.1)	91.08 (± 1.1)	50.98 (± 6.9)
16	0.62 (± 0.2)	0.2 (± 0.02)	1.67 (± 0.2)	93.94 (± 0.8)	52.18 (± 4.2)
24	1.08 (± 0.1)	0.2 (± 0.01)	1.27 (± 0.2)	94.97 (± 1.1)	63.22 (± 4.6)
48	1.04 (± 0.2)	0.2 (± 0.03)	0.76 (± 0.2)	96.01 (± 0.8)	76.95 (± 4.5)

Lei *et al.*, (2007) reportan que en el estudio de 7 especies de microalgas (*Chlamydomonas sp.*, *Chlorella miniata*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *cuadricauda Scenedesmus*, *Selenastrum capricornutum*, y *Synechosystis sp.*) con el fluoranteno (Flu) y Pir de forma individual y en mezcla, se encontró que los porcentajes de remoción con *S. capricornutum* fueron del 80% para la Flu y el 73% para Pir, pero cuando la *S. capricornutum* se expuso a una mezcla de la Flu y Pir durante 96 h, la eliminación Pir aumentó a 76% y se observó un aumento similar para la eliminación del Flu.

Por otra parte, Luo *et al.*, (2014) reportaron el empleo de la *S. capricornutum* y *Chlorella sp.*, en la remoción de 8 HAPs en una concentración de 100 µg/L, en el cálculo del porcentaje de biodegradación con respecto a la cantidad de HAPs adicionado encontraron para el BaA 68.7%, BbF 74.1%, BkF 55.1% y BaP 64.1% al cabo de 48h de exposición a la *S. capricornutum*. García de Llasera *et al.* (2016), reportan la degradación del 99% del BaP a las 15h de exposición y en un posterior estudio [García de Llasera y García-Cicourel, 2017] para el BaA reportaron la degradación en un 97% al cabo de 6h, en el presente trabajo para alcanzar porcentajes semejantes (77-91%) se requirieron de 48h de exposición, con lo cual se establece que a mayor cantidad de HAPs en la mezcla se requiere de mayor tiempo de exposición para que la microalga logre porcentajes más altos de remoción, sin embargo, el estudio no involucro el seguimiento por más de 48 h.

Estas observaciones van en consonancia con Luo *et al.*, (2014), que informaron que la degradación porcentual en una mezcla de siete HAPs de peso molecular alto con *Selenastrum capricornutum* después de 24h de exposición fue para el BaA (41.4%), BbF (39.6%), BkF (28.1%), BaP (40.2%), DBA (7.8%), indeno (1,2,3-c, d) pireno, IP (29.9%) y el benzo (g,h,i) perileno- BghiP (0%). Su estudio también estableció la eliminación y transformación de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante el uso de luz diferente (luz amarilla y luz blanca), mostrando que el BaA y BaP fueron transformados en ambos tipos de luz, seguido por menor proporción de BbF y BkF, lo cual también va en el sentido de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

6.5.2.2. Cuantificación metabolitos.

Los resultados de las cantidades de metabolitos formados como resultado de la exposición a diferentes tiempos se reportan en la tabla 22.

6.5.2.2.1. Metabolitos del BaA.

La mayor cantidad de metabolitos corresponde a la biodegradación del BaA, al cabo de 24h la formación de la mezcla 8,9- y 10,11-dBaA alcanza 2358 ng (± 108.9) en medio de cultivo y 389ng (± 85.9) en biomasa, mientras el 5,6-dBaA tiene 532 ng (± 85.1) en medio líquido y 123ng (± 12) en biomasa, lo que es equivalente estequiométricamente a la degradación del 74% del BaA adicionado al inicio.

Tabla 22. Cantidad medida de cada metabolito en función del tiempo en medio líquido y biomasa

Cantidad de metabolito (ng) en medio de cultivo								
Número	Compuesto	0.75h	1h	3h	8h	16h	24h	48h
1	9,10-dBaP	ND	1.0 (± 0.6)	1.1 (± 0.6)	28.3 (± 6.1)	109.1 (± 15.2)	103.1 (± 10.2)	196 (± 41.0)
2	11,12-dBbF	NA	NA	NA	ND	ND	ND	ND
3	1,2-dBbF	ND	ND	ND	2.0 (± 0.5)	6.9 (± 1.7)	11.6 (± 2.9)	2.0 (± 0.4)
4	5,6-dBaA	2.0 (± 0.8)	9.9 (± 2.3)	41.5 (± 20.0)	264.8 (± 89.0)	359.7 (± 63.6)	531.9 (± 85.1)	780.4 (± 88.0)
5/6	8,9-dBaA/ 10,11-dBaA	14.5 (± 5.1)	41.5 (± 20.1)	11.1 (± 4.7)	1204.6 (± 326.5)	1910.6 (± 88.9)	2358.5 (± 105.0)	2612.1 (± 114.1)
7	4,5-dBaP	4.6 (± 1.1)	11.1 (± 4.7)	36.1 (± 4.7)	335.9 (± 130.0)	622.2 (± 100.3)	674.1 (± 102)	346.8 (± 196.6)
8	8,9-dBkF	NA	NA	NA	31.0 (± 5.0)	63.9 (± 6.7)	260.0 (± 35.9)	27.3 (± 6.6)
9	7,8-dBaP	1.5 (± 1.0)	5.7 (± 2.1)	5.8 (± 2.1)	42.0 (± 14.5)	39.2 (± 3.7)	98.5 (± 7.7)	18.3 (± 6.6)
10	9,10-dBbF	NA	NA	NA	1.0 (± 0.03)	1.8 (± 0.18)	3.1 (± 0.92)	1.0 (± 0.03)
Cantidad de metabolito en Biomasa (ng)								
	Compuesto	0.75h	1h	3h	8h	16h	24h	48h
1	9,10-dBaP	2.10 (± 0.75)	3.5 (± 0.7)	4.5 (± 3.3)	14.5 (± 0.7)	14.9 (± 2.2)	17.4 (± 2.44)	2.1 (± 1.1)
2	11,12-dBbF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	1,2-dBbF	NA	NA	NA	12.2 (± 2.0)	6.1 (± 0.7)	4.8 (± 1.5)	1.9 (± 0.08)
4	5,6-dBaA	13.4 (± 2.4)	18.0 (± 1.6)	16.6 (± 6.1)	43.0 (± 3.7)	87.7 (± 18.3)	122.9 (± 12.2)	34.6 (± 6.5)

5/6	8,9-dBaA 10,11-dBaA	86.1 (±24.1)	110.8 (±19.0)	131.0 (±42.7)	274.2 (±4.0)	265.1 (±28.9)	389.0 (±28.8)	62.4 (±26.0)
7	4,5-dBaP	17.6 (±4.6)	27.7 (±3.0)	45.9 (±13.6)	49.3 (±3.0)	92.7 (±18.5)	102.1 (±14.8)	21.8 (±20.0)
8	8,9-dBkF	NA	NA	NA	60.1 (±6.1)	63.4 (±3.3)	73.4 (±10.2)	30.4 (±9.0)
9	7,8-dBaP	7.4 (±1.2)	14.1 (±4.3)	31.0 (±13.3)	111.9 (±4.1)	83.8 (±13.1)	104.9 (±23.1)	4.8 (±0.9)
10	9,10-dBbF	NA	NA	NA	0.6 (±0.1)	2.1 (±0.5)	3.2 (±0.7)	1.4 (±0.07)

ND= No Detectado

NA= No Analizado

La cantidad de BaA remanente (Tabla 20) en medio de cultivo y biomasa al cabo de 24h corresponde al 33% de la masa inicial estableciendo un balance de masa para el BaA. En la figura 27a se muestra la gráfica correspondiente al seguimiento de los metabolitos del BaA en medio de cultivo y en la 27b la cantidad determinada en la biomasa, donde se observó que la formación de metabolitos en función del tiempo, fue consistente con la disminución de la cantidad de HAP en el medio líquido y la biomasa. Se encontró que, a las 0.75h de exposición, hay la formación de los metabolitos de la mezcla 10,11-dBaA/8,9-dBaA y en mayor cantidad que el 5,6-dBaA (en total 2.5% degradado con respecto a la cantidad inicial de BaA adicionado) y aparecen inicialmente en la biomasa, lo que indicó que su formación ocurre por la acción de enzimas de la especie dentro del proceso metabólico. La concentración en el medio líquido siguió aumentando con el tiempo de exposición las 48 h, con lo cual se establece que su formación es continua y en la medida que la microalga lo va formando dentro de su estructura, va siendo eliminados por ella hacia el medio, lo que se constata con la menor concentración encontrada en la biomasa en todos los tiempos. A este tiempo de exposición el 5,6-dBaA y 8,9-dBaA/10,11-dBaA producido en la biomasa y el medio líquido representó el 2.1% (97 ng) y el 74% (3.392 ng) de la masa inicial BaA, respectivamente (figura 30a y 30b), mientras el BaA remanente es del 14.5% indicando que se presentó la posible degradación de los metabolitos por procesos abióticos ó por acción del metabolismo de la microalga. Al final de las 48h de exposición se aprecia en las figuras 26c1 y c2 como la cantidad de metabolito ha disminuido en la biomasa y ha llegado al máximo en el medio líquido indicando posiblemente el final del proceso de degradación.

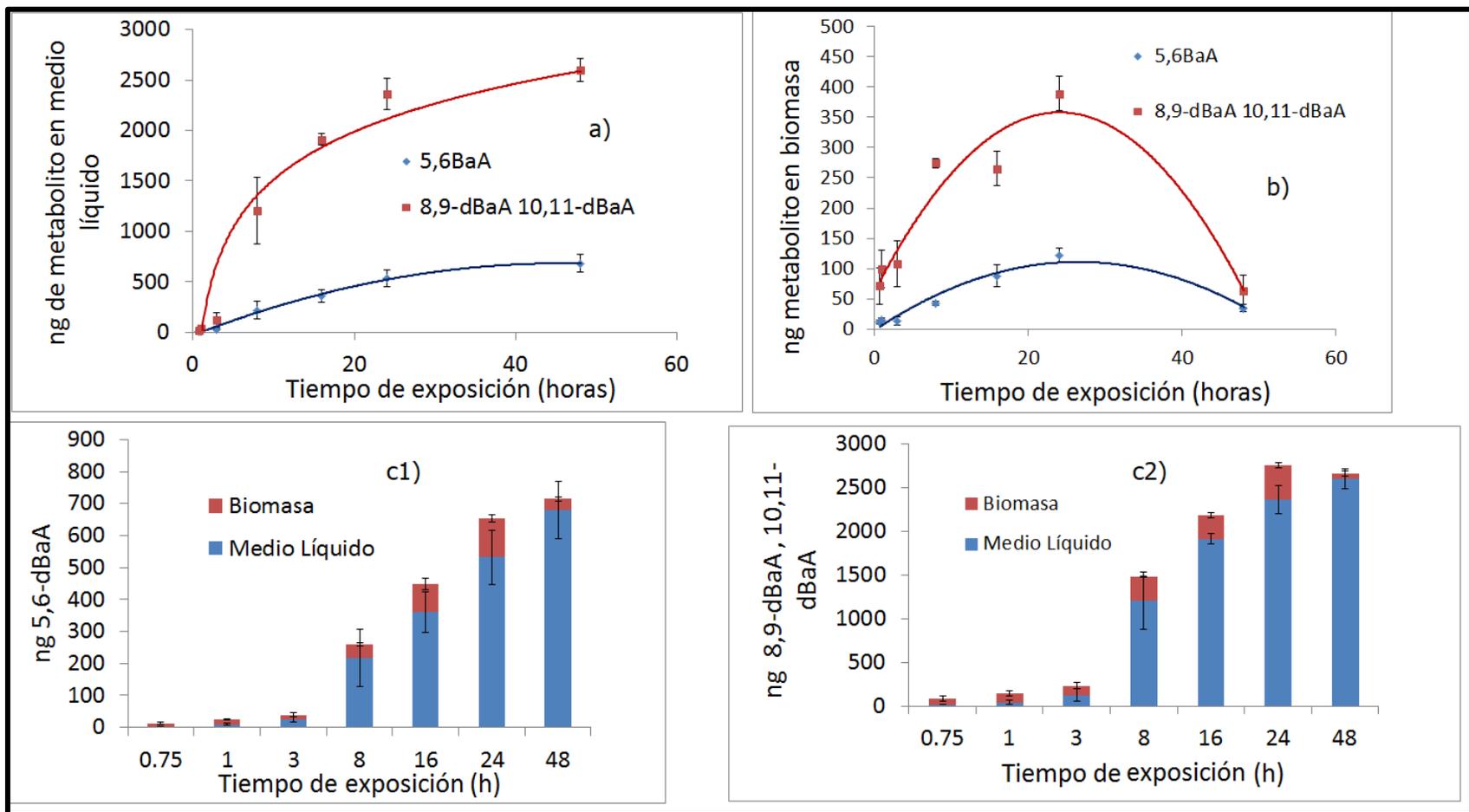


Figura 27. Cantidad recuperada de metabolitos del BaA a diferentes tiempos de exposición en a) medio líquido; b) en biomasa; Cantidad total de c1) 5,6-dBaA y c2) 8,9-dBaA/10,11-dBaA.

García de Llasera y García-Cicourel, (2017), reportaron que la cantidad de los metabolitos 8,9- y 10,11- llegan a la máxima formación al cabo de 6h e inicia su descenso y después de las 24h no se logró cuantificar ninguno de éstos metabolitos por el método validado, en este trabajo se encontró que la mayor cantidad de la mezcla se alcanzó justo a las 24h de exposición y recién a las 48h inicia el descenso de la cantidad encontrada en la biomasa, lo cual puede estar relacionado con un proceso de degradación del BaA lento cuando hace parte de la mezcla que cuando se encuentra solo a pesar que el proceso de remoción es más rápido. Además, podría pasar que una vez eliminado del interior de la microalga inicie una competencia entre los metabolitos generados del BaA y los demás HAPs y sus metabolitos para continuar con procesos de degradación asociados al metabolismo de la microalga y por esta razón no se ve su disminución antes de las 48 h.

6.5.2.2.2. Metabolitos del BaP

El análisis del medio líquido mostró que el metabolito de BaP que se formó primero y en mayor cantidad fue el 4,5-dBaP (22.2 ng al cabo de 0.75h) y fue encontrado primero en la biomasa que, en el medio líquido, lo cual establece que su formación es resultado de los procesos metabólicos de la microalga sobre el BaP. Sin embargo, la cantidad de metabolito cuantificado que se formó corresponde estequiométricamente en este tiempo al 0.7% del BaP adicionado al inicio que ha sido degradado del 96.3% que se ha removido. La mayor cantidad de 4,5-dBaP se alcanza a las 24h de exposición con 674 ± 102 ng en medio líquido y 102.1 ± 14.8 ng en biomasa, correspondiente estequiométricamente al 17.1% del BaP adicionado, lo cual es similar al comportamiento observado por Olmos-Espejel *et al.* (2012), donde el 4,5-dBaP fue el de mayor formación, con la diferencia que se logró en un tiempo aproximado de 6h de exposición con la *S. capricornutum* en la exposición de BaP de forma individual, lo que indica que aunque la remoción es rápida, la biodegradación está asociada a la presencia de otros HAPs. García de Llasera *et al.* (2016), reportaron para este metabolito una cantidad máxima de 51 ± 4 ng cuando la prueba de exposición se realizó también individualmente con BaP y con concentraciones similares al de esta investigación, y coincide con las de 6h de exposición como el tiempo necesario para esta cantidad, también reportó que el 9,10-dBaP fue inicialmente cuantificado a las 6h y al cabo de 15h de exposición la cantidad fue de 9 ± 1 ng, aumentando a 14 ng al cabo

de las 24h de exposición. En este trabajo, transcurrida 1h de exposición el 9,10- fue encontrado en la biomasa, tal y como lo reporto Olmos-Espejel *et al.*, (2012) empleando el sistema EFS on-line, pero solo hasta las 8h fue cuantificado en el medio líquido, la cantidad de 9,10-dBaP aumentó en éste medio hasta 196 ± 41 ng después de 48h de exposición, pero en este punto no se encontró cantidad significativa en biomasa, caso similar a lo reportado por García de Llasera *et al.* 2016, para el BaP individual, a las 24h de exposición.

Los resultados también mostraron que el metabolito 7,8-dBaP se encuentra en cantidades más pequeñas en el medio líquido en comparación con los otros dos metabolitos del BaP después de 24h de exposición (98.5 ± 7.7 ng), y a las 48h (18.3 ± 6.6 ng), pero en biomasa es mayor que la del 9,10- implicando con lo anterior que la eliminación es probablemente facilitada por la afinidad de los metabolitos a la fase acuosa y posiblemente relacionado con los valores de $k'w$ encontrados en esta investigación (tabla 10). Al cabo de las 24h la formación de metabolitos estequiométricamente equivale al 24.2% de BaP con un 17.8% de BaP remanente con respecto al BaP adicionado inicialmente, como se observa en la figura 28, donde las cantidades de 4,5-dBaP y 7,8-dBaP disminuyen rápidamente a estos tiempos, y teniendo en cuenta que los estudios de estabilidad realizados a estos dos metabolitos muestran que al cabo de 48h su concentración no se ve afectada por efecto de la luz amarilla, se puede asociar su disminución a procesos de degradación de los dihidrodioles formados por procesos metabólicos, al igual que en las bacterias. Por otra parte, los resultados parecen corroborar que *S. capricornutum* degrada mejor la mezcla de HAPs sobre el compuesto individual, a pesar de tardarse más tiempo. Este hecho se soporta en la hipótesis de la existencia de un período de activación de las células para la producción adicional de enzimas cuando las microalgas están expuestas a un medio multicontaminado, aunque ciertamente, es claro que se necesita más investigación para dilucidar este fenómeno.

Nuestros resultados están de acuerdo con los de estudios que sugieren que las microalgas metabolizan con preferencia HAP través de la vía di-oxigenasa, donde se favorece la producción de dihidrodioles, ya que no se presentó detección de la formación de mono-hidroxiados, los cuales serían intermediarios en la actuación de mono-oxigenasas. La

figura 28 (a, b) muestra la cantidad de metabolito en función del tiempo de exposición y las cantidades totales de metabolitos formados BaP (c1, c2, c3). Warshawsky *et al.*, (1995), también informaron de la formación de estos metabolitos 9,10-dBaP; 7,8-dBaP, además de una mezcla de 4,5-dBaP/11,12-dBaP después de la exposición de *Selenastrum capricornutum* a 160 mg/L de BaP, estableciendo que la mayor cantidad de metabolitos correspondió a la mezcla 4,5-/11,12- dihidrodiol, seguida del 9,10- y el 7,8- dihidrodioles después de dos días de exposición, lo cual se observó en la presente investigación.

Pocos estudios han evaluado la formación de metabolitos en el medio de cultivo y la biomasa, especialmente, BaA; BbF; y BkF; por tanto, los resultados de este estudio son importantes en la elucidación del proceso de degradación de la especie estudiada. Se puede asegurar que la exposición de la *S. capricornutum* a la mezcla de HAPs resultó en una buena degradación de BaA, lo cual es corroborado por las cantidades totales de metabolitos formados (Fig. 27 c1 y c2) y las razones de este aumento pueden explicarse posiblemente en el hecho que el BaA es de menor tamaño (4 anillos) que los otros HAPs (5 anillos), además, el BaA tiene mayor solubilidad (9.40 mg/L) que los otros HAPs (BaP: 1.2 mg/L; BkF: 0.55 mg/L; y BbF: 1.2 mg/L) y menor hidrofobicidad de acuerdo con log Kow (BaA: 5.61; BbF: 5.78; BkF: 6.11; y BaP: 6.35); lo cual facilitó su movilidad hacia la célula. García de Llasera y García-Cicourel (2017), reportan la formación de 8,9-dihidrodiol, 5,6-dihidrodiol y 10,11-dihidrodiol para el BaA siendo el metabolito de mayor formación el 10,11-dihidrodiol (960±37 ng), 5,6-dihidrodiol (292±16 ng) y el 8,9-dihidrodiol (200±4 ng), al cabo de 6h de exposición, al igual que con el BaP de acuerdo con Olmos-Espejel *et al.*, (2012) comparado con los resultados del presente trabajo, se establece que el tiempo de exposición requerido para la degradación del HAP individual es menor que para la mezcla a pesar de llevarse a cabo procedimientos de remoción más rápidos.

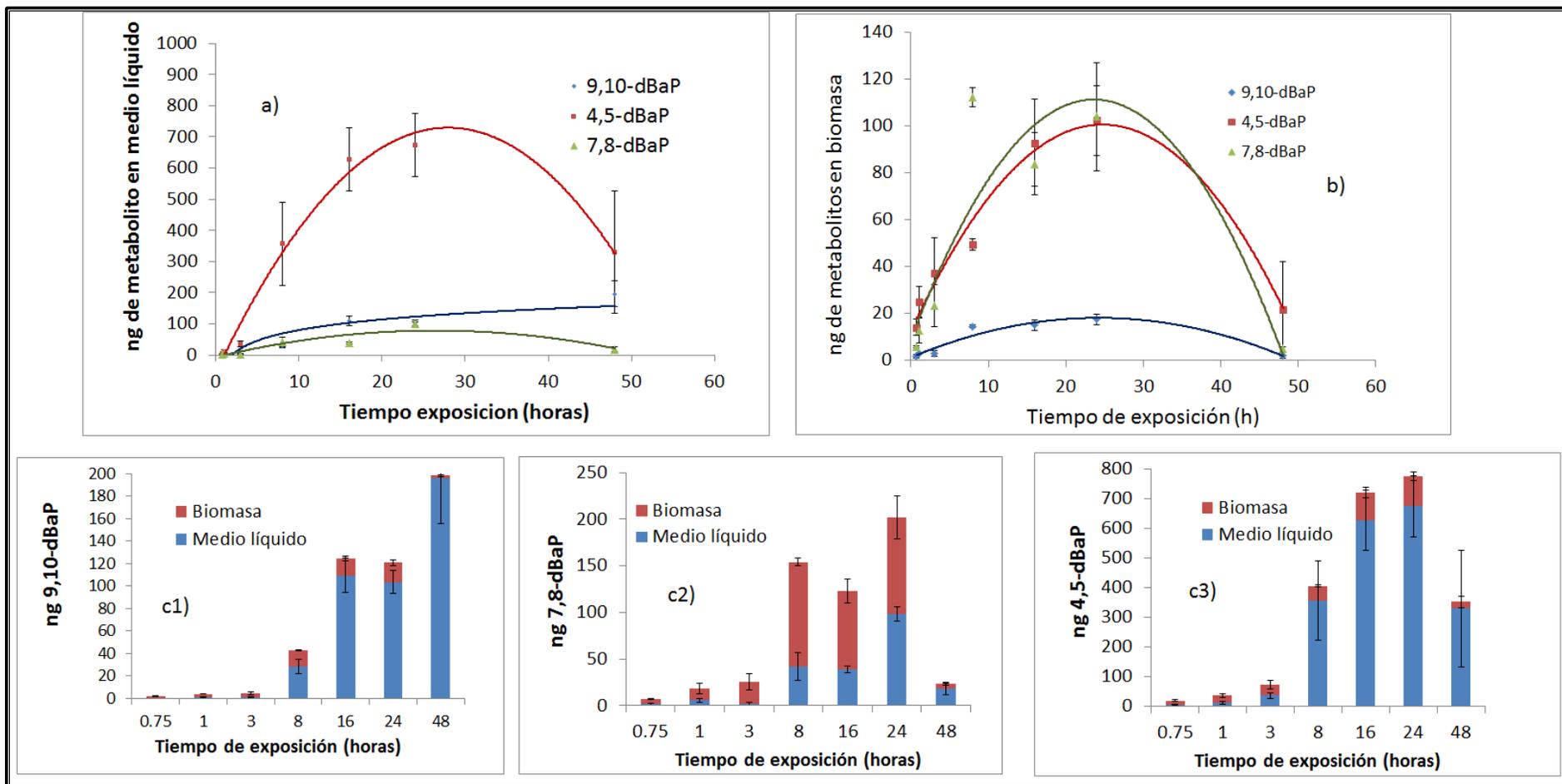


Figura 28. Cantidad recuperada de metabolitos del BaP a diferentes tiempos de exposición en a) medio líquido; b) en biomasa; Cantidad total de c1) 9,10-dBaP y c2) 7,8-dBaP y c3) 4,5-dBaP.

Por otra parte, las figuras 29 y 30 muestran los cromatogramas obtenidos de los recobros de metabolitos en medio líquido y biomasa, donde se identifican con números los metabolitos cuantificados por estándares (tabla 21) y con la letra D seguida de un número para los compuestos desconocidos que pueden tratarse de metabolitos formados por las microalgas ó incluso productos de degradación de los metabolitos formados. De acuerdo con Warsharwsky *et al.*, 1995 el metabolito del 11,12-dihidrodiol no pudo ser separado del 4,5-dihidrodiol teniendo que cuantificarse en mezcla, a pesar que en el presente trabajo no se contó con este metabolito, el compuesto identificado con D3 correspondería a este metabolito según los resultados del autor, sin embargo, debe ser corroborado.

6.5.2.2.3. *Metabolitos del BbF y BkF*

En principio, la aparición de los compuestos desconocidos como el D3 y la mayor cantidad de los metabolitos del BaA y BaP que ensancharon los picos cromatográficos, no se pudo realizar la cuantificación de los metabolitos del BbF y BkF por el solapamiento presentado. Por lo anterior, se decidió realizar la exposición de la mezcla de BbF y BkF en tiempos de 8, 16, 24 y 48h ya que se observó que antes de este tiempo no se presentó formación de metabolitos. Los resultados para la exposición de la mezcla de BbF y BkF con la microalga *S. capricornutum* se muestran en la figura 31. La secuencia completa de tiempos de exposición puede verse en el Anexo 7 para el medio y biomasa respectivamente.

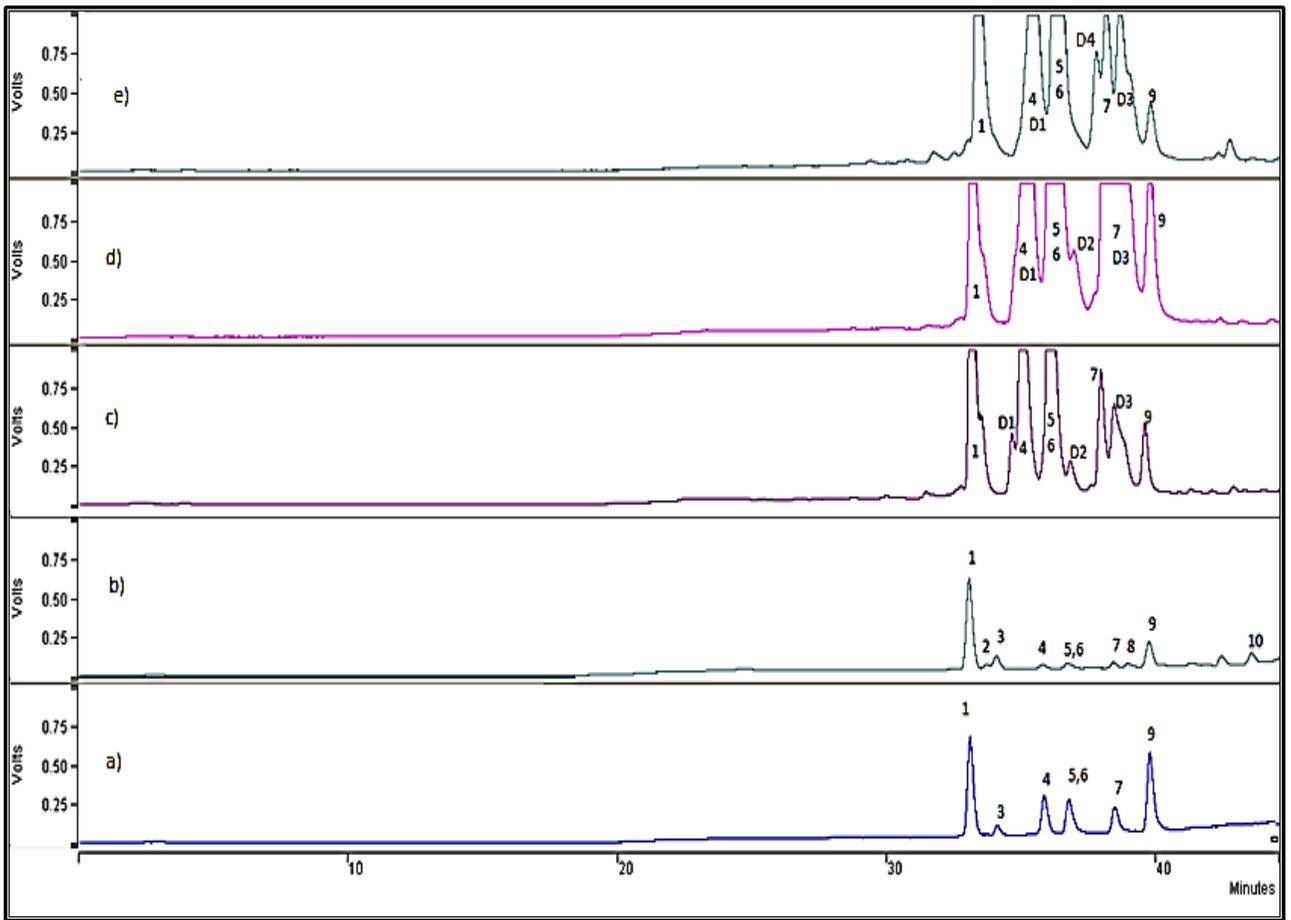


Figura 29. Cromatograma de a) Solución estándar de metabolitos a 12 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ex.}}$ 260 nm y $\lambda_{\text{em.}}$ 410 nm); b) Solución estándar de metabolitos a 12 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ex.}}$ 270 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 428 nm), reportados en la tabla 21 y extractos de medio líquido ($\lambda_{\text{ext.}}$ 260 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 410 nm); c) ME 16 h; d) ME 24 h; e) ME 48h

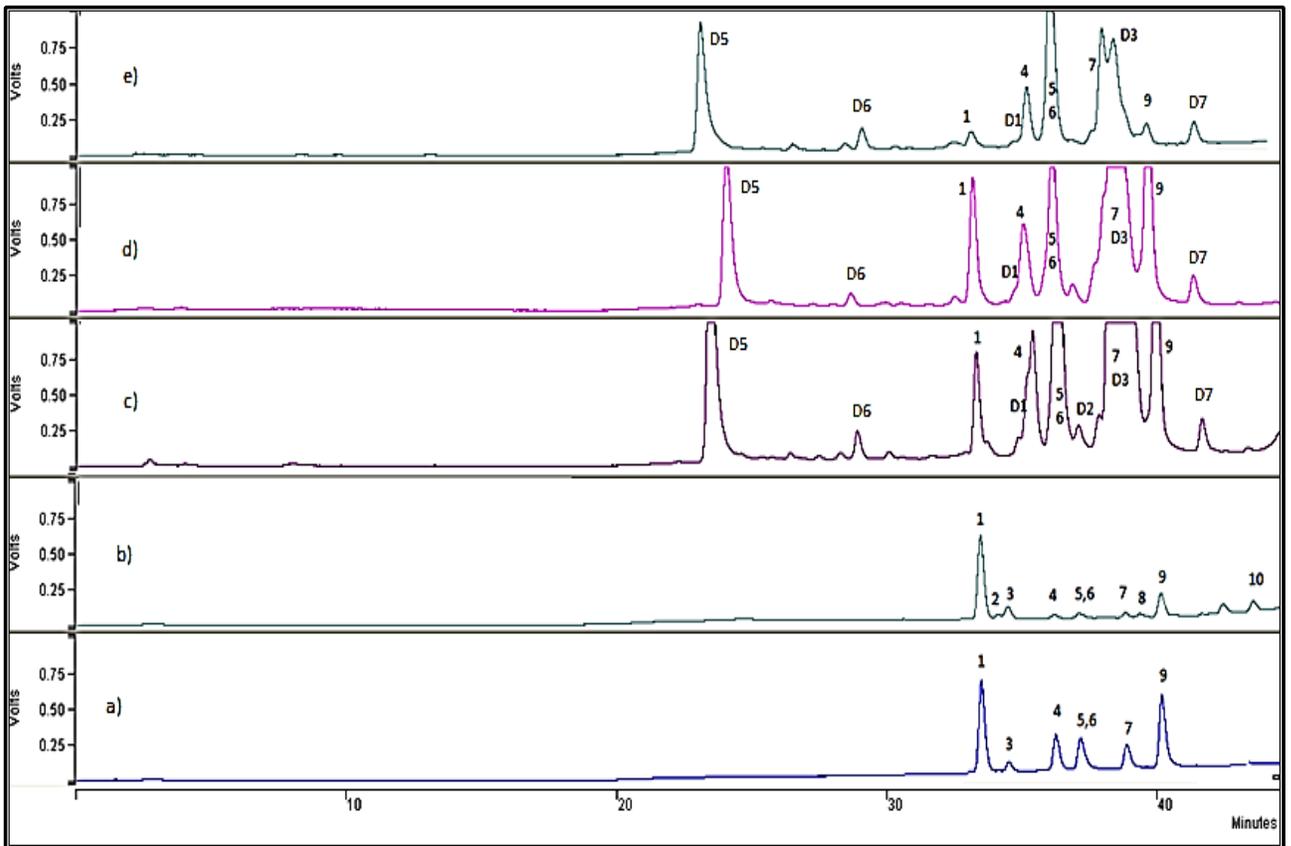


Figura 30. Cromatograma de a) Solución estándar de metabolitos a 12 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ex.}}$ 260 nm y $\lambda_{\text{em.}}$ 410 nm), reportados en tabla 21; b) Solución estándar de metabolitos a 12 $\mu\text{g/L}$ ($\lambda_{\text{ex.}}$ 270 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 428 nm) y extractos de biomasa ($\lambda_{\text{ext.}}$ 260 nm and $\lambda_{\text{em.}}$ 410 nm); c) ME 16 h; d) ME 24 h; e) ME 48h

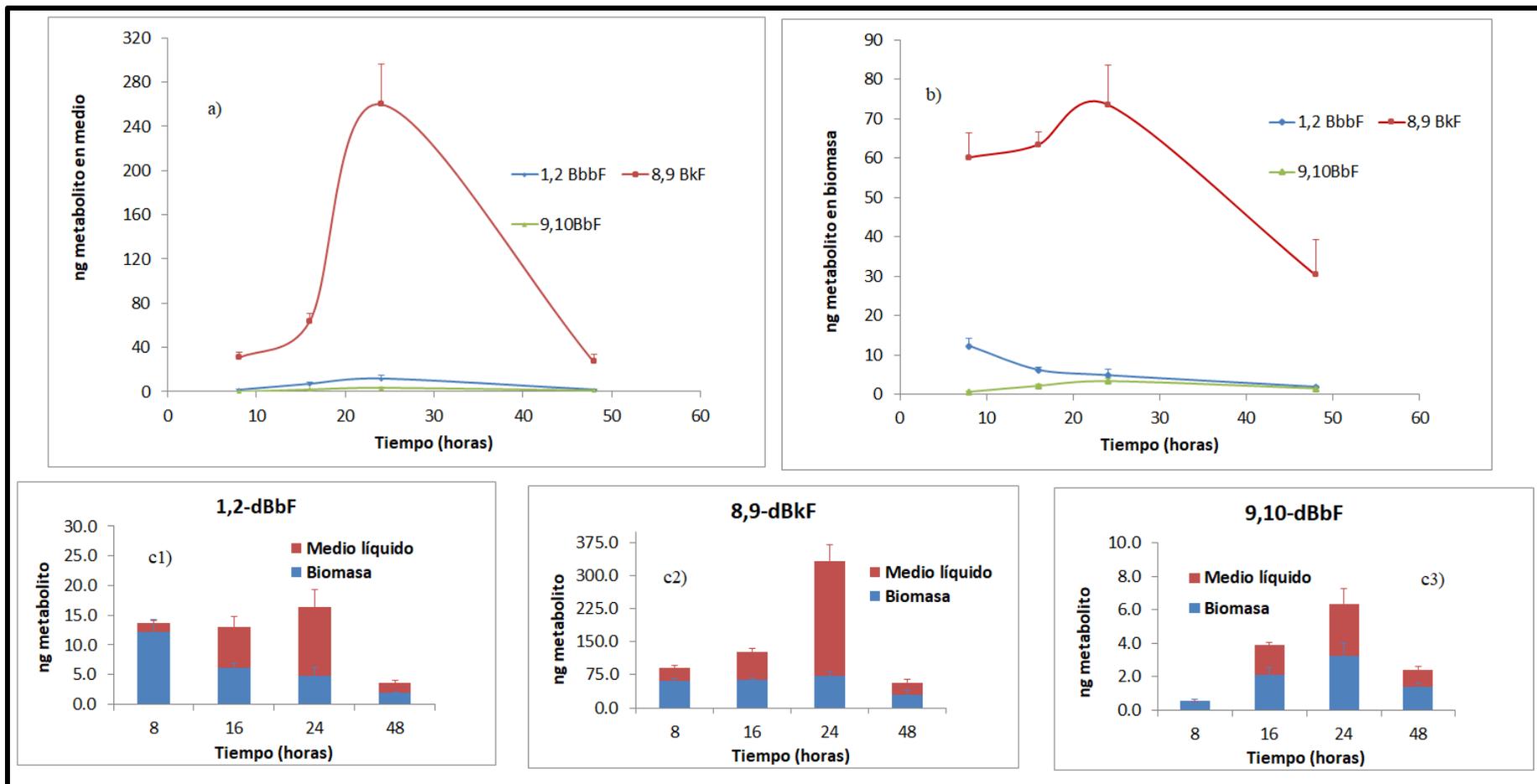


Figura 31. Cantidades recuperadas de metabolitos de BbF y BkF con respecto al tiempo en exposición con *S. capricornutum* a) Medio líquido; b) Biomasa. Cantidad total de c1)1,2-dBbF, c2)8,9-dBkF, c3)9,10-dBbF.

La exposición de *S. capricornutum* a la mezcla de BbF y BkF permitió la identificación de tres metabolitos, dos metabolitos formados a partir del BbF (1,2-dBbF y 9,10-dBbF), y uno de BkF (8,9-dBkF), encontrados después de 8h de exposición, lo cual es posiblemente debido a la baja solubilidad de los HAPs y por tanto una menor difusión hacia el interior de la microalga comparado con el BaA y BaP. La cantidad de metabolito formado en este tiempo se distribuye entre la biomasa y medio líquido, encontrándose que en biomasa hubo mayor cantidad, con lo que se reitera que la formación del metabolito proviene de procesos metabólicos llevados a cabo por la microalga. El tiempo de exposición de 24h dio lugar a la obtención de las mayores cantidades de estos tres metabolitos, donde la cantidad total de 8,9-dBkF producido (333 ± 37.4 ng) fue estequiométricamente equivalente al 8% del BkF añadido inicialmente (260 ± 36 ng en medio líquido y 73 ± 10 ng de la biomasa), el 16% del BkF se encuentra remanente indicando que los procesos de remoción son rápidos mientras la degradación es lenta, además la degradación de metabolitos por la microalga ó procesos abióticos también podrían estar presentes. Blumer, (1975), reportó que los enlaces carbono-carbono en anillos de cinco miembros están sometidos a una mayor deformación y, por lo tanto, tenían un mayor contenido energético y una menor estabilidad, reforzando la posibilidad de degradación por procesos abióticos.

Las cantidades de los otros dos metabolitos fueron menores, 12 ± 3 ng de 1,2-dBbF (0.3% de la masa inicial BbF) y 3.1 ± 0.9 ng de 9,10 dBbF (0.1% de la masa inicial BbF) en el medio líquido (figura 34a) y en la biomasa (figura 34b), las cantidades de estos metabolitos fueron más bajas que en medio líquido, con la excepción de 9,10-dBbF, la cantidad de todos los metabolitos fue mayor en el medio líquido a las 24h en total con un 0.6% del BbF adicionado inicialmente y disminuyó al aumentar el tiempo de exposición. Las bajas concentraciones de metabolitos obtenidos en este caso pueden ser atribuidas a la estructura, bajas solubilidades y altas hidrofobicidades de estos compuestos y al igual que con el BaA y BaP se observa una remoción rápida de la mezcla, pero una degradación lenta comparada con los estudios individuales. Además, si se tiene en cuenta lo observado con respecto al BaA y el BaP al exponerlo individualmente y en mezcla es de esperarse que se requiera mayor tiempo para lograr la degradación de éstos HAPs debido

a estas propiedades fisicoquímicas, como lo reportó Luo *et al.*, (2014) cuando expusieron una mezcla de HAPs a la microalga *S. capricornutum* y requirieron cuatro días (96 h) para lograr la transformación de un 55% del BkF y de un 74% del BbF

No hay informes disponibles en la literatura sobre la biodegradación de una mezcla de BaA, BaP, BbF y BkF por la microalga *S. capricornutum* para la identificación y seguimiento de los metabolitos aquí investigados. Lo más cercano a este experimento fue lo reportado por Luan *et al.*, (2007), quienes identificaron metabolitos tipo dihidrodiol después de la exposición con la microalga *Selenastrum capricornutum* de un medio contaminado con fluoranteno y se encontró que uno de los metabolitos, el 2,3-dihidroxi fluoranteno fue producido en cantidades considerablemente mayores que 3-hidroxi fluoranteno; concluyendo que fueron principalmente degradados vía di-oxigenasa, con lo cual no se descarta la posibilidad de generación de metabolitos mono-hidroxilados, lo cual debe profundizarse más en estudios posteriores. Los cromatogramas de los metabolitos recuperados de la mezcla de BbF y BkF (figura 32 y 33) muestran la identificación de los metabolitos estudiados y la aparición de dos posibles metabolitos identificados como D8 y D9, el primero aparece en el medio líquido y solo a las 24h de exposición mientras el segundo se observa en medio líquido y biomasa.

Los resultados analizados para los de los HAPs, mostraron el descenso en la cantidad de HAPs encontrándose que a las 24h un 88% del BbF y un 70% del BkF habían sido removidos por la *S. acutus*, mientras a ese mismo tiempo la *S. capricornutum* había removido el 96.01% del BbF y 97.5% del BkF, porcentajes que fueron logrados por *S. acutus* al cabo de 96 h, en cuanto a la degradación al cabo de las 24h en *S. acutus* alcanzó una degradación del 60.0% y el 50.9% para el BbF y BkF contra el 90.73% y el 76.95% alcanzado por la *S. capricornutum* en el mismo tiempo respectivamente, con lo cual se establece un proceso metabólico más lento para la degradación de los dos HAPs en la *S. acutus* que en la *S. capricornutum*. Warshawsky *et al.*, (1995), reportaron una menor cantidad de degradación del BaP con *S. acutus* (83.1%) que para *S. capricornutum* (89.5%), lo cual es similar a lo observado con el BbF y BkF. No se encuentran reportes en literatura sobre los productos de biodegradación de estos dos HAPs, Lei *et al.*, (2007), reportan una comparación entre la degradación de fluoranteno con la *S. capricornutum* y

dos especies de *Scenedesmus*, en ese estudio la *platydiscus* y *quadricauda* coincidiendo en una mayor remoción con la primera con un 80.9% contra un 47.6 y 55.5% de las otras dos especies respectivamente. García de Llasera *et al.*, en (2016) reportan la remoción casi del doble de la cantidad de BaP por parte de la *S. capricornutum* que por la *S. acutus* al cabo de los primeros 0.75h y una posterior degradación más eficiente en la primera especie. Es necesario recordar que el medio cultivo en las condiciones necesarias para realizar los procesos de exposición es alcanzado en menor tiempo con la *S. acutus* que con la *S. capriornutum*, mostrando una tasa de crecimiento más rápida, lo cual parece afectar sus propiedades de remoción y degradación de HAPs.

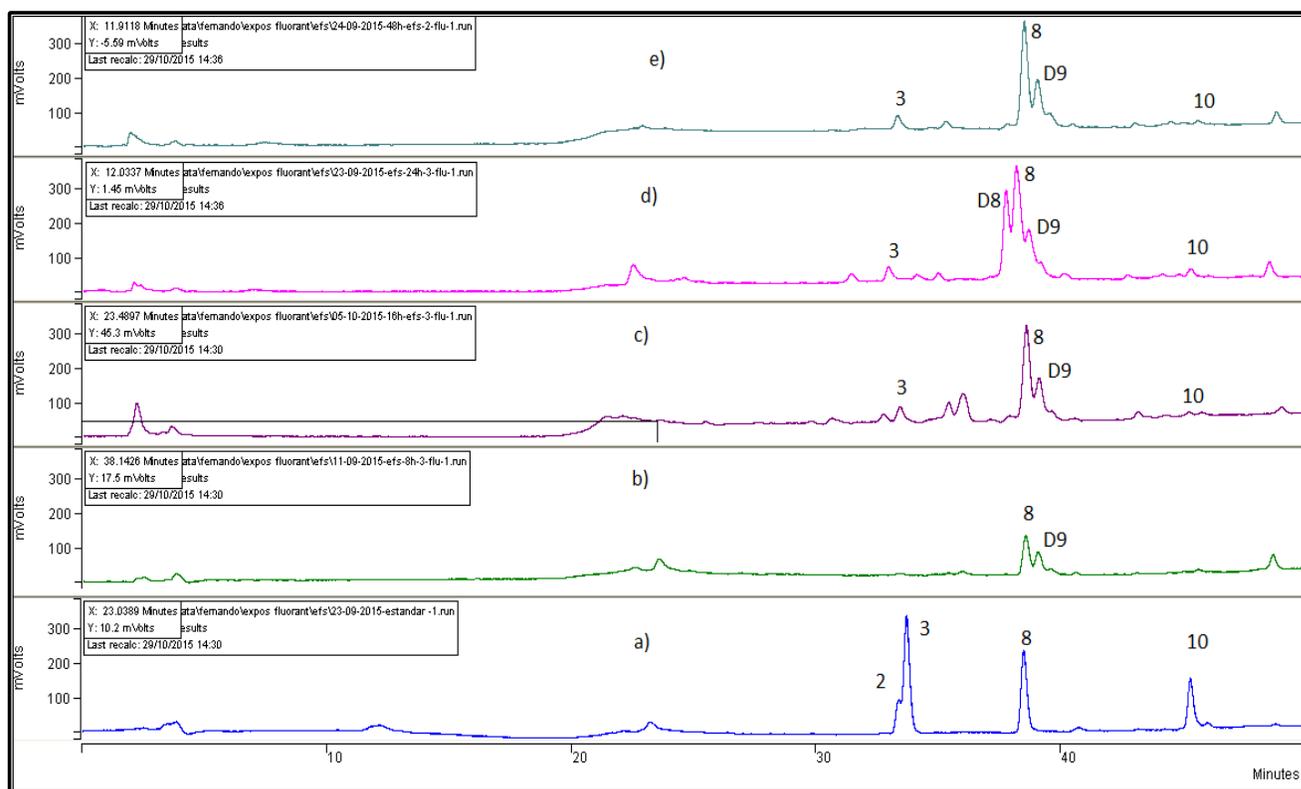


Figura 32. Cromatogramas a λ_{ex} . 270 nm y λ_{em} 428 nm de a) Solución de metabolitos a 20 $\mu\text{g/L}$; 2). 11,12-dBbF, 3)1,2-dBbF; 8)8,9-dBkF y 10) 9,10-dBbF y extractos de medio líquido de exposición con *S. capricornutum* b) ME 8 h; c) ME 16 h; d) ME 24 h; e) ME 48 h

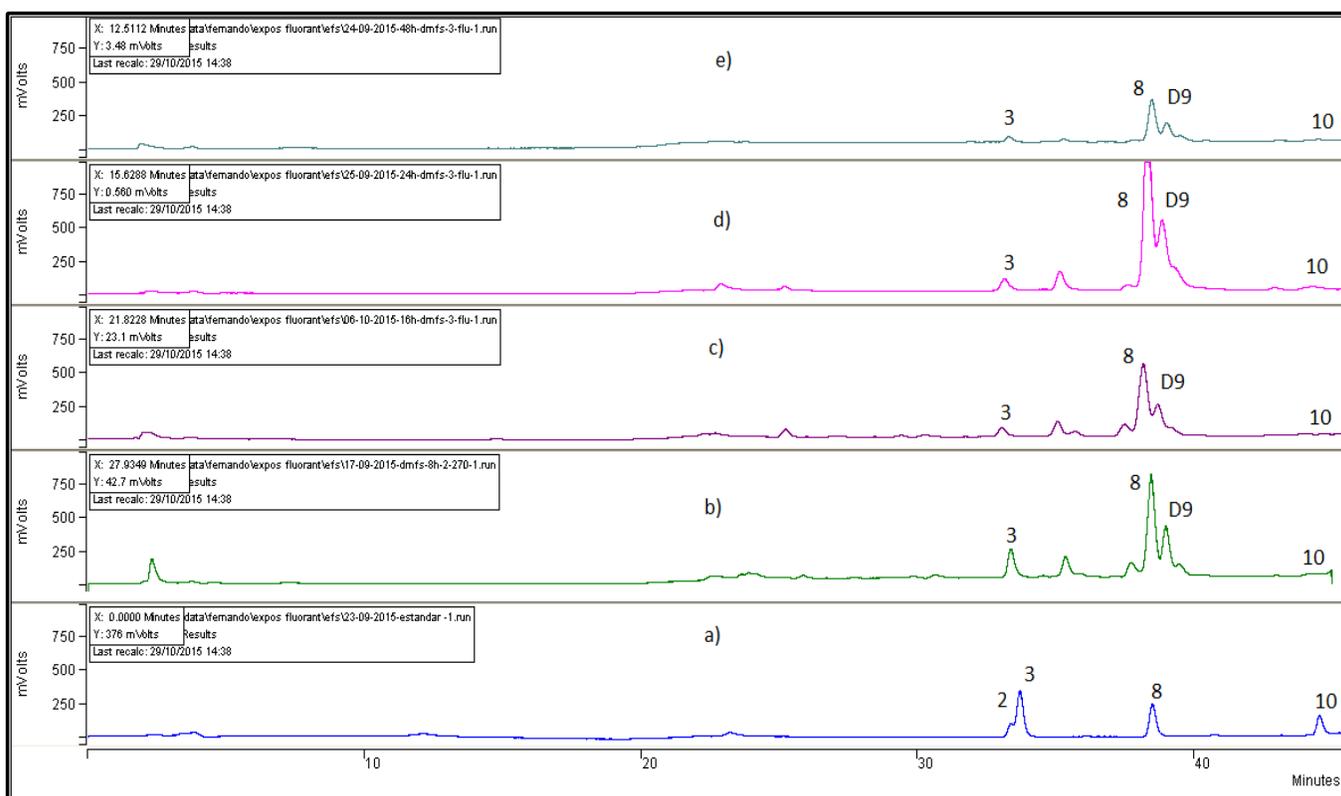


Figura 33. Cromatogramas a λ_{ex} . 270 nm y λ_{em} 428 nm de a) Solución de metabolitos a 20 $\mu\text{g/L}$; 2). 11,12-dBbF, 3)1,2-dBbF; 8)8,9-dBkF y 10) 9,10-dBbF y extractos de biomasa de exposición con *S. capricornutum* de b) ME 8 h; c) ME 16 h; d) ME 24 h; e) ME 48 h.

6.5.3. Ensayos de exposición con mezcla de HAPs (BbF, BkF) a concentración de 266 $\mu\text{g/L}$ con la microalga *Scenedesmus acutus* (3×10^6 células/mL) en función del tiempo (16, 24, 48 y 76h) a 25°C.

Los resultados de este estudio mostraron en primer lugar la formación del 8,9-dBkF como resultado de la degradación del BkF y los dos metabolitos estudiados del BbF, el 1,2- y el 9,10-dBbF de la degradación del BbF, lo cual fue similar a lo observado en la *S. capricornutum*, en la figura 34 y en la tabla 23 se muestran los resultados obtenidos en función del tiempo para los metabolitos del BbF y BkF obtenidos con la *Scenedesmus acutus*. El primer metabolito en ser encontrado en la biomasa corresponde al 8,9-

dihidrodiol del BkF a las 16h de exposición, mientras el 1,2-dihidrodiol y el 9,10-dihidrodiol del BbF requirió de 24h de exposición para ser encontrado en la biomasa.

Tabla 23. Cantidad de metabolitos de BbF y BkF en medio de cultivo y biomasa en la exposición a *S. acutus*.

<i>Cantidad de metabolito (ng) en medio de cultivo</i>						
Número	Compuesto	16h	24h	48h	72h	96h
2	11,12-dBbF	ND	ND	ND	ND	ND
3	1,2-dBbF	ND	ND	1.7 (±0.2)	21.2 (±3.3)	5.5 (±0.3)
8	8,9-dBkF	ND	ND	11.2 (±3.6)	9.6 (±2.9)	23.4 (±5.3)
10	9,10-dBbF	ND	ND	2.3 (±1.2)	2.4 (±1.7)	4.1 (±0.2)
<i>Cantidad de metabolito (ng) en biomasa</i>						
2	11,12-dBbF	ND	ND	ND	ND	ND
3	1,2-dBbF	ND	1.4 (±0.1)	5.8 (±0.5)	2.4 (±0.4)	1.8 (±0.4)
8	8,9-dBkF	1.6 (±0.2)	43.2 (±5.0)	45.9 (±3.0)	7.3 (±0.1)	12.1 (±1.4)
10	9,10-dBbF	ND	1.6 (±0.1)	1.3 (±0.2)	1.1 (±0.2)	0.8 (±0.2)

ND= No Detectado

Lo anterior evidencia el requerimiento de mayor tiempo por parte de la *S. acutus* no solo para la remoción de los HAPs sino para la formación de los metabolitos, toda vez que la *S. capricornutum* al cabo de 8h de exposición ya empezaron a aparecer los metabolitos anteriormente mencionados en la biomasa. Fewson en 1988, estableció que la degradación de compuestos persistentes depende de varios aspectos relacionados con el microorganismo involucrado: el transporte del sustrato, debido a la variedad de sistemas

que permiten la entrada del contaminante a la célula de manera específica e inducible, el mecanismo de acumulación que es otro de los aspectos influyentes en el proceso y la degradación intracelular, debido a la posibilidad de que se realice por vías metabólicas periféricas, centrales y/o la combinación entre ellas. Lo anterior presenta una posible explicación de la diferencia entre los procesos de absorción y degradación de los HAPs entre las microalgas estudiadas.

La mayor cantidad de metabolito en la degradación del BkF fue lograda al cabo de 48h de exposición con 11.2 ± 3.6 ng en medio líquido y 45.9 ± 3.0 ng en biomasa (tabla 23) correspondientes estequiométricamente a un 1.3% del BkF adicionado. También es apreciable que la cantidad de metabolito en biomasa no cambia significativamente entre las 24h y las 48h (este último tiempo en el cual se empezó a cuantificar metabolito en medio líquido) de acuerdo con la prueba de comparación estadística t-student para medias relacionadas (Anexo 8), donde se encontró que el estadístico muestra una significancia de 0.583, con lo cual se acepta que no hay diferencia significativa entre las medias, con lo que se podría analizar que posiblemente esta sería la cantidad máxima que puede ser almacenada en la biomasa antes de eliminar hacia el medio el metabolito. En cuanto al BbF el 1,2-dihidrodiol con 21.2 ± 3.3 ng fue la mayor cantidad encontrada en medio líquido y 2.4 ± 0.4 ng en biomasa al cabo de 72 h, al mismo tiempo el 9,10-dihidrodiol fue encontrado con 2.4 ± 1.7 ng en medio líquido y 1.1 ± 0.2 ng en biomasa (equivalente estequiométricamente al 0.7% del BbF adicionado inicialmente). El análisis de la prueba t de medias relacionadas para las cantidades totales de metabolito formado muestra una diferencia significativa entre 48h y 96h (sig. 0.047) pero no entre 72h y 96h (sig. 0.348) con lo que se establece que de forma similar al metabolito 1,2-dBbF (Anexo 8), el aumento en el medio líquido se debe a la eliminación del metabolito desde el interior de la microalga. No existen reporte sobre el empleo de la *S. acutus* para la degradación de BbF y BkF, el estudio de García de Llasera *et al.* (2016), en la degradación del BaP la aparición de los metabolitos 4,5- y 7,8- a las 0.25h y llegando al máximo al cabo de 15 y 72h respectivamente, mientras para el 9,10-dBaP se observó su aparición a las 4h, les permitieron establecer que la degradación es más lenta que en la *S. capricornutum* y se asocia con una menor velocidad en el proceso de adsorción.

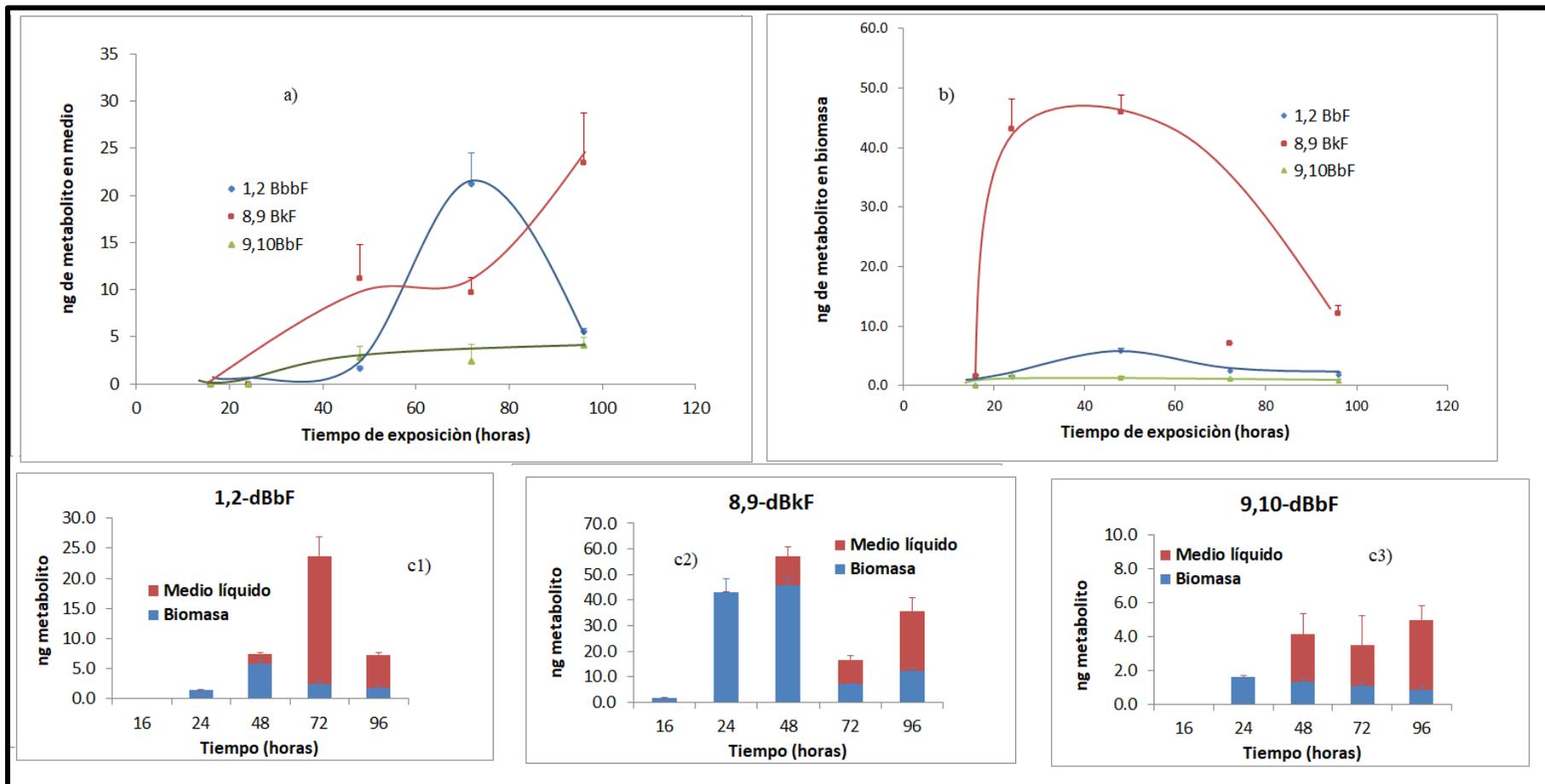


Figura 34. Cantidades recuperadas de metabolitos de BbF y BkF con respecto al tiempo en exposición con *S. acutus* a) Medio líquido; b) Biomasa. Cantidad total de c1)1,2-dBbF, c2)8,9-dBkF, c3)9,10-dBbF.

Las figuras 35 y 36 muestran los cromatogramas obtenidos del proceso de exposición de la mezcla BbF y BkF de concentración de 266 $\mu\text{g/L}$ la especie *Scenedesmus acutus* a diferentes tiempos y recuperados del medio líquido y biomasa respectivamente para diferentes tiempos en medio líquido y biomasa.

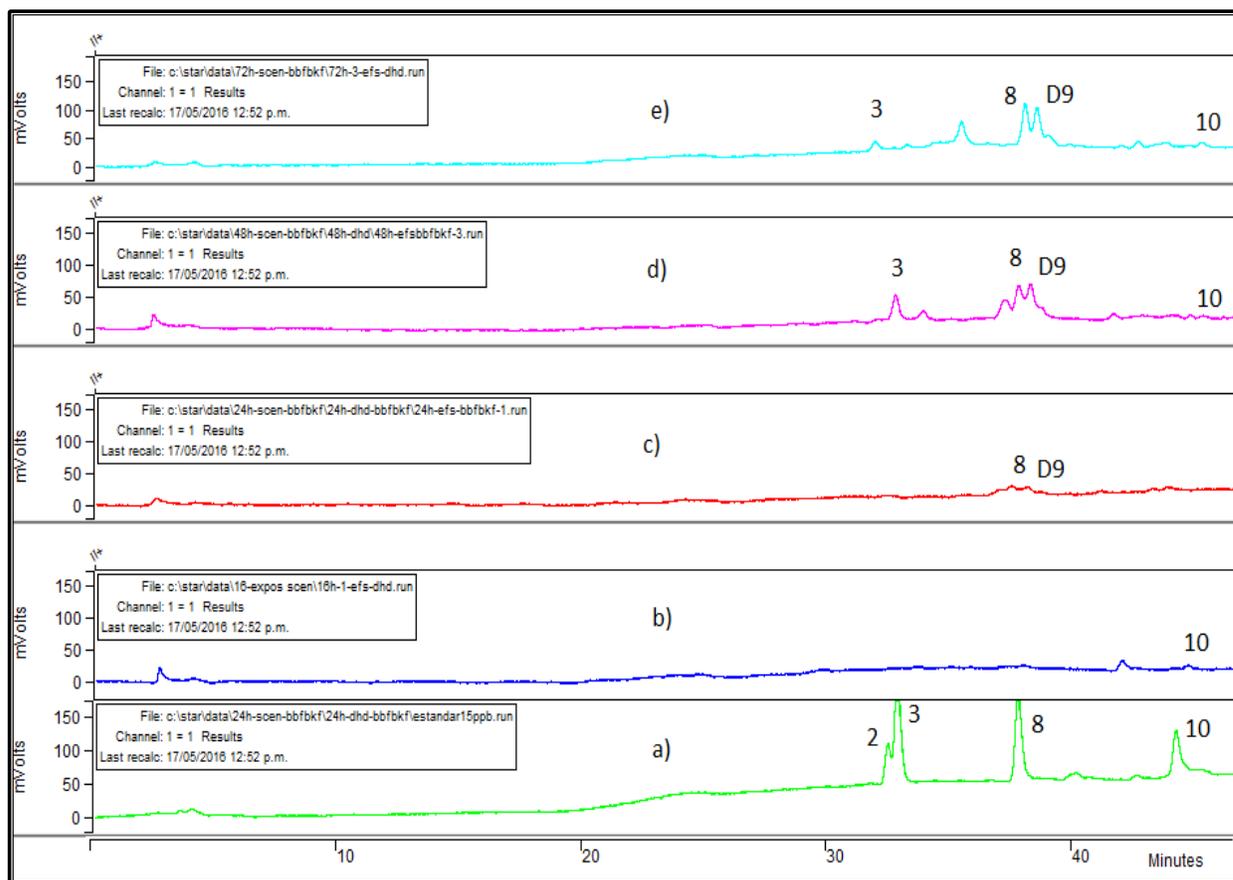


Figura 35. Cromatograma de extracción del medio líquido para determinación de dihidrodioles de la exposición de la mezcla de BbF y BkF con *S. acutus* a) Estándar de 15 $\mu\text{g/L}$ (λ ext. 270 nm and λ em. 428 nm) de mezcla de dihidrodioles 2). 11,12-dBbF, 3)1,2-dBbF; 8)8,9-dBkF y 10) 9,10-dBbF b) 16h c)24h d)48h y e)72h de exposición.

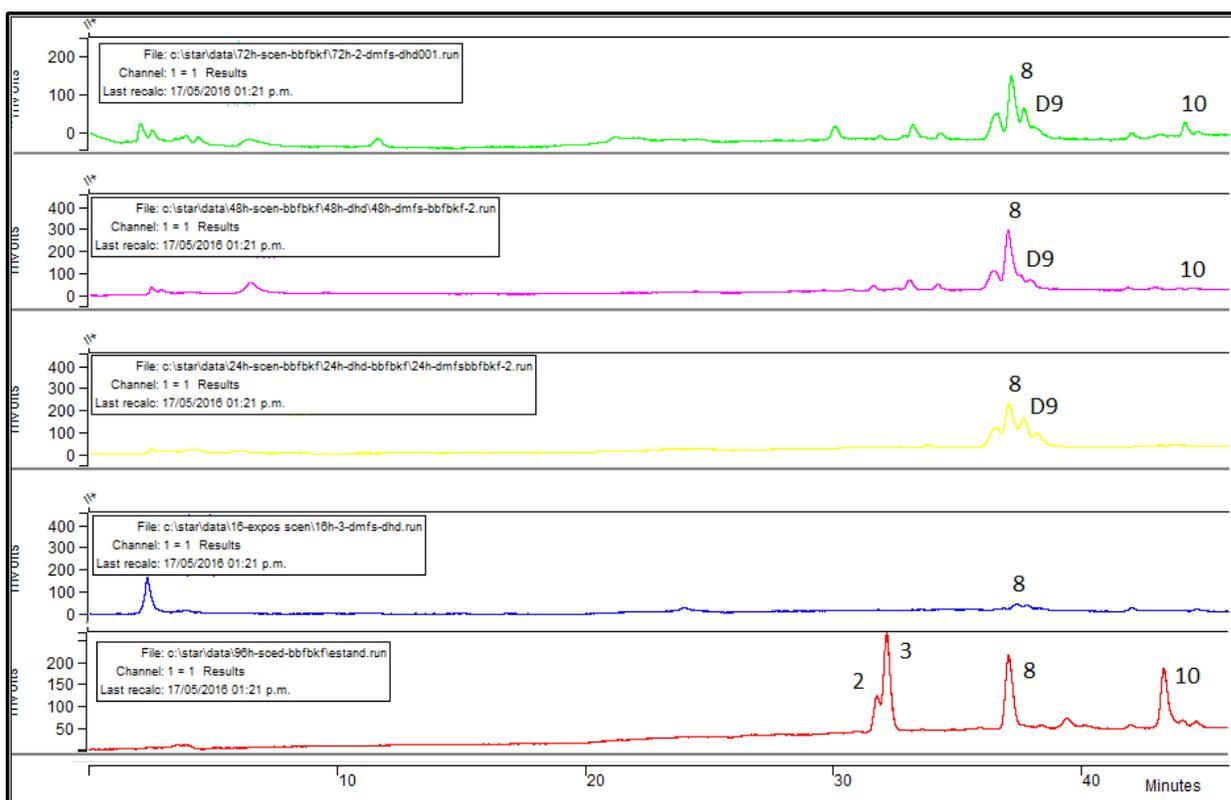


Figura 36. Cromatograma de extracción de la biomasa para determinación de dihidrodioles de la exposición de la mezcla de BbF y BkF con *S. acutus* a) estándar de 15 $\mu\text{g/L}$ (λ ext. 270 nm and λ em. 428 nm) de mezcla de dihidrodioles 2). 11,12-dBbF, 3)1,2-dBbF, 8)8,9-dBkF y 10) 9,10-dBbF b)16h c)24h d)48h e)72h.

6.5.4. Comparación de la degradación de la mezcla de BbF y BkF con *Scenedesmus acutus* y *Selenastrum capricornutum*

En la comparación de los resultados obtenidos (figura 37) para la exposición de la mezcla de BbF y BkF a las dos especies estudiadas, la *Scenedesmus acutus* y la *Selenastrum capricornutum*, de manera general se observa una mayor velocidad en el proceso de biodegradación de la *S. capricornutum* puesto que la formación de metabolitos fue más rápida empleando esta especie.

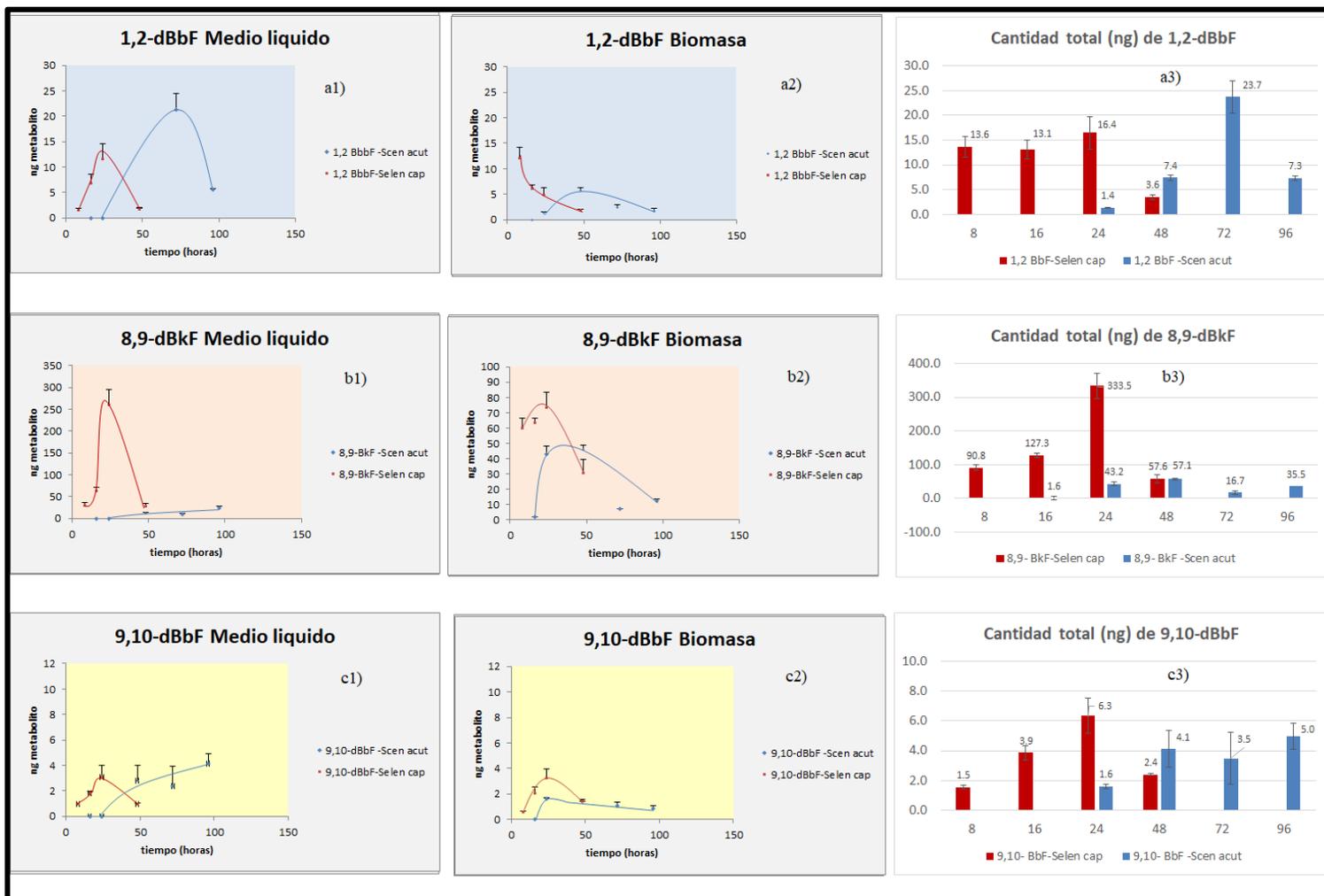


Figura 37. Comparación de las cantidades obtenidas para los 3 metabolitos en medio líquido (a1, b1 y c1) y biomasa (a2, b2 y c2) y las cantidades totales de metabolito (a3, b3, c3) en las exposiciones con *S. capricornutum* (rojo) *S. acutus* (azul).

El análisis de las cantidades de metabolito encontrado en el medio líquido (figura 37b1) muestra que para el formado a partir de la degradación del BkF (8,9-dBkF) es mayor en la *Selenastrum capricornutum* con 260.0 ± 35.9 ng (tabla 22) al cabo de 24h de exposición, mientras en la *Scenedemus acutus* fue de 23.4 ± 5.3 ng (tabla 23) a las 96h de exposición, mientras en la biomasa (figura 37b2) a los mismos tiempos se encontraron 73.4 ± 10.2 ng y 12.1 ± 1.4 , respectivamente, la cantidad total de metabolito producido por la microalga *S capricornutum* (figura 37b3) es aproximadamente 9.5 veces mayor que en la *S. actus*, indicando su mayor eficiencia en la degradación del BkF.

Para el caso de los metabolitos generados a partir de la degradación del BbF; 1,2-dBbF (figura 37 a1, a2 y a3) y 9,10-dBbF (figura 37c1, c2 y c3) se encontró que a las 24h de exposición, las cantidades en *S. capricornutum* fueron en medio líquido, 11.6 ± 2.9 ng y 3.1 ± 0.92 , mientras para la biomasa 4.8 ± 1.5 y 3.4 ± 0.07 ng, mientras en la *S. acutus* después de 72h de exposición se encontraron 21.2 ± 3.3 ng y 2.4 ± 1.7 ng en medio líquido, mientras en biomasa fue 2.4 ± 0.4 ng y 1.1 ± 0.2 ng. El primer análisis está relacionado con la cantidad de metabolito 1,2-dBbF en medio líquido, hay una mayor cantidad en el medio líquido para la *S. acutus*, pero la cantidad del metabolito en la biomasa es menor comparada con la de la *S. capricornutum*. Al realizar la t de medias relacionadas para la cantidad total de metabolito formada (ng en medio líquido y biomasa) muestra una significancia para el estadístico de 0.206, con lo cual se establece que no hay diferencia significativa en la cantidad obtenida del metabolito en la exposición a las dos microalgas (Anexo 8).

Lo anterior permite establecer que el aumento de la cantidad en el medio líquido del 1,2-dBbF en la *S. acutus* se debe a la eliminación por parte de la *S. acutus* del metabolito hacia el medio líquido. Para el caso del 9,10-dBbF, la situación es similar en el medio líquido y nuevamente el estadístico t para medias relacionadas de 0.333 (Anexo 8) muestra que no hay diferencia significativa en la cantidad total de metabolito formado por las dos microalgas, confirmando una rápida eliminación del metabolito desde el interior de la microalga al medio líquido. De acuerdo con lo anterior la diferencia entre las dos especies radica en la mayor lentitud en el proceso de degradación del BbF y BkF en la *S. acutus* y la mayor cantidad en el medio líquido de los metabolitos del BbF sin una

diferencia significativa en la cantidad total de metabolito formada por las dos microalgas se debe a una mayor eliminación del metabolito desde el interior de la *S. acutus*, lo que pudiera ser un indicador de una menor capacidad de retención de metabolitos con respecto a la *S. capricornutum*. La cantidad total de metabolito encontrado en las microalgas muestra otra diferencia entre ellas, 357 ± 45.8 ng en la *S. capricornutum* y 85 ± 13.9 ng de la *S. acutus* indicando que su eficiencia en la formación de estos metabolitos es más baja para la *S. acutus*.

La figura 38 muestra la comparación entre los cromatogramas obtenidos para la exposición de la mezcla de BbF y BkF a 48h de exposición para las dos microalgas de trabajo. Un aspecto importante a destacar en esta comparación, es la generación de un compuesto desconocido identificado con D9 en la exposición del BbF en la *S. capricornutum*, y la *S. acutus*, pero en esta última adicional hay la aparición de otro compuesto desconocido identificado como D8, donde incluso visualmente se logra diferenciar la cantidad de este último encontrada en la biomasa en ambas especies. Lamentablemente los resultados obtenidos por CLAR-EM no permitieron dar una identificación preliminar de estos compuestos.

6.6. Análisis por CLAR-EM

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), han sido estudiados y analizados por espectrometría de masas, Pyle *et al.*, (1997), emplearon un analizador de trampa iónica con triple cuadrupolo para estudiar 19 HAPs. Se reportaron los de interés en este trabajo, con relaciones m/z características para cada HAP y con la intensidad del fragmento entre paréntesis, así: para el BaA m/z 228(100), 226(62.3) y 202(11.8), para el BaP 259(100), 226(28.9), 252(21.6), y 248(12.6), el BbF 250(100), 226(20.2), 249(19.8), 252(9) y el BkF 250(100), 252(46.2), 226(18.4), 248(8.6). Se aprecia que los fragmentos de mayor intensidad corresponden al ión molecular $[M^+]$ para el BaA y BaP, mientras el $[M-2]^+$ es el ión más intenso para el BbF y BkF, el cual de acuerdo con los autores se produce por excitaciones no-resonantes. Otro estudio reportó, al realizar el seguimiento de la ionización que la relación m/z medida en un sistema de triple cuadrupolo para estos HAPs

(BbF y BkF) fue $[M-4]^+$ [Gosseti *et al.*, 2011], corroborado por Concha-Graña *et al.*, (2015), empleando un sistema de vaporización por temperatura programada y CG-EM/EM reportaron el mismo ión de m/z $[M-4]^+$ para los cuatro HAPs como ión producto.

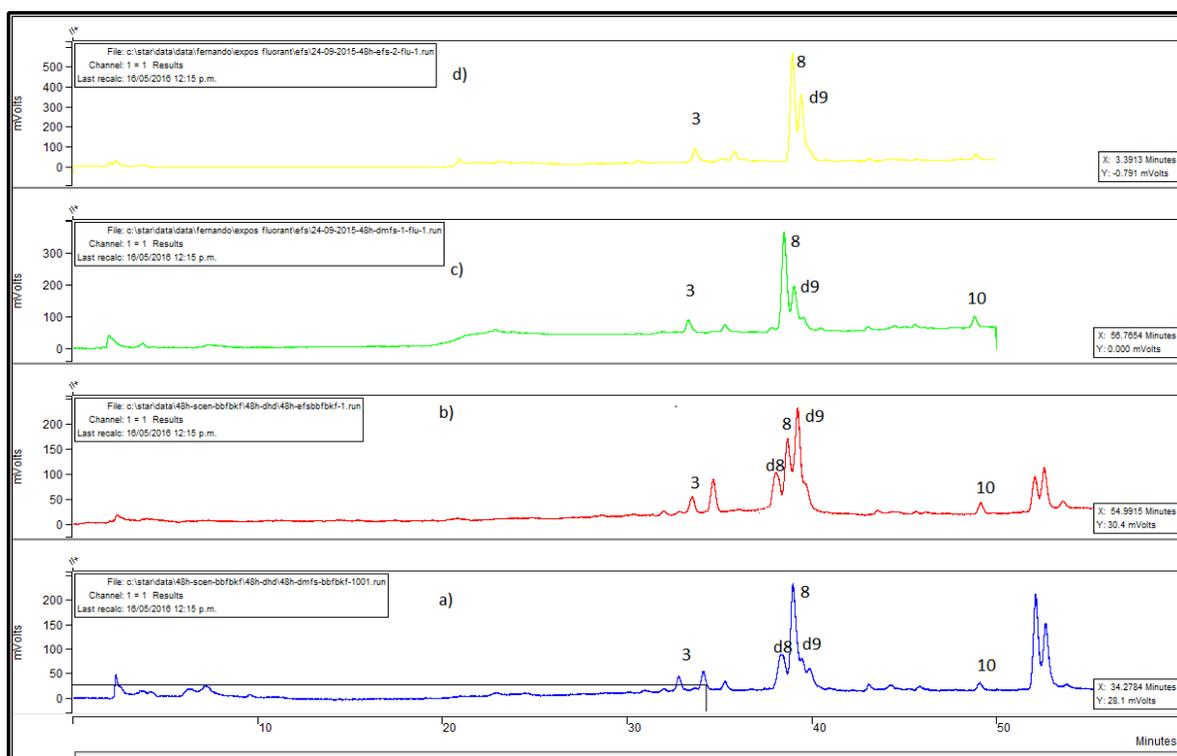


Figura 38. Cromatograma de extractos obtenidos a 48h de exposición para a) biomasa *Scenedesmus* b) medio líquido *Scenedesmus* c) biomasa *Selenastrum* y d) medio líquido *Selenastrum*. 3) 1,2-dBbF, 8) 8,9-dBkF y 10) 9,10-dBbF.

Los reportes de análisis por espectrometría de masas de metabolitos producidos en la degradación de HAPs por microalgas son relativamente escasos, por lo que el proceso metabólico de degradación de estos compuestos aún no es claro. En el presente trabajo, el análisis por espectrometría de masas presentó dificultades debido a que la concentración empleada en los procesos de exposición y la concentración de metabolitos formados fue baja y aumentó la presencia de interferentes en el equipo. A continuación,

se resumen los resultados obtenidos del análisis de los extractos que contienen los metabolitos, se puede ver en el Anexo 9 el complemento del análisis.

Inicialmente, se realizó el estudio empleando el programa Mass Spec Calculator Pro versión libre, diseñado por Scientific Instrument Services, Inc. (Ringoes, NJ 08551-1054), en el que se predicen los fragmentos esperados para los diferentes metabolitos, en la tabla 24 se presentan los resultados del análisis.

Tabla 24. Posibles fragmentos calculados teóricamente por ionización negativa para el sistema electrospray.

Relación m/z para Dihidrodióles del BaP

Pérdida	[M-H] ⁻	[M+H ₂ O] ⁻	[M+HCOO] ⁻
	285	303	331
M-18	267	285	313
M-26	259	277	305
M-43	242	260	288
M-30	255	273	301
M-39	246	264	292

Relación m/z para Dihidrodióles del BaA

Pérdida	[M-H] ⁻	[M+H ₂ O] ⁻	[M+HCOO] ⁻
	261	279	308
M-18	243	261	289
M-26	235	253	281
M-43	218	236	264
M-79	182	200	228
M-127	134	152	180

Relación m/z para Dihidrodióles del BbF y BkF

Las primeras pérdidas de masa serían las equivalentes a los metabolitos del BaP junto con las 3 siguientes

Pérdida	[M-H] ⁻	[M+H ₂ O] ⁻	[M+HCOO] ⁻
M-76	209	227	255
M-52	233	251	279
M-80	205	265	251

6.6.1. Dihidrodiolos del BaP

En el análisis de estándares de dihidrodiolos de BaP, se encontraron algunos picos correspondientes a interferentes, contaminaciones ó posibles compuestos de degradación, no fue claro de dónde provenían esos componentes, en la figura 39, se reúne las TIC de los estándares de metabolitos del BaP analizados. Tomando el pico más intenso genera el fragmento 255 corresponde al ión $[M-OHCH]^-$ que fue común para los tres metabolitos. Otro de los picos corresponde a un fragmento 265 que de acuerdo con la determinación teórica corresponde a la pérdida de 80 unidades de un aducto $[M+H_2O]^-$.

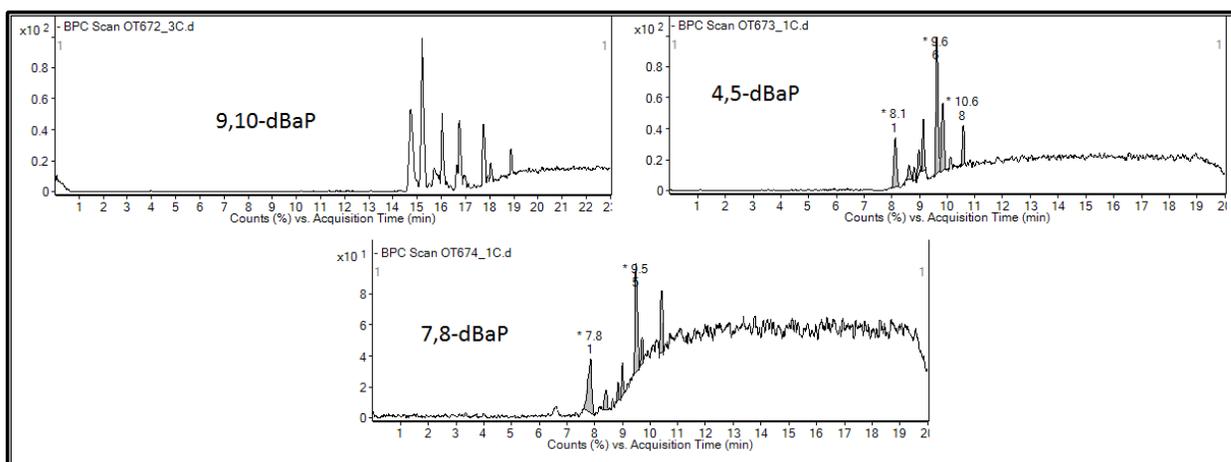


Figura 39. Corriente iónica total para los metabolitos dihidrodiolos del BaP obtenidos por CLAR-EM/ESI.

En el caso de los metabolitos hidroxilados presentaron un fragmento de relación m/z 267, correspondiente a $[M-H]^-$ común a los 3 compuestos hidroxilados, las TIC para estos compuestos se observa en la figura 40.

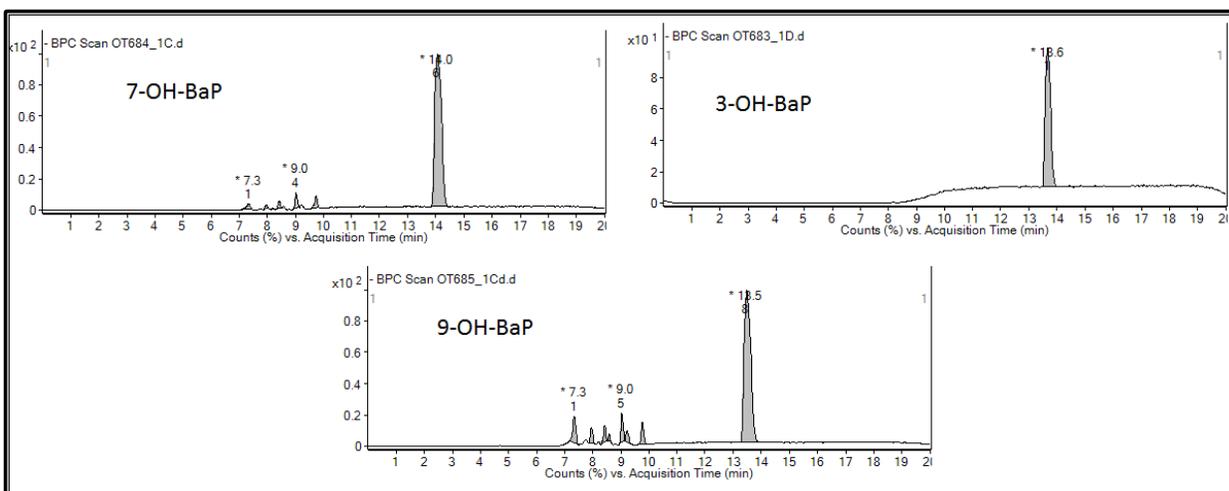


Figura 40. Corriente iónica total para los metabolitos hidroxilados del BaP BaP obtenidos por CLAR-EM/ESI.

6.6.2. Dihidrodiolos del BaA

Para todos los metabolitos del BaA, se observaron nuevamente varios picos desconocidos (figura 41), pero el fragmento común corresponde a la masa de 261 probablemente $[M-H]^-$. Otro fragmento que se repite es el 243 correspondiente al $[M-18]^-$ y otro fragmento es el 233 pero no se logró establecer a que ión correspondería específicamente.

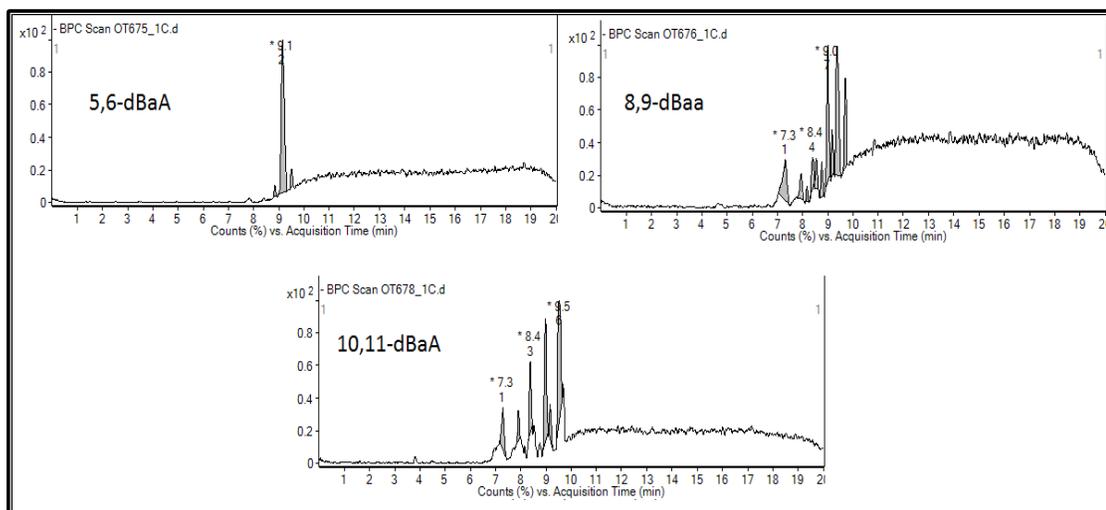


Figura 41. Corriente iónica total para los metabolitos dihidrodiolos del BaA obtenidos por CLAR-EM/ESI.

6.6.3. Dihidrodiolos del BbF y BkF

Para los metabolitos 1,2 y 11,12 del BbF el fragmento común corresponde a la masa de 267 que es el ión molecular perdiendo un hidrógeno y 18 unidades por una molécula de agua $[M-H_2O]^-$. Para el 9,10-dBbF y 8,9-dBkF se observan dos fragmentos el primero de masa 281 que corresponde a $[M-H]^-$ y el de masa 255 que sería el ión molecular con pérdida del protón y posteriormente del $-OHCH$ $[M-OHCH]^-$, en la figura 42 se presentan las corrientes iónicas totales de cada compuesto.

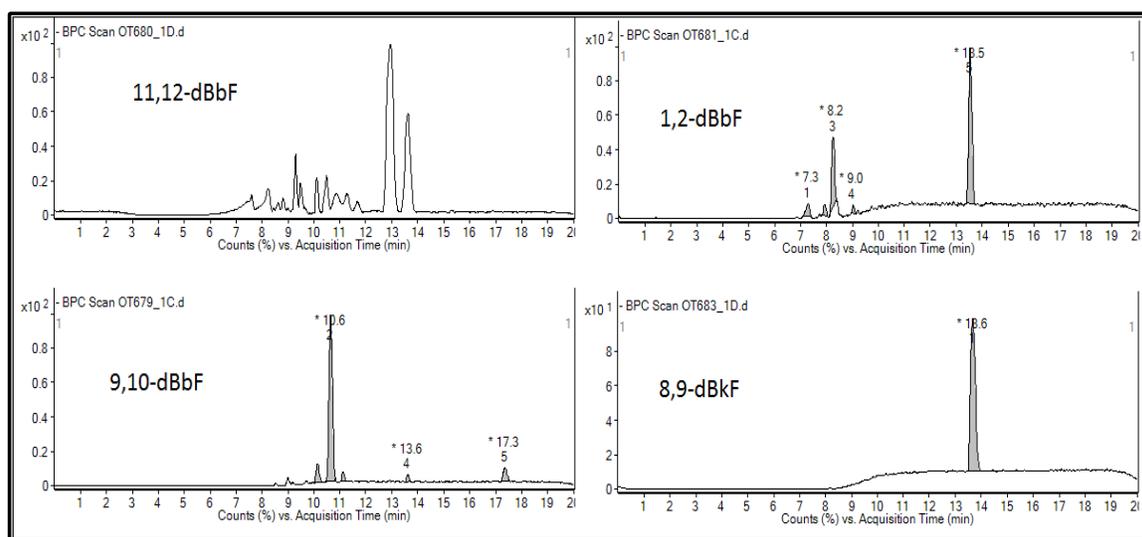


Figura 42. Corriente iónica total para los metabolitos dihidrodiolos del BbF y BkF por CLAR-EM/ESI.

6.6.4. Análisis de muestras

Para el análisis de compuestos de degradación después de la generación de los dihidrodiolos, se tendrá en cuenta algunos reportes de literatura basados en la acción de las di-oxigenasas, observadas en bacterias y quienes como se mencionó podrían estar asociadas también a la degradación por microalgas. Seo *et al.*, (2009) en su revisión establecen los posibles productos de degradación para el BaP, los cuales se presentan en la figura 43 y a los que se les reporta la relación m/z para la ionización negativa por el sistema ESI como se realizó para el presente trabajo.

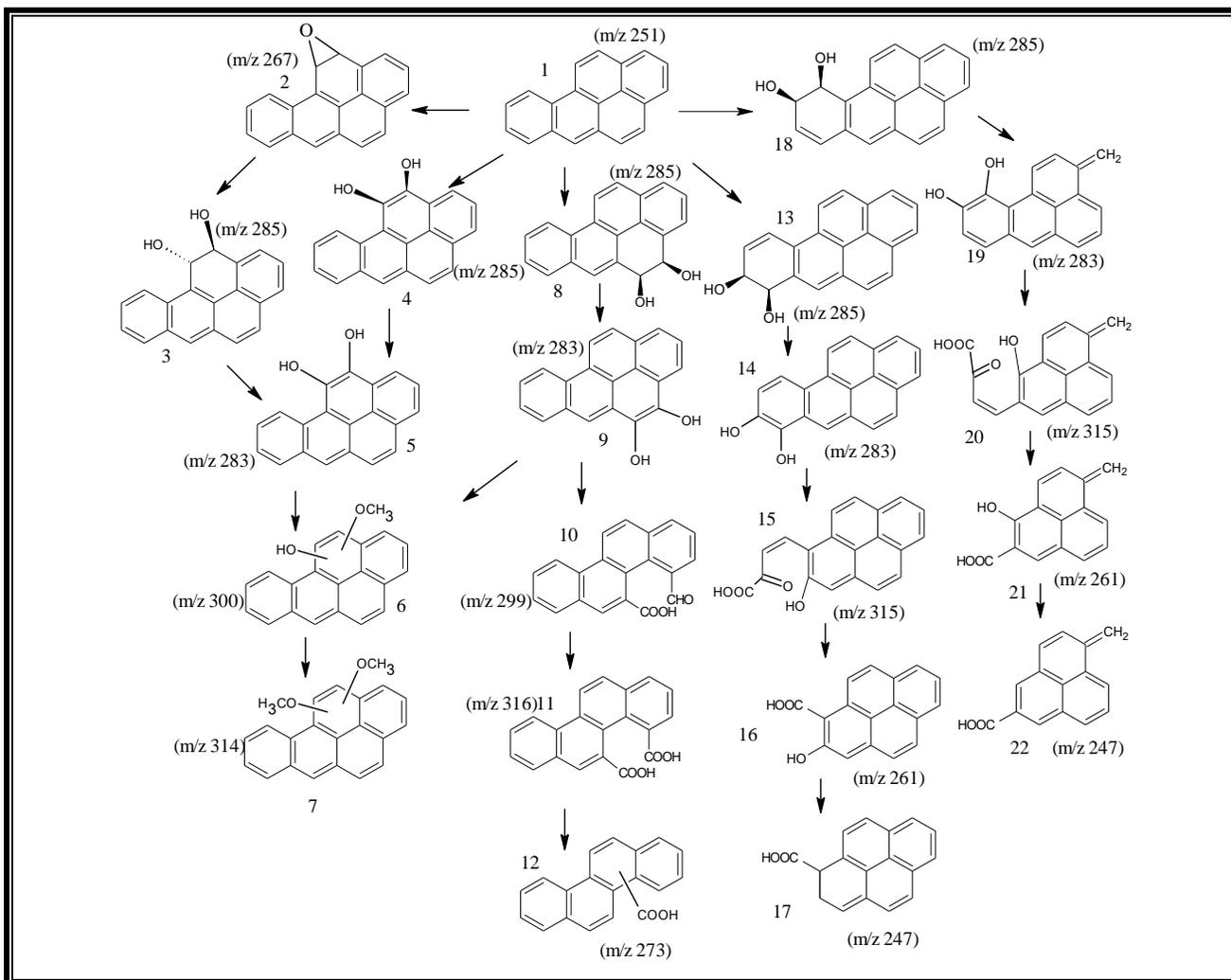


Figura 43. Metabolitos generados en la biodegradación de BaP por enzimas di-oxigenasas (adaptado de Seo *et al.* 2009); 1) BaP; 2) 11,12 epóxido-BaP; 3) *trans*-11,12 dBaP; 4) *cis*-11,12-dBaP; 5) 11,12-dihidroxiBaP; 6) hidroxi-metoxi-BaP; 7) di-metoxi-BaP; 8) *cis*-4,5-dBaP; 9) 4,5-dihidroxiBaP; 10) ácido 4-formilcriseno-5-carboxílico; 11) ácido 4,5criseno-dicarboxílico; 12) ácido 4- ó 5-criseno-carboxílico; 13) *cis*-7,8-dBaP; 14) 7,8-dihidroxiBaP; 15) ácido *cis*-4-(7-hidroxipireno-8-il)-2-oxobut-3-enoico; 16) ácido pireno-7-hidroxi-8-carboxílico; 17) ácido 7,8-dihidro-pireno-8-carboxílico; 18) *cis*-9,10-dBaP; 19) 9,10-dihidroxi-BaP; 20) ácido *cis*-4-(8-hidroxipireno-7-il)-2-oxobut-3-enoico; 21) ácido pireno-8-hidroxi-7-carboxílico; 22) ácido 7,8-dihidro-pireno-7-carboxílico;

Para el BaA, se reportan en literatura los tres metabolitos estudiados (5,6- 8,9- y 10,11-) en el presente trabajo como producto de la acción de enzimas di-oxigenasas en bacterias

[Schneider J., *et al.*, 1996], Kunihiro M., *et al.*, (2013) reportaron que en la degradación con bacterias del B(a)A pudieron identificar algunos metabolitos como:

Ácido (2-)hidroxi-2-(1-)antranoico ó Ácido 2-(3-)hidroxi-3(2-) fenantroico (m/z 237)

Ácido 2-hidroxi-3-naftoico ó 1-hidroxi-2-naftoico (m/z=187)

Ácido 1-(2-)[3-hidroxi-3-oxo-prop-1-enil]antraceno-2-(1-) carboxílico y/o ácido 2-(3-) [3-hidroxi-3-oxo-prop-1-enil]fenantreno-3-(2-)-carboxílico (m/z 291)

Ácido 1,6-Dihidroxinaftaleno-2,7-dicarboxílico (m/z 247).

Moody *et al.*, (2003) establecieron una posible ruta de degradación del BaA y la formación de diferentes metabolitos producto de ésta, establecieron la formación de dihidrodioles (2) 5,6-, (7) 10,11- estudiados en el presente trabajo, además, reportan la formación del 1,2-dBaA (14) y de la 7,12-diona (11) y se puede notar la ausencia del 8,9-dBaA, se ratifica la ausencia como en los demás reportes del 3,4-dBaA, como se muestra en la figura 44.

La exposición de *S. capricornutum* a la mezcla de HAPs resultó en la formación de siete picos desconocidos distribuidos entre el medio líquido y la biomasa. Las muestras de 24 y 48h de exposición, tanto del medio líquido y la biomasa se analizaron mediante espectrometría de masas. La corriente iónica total y los fragmentogramas del medio líquido de la muestra de exposición de la mezcla de BaA y BaP y BbF y BkF con la microalga *S. capricornutum* a 24h se presentan en la figura 45. La señal (4) muestra un fragmento de masa de 233, característico de los metabolitos de BaA, al igual que la señal (10). Además, de acuerdo con lo observado en la acción de las di-oxigenasas, los fragmentos con m/z 100 son característicos de los metabolitos del BaA de acuerdo con Kunihiro, ó fragmentación de la diona (11) según reporta Moody *et al.* 2003. La señal (6) tiene un fragmento base de m/z 311 y uno de m/z 227 este último posiblemente debido a la pérdida de C₃O₃H₄ m/z 88 en 15 ó 20 en la figura 43, provocada por reordenamiento de la estructura, indicando que puede tratarse de un metabolito ácido del BaP. La señal (7) y (9) su m/z 325 no es identificable en los metabolitos de uno u otro HAP, pero la m/z 137 es característica para el ácido salicílico, estructura aromática ácida, indicando que puede tratarse de un fragmento de un metabolito ácido de cualquiera de los HAPs.

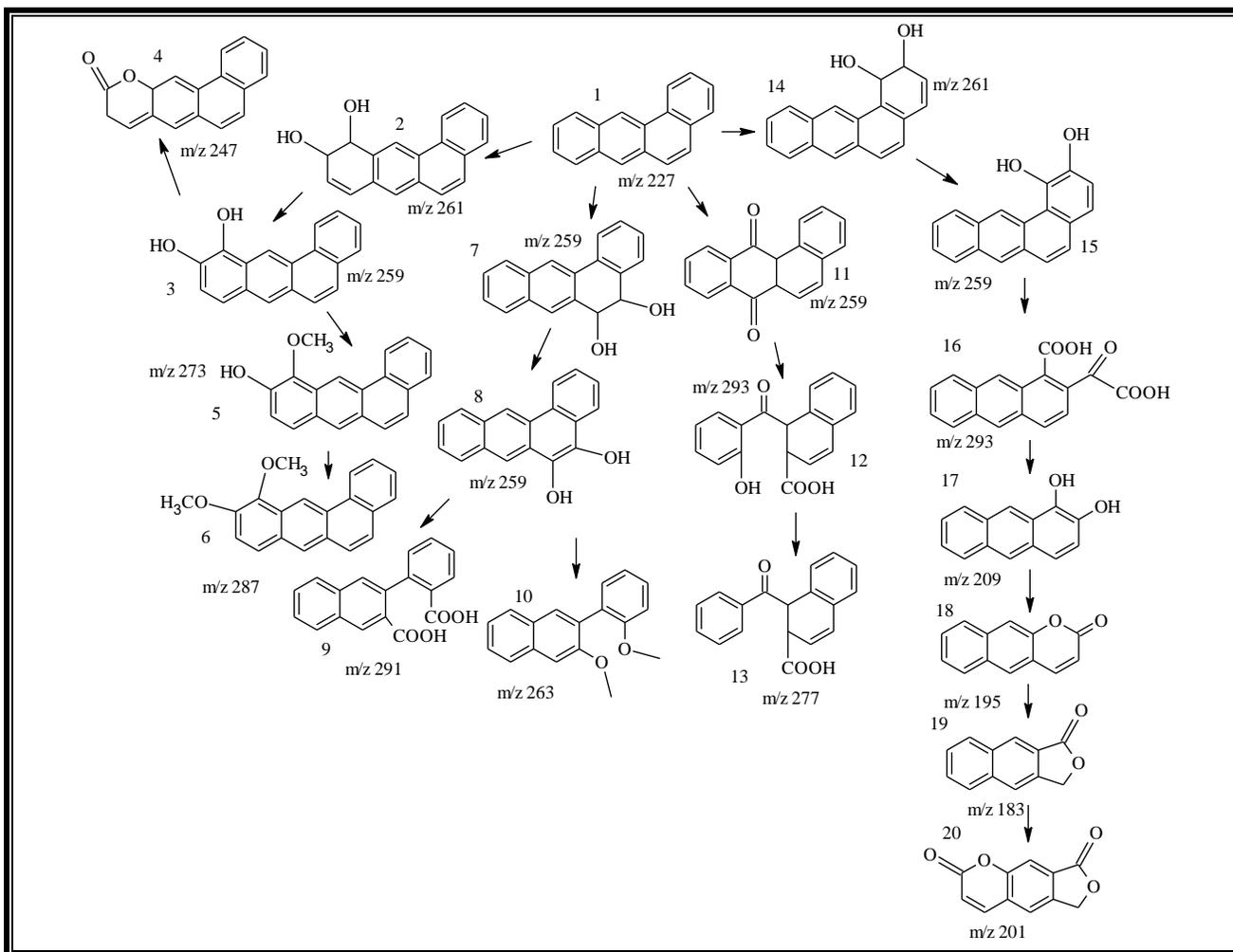


Figura 44. Metabolitos generados en la biodegradación de BaA por enzimas di-oxigenasas (adaptado de Moody *et al.* 2003); 1) BaA; 2) *cis*-10,11-dBaA; 3) 10,11-dihidroxi-BaA; 4) nafto[2,1-g]cromen-10-ona; 5) 10-hidroxi-11-metoxiBaA; 6) 10,11-dimetoxi-BaA; 7) *cis*-5,6-dBaA; 8) 5,6-dihidroxi-BaA; 9) ácido 3-(2-carboxifenil)-2-naftoico; 10) 5,6-dimetoxi-BaA; 11) 7,12-diona-BaA; 12) ácido 1-(2-hidroxibenzoil)-2-naftoico; 13) ácido-1-benzoil-2-naftoico ; 14) *cis*-1,2-dBaA; 15) 1,2-dihidroxi-BaA; 16) ácido 1-[2-carboxicarbonil]antraceno ; 17) 1,2-dihidroxiantraceno; 18) benzo[g]-cromen-2-ona; 19) nafto[2,3-c]furan-1(3H)-ona; 20) 2H-furo[3,4-g]cromene-2,8(6H)-diona.

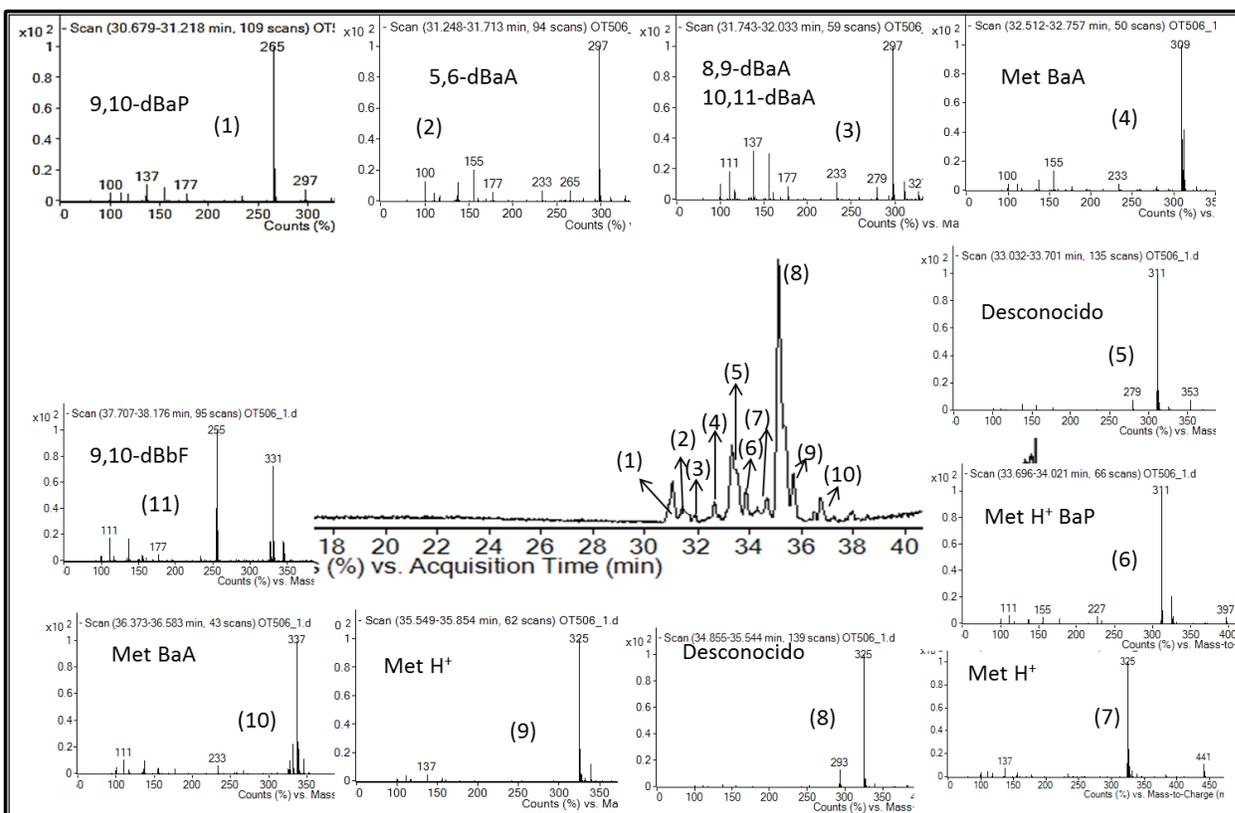


Figura 45. Corriente iónica total y fragmentogramas para la muestra de medio líquido de la exposición de la mezcla de los 4 HAPs con *S. capricornutum* durante 24 h.

Los fragmentos m/z 325 pueden tratarse de aductos formados con el disolvente como se reporta en la tabla 24 ó interferentes en la columna ó en la detección, debido a que el principal inconveniente para el análisis por espectrometría de masas es la concentración de los metabolitos formados ($\mu\text{g/L}$). Una señal m/z 111 (10) corresponde a la fragmentación de la estructura de los dihidroxiantracenos (17 de la figura 44) de acuerdo con Moody *et al.* (2003) y junto con el fragmento m/z 233, confirmarían que se trata de un metabolito del BaA.

En la figura 46 se presentan los resultados obtenidos para la muestra obtenida de la biomasa con la exposición de la mezcla a la *Selenastrum capricornutum* durante 24 h, donde se aprecia una primera señal (1) con un fragmento característico de los dihidrodioles del BaP m/z 265, pero también aparece un fragmento m/z 233 Característicos de los metabolitos del BaA y la m/z 137 del ácido salicílico , indicando un

posible solapamiento de las señales cromatográficas del 9,10-dBaP y un metabolito ácido del BaA.

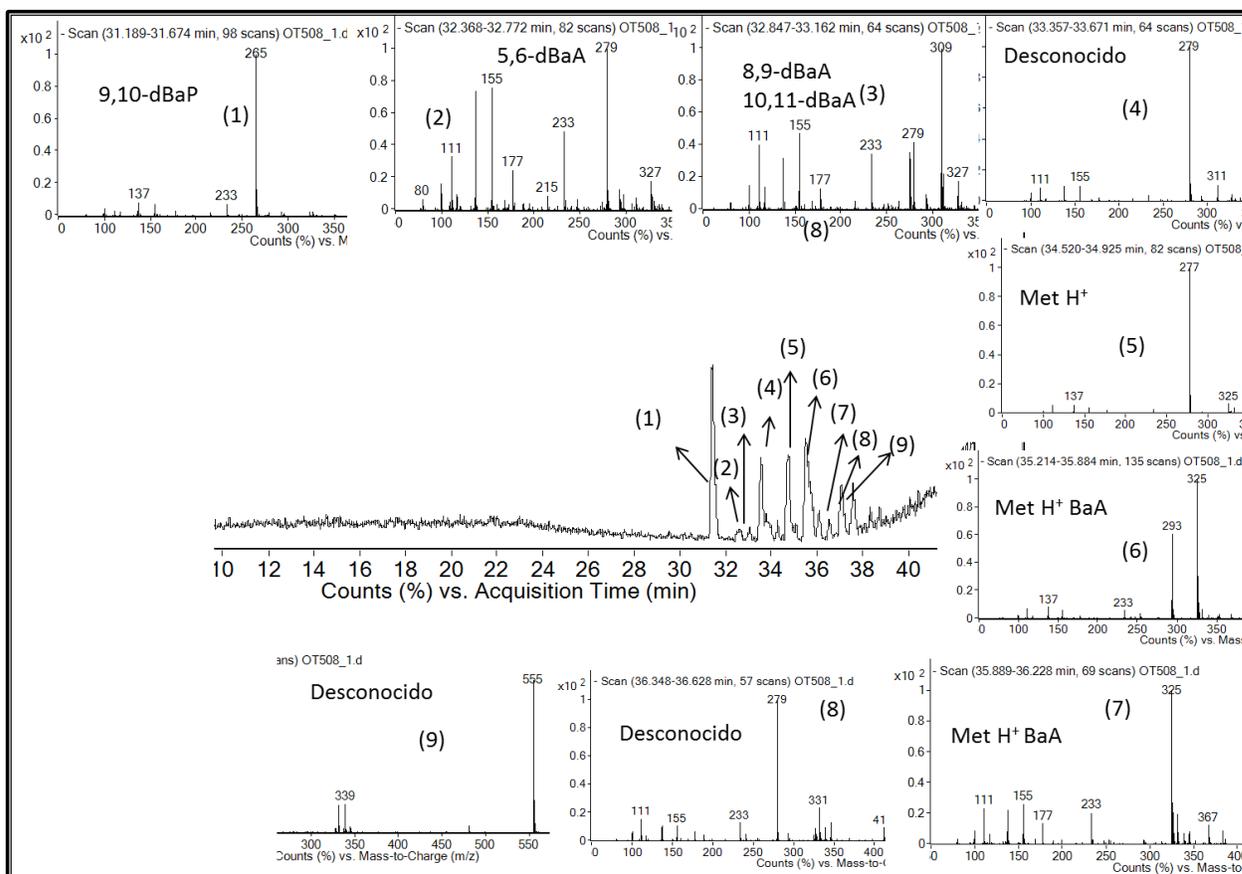


Figura 46. Corriente iónica total y fragmentogramas para la muestra de biomasa de la exposición de la mezcla de los 4 HAPs con *S. capricornutum* durante 24 h.

En (5) se aprecia el fragmento m/z 137 del ácido salicílico indicando un metabolito ácido proveniente de cualquiera de los HAPs. La señal (6) de m/z 293, posiblemente sea el ácido 1-[2-carboxicarbonil]antraceno ó ácido 1-(2-hidroxibenzoil)-2-naftoico (16 y 12 de la figura 44 respectivamente) confirmado con la presencia del fragmento de m/z 137 del ácido salicílico. En (7) como se mencionó anteriormente la presencia de una m/z 111 y la señal de m/z 233 pueden indicar que es un metabolito ácido del BaA.

Finalmente, como se discutió antes de forma general, las bacterias metabolizan los HAPs por enzimas di-oxigenasas que incorporan oxígeno molecular a una molécula de HAP para

dar un *cis*-dihidrodiol (Sutherland *et al.*, 1995). En el presente estudio, dihidrodioles de BaP, BaA, BbF y BkF fueron encontrados y propuestos como metabolitos de HAPs producidos por procesos de metabolización por la microalga *S. capricornutum* y *S. acutus* sugiriendo que las microalgas podría metabolizar los HAPs por enzimas di-oxigenasas, como lo propone Warshawsky *et al.* (1995) y como ha sido reportado por García de Llasera *et al.*, 2016 y Olmos *et al.*, (2012), no se encontraron compuestos mono-hidroxilados por lo que no podría establecerse el empleo de mono-oxigenasas en el proceso metabólico de las microalgas. Juhasz y Naidu, (2000) informaron que el BaP, una HAP de 5 anillos, se metabolizó en *cis*-dihidrodiol de BaP por *S. capricornutum* y propuso que el BaP pudiera ser metabolizado a través de la vía de la di-oxigenasa, los metabolitos identificados para los 4 HAPs estudiados se reportan en la figura 45 y 46 y en el Anexo 10 se resume los análisis presentados sobre la identificación de los posibles fragmentos producto de la degradación de los HAPs.

Son pocos los estudios que informan de la interacción y del efecto sinérgico que puede haber entre diferentes HAPs durante su metabolismo, por ejemplo, Bezalel *et al.*, (1996) reportaron el posible metabolismo del dibenzotiofeno, fluoreno, antraceno y pireno, en una mezcla por un hongo *Pleurotus ostreatus*, pero no las interacciones ó relación con el tiempo empleado en la degradación. Zhong *et al.*, (2006), mostraron que cuando el pireno fue degradado solo por *Mycobacterium sp.* el 33% se degradó con la formación de 7 metabolitos y que al adicionar fenantreno y fluoranteno, la cepa se vio alterada significativamente, en presencia de fluoranteno su degradación llegó al 57% y desaparecieron metabolitos de 4 anillos y acumulación de metabolitos de 3 anillos, mientras con el fenantreno se degradó completamente con poca evidencia de metabolitos.

En el presente estudio, los fragmentogramas obtenidos indican que además de los metabolitos dihidrodioles hay coincidencias con algunos reportes de metabolitos generados posteriormente de la degradación de los primeros por acción de las di-oxigenasas, los que indican que los procesos de degradación continúan después de formado el dihidrodiol, aunque presentan mayor coincidencia con metabolitos del BaA que de los otros HAPs, que podría indicar que son los metabolitos del BaA los primeros en continuar con el proceso de degradación.

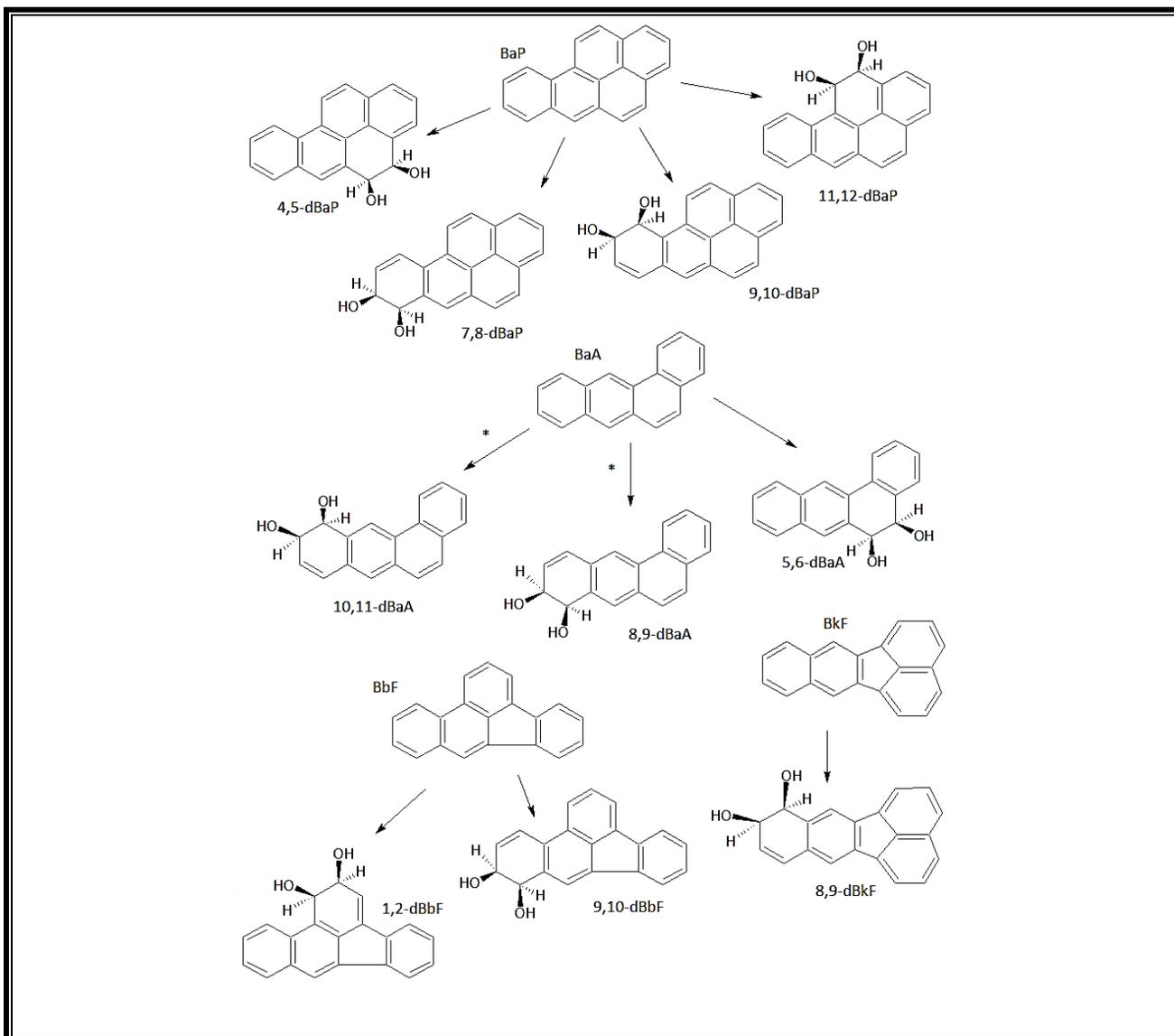


Figura 47. Metabolitos formados por los HAPs estudiados con *S. capricornutum* y *S. acutus* en posición *cis*, el símbolo * indicó la posibilidad de formación de uno o el otro ó la mezcla.

Si el comportamiento es similar al presentado por las bacterias se espera que después de la formación del dihidrodiol continúe la degradación con el rompimiento de la estructura y la generación del respectivo ácido dicarboxílico ó el hidroxiácido respectivo involucrando la pérdida del anillo aromático, generando el respectivo ácido carboxílico del HAP con un anillo menos como lo reporto Gibson, Moody, Kunihiro y Schneider dentro del metabolismo observado en las bacterias y que fue analizado anteriormente. Hasta el momento si se

puede confirmar la formación de metabolitos tipo dihidrodiol, pero es necesario nuevos estudios para confirmar los otros metabolitos generados por la degradación de estos compuestos principales como se aprecia en la figura 47.

7. CONCLUSIONES

Se evaluó el crecimiento de la microalga *Selenastrum capricornutum* en condiciones de estrés empleando la concentración de trabajo de BaP y la mezcla de los 4 HAPs (266 µg/L) y se encontró que aunque el tiempo requerido para alcanzar la cantidad necesaria para el estudio (absorbancia 1.0 con 3×10^6 células mL⁻¹) se incrementó en 10 días para BaP y más de 15 días para la mezcla de HAPs, con lo anterior se estableció la capacidad de resistencia de la microalga a las condiciones de experimentación y de la posibilidad tal y como lo reportan algunos autores de la adaptación del microorganismo a las condiciones establecidas. Las metodologías analíticas implementadas, verificadas, validadas y/o revalidadas, permitieron realizar el seguimiento de la biodegradación de una mezcla de cuatro HAPs incluidos por la USEPA como de alto riesgo y de importancia cancerígena. Dicho seguimiento fue realizado en el medio de cultivo y la biomasa y extraídos por técnicas minimizadas como la EFS y DMFS respectivamente, y cuantificando los productos de biodegradación tipo dihidrodiol y los HAPs remanentes. Se encontraron límites de detección óptimos para cuantificar los HAPs remanentes a cada uno de los tiempos de exposición y para realizar el seguimiento de la aparición de metabolitos (0.05-0.3 µg/L para el medio líquido y 0.1 a 0.3 µg/L en la biomasa) que permitieran observar el comportamiento de la microalga en la biodegradación de los HAPs. Una vez se validaron las metodologías, se realizó la exposición de los 4 HAPs a la microalga *S. capricornutum* encontrándose la formación de metabolitos tipo dihidrodiol principalmente y en mayor cantidad los provenientes del BaA y BaP. Dentro de la metodología cromatográfica no se logró la separación completa del 8,9-dBaA y el 10,11-dBaA por lo que se realizó la cuantificación de la mezcla en el medio líquido y en la biomasa. Debido a la aparición de otros componentes y la concentración alta de los metabolitos del BaP y BaA, la formación de los metabolitos del BbF y BkF no se pudo cuantificar, por lo que se decidió realizar la exposición de la mezcla de BbF y BkF, encontrándose la formación principalmente del 8,9-dBkF y por parte del BbF del 1,2 y 9,10-dBbF.

La microalga verde de agua dulce *S. capricornutum* se utilizó en la biodegradación de una mezcla de cuatro HAPs de alto peso molecular y posteriormente se comparó su capacidad de degradación con respecto a la microalga *Scenedesmus acutus* en una mezcla de BkF

y BbF. En la degradación de la mezcla con la *S. capricornutum* se observó la formación de metabolitos tipo dihidrodiol y se encontró que la capacidad de las microalgas para generar éstos, se incrementa en el tiempo con respecto a la aparición en la degradación de un único HAP. Reportes analizados de degradación de un HAP con la especie *S. capricornutum* con concentraciones equivalentes de células por ml^{-1} (3×10^6), concentraciones de HAP para la exposición iguales ($266 \mu\text{g/L}$) y condiciones similares en los experimentos de exposición, mostraron un aumento en el tiempo de aparición de los metabolitos cuando se empleó la mezcla de HAPs que cuando se emplean de forma individual hasta en 18h.

Para realizar la comparación entre las microalgas *S. capricornutum* y *S. acutus* se realizó el mismo procedimiento de exposición, concentración de exposición de la mezcla de $266 \mu\text{g/L}$, número de especies de microalga (3×10^6 células mL^{-1}) y se encontró que para la primera especie la generación de metabolitos procede a un menor tiempo de exposición (6 h) que para la segunda especie (72 h) con lo cual podría considerarse que la capacidad de transporte del contaminante hacia el interior de la microalga es diferente para cada especie. En cuanto a la cantidad total de metabolito formada por las microalgas se encontraron dos características, para el 8,9-dBkF, claramente se observó una mayor cantidad de metabolito formada por la *S. capricornutum* (334 ± 46 ng a 24h de exposición) que por la *S. acutus* (57.1 ± 4.2 ng a 48h de exposición) comportamiento similar a lo reportado en la comparación realizada empleando BaP en otros estudios. En la formación de metabolitos de la degradación del BbF, los resultados mostraron que no hay diferencias significativas entre las cantidades totales de metabolito generado por las microalgas para la degradación del BbF, con lo cual la mayor presencia de los dos metabolitos en el medio líquido indicaría una menor capacidad de retención en la *S. acutus*. Finalmente se logró determinar la posible formación de otros compuestos como productos de metabolización de los HAPs entre los cuales se encuentra de acuerdo con algunos reportes el 10,11-dihidrodiol-BaP, un seguimiento empleando espectrometría de masas permitirá la identificación de éstos y posibles nuevos compuestos. Los productos de la exposición de esta mezcla de HAPs a las dos especies de microalgas estudiadas fueron dihidrodioles, lo que ha sido reportado por varios autores como los compuestos resultantes cuando en

el metabolismo están inmiscuidas las enzimas di-oxigenasas, aunque no se descarta la posible formación de metabolitos mono-hidroxilados por acción de enzimas mono-oxigenasas que en el presente estudio no fueron detectados por el método revalidado en este trabajo. Los resultados de este estudio aportan experiencias que conducen a ayudar a esclarecer el mecanismo metabólico por el cual las microalgas *S. acutus* y *S. capricornutum* degradan contaminantes HAPs, y este podría ser a través de la participación de enzimas di-oxigenasas que permitirá con futuros estudios concluir con la elucidación del mecanismo, que en la actualidad aun es fuente de controversia. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza de forma simultánea, todo este grupo de metabolitos en cultivos de *S. capricornutum*, una microalga con propiedades de eliminación de contaminantes, se observó la formación de siete compuestos desconocidos. La espectrometría de masas mostró que dos de estos compuestos son metabolitos del tipo dihidrodiol, sin embargo, son necesarios más estudios para comprender el proceso de biodegradación completa.

8. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas futuras a considerar relacionada con la presente investigación se puede mencionar:

- Con el fin de establecer el mecanismo por el cual los HAPs son degradados y se generan los metabolitos tipo dihidrodioles, estandarizar métodos cromatográficos con el empleo de columnas quirales que permitan la separación e identificación de la orientación *cis* de la *trans*, así como continuar con la identificación por CLAR-EM de los compuestos desconocidos que fueron generados como resultado del proceso de degradación.
- Realizar estudios de adaptación de las microalgas a concentraciones de HAP estudiadas en esta investigación durante el crecimiento y posteriormente realizar estudios de degradación de medios contaminados con el fin de evaluar la afectación sobre la capacidad biodegradadora de la microalga.
- Continuar con los estudios tendientes a establecer la influencia de otros posibles compuestos que puedan hacer parte de una matriz acuosa normal que se encuentre contaminada con HAPs, como es la presencia de metales, grasas, tensoactivos, detergentes u otros componentes, con el objetivo de evaluar su influencia en la degradación de los HAPs.
- Seguir ampliando los estudios de procesos de degradación con las algas *S capricornutum* y *S acutus* con otros HAPs incluidos en la lista de la USEPA individualmente y en mezcla, realizando el seguimiento de la formación de metabolitos en función del tiempo con el propósito de alcanzar un conocimiento más amplio de la vía metabólica en formación de estos compuestos y la adaptación que las especies hacen a medios contaminados.
- Estudiar procesos más selectivos en la extracción de los metabolitos con el empleo de fases sólidas como polímeros impresos, con el fin de aislar selectivamente los metabolitos tipo dihidrodiole para facilitar la identificación.

9. BIBLIOGRAFÍA

Adáñez-Rubio, I., Viteri, F., Millera, Á., Bilbao, R., and Alzueta, M. U., 2018. S-PAH, oxy-PAH and EPA-PAH formation during ethylene-SO₂ pyrolysis. *Fuel Process. Technol.*, 182, 68–76.

Adhiya, J., Cai, X. H., Sayre, R. T. and Traina, S. J., 2002, Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Colloids Surface A*, 210 (1), 1-11.

Ali, M.Y., and Cole, R.B., 1998, SFE plus C18 lipid cleanup method for selective extraction and GC/MS quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in biological tissues. *Anal. Chem.*, 70, 3242-3248.

Almeida, J.R., Gravato C., and Guilhermino L., 2012, Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: A case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax L.*), *Chemosphere*, 86 (9), 926-937.

Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., and Cerdà, V., Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I), 2016, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 80, 641-654.

Andreolli, M., Lampis, M., Poli, M., Gullner, G., Biró, B., and Vallini, G., 2013, Endophytic *Burkholderia fungorum* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chemosphere*, 92 (6), 688-694.

Atlas, R.M., 1981, Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective, *Microbiol Rev.*, 45 (1), 180-209.

ATSDR, 1995. US Department of Health Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), US Department of Health and Human Service, Public Health Service, Atlanta, GA.

Bandowe, B. A. M., and Nkansah, M. A., 2016, Occurrence, distribution and health risk from polycyclic aromatic compounds (PAHs, oxygenated-PAHs and azaarenes) in street dust from a major West African Metropolis. *Sci. Total Environ.*, 553, 439–449.

Barker S. A., Long A. R., and Short C. R., 1989, Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion, *J. Chromatogr. A*, 475, 353-361.

Barker, S. A., 2000, Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A.*, 885 (1-2), 115-127.

Barker, S. A., 2007, Review Matrix solid phase dispersion (MSPD), *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 70 (2), 151-162.

Barnett, K. L., Harrington, B., Graul, T. W., 2017, Chapter 22 - Validation of liquid chromatographic methods, *Liquid Chromatography (Second Edition)*, Elsevier, 533-552, DOI: 10.1016/B978-0-12-805393-5.00022-1.

Barnsley, E.A., 1975, The bacterial degradation of fluoranthene and benzo[a]pyrene. *Can. J. Microbiol.*, 21, 1004-1008.

Belles, A., Alary, C., Mamindy-Pajany, Y., & Abriak, N.-E., 2016, Relationship between the water-exchangeable fraction of PAH and the organic matter composition of sediments. *Environ. Poll.*, 219, 512–518.

Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P., and Cerniglia, C. E., 1996, Metabolism of Phenanthrene by the White Rot Fungus *Pleurotus Ostreatus*, *Appl. Environ. Microb.*, 62 (7), 2547-2553.

Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., and Cerniglia, C. E., 1997, Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the white rot Fungus *Pleurotus osreatus*, *Appl. Environ. Microb.*, 62 (1), 292-295.

Birilli, W. G., Santos, D., Alvarenga, N., García, A. C. F. S., Romão, L. P. C., and Porto, A. L. M., 2018, Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium sp.* CBMAI 1237, *Mar. Pollut. Bull.*, 129 (2), 525-533.

Birungi, Z. S., and Chirwa, E.M.N., 2015, The adsorption potential and recovery of thallium using green microalgae from eutrophic water sources, *J. Hazard. Mater.*, 299, 67-77.

Biswas, B., Sarkar, B., Rusmin, R., and Naidu, R., 2015, Bioremediation of PAHs and VOCs: Advances in clay mineral–microbial interaction, *Environ. Int.*, 85, 168-181.

Blumer M., 1976, Polycyclic aromatic compounds in nature, *Sci Am.*, 234, 35–45.

Bogan, B.W., Schoenike, B., Lamar, R.T., and Cullen, D., 1996, Manganese peroxidase RNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2381–2386.

Boopathy, R., 2017, Anaerobic Degradation of Petroleum Hydrocarbons in Sediments, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Elsevier, ISBN 978-0444636676, 475-490.

Bortey-Sam, N., Ikenaka, Y., Akoto, O., Nakayama, S. M. M., Asante, K. A., Baidoo, E., Obirikorang, C., Saengtienchai, A., Isoda, N., Nimako, C., Mizukawa, H., Ishizuka, M., 2017, Oxidative stress and respiratory symptoms due to human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Kumasi, Ghana, Environ. Pollut., 228, 311–320.

Bouزيد, I., Maire, J., Brunol, E., Caradec, S., & Fatin-Rouge, N., 2017, Compatibility of surfactants with activated-persulfate for the selective oxidation of PAH in groundwater remediation, J. Environ. Chem. Eng., 5(6), 6098–6106

Bugg, T., Foght, J. M., Pickard, M. A., and Gray, M. R., 2000, Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens LP6a*, Appl. Environ. Microb., 66 (12), 5387-5392.

Brum, D. M., Cassella, R. J., and Pereira Netto, A. D., 2008, Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection, Talanta, 74 (5), 1392-1399.

Bumpus, J.A., 1989, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Environ. Microbiol., 55 (1), 154-158.

Busetti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., and Traverso, P., 2006, Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant, J. Chromatogr. A, 1102 (1-2), 104–115.

Cajthaml, T., Möder, M., Kacer, P., Sasek, V., and Popp, P., 2002, Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection, J. Chromatogr. A, 974 (1-2), 213-222.

Cammack, R., 1992, Iron-Sulfur Clusters in Enzymes: Themes and Variations, Adv. Inorganic Chem., 38, 281-322.

Canet, R., Birnstingl, J. G., Malcolm, D. G., López-Real, J. M., and Beck, A., 2001. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and

combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil, *Bioresource Technol.*, 76 (2), 113-117.

Cardoso, A.S., Feliciano, S.A., Rebelo, M.H., Jose, S.S., and Reis, C., 2008, Optimization and validation of a chromatographic methodology for the quantification of PAHs in drinking water samples WIT, *Trans. Ecol. Envir.*, 110, 271-280.

Carratt, S. A., Hartog, M., Buchholz, B. A., Kuhn, E. A., Collette, N. M., Ding, X., and Van Winkle, L. S., 2019, Naphthalene genotoxicity: DNA adducts in primate and mouse airway explants. *Toxicol. Lett.*, 305, 103–109

CDER (Center for Drug Evaluation and Research), 1994, Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. November, 29p.

Cerniglia, C. E., and Gibson, D.T., 1980, Fungal oxidation of benzo[a]pyrene and (+/--*trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene – evidence for the formation of a benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide, *J. Biol. Chem.*, 255 (11), 5159-5163.

Cerniglia, C. E., David, L., Gibson, T. and Van Baalen, C., 1980, Oxidation of Naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae, *J. Gen. Microbiol.*, 116, 495-500.

Cerniglia, C.E, Dodge R.H., and Gibson D.T., 1980, Studies on the fungal oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Bot. Mar.*, 23 (2),121-124.

Cerniglia, C.E., White G.L., and Heflich R.H., 1985, Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Arch. Microbiol.*, 143 (2), 105-110.

Cerniglia, C.E., and Heitkamp M. A., 1989, Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment en: Varanasi (ed) *Metabolism of polycyclic aromatic hidrocarbons in the acuatic environment*, 41-68, CRC Press, Boca Raton, FL.

Cerniglia, C. E., 1993, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Curr. Opin. Biotech.*, 4 (3), 331-338.

Chan, S. M. N., Luan, T., Wong, M. H., and Tam, N. F. Y., 2006, Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 (7), 1772–1779.

Chang, H.C., Mi H.H., Lin Y.C., Hsieh L.T., and Chao H.R., 2011, Removal of gaseous polycyclic aromatic hydrocarbons from cooking fumes using an atmospheric plasma reactor, *J. Environ. Sci. Heal. A*, 46 (13), 1443-1449.

Chen, B., Huang J., Yuan K., Lin L., Wang X., Yang L., and Luan T., 2016, Direct evidences on bacterial growth pattern regulating pyrene degradation pathway and genotypic dioxygenase expression, *Mar. Pollut. Bull.*, 105 (1), 73-80.

Chen, S., Yin, H., Ye, J., Peng, H., Liu, Z., Dang, Z., and Chang, J., 2014, Influence of co-existed benzo[a]pyrene and copper on the cellular characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* during biodegradation and transformation, *Bioresource Technol.*, 158, 181-187.

Chouler, J., Monti, M., Morgan, W. J., Cameron, P. J., and Di Lorenzo, M., 2019, A photosynthetic toxicity biosensor for water, *Electrochim. Acta*, 309, 392-401.

Cochran R. E., Jeong H, Haddadi S, Fisseha Derseh, R., Gowan, A., Beránek, J., and Kubátová, A., 2016, Identification of products formed during the heterogeneous nitration and ozonation of polycyclic aromatic hydrocarbons., *Atmos Environ* 128, 92–103.

Cofield, N., Banks, M.K., and Schwab A.P., 2007, Evaluation of hydrophobicity in PAH-contaminated soils during phytoremediation, *Environ. Pollut.*, 145 (1), 60-67.

CONAGUA, Comisión Nacional del Agua, 2014, hidrocarburos aromáticos policíclicos, disponible en: http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_quimicos/Hidrocarburos%20AROMÁTICOS%20policiclicos.pdf, http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/descargas/reglamento_calidad_agua.pdf

Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., De Nicola, F., Aboal, J. R., Rey-Asensio, A. I., Giordano, S., Reski, R., López-Mahía, P., and Prada-Rodríguez, D., 2015, Matrix solid phase dispersion method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in moss, *J. Chromatogr. A*, 1406 (7), 19-26.

Couderchet, M., and Vernet, G., 2003, Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae., *Ecotox. Environ. Safe.*, 55 (3), 271-277.

Crist, R. H., Oberholser, K., Shank, N., and Nguyen, M., 1981, Nature of bonding between metallic-ions and algal cell-walls, *Environ. Sci. Technol.*, 15 (10), 1212-1217.

Crouch, M.D., and Barker S. A., 1997, Analysis of toxic wastes in tissues from aquatic species: Applications of matrix solid-phase dispersion, *J. Chromatogr. A*, 774, 287–309.

Cui, C., Ma L., Shi J., Lin K., Luo Q., and Liu Y., 2014, Metabolic pathway for degradation of anthracene by halophilic *Marteella sp.* AD-3, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 89, 67-73.

Da Silva, M., Esposito, E., Moody, J. D., Canhos, V. P., and Cerniglia, C. E., 2004, Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium sp.* *Chemosphere*, 57(8), 943–952.

Das, S., and Dash, H. R., 2014, Microbial Bioremediation. Microbial Biodegradation and Bioremediation, 1-21. Elsevier, ISBN: 978-0-12-800021-2.

Davis, M.W., Glaser, J.A., Evans, J.W., and Lamar, R.T., 1993. Field evaluation of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* to treat creosote-contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2572–2576.

DeBashan, L.E., and Bashan Y., 2010, Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects, *Bioresource Technol.*, 101 (6), 1611-1627.

Delhomme, O., Rieb, E., and Millet, M., 2007, Solid-Phase Extraction and INDICE with Fluorescence Detection for Analysis of PAHs in Rainwater, *Chromatographia*, 65 (3-4), 163-171.

Deng, F., Liao C., Yang C., Guo C., and Dang Z., 2016, Enhanced biodegradation of pyrene by immobilized bacteria on modified biomass materials, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 110, 46-52.

Denis, E.H., Toney J.L., Tarozo R., Scott A. R., Roach L.D., and Huang Y., 2012, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lake sediments record historic fire events: Validation using HPLC-fluorescence detection, *Org. Geochem.*, 45, 7-17.

Dhananjayan, V., 2013, Accumulation pattern and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in liver tissues of seven species of birds from Ahmedabad, India, during 2005-2007, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 20, 3414–3422.

Dias, R.L., Ruberto, L., Hernández, E., Vázquez, S.C., Lo Balbo, A., Del Panno, M.T., and Mac Cormack, W.P., 2012, Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: Evaluation of the “on site” biostimulation strategy using different nutrient sources, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 75, 96-103.

Dissanayake, A., and Bamber S. D., 2010, Monitoring PAH contamination in the field (South west Iberian Peninsula): Biomonitoring using fluorescence spectrophotometry and physiological assessments in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) (*Crustacea: Decapoda*), *Mar. Environ. Res.*, 70 (1), 65-72.

Dos Santos, I. F., Ferreira, S. L. C., Domínguez, C., and Bayona, J.M., 2018, Analytical strategies for determining the sources and ecotoxicological risk of PAHs in river sediment, *Microchem. J.*, 137, 90-97.

Du, Ch. M., Yan, J. H., Li, X. D., Cheron, B. G., You, X. F., Chi, Y., Ni, M. J., and Cen, K. F., 2006, Simultaneous Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Soot Particles from flue Gas by Gliding arc Discharge Treatment, *Plasma Chem. Plasma P.*, 25 (5), 517-525.

Eaton, D. L., Farin, F., Omiecinski, C. J., and Omenn, G. S., 1998, Genetic Susceptibility, en: *Environmental and Occupational Medicine*, ed. WN Rom, 3rd Edition, Chp. 17, Little, Brown & Co., 209-221, ISBN 978-0781762991.

Elena, S. F., and Lenski, R. E., 2003, Microbial genetics: Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation, *Nature Rev. Genet.*, 4 (6), 457-469.

Ellenhorn, M. J., 1997, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. En: *Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning*, Second edition, Baltimore, Williams & Williams, 1420-1447, ISBN 978-0683303872.

Falciglia, P. P., De Guidi, G., Catalfo, A., and Vagliasindi, F. G. A., 2016, Remediation of soils contaminated with PAHs and nitro-PAHs using microwave irradiation. *Chem. Eng. J.*, 296, 162–172.

Farnet, A. M., Gil, G., Ruaudel, F., Chevremont, A. C., and Ferre, E., 2009, Polycyclic aromatic hydrocarbon transformation with laccases of a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter. *Geoderma*, 149(3-4), 267–271.

Fatemi, M.H., Hadjmohammadi M.R., Shakeri P., and Biparva P., 2012, Extraction optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons by alcoholic-assisted dispersive liquid–liquid microextraction and their determination by HPLC, *J. Sep. Sci.* 35, 86–92.

Fawley, M.W., Dean, M.L., Dimmer, S.K., and Fawley, K.P., 2006, Evaluating the morphospecies concept in the *Selenastraceae* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*). *J. Phycol.*, 42, 142-154.

FDA, 2000, Draft Guidance for Industry on Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. August, 32p.

Fewson, C, 1988, Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Trends Biotechnol*, 6(7), 148–153.

Franco, M. E., and Lavado, R., 2019, Applicability of in vitro methods in evaluating the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish: Advances and challenges, *Sci. Total Environ.*, 671, 685–695.

Frense, D.; Muller, A., and Beckmann, D., 1998, Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. *Sensor Actuat. B-Chem.*, 51, 256–260.

Gao, P., da Silva, E., Hou, L., Denslow, N. D., Xiang, P., and Ma, L. Q., 2018, Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective, *Environ. Int.*, 119, 466–477.

Gao, Q.T., and Tam, N.F.Y. 2011, Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress, *Chemosphere* 82, 346–354.

Gao, Y., Zhang Y., Liu J., and Kong H., 2013, Metabolism and subcellular distribution of anthracene in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), *Plant and Soil*, 365 (1), 171–182.

Gaur, N., Narasimhulu, K., and Pydisetty, Y., 2018, Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment, *J. Clean. Prod.*, 198, 1602–1631.

García de Llasera M. P., and García-Cicourel A. R., 2017, On-line SPE chromatography with spectrophotometric diode array detection as a simple and advantageous choice for the selective trace analysis of benzo(a)anthracene degradation products from microalgae, *Talanta*, 165, 584-592.

García de Llasera, M., Olmos-Espejel, J., Díaz-Flores, G., and Montaña-Montiel, A., 2016, Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae *Selenastrum capricornutum* and *Scenedesmus acutus*: a comparative study useful for bioremediation, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23 (4), 3365-3375.

García-Falcón, M. S., Pérez-Lamela M., and Simal-Gándara J., 2004, Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (23), 6897-6903.

Ghasemzadeh-Mohammadi, V., Mohammadi A., Hashemi M., Khaksar R., and Haratian P., 2012, Microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish, *J. Chromatogr. A*, 1237, 30-36.

Gibson, D.T., and Subramanian V., 1984, Microbial degradation of aromatic hydrocarbons in: Gibson D. T., (Ed) *Microbial Degradation of Organic Compounds*, 181-252, Marcel Dekker, New York, ISBN 978-0824771027.

Gibson, D.T., Mahadevan, V., Jerina, DM, Yagi, H. and Yeh, HJC., 1975, Oxidation of the carcinogens benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium, *Science*. 189, 295-297.

Gojkovic, Ž., Garbayo, I., Ariza, J. L. G., Márová, I., and Vílchez, C., 2015, Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae, *Algal Res.*, 7, 106-116.

González, R., García-Balboa, C., Rouco, M., López-Rodas, V., and Costas, E., 2012. Adaptation of microalgae to lindane: A new approach for bioremediation. *Aquat. Toxicol.* 109, 25-32.

Gordon L., and Dobson A. D. W., 2001, Fluoranthene degradation in *Pseudomonas alcaligenes* PA-10, *Biodegradation*, 12 (6), 393-400.

Gosseti F., Chiuminatto U., Mazzuco E., Robotti E., Calabrese G., Gennaro M. C., and Marengo E., 2011, Simultaneous determination of thirteen polycyclic aromatics hydrocarbons and twelve aldehydes in cooked food by an automated on-line solid phase extraction ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chrom. A*, 1218, 6308-6318.

Graupner, A., Instanes, C., Dertinger, S. D., Andersen, J. M., Lindeman, B., Rongved, T. D., Gunnar Brunborg, and Olsen, A.-K., 2014, Single cell gel electrophoresis (SCGE) and Pig-a mutation assay in vivo-tools for genotoxicity testing from a regulatory perspective: A study of benzo[a]pyrene in *Ogg1*^{-/-} mice, *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.*, 772, 34-41.

Greene, L., Elzey, B., Franklin, M., and Fakayode, S. O., 2017, Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and chiral-PAH analogues-methyl- β -cyclodextrin guest-host

inclusion complexes by fluorescence spectrophotometry and multivariate regression analysis, *Spectrochim. Acta A*, 174, 316–325.

Grova, N., Monteau F., Le Bizec B., Feidt C., Andre F, and Rychen G., 2005, Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography-mass spectrometry., *J. Anal. Toxicol.* 29: 175-181.

Guiry, M.D. in Guiry, M.D. and Guiry, G.M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; April 2015.

Haemmerli, S.D., Leisola M.S.A., Sanglard D., and Flechter A., 1986, Oxidation of benzo[a]pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*: veratryl alcohol and stability of ligninase., *J. Biol. Chem.*, 261 (15), 6900-6903.

Hahladakis, J. N., Calmano, W., and Gidaracos, E., 2013, Use and comparison of the non-ionic surfactants Poloxamer 407 and Nonidet P40 with HP- β -CD cyclodextrin, for the enhanced electroremediation of real contaminated sediments from PAHs. *Sep. Purif. Technol.*, 113, 104–113.

Hashemi, B., Zohrabi, P., and Shamsipur, M., 2018, Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. *Talanta*, 187, 337–347.

Haritash, A. K., and Kaushik, C. P., 2009, Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review, *J. Hazard. Mater.*, 169 (1-3), 1-15.

Harrak, R.E., Calull, M., Marce, R. M, and Borrull, F., 1998, Influence of the Organic Solvent in On-Line Solid Phase Extraction for the Determination of PAHs by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection, *J. High Res. Chromatogr.*, 21, 12, 667-670.

He Y., and Lee, H.K. 1998, Trace analysis by combined use of off-line solid-phase extraction, on-column sample focusing and U-shape flow cell in capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr A*, 808, 79–86.

Hegewald, E. H. 1997, Taxonomy and Phylogeny of *Scenedesmus*, *Algae*, 12 (4), 235-246.

Heitkamp, M.A., Franklin W. and Cerniglia C.E., 1988, Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Isolation and Characterization of a Pyrene-Degrading Bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (10), 2549-2555.

Heitkamp, M.A., Freeman J., Miller, D.W., and Cerniglia C.E., 1988, Pyrene Degradation by a *Mycobacterium* sp.: Identification of Ring Oxidation and Ring Fission Products, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (10), 2556-2565.

Hennion M-C., 1999, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 856 (1-2), 3-54.

Hoff, R. B., and Pizzolato, T. M., 2018, Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: a review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *TrAC, Trends Anal. Chem*, 109, 83-96.

Hofrichter, M., Schneibner, K., Schneegab, I., and Fritzche, W. 1998, Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (2), 399-404.

Huang, D., Peng, P., Xu, Y., Deng, Y., and Deng, H., 2009, Distribution and deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation in Guangzhou, South China, *J. Environ. Sci.*, 21 (5), 654-660.

Huang, R-Y., Tian W-J., Liu Q., Yu H-B, Jin X., Zhao Y-G., Zhou Y-H, and Feng G., 2016, Enhanced biodegradation of pyrene and indeno(1,2,3-cd) pyrene using bacteria immobilized in cinder beads in estuarine wetlands, *Mar. Pollut. Bull.*, 102 (1), 128-133.

Huang, W., Yang J., Zhao J., Wang C., Yuan C., and Li S-P., 2010, Quantitative analysis of six polyenes and one polyene in *Oplopanax horridus* and *Oplopanax elatus* by pressurized liquid extraction and on-line SPE-HPLC, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 53 (4), 906-910.

ICH Q2A, 1995, Text on Validation of Analytical Procedures: Terms and Definitions, International Conference on Harmonization. Federal Register (60 FR), 11260, March, 17p.

Idowu O., Semple K. T., Ramadass K., O'Connor W., Hansbro P., Thavamani P., 2019, Beyond the obvious: Environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ. Int.*, 123, 543-557.

Islam, M. N., Jo, Y.-T., Jung, S.-K., and Park, J.-H., 2013, Thermodynamic and kinetic study for subcritical water extraction of PAHs. *J. Ind. Eng. Chem.*, 19(1), 129–136.

Jia, C., Li P., Li X., Tai P., Liu W., and Gong Z., 2011, Degradation of pyrene in soils by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from liquid cultures, *Proc. Biochem.*, 46 (8), 1627-1631.

Jones, M., Singleton, D.R., Carstensen, D.P., Powell, S.N., Swanson, J.S., Pfaender, F.K., and Aitken, M.D., 2008, Effect of incubation conditions on the enrichment of pyrene-degrading bacteria identified by stable-isotope probing in an aged, PAH-contaminated soil. *Microb. Ecol.*, 56, 341-349.

Juhasz, A. L. and Naidu, R., 2000, Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 45 (1-2), 57-88.

Kadri, T., Rouissi, T., Kaur Brar, S., Cledon, M., Sarma, S., and Verma, M., 2017, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review, *J. Environ. Sci.*, 51, 52-74.

Kammann, U., Akcha, F., Budzinski, H., Burgeot, T., Gubbins, M. J., Lang, T., ... Hylland, K., 2017, PAH metabolites in fish bile: From the Seine estuary to Iceland, *Mar. Environ. Res.*, 124, 41–45.

Kanchanamiayoon, W., and Tatrahun, N., *J. Environ.*, 2009, Extraction of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *Sci. Technol.*, 2, 95-99.

Kang, H-J., Lee, S-Y., and Kwon, J.-H., 2016, Physico-chemical properties and toxicity of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Hazard. Mater.*, 312, 200-207.

Kayillo, S., Dennis, G. R., and Shalliker, R A., 2007, An assessment of the retention behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons on reversed phase stationary phases--thermodynamic behaviour on C₁₈ and phenyl-type surfaces, *J. Chromatogr. A*, 1145 (1-2), 133-140.

Ke, L., Luo, L., Wang, P., Luan, T., and Tam, N. F. Y., 2010, Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*, *Bioresource Technol.*, 101 (18), 6950-6961.

Kim, K-H., Jahan, S-A., Kabir E., and Brown, R.J.C., 2013, A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects, *Environ. Int.*, 60, 71-80.

Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R.C., Edmondson, R. D., and Cerniglia, C. E., 2008, Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, *Biodegradation*, 19 (6), 859-881.

Kiyohara, H., Nagao K., and Nomi R., 1976, Degradation of phenanthrene through o-phthalate in an *Aeromonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* 40 (6), 1075-1082.

Komoßa, D., Langebartels, C., and Sandermann., H., 1995, Metabolic processes for organic chemicals in plants. In: Trapp, S., Mc., and Farlane, J.C. (Eds.), *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*, 69-103, ISBN 978-1566700788.

Kong, Q., Zhu, L., and Shen, X., 2010, The toxicity of naphthalene to marine *Chlorella vulgaris* under different nutrient conditions, *J. Hazard. Mat.*, 178, (1-3), 282-286.

Kootstra, P.R., Straub, M. H. C., Stil, G. H., Van der Velde, E. G., Hesselink, W., and Land, C.C.J., 1995, Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples, *J. Chromatogr. A*, 697, (1-2), 123-129.

Krouzek, J., Durdak, V., Hendrych, J., Masin, P., Sobek, J., and Spacek, P., 2018, Pilot scale applications of microwave heating for soil remediation, *Chem. Eng. and Process.*, 130, 53–60.

Kunihiro, M., Ozeki, Y., Nogi, Y., Hamamura, N., and Kanalya, R., 2013, Benz[a]anthracene Biotransformation and Production of Ring Fission Products by *Sphingobium* sp. Strain KK22, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79 (14), 4410-4420

Kuppusamy, S., Thavamani P., Megharaj M., and Naidu R., 2016, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by novel bacterial consortia tolerant to diverse physical settings-Assessments in liquid-and slurry-phase systems, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 108, 149-157.

Kuusimäki, L., Peltonen, Y.; Mutanen, P., Peltonen, K, and Savela, K., 2004, Urinary hydroxyl- metabolites of naphthalene, phenanthrene and pyrene as markers of exposure to diesel exhaust, *Int. Arch. Occ. and Env. Hea.*, 77 1, 23-30.

Kwach, B.O., and Lalah J.O. 2009, High concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons found in water and sediments of car wash and Kisat areas of Winam Gulf, Lake Victoria-Kenya, *Bull Environ Contam Toxicol.*, 83 (5), 727-733.

Kweon, O., Kim, S-J, and Cerniglia, C-E., 2010, Genomic View of Mycobacterial High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Springer, 1165-1178, Berlin, ISBN 978-3-540-77587-4.

Larkin, M. J., Kulakov, L. A., and Allen, C. C. R., 2010, *Rhodococcus* Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Springer, 1839-1852, ISBN 978-3-540-77587-4, Berlin.

Larrivee, M.L, and Poole, CF., 1994, Solvation parameter model for the prediction of breakthrough volumes in solid-phase extraction with particle-loaded membranes, Anal. Chem., 66 (1), 139-146.

Lee, R.E., 2008, Phycology, Fourth edition, Cambridge University Press, New York, ISBN 978-0-521-86408-4.

Lei, A-P., Hu, Z- L., Wong, Y-S., and Tam, N. F-Y., 2007, Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgae species, Bioresource Technol., 98 (2), 273–280.

Lei, A. P., Wong, Y. S., and Tam, N. F. Y., 2003, Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species, Chemosphere, 50 (3), 293-301.

Li, C-H., Wong, Y-S., Wang, H-Y., and Tam, N. F-Y., 2015, Anaerobic biodegradation of PAHs in mangrove sediment with amendment of NaHCO₃, J Environ. Sci., 30, 148-156.

Li, R., Dörfler, U., Schroll, R., and Munch, J. C., 2016, Biodegradation of isoproturon in agricultural soils with contrasting pH by exogenous soil microbial communities. Soil Biol. Biochem., 103, 149–159.

Li, Y., Juhasz, A. L., Ma, L. Q., and Cui, X., 2018, Inhalation bioaccessibility of PAHs in PM_{2.5}: Implications for risk assessment and toxicity prediction, Sci. Total Environ., 650 (1), 56-64.

Li, X., Pan, Y., Hu, S., Cheng, Y., Wang, Y., Wu, K., Zhang, S., y Yang, S., 2018, Diversity of phenanthrene and benz[a]anthracene metabolic pathways in white rot fungus *Pycnoporus sanguineus* 14., Int. Biodeter. Biodegr., 134, 25–30.

Li, Z-Y., Wu, Y-H., Huo, Y-Y., Cheng, H., Wang, C-S., and Xu X-W., 2016, Complete genome sequence of a benzo[a]pyrene-degrading bacterium *Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1.7731T, Mar. Genom., 25, 39-41.

Liao, X., Wu, Z., Li, Y., Cao, H., and Su, C., 2019, Effect of various chemical oxidation reagents on soil indigenous microbial diversity in remediation of soil contaminated by PAHs, Chemosphere, 483-491.

Lika, K., and Papadakis, I. A., 2009, Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae. J. Sea Res., 62 (2-3), 135–146.

Lima, A. T., Ottosen L. M., Heister K., and Loch G. J.P., 2012, Assessing PAH removal from clayey soil by means of electro-osmosis and electro dialysis, Sci. Total Environ. 435-436, 1–6.

Lin, M., Ning, X.-A., An, T., Zhang, J., Chen, C., Ke, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Sun, J., and Liu, J., 2016, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in textile dyeing sludge with ultrasound and Fenton processes: Effect of system parameters and synergistic effect study, 2016, J. Hazard. Mater., 307, 7-16.

Lindquist, B., and Warshawsky D., 1985, Identification of the 11,12-dihydroxybenzo[a]pyrene as a major metabolite produced by the green alga, *Selenastrum capricornutum*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 130 (1), 71-75.

Liu, J., and Liu, H., 1992, Degradation of azo dyes by algae., Environ. Pollut., 75 (3), 273-278.

Liu, S., Liu, X., Liu, M., Yang, B., Cheng, L., and Li, Y., Qadeer, A., 2016, Levels, sources and risk assessment of PAHs in multi-phases from urbanized river network system in Shanghai, Environ. Pollut., 219, 555-567.

Liu, X.-G., Yang, H., Cheng, X.-L., Liu, L., Qin, Y., Wang, Q., Qi, P., Li, P., 2014, Direct analysis of 18 flavonol glycosides, aglycones and terpene trilactones in Ginkgo biloba tablets by matrix solid phase dispersion coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry, J. Pharmaceut. Biomed., 97, 123-128.

Lofthus, S., Almås, I. K., Evans, P., Pelz, O., and Brakstad, O. G., 2018, Biodegradation in seawater of PAH and alkylphenols from produced water of a North Sea platform, Chemosphere, 206, 465-473.

López-Rodas, V., Rouco, M., Sánchez-Fortún, S., Flores-Moya, A., and Costas, E., 2011, Genetic Adaptation and Acclimation of Phytoplankton Along a Stress Gradient in the Extreme Waters of the Agrio River-Caviahue Lake (Argentina), *J. Phycol.* 47 (5), 1036-1043.

López-Rodas, V., Carrera, D., Salgado, E., Mateos, A., Baez, J.C., and Costas, E., 2009. A fascinating example of microalgal adaptation to extreme crude oil contamination in a natural spill in Arroyo Minero, Rio Negro, Argentina. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 75 (4), 883–889.

Lorenzo-Parodi, N., Kaziur, W., Stojanović, N., Jochmann, M.A., and Schmidt, T. C., 2018, Solventless microextraction techniques for water analysis, *TrAC-Trend Anal. Chem.*, en impresión.

Lu, H., Wang, W., Li, F., and Zhu, L., 2019, Mixed-surfactant-enhanced phytoremediation of PAHs in soil: Bioavailability of PAHs and responses of microbial community structure. *Science of The Total Environment*, 653, 658-666.

Luan, T., Fang S., Zhong Y., Lin L., Chan S.M.N., Lan C., and Tam N. F. Y., 2007, Determination of hydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by fully automated solid-phase microextraction derivatization and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1173, (1–2), 37-43.

Luch, A., and Baird, W. M., 2010, Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Comprehensive Toxicology*, 14 (14.06), 85-123, Ed. Elsevier Ltda.

Luo, L., Wang P., Lina L., Luana T., Keb L., and Tam N.F.Y., 2014, Removal and transformation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in water by live and dead microalgae, *Process Biochem.* 49 (10), 1723–1732.

Ma, W.-L., Liu, L.-Y., Jia, H.-L., Yang, M., & Li, Y.-F., 2018, PAHs in Chinese atmosphere Part I: Concentration, source and temperature dependence. *Atmos. Environ.*, 173, 330–337.

McMillan, J., 2016, 13-Principles of Analytical Validation, Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition), Elsevier, 239-251, DOI: 10.1016/B978-0-444-63688-1.00013-6.

Manilal, V.B., and Alexander, M., 1991, Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil, *Appl. Microbiol. Biot.* 35 (3), 401- 405.

Marv, F., López-Rodas, V., Rouco, M., Navarro, M., Toro, F. J., Costas, E., and Flores-Moya, A., 2010, Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations, *Aquat. Toxicol.* 96 (2), 130–134.

Mastrangelo, G., Radda, M. and Marzia, V., 1996, Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man, *Environ Health Persp.*, 104 (11), 1166-1170.

Matamoros, V., Jover E., and Bayona J. M., 2010, Part-per-Trillion Determination of Pharmaceuticals, Pesticides, and Related Organic Contaminants in River Water by Solid-Phase Extraction Followed by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 82 (2), 699-706.

Mebarka, D. H., Taleb, S., Benghalem, A., Tundo, P., Ahmed, M. T., and Arabi, M., 2012, Residue Analysis of Some PAHs in Some Algerian Soil: A Preliminary Environmental Impact Assessment, *Energy Proc.*, 18, 1125–1134.

Megharaj, M., Kantachote, D., Singleton, I., and Naidu, R., 2000, Effects of long-term contamination of DDT on soil microflora with special reference to soil algae and algal transformation of DDT., *Environ. Pollut.* 109, 35-42.

Meng, Y., Liu, X., Lu, S., Zhang, T., Jin, B., Wang, Q., Tang, Z., Liu, Y., Guo, X., Zhou, J., and Xi, B., 2019, A review on occurrence and risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lakes of China, *Sci. Total Environ.*, 651 (2), 2497-2506.

Moldoveanu, S., and David, V. (2015). Solid-Phase Extraction. *Modern Sample Preparation for Chromatography*, 191–286.

Moody J. D. Freeman J. P., and Cerniglia C. E. 2005, Degradation of benz[a]anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii strain* PYR-1, *Biodegradation*, 16, 513–526.

Moon, H.B., An Y.R., Choi, S.G., Choi, M., and Choi, H.G., 2012, Accumulation of PAHs and synthetic musk compound in minke whales (*Balanoptera acutorostrata*) and long-beaked common dolphins (*Delphinus capensis*) from Korean coastal waters, *Environ. Toxicol. Chem.*, 31 (3), 477-485.

Mori, T., Watanabe, M., Taura, H., Kuno, T., Kamei I., and Kondo, R., 2015, Degradation of chlorinated dioxins and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and

remediation of PAH-contaminated soil by the entomopathogenic fungus, *Cordyceps militaris*, J. Environ. Chem. Eng., 3 (4), Part A, 2317-2322.

Motelay-Massei, A., Ollivon D, Garban B, and Chevreuil M, 2003, Polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk deposition at a suburban site: assessment by principal component analysis of the influence of meteorological parameters, Atmos. Environ. 37 (22), 3027-3166.

Mueller, J.G., Chapman, P.J. and Pritchard, P.H., 1990, Action of a fluoranthene-utilizing bacteria community on polycyclic aromatic hydrocarbon component of creosote. Appl Environ Microbiol., 55 (12), 3085-3090.

Naessens, M.; Leclerc, J.C. and Tran-Minh, C., 2000, Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds. Ecotox. Environ. Safe., 46 (2), 181–185.

Nagpal, P., Walker, L. N., Young, J. C., Sonawala, A., Timpte, C., Estelle, M., and Reed J. W., 2000, AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family, Plant Physiol., 123 (2), 563–573.

Nayar, S., Goh, B.P.L., and Chou, L.M., 2005. Settlement of marine periphytic algae in a tropical estuary. Estuarine, Coastal and Shelf, Science, 64, 241–248.

Ncube S., Kunene P., Tavengwa N. T., Tutu H., Richards H., Cukrowska E., and Chimuka L., 2017, Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer for the isolation of the 16 US-EPA priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in solution, J. Environ. Manage., 199 (1), 192-200.

Ncube, S., Madikizela, L., Cukrowska, E., and Chimuka, L., 2018, Recent advances in the adsorbents for isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from environmental sample solutions, TrAC-Trend Anal. Chem. 99, 101-116.

Neher, T. M., and Lueking D. R., 2009, *Pseudomonas fluorescens ompW*: plasmid localization and requirement for naphthalene uptake, Can J. of Microbiol., 55 (5), 553-563.

Nkansah, M. A., Christy, A. A., Barth, T., and Francis, G. W., 2012, The use of lightweight expanded clay aggregate (LECA) as sorbent for PAHs removal from water, J. Hazard. Mater., 217- 218, 360-363.

Noghabi, K. A., Zahiri, H. S., and Yoon S. C., 2007, The production of a cold-induced extracellular biopolymer by *Pseudomonas fluorescens* BM07 under various growth conditions and its role in heavy metals absorption, *Process Biochem.*, 42 (5), 847-855.

Ntougias, S., Melidis, P., Navrozidou, E., and Tzegkas, F., 2015, Diversity and efficiency of anthracene-degrading bacteria isolated from a denitrifying activated sludge system treating municipal wastewater, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 97, 151-158.

Nzila A., 2018, Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: Overview of studies, proposed pathways and future perspectives, *Environ. Pollut.*, 239, 788-802.

Olmos-Espejel, J. J., García de Llasera, M. P., and Velasco-Cruz, M., 2012. Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1262, 138– 147.

Paliwal C., Mitraa M., Bhayani K., Bharadwaj SV. V., Ghosh T., Dubey S., and Mishra S., 2017, Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae, *Bioresource Technol.*, En impresión.

Pang, J., Yuan, D., and Huang, X., 2018, On-line combining monolith-based in-tube solid phase microextraction and high-performance liquid chromatography- fluorescence detection for the sensitive monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex samples. *J. Chromatog A*, 1571, 29-37.

Papazi, A., Karamanli, M., & Kotzabasis, K., 2019, Comparative biodegradation of all chlorinated phenols by the microalga *Scenedesmus obliquus*—The biodegradation strategy of microalgae. *J. Biotechnol.*, 61-68.

Parnis, J. M., Mackay, D., & Harner, T., 2015, Temperature dependence of Henry's law constants and KOA for simple and heteroatom-substituted PAHs by COSMO-RS. *Atmospheric Environment*, 110, 27–35.

Passarini, M.R.Z., Rodrigues, MVN., Da Silva M., and Sette L.D., 2011, Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation, *Mar. Pollut. Bull.*, 62, (2), 364-370.

Peluffo, M., Rosso, J. A., Morelli, I. S., and Mora, V. C., 2018, Strategies for oxidation of PAHs in aged contaminated soil by batch reactors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 151, 76-82.

Pena, M. T., Casais M. C., and Mejuto M. C., 2008, Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples, *Anal. Chim. Acta*, 626 (2), 155-165.

Pensado, L., Casais M.C., Mejuto M.C., and Cela R., 2005, Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples, *J. Chromatogr. A.*, 1077 (2), 103-109.

Perullini, M., Ferro, Y., Durrieu, C., Jobbágy, M., and Bilmes, S. A., 2014, Sol-gel silica platforms for microalgae-based optical biosensors, *J. Biotechnol.*, 179, 65-70.

Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., and Temussi, F., 2002, Biodegradation of phenols by microalgae, *Biotechnol. Lett.*, 24, 2047-2051.

Pitarch, E., Medina C., Portolés T., López F. J., and Hernández F., 2007, Determination of priority organic micro-pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 583 (2), 246-258.

Pogorzelec, M., and Piekarska, K., 2018, Application of semipermeable membrane devices for long-term monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons at various stages of drinking water treatment, *Sci. Total Environ.*, 631-632, 1431-1439.

Possanzini M., Di Palo V., Gigliucci P., Tomasi Sciano M.C., and Cecinato A., 2004, Determination of phase-distributed PAH in Rome ambient air by denuder/GC-MS method. *Atmos. Environ.*, 38 (12), 1727-1734.

Pothuluri, J. V., Freeman, J. P., Evans, F. E., and Cerniglia, C. E., 1990, Fungal transformation of fluoranthene, *Appl. Environ. Microb.*, 56 (10), 2974-2983.

Pozdnyakova, N., Dubrovskaya, E., Chernyshova, M., Makarov, O., Golubev, S., Balandina, S., and Turkovskaya, O., 2018, The degradation of three-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons by wood-inhabiting fungus *Pleurotus ostreatus* and soil-inhabiting fungus *Agaricus bisporus*. *Fungal Biol-UK*, 122(5), 363-372.

Pugazhendi, A., Qari, H., Al-Badry Basahi, J. M., Godon, J. J., and Dhavamani, J., 2017, Role of a halothermophilic bacterial consortium for the biodegradation of PAHs and

the treatment of petroleum wastewater at extreme conditions, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 121, 44–54

Pyle, S.M., Betowski L.D., Marcus A.B., and Winnik W., 1997, Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Ion Trap Tandem Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 8 (2), 183-190.

Rabodonirina, S., Rasolomampianina, R., Krier, F., Drider, D., and Ouddane, B., 2019, Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites, *J. Environ. Manage.*, 232, 1-7.

Rachinskii VV., 1965 The general theory of sorption dynamics and chromatography. New York: Consultants Bureau; 94p., ISBN 978-1-4757-0061-9

Rainer U M., and Housna M., 2011, Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons, *Curr. Opin. Biotech.*, 22 (3), 406-414.

Reboud, X., Majerus, N., Gasquez, J., and Powles, S., 2007, *Chlamydomonas reinhardtii* as a model system for pro-active herbicide resistance evolution research, *Biol. J. Linnean Soc.*, 91 (2), 257-266.

Ríos, F., Lechuga, M., Fernández-Serrano, M., and Fernández-Arteaga, A., 2017, Aerobic biodegradation of amphoteric amine-oxide-based surfactants: Effect of molecular structure, initial surfactant concentration and pH. *Chemosphere*, 171, 324–331.

Rivas, J., Gimeno, O., Se la Calle, R. G., Portela, J. R., and De la Ossa, E. M., 2009, Remediation of PAH spiked soils: concentrated H₂O₂ treatment/continuous hot water extraction-oxidation, *J. Hazard. Mater.*, 168, (2-3), 1369-1365.

Rodríguez, A., Nogueira R., Melo L. F., and Brito A. G., 2013, Effect of low concentrations of synthetic surfactants on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) biodegradation, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 83, 48-55.

Rodríguez-Sanmartín, P., Moreda-Piñeiro A., Bermejo-Barrera A., and Bermejo-Barrera P., 2005, Ultrasound-assisted solvent extraction of total polycyclic aromatic hydrocarbons from mussels followed by spectrofluorimetric determination, *Talanta*, 66, 683–690.

Romero, M.C., Salvioli, M.L., Cazau, M.C., and Arambarri A.M., 202, Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi, *Environ. Pollut.*, 117, (1), 159-163.

Romero-Lopez, J., Lopez-Rodas, V., and Costas, E., 2012, Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination, *Aquat. Toxicol.*, 124-125, 227–237.

Sagarkar, S., Mukherjee S., Nousiainen A., Björklöf K., Purohit H.J., Jørgensen K.S., and Kapley A., 2013, Monitoring bioremediation of atrazine in soil microcosms using molecular tools, *Environ. Pollut.*, 172, 108-115.

Sahu, P. K., Ramiseti, N. R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C. S., Panda, J., 2018, An overview of experimental designs in HPLC method development and validation, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 147, 590-611.

Saija, E., Mangano, V., Casale, K. E., La Torre, G. L., Dugo, G., and Salvo, A., 2016, Determination and quantification of PCBs, POCs and PAHs in *Thunnus thynnus* from the Straits of Messina (Italy). *Data in Brief*, 7, 129–134.

Sakulthaew, C., Comfort, S. D., Chokejaroenrat, C., Li, X., and Harris, C. E., 2015, Removing PAHs from urban runoff water by combining ozonation and carbon nano-onions. *Chemosphere*, 141, 265–273.

Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., and Tadeo, J. L., 2007, Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid, *J. Chromatogr. A*, 1148, 219–227.

Sánchez-Fortun, S., López-Rodas, V., Navarro, M., Marva, F, D'ors A., Rouco, M., Haigh-Florez D., and Costas E., 2009, Toxicity and adaptation of *Dictyosphaerium chlorelloides* to extreme chromium contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (9), 1901-1905.

Sandermann, H., 1994, Invited review: higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept., *Pharmacogenetics*, 4 (5), 225-241.

Santos, E., Souza, M. R. R., Vilela Junior, A. R., Soares, L. S., Frena, M., and Alexandre, M. R., 2018, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in superficial water from a tropical estuarine system: Distribution, seasonal variations, sources and ecological risk assessment, *Mar. Pollut. Bull.*, 127, 352–358.

Santos, L. O., Dos Anjos, J. P., Ferreira, S. L. C., and De Andrade, J. B., 2017, Simultaneous determination of PAHS, nitro-PAHS and quinones in surface and groundwater samples using SDME/GC-MS. *Microchem. J.*, 133, 431–440.

Sarigiannis, D. A., Karakitsios, S. P., Zikopoulos, D., Nikolaki S., and Kermenidou M., 2015, Lung cancer risk from PAH emitted from biomass combustion, *Environ. Res.*, 137, 147–156.

Sarria-Villa, R., Ocampo-Duque W., Páez M., and Schuhmacher, M., 2016, Presence of PAHs in water and sediments of the Colombian Cauca River during heavy rain episodes, and implications for risk assessment, *Sci. Total Environ.*, 540, 455-465.

Sayara, T., Pognani, M., Sarrà, M., and Sánchez, A., 2010, Anaerobic degradation of PAHs in soil: Impacts of concentration and amendment stability on the PAHs degradation and biogas production, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 64(4), 286–292.

Schedl M., Wilharm G., Achatz S., Ketrup A., Niessner R., and Knopp D., 2001, Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human urine: extraction and purification with a Sol–Gel glass immunosorbent, *Anal. Chem.*, 73 (23), 5669–5676.

Scheible W.R, Eshed R., Richmond T., Delmer D., and Somerville C. 2001. Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis lxr1* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (18), 10079-10084.

Schneider J., Grosser R., Jayasimhulu K., Xue W., and Warshawsky D., 1996, Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by mycobacterium sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site, *Appl. Environ. Microb.*, 62, 13–19

Schoeny, R., Cody, T., Warshawsky, D., and Radike, M., 1988, Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species, *Mutat. Res-Fun Mol M.*, 197 (2), 289-302.

Scragg, A. H., Spiller, L., and Morrison, J., 2003, The effect of 2,4-dichlorophenol on the microalga *Chlorella* VT-1., *Enzyme Microb. Tech.* 32 (5), 616-622.

Semple, K. T., 1998, Heterotrophic growth on phenolic mixtures by *Ochromonas danica*, *Res. Microbiol.*, 149 (1), 65-72.

Semple, K. T., Cain, R. B, and Schmidt, S., 1999, Biodegradation of aromatic compounds by microalgae, *FEMS Microbiol. Lett.*, 170, 291-300.

Sen, S., and Field, J. M., 2013, Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites, Chapter 3, *Adv. Molec. Toxicol.*, 83–127

Seo J-S., Keum Y-S., and Li, Q-X, 2009, Bacterial Degradation of Aromatic Compounds, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 6, 278- 309.

Serpe, F. P., Esposito, M., Gallo, P., and Serpe, L., 2010, Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels, *Food Chem.*, 122 (3), 920-925.

Shaw, G.R. and Connell, D.W., 1994, Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs). *Rev. Environ. Contam. T.*, 135, 1–62.

Shi, W., Fang, X., Wu, X., Zhang, G., Que, W., and Li, F., 2018, Alteration of bioaccumulation mechanisms of Cu by microalgae in the presence of natural fulvic acids, *Chemosphere*, 211, 717–725.

Siddens, L. K., Bunde, K. L., Harper Jr., T. A., McQuistan, T. J., Löhr, C. V., Bramer, L. M., Waters K. M., Tilton, S. C., Krueger S. K., Williams, D. E., and Baird, W. M., 2015, Cytochrome P450 1b1 in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-induced skin carcinogenesis: Tumorigenicity of individual PAHs and coal-tar extract, DNA adduction and expression of select genes in the Cyp1b1 knockout mouse, *Toxicol. Appl. Pharm.*, 287, (2), 149-160.

Siemers, A-K., Mänz, J-S., Palm, W-U., and Ruck, W. K. L. 2015, Development and application of a simultaneous SPE-method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), alkylated PAHs, heterocyclic PAHs (NSO-HET) and phenols in aqueous samples from German Rivers and the North Sea, *Chemosphere*, 122, 105-114

Silva, I.S., Grossman, M., and Durrant, L.R., 2009, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 63 (2), 224-229.

Silva, I.S., Santos E.C., Menezes C.R., Faria A.F., Franciscon, E., Grossman, M., and Durrant, L.R., 2009, Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia, *Biores. Tech.*, 100 (20), 4669-4675.

Simpson N. J. K, editor. 2000, Solid-phase extraction, principles, techniques and applications. New York: M. Dekker, 503p., ISBN 0-8247-0021-X.

Sims, R. C., and Overcash, M. R., 1988, Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems, In: Gunther F.A. (eds) Residue Reviews. Residue Reviews, vol 88. Springer, New York, NY.

Sniegowski, P. D., and Lenski, R. E., 1995, Mutation and adaptation: the directed mutation controversy in evolutionary perspective, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 26, 553-578.

Sponza, D-T., and Oztekin, R., 2011, Removals of some hydrophobic poly aromatic hydrocarbons (PAHs) and *Daphnia magna* acute toxicity in a petrochemical industry wastewater with ultrasound in Izmir-Turkey, *Sep, Purif, Technol.*, 77 (3), 301-311.

Stingley, R. L., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E., 2004, Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322 (1), 133–146.

Subashchandrabose, S. R., Logeshwaran, P., Venkateswarlu, K., Naidu, R., and Megharaj, M., 2017, Pyrene degradation by *Chlorella sp. MM3* in liquid medium and soil slurry: Possible role of dihydrolipoamide acetyltransferase in pyrene biodegradation, *Algal Res.*, 23, 223–232.

Suenaga H., Koyama Y., Miyakoshi M., Miyazaki R., Yano H., Sota M., Ohtsubo Y., Tsuda M., and Miyazaki K., 2009, Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis, *ISME J.*, 3 (12), 1335-1348.

Sungthong, R., Van West P., Cantos M., and Ortega-Calvo J. J., 2015, Development of eukaryotic zoospores within polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-polluted environments: A set of behaviors that are relevant for bioremediation, *Sci Total Environ.*, 511, 767-776.

Suter, M. A., Aagaard, K. M., Coarfa, C., Robertson, M., Zhou, G., Jackson, B. P., Thompson D., Putluri V., Putluri N., Hagan J., Wang L., Jiang W., Lingappan W., Moorthy, B., 2019, Association between elevated placental polycyclic aromatic hydrocarbons

(PAHs) and PAH-DNA adducts from Superfund sites in Harris County, and increased risk of preterm birth (PTB Biochem. Biophys. Res. Commun. 516 (2), 344-349.

Sutherland, J.B, Rafii F., Khan A.A. and Cerniglia C.E., 1995, Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation en: Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals Young LY & Cerniglia CE ed, 296–306. Wiley-Liss, New York, ISBN 0471521094 9780471521099.

Swaathy, S., Kavitha, V., Pravin, A.S., Mandal, A.B., and Gnanamani, A., 2014, Microbial surfactant mediated degradation of anthracene in aqueous phase by marine *Bacillus licheniformis* MTCC 5514, Biotechnol. Reports, 4, 161-170.

Talano, M., Busso, D. C., Paisio, C. E., González, P. S., Purro, S., Medina, M. I., and Agostini, E., 2012, Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol using wild type and transgenic tobacco plants, Environ. Sci. Poll. Res. Int. 19 (6), 2202-2211.

Tam, N. F. Y., and Wong, Y. S., 2000, Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal., Environ. Pollut. 107 (1), 145-151.

Tan, X., Yu, X., Cai, L., Wang, J., and Peng, J., 2019, Occurrence and organic contaminant-carrier effect of microplastics in surface water from the Feilaixia Reservoir in the Beijiang River, China. Chemosphere, en impresión.

Thelusmond J-R, Kawka E., Strathmann T. J., and Cupples A. M., 2018, Diclofenac, carbamazepine and triclocarban biodegradation in agricultural soils and the microorganisms and metabolic pathways affected, Sci. Total Environ., 640-641 (1), 1393-1410.

Thies, F., Backhaus, T., Bossmann, B., and Grimme, L. H., 1996, Xenobiotic biotransformation in unicellular green algae - Involvement of cytochrome P450 in the activation and selectivity of the pyridazinone pro-herbicide metflurazon, Plant Physiol., 112 (1), 361-370.

Tikoo, V., Scragg, A. H., and Shales, S. W., 1997, Degradation of pentachlorophenol by microalgae., J. Chem. Technol. Biot., 68 (4), 425-431.

Toriba, A., Nakamura, H., Chetiyankornkul T., Kizu, R., Makino, T., Nakazawa, H., Yokoi, T., and Hayakawaa K., 2003, Method for determining monohydroxybenzo[a]pyrene

isomers using column-switching high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, 312, 14-22.

Trevelin, W. R., Vidal L. H., Landgraf M. D., Silva I. C., and Rezende M.O., 1992, Optimization of parameters for the gas chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Chim. Acta*, 268, 67-71.

Turemis, M., Silletti, S., Pezzotti, G., Sanchís, J., Farré, M., and Giardi, M. T., 2018, Optical biosensor based on the microalga-paramecium symbiosis for improved marine monitoring, *Sensor Actuat B-Chem*, 270, 424–432.

Vassura, I., Foschini F., Baravelli V., and Fabbri D., 2005, Distribution of alternant and non-alternant polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and clams of the Pialassa Baiona Lagoon (Ravenna, Italy), *Chem. Ecol.* 21 (6), 415-424.

Vázquez-Gómez, G., Rubio-Lightbourn, J., y Espinosa-Aguirre, J. J., 2016, Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo[a]pireno y el desarrollo de tumores. *TIP-Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(1), 54–67.

Védrine, C.; Leclerc, J.; Durrieu, C. and Tran-Minh, C., 2003, Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides, *Biosens. Bioelectrons.*, 18, 457–463.

Vela, N., Martínez-Menchón, M., Navarro, N., Pérez-Lucas, G., and Navarro, S., 2012, Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from groundwater by heterogeneous photocatalysis under natural sunlight, *J. Photoch. Photobio. A*, 232, 32-40.

Verstraete, W.R., Vanlooche, R., and Borger, R., 1976, Modeling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers, en: *Proc. 3rd Int. Biodegradation Symp.* Sharpley, J.M., Kaplan A. M.(eds)., Appl. Science Publishers. London. 98-112.

Visser, T., Sarobe M., Jenneskens L. W., and Wesseling J. W., 1998, Identification of isomeric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in pyrolysates from ethynylated PAH by gas chromatography-Fourier infrared spectroscopy. Their relevance for the understanding of PAH rearrangement and interconversion processes during combustion, *Fuel*, 77 (9–10), 913-920.

- Vyas, B.R.M., Bakowski, S., Sasek, V., and Matucha, M., 1994, Degradation of anthracene by selected white rot fungi, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 14, 65–70.
- Walker, J. D., Colwell, R.R., and Petrakis, L., 1975, Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii.*, *Appl. Microbiol.* 30 (1), 79-81.
- Wang, C., Wang, Y., and Herath, H. M. S. K., 2017, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in biochar – Their formation, occurrence and analysis: A review, *Org. Geochem.*, 114, 1–11.
- Wang, C., Yu, X., and Bartha, R., 1990, Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil, *Envir. Sci. Technol.*, 24, 1086–1089.
- Wang, J., Liu, J., Ling, W., Huang, Q., and Gao, Y., 2017, Composite of PAH-degrading endophytic bacteria reduces contamination and health risks caused by PAHs in vegetables, *Sci. Total Environ.*, 598, 471-478.
- Wang, J., Zhang, X., Ling, W., Liu, R., Liu, J., Kang, F., and Gao, Y., 2017, Contamination and health risk assessment of PAHs in soils and crops in industrial areas of the Yangtze River Delta region, China, *Chemosphere*, 168, 976–987.
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, K., and 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. *Chem. Biol. Interact.*, 97 2, 131-148.
- Warshawsky, D., LaDow, K., and Schneider, J., 2007, Enhanced degradation of benzo[a]pyrene by *Mycobacterium sp.* in conjunction with green alga, *Chemosphere*, 69 (3), 500-506.
- White, J. S., Tobin, J. M., and Cooney, J. J., 1999, Organotin compounds and their interactions with microorganisms, *Can. J. Microbiol.*, 45 (7), 541-554.
- Whyte, L., Bourbonniere, L., and Bellrose, C., 1999, Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated soils from the high artic, *Can. Biorem. J.*, 3, 69-79.
- Williams, P. T., and Nazzari, J. M., 1995, Polycyclic aromatic compounds in oils derived from the fluidised bed pyrolysis of oil shale, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 35, 2, 181-197.
- Wiltse, J., and Dellarco, V. L., 1996, U.S. Environmental Protection Agency guidelines for carcinogen risk assessment: Past and future, *Mutat. Res.-Rev. Genet.*, 365, (1–3), 3-15.

Windal, I., Boxus, L., and Hanot, V., 2008, Validation of the analysis of the 15+1 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons by donor-acceptor complex chromatography and high-performance liquid chromatography-ultraviolet/fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, 1212 (1-2), 16-22.

Winqvist, E., Björklöf K., Schultz E., Räsänen M., Salonen K., Anasonye F., Cajthaml T., Steffen, K. T., Jørgensen K. S., and Tuomela M., 2014, Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi – From laboratory to field scale, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 86, 238-247.

Wu, Y., He, T., Zhong, M., Zhang, Y., Li, E., Huang, T., and Hu, Z., 2009, Isolation of marine benzo[a]pyrene-degrading *Ochrobactrum sp.* BAP5 and proteins characterization, *J. Environ. Sci.*, 21 (10), 1446-1451.

Wu, Y.-L., Wang X.-H., Li Y.-Y., and Hong H.-S., 2011, Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater from the Western Taiwan Strait, China, *Mar. Pollut. Bull.*, 63, (5–12), 459-463.

Wu, Z., Zhu, Z., Hao, X., Zhou, W., Han, J., Tang, X., Yao, S., Zhang, X., 2018, Enhanced oxidation of naphthalene using plasma activation of TiO₂/diatomite catalyst, *J. Hazard. Mat.*, 347, 48–57.

Wunder, T., Kremer, S., Sterner, O., and Anke, H., 1994, Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317." *Appl. Microbiol. Biot.*, 42 (4), 636-641.

Xiao, N., Liu R., Jin C., and Dai Y., 2015, Efficiency of five ornamental plant species in the phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil, *Ecol. Eng.*, 75, 384-391.

Xu, S., Wang, W., and Zhu, L., 2019, Enhanced microbial degradation of benzo[a]pyrene by chemical oxidation. *Sci. Total Environ.*, 653, 1293–1300.

Yamazoe, Y., and Yoshinari, K., 2017, Prediction of regioselectivity and preferred order of metabolisms on CYP1A2-mediated reactions. Part 2: Solving substrate interactions of CYP1A2 with non-PAH substrates on the template system, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 32(5), 229–247.

Yan, J., Wang L., Fu P.P, and Yu H., 2004, Photomutagenicity of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA's priority pollutant list, *Mutat. Res.*, 557 1, 99-108.

Yang, W., Lang, Y., and Li, G., 2014, Cancer risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the soils from Jiaozhou Bay wetland, *Chemosphere*, 112, 289-295.

Yao, J-J., Huang, Z.-H., and Masten, S.J., 1998, The ozonation of pyrene: Pathway and product identification, *Water Research*, 32 (10), 1998, 3001-3012.

You, F., Zhu L., He L., Ran L-J., Jin Y., and Sun C-J., 2014, Simultaneous Determination of Seven Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Urine by Online Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography, *Chinese J. Anal. Chem.*, 42 (12), 1723-1728.

Yu, L., Tu, X., Li, X., Wang, Y., Chi, Y., and Yan, J., 2010, Destruction of acenaphthene, fluorene, anthracene and pyrene by a dc gliding arc plasma reactor, *J. Hazard. Mat.*, 180(1-3), 449–455.

Yu, X.Z., Wu, S.C., Wu, F.Y., and Wong, M.H., 2011, Enhanced dissipation of PAHs from soil using *Mycorrhizal ryegrass* and PAH-degrading bacteria, *J. Hazard. Mat.*, 186 (2-3), 1206-1217.

Zafra, G., Absalón, Á. E., Anducho-Reyes, M. Á., Fernandez, F. J., and Cortés-Espinosa, D. V., 2017, Construction of PAH-degrading mixed microbial consortia by induced selection in soil. *Chemosphere*, 172, 120–126.

Zhang, H., Xue, M., and Dai, Z., 2010, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence, *J. Food Comp. Analysis*, 23 (5), 469-474.

Zhang S., Ning, Y., Zhang, X., Zhao, Y., Yang, X., Wu, K., Yang, S., La, G., Sun X., and Li, X., 2015, Contrasting characteristics of anthracene and pyrene degradation by wood rot fungus *Pycnoporus sanguineus* H1, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 105, 228-232.

Zhang, Y., Zhang, L., Huang, Z., Li, Y., Li, J., Wu, N., He, J., Zhang, Z. and Niu, Z., 2019, Pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in drinking water of China: Composition, distribution and influencing factors, *Ecotox. Environ. Safe.*, 177, 108–116.

Zhong, Y., Luan, T. G., Zhou, H. W., Lan C. Y., and Tam, N. F. Y., 2006, Metabolite production in degradation of pyrene alone or in a mixture with another polycyclic aromatic hydrocarbon by *Mycobacterium sp.*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 (11), 2853-2859.

Zouboulis, A. I., Moussas, P. A., and Psaltou, S. G., 2018. Groundwater and Soil Pollution: Bioremediation ☆. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, 1037-1044, ed. Elsevier, ISBN: 978-0-12-409548-9.

10.ANEXOS

Anexo 1. Pruebas de regresión lineal para los estándares de dihidrodioles de cada HAP por SPSS

A continuación, se presenta el ejemplo de los resultados obtenidos para el 9,10-Dhd del BaP, 5,6-Dhd del BaA y el 9,10-Dhd del BbF

1. 9,10-BaP

Resumen del modelo^b

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					Durbin-Watson
					Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
1	.999 ^a	.997	.997	.16887	.997	3518.931	1	10	.000	1.898

a. Variables predictoras: (Constante), BaP910

b. Variable dependiente: conc

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	100.356	1	100.356	3518.931	.000 ^a
	Residual	.285	10	.029		
	Total	100.641	11			

a. Variables predictoras: (Constante), BaP910

b. Variable dependiente: conc

5,6-Dhd-BaA

Resumen del modelo^b

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					Durbin-Watson
					Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
1	.999 ^a	.997	.997	.16295	.997	3780.030	1	10	.000	2.082

a. Variables predictoras: (Constante), BaA56

b. Variable dependiente: conc

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	100.375	1	100.375	3780.030	.000 ^a
	Residual	.266	10	.027		
	Total	100.641	11			

a. Variables predictoras: (Constante), BaA56

b. Variable dependiente: conc

9,10-Dhd BbF

Resumen del modelo^b

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					Durbin-Watson
					Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
1	.939 ^a	.882	.871	1.88063	.882	82.096	1	11	.000	1.852

a. Variables predictoras: (Constante), BbF910

b. Variable dependiente: conc

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	290.354	1	290.354	82.096	.000 ^a
	Residual	38.904	11	3.537		
	Total	329.258	12			

a. Variables predictoras: (Constante), BbF910

b. Variable dependiente: conc

Anexo 2. Prueba t de muestras relacionadas para las pendientes de las curvas de calibración de metabolitos a las dos longitudes de absorción y emisión.

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	m260 - m270	134948.000	137493.416	51967.627	7787.798	262108.202	2.597	6	.041

Prueba de Duncan

9,10-BaP

Duncan^a

conc	N	alpha = 0.05		
		1	2	3
.96	3	1037442.5000		
3.20	3		2330777.0000	
9.60	3			6980137.5000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se muestran medias para grupos en subconjuntos homogéneos.

a. Tamaño de muestra usa media armonica = 3.000.

5,6-BaA

Duncan^a

conc	N	alpha = 0.05		
		1	2	3
.96	3	35830.0000		
3.20	3		101302.0000	
9.60	3			302356.5000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se muestran medias para grupos en subconjuntos homogéneos.

a. Tamaño de muestra usa media armonica = 3.000.

9,10-BbF

Duncan^a

conc	N	alpha = 0.05		
		1	2	3
.96	3	77541.0000		
3.20	3		330501.5000	
9.60	3			836365.5000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se muestran medias para grupos en subconjuntos homogéneos.

a. Tamaño de muestra usa media armonica = 3.000.

Anexo 3. Análisis estadístico para la validación del sistema cromatográfico en la determinación de HAPs

BaA

Resumen del modelo^b

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación	Durbin-Watson
1	1.000 ^a	.999	.999	.04342	2.087

a. Variables predictoras: (Constante), área 3 BaA, área 2 BaA, área 1

BaA

b. Variable dependiente: concentración de BaA

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	11.548	3	3.849	2042.202	.000 ^a
	Residual	.008	4	.002		
	Total	11.555	7			

a. Variables predictoras: (Constante), área 3 BaA, área 2 BaA, área 1 BaA

b. Variable dependiente: concentración de BaA

BkF

Resumen del modelo^b

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación	Durbin-Watson
1	1.000 ^a	1.000	.999	.03671	1.983

a. Variables predictoras: (Constante), área 3 BkF, área 1 BkF, área 2 BkF

b. Variable dependiente: concentración de BaA

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	11.550	3	3.850	2856.533	.000 ^a
	Residual	.005	4	.001		
	Total	11.555	7			

a. Variables predictoras: (Constante), área 3 BkF, área 1 BkF, área 2 BkF

b. Variable dependiente: concentración de BaA

Prueba de homogeneidad de varianzas para los cuatro HAPs

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
BaA	4.967	7	16	.004
BkF	5.160	7	16	.003
BbF	11.336	7	16	.000
BaP	6.459	7	16	.001

Prueba de análisis de varianza para los cuatro HAPs

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
BaA	Inter-grupos	1.048E10	7	1.497E9	530.700	.000
	Intra-grupos	4.512E7	16	2820109.833		
	Total	1.052E10	23			
BkF	Inter-grupos	1.686E10	7	2.408E9	147.522	.000
	Intra-grupos	2.612E8	16	1.632E7		
	Total	1.712E10	23			
BbF	Inter-grupos	9.189E9	7	1.313E9	172.591	.000
	Intra-grupos	1.217E8	16	7606118.958		
	Total	9.311E9	23			
BaP	Inter-grupos	9.741E9	7	1.392E9	269.904	.000
	Intra-grupos	8.249E7	16	5155851.208		
	Total	9.824E9	23			

Anexo 4 Pruebas de regresión lineal para el método EFS-HPLC/FL para los dihidrodiolos
9,10-dBaP

Resumen del modelo^b

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación	Durbin-Watson
1	.996 ^a	.993	.992	.68448	1.874

a. Variables predictoras: (Constante), **BaP910**

b. Variable dependiente: CONC

ANOVA^b

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	392.683	1	392.683	838.156	.000 ^a
	Residual	2.811	6	.469		
	Total	395.494	7			

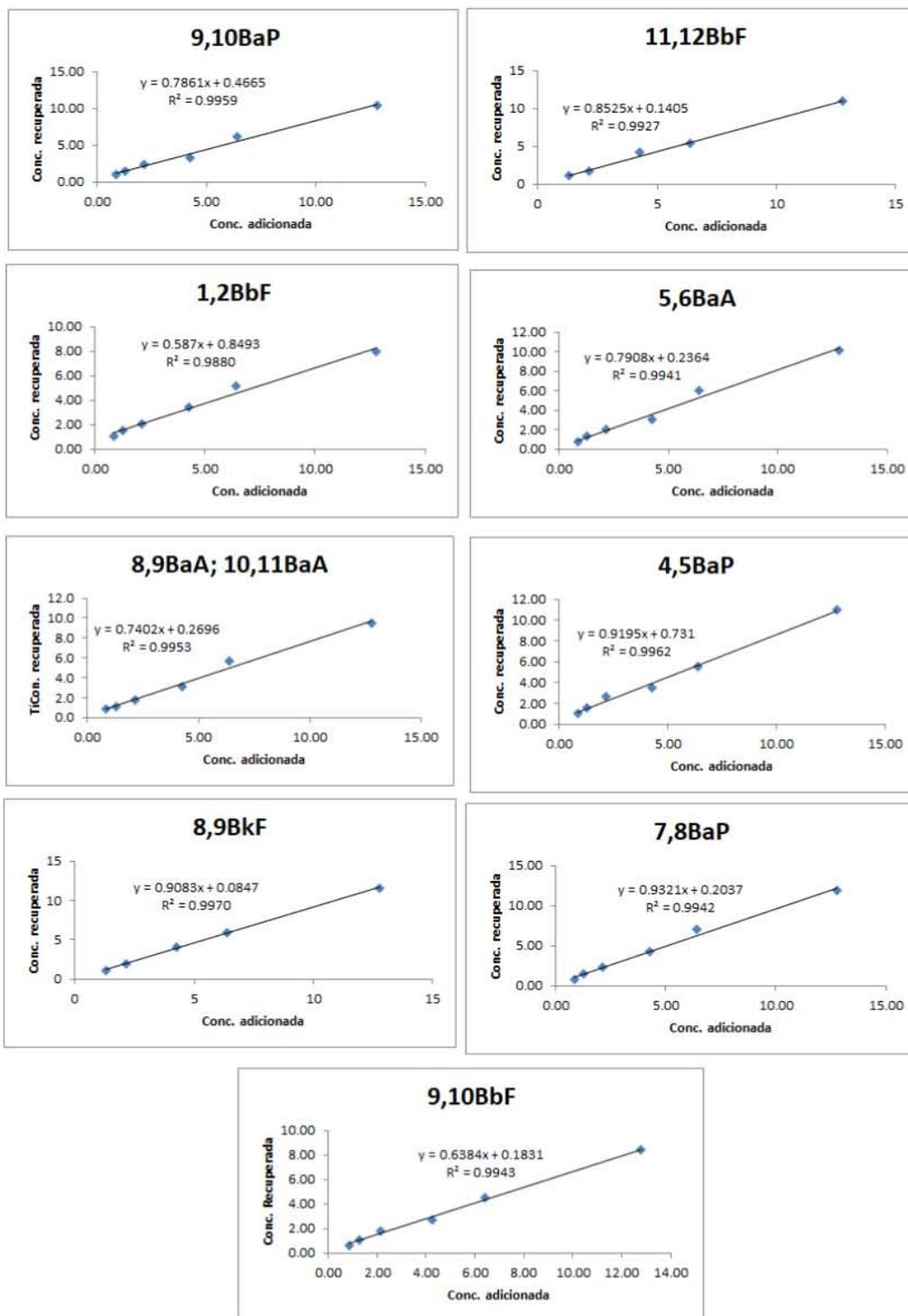
a. Variables predictoras: (Constante), BaP910

b. Variable dependiente: CONC

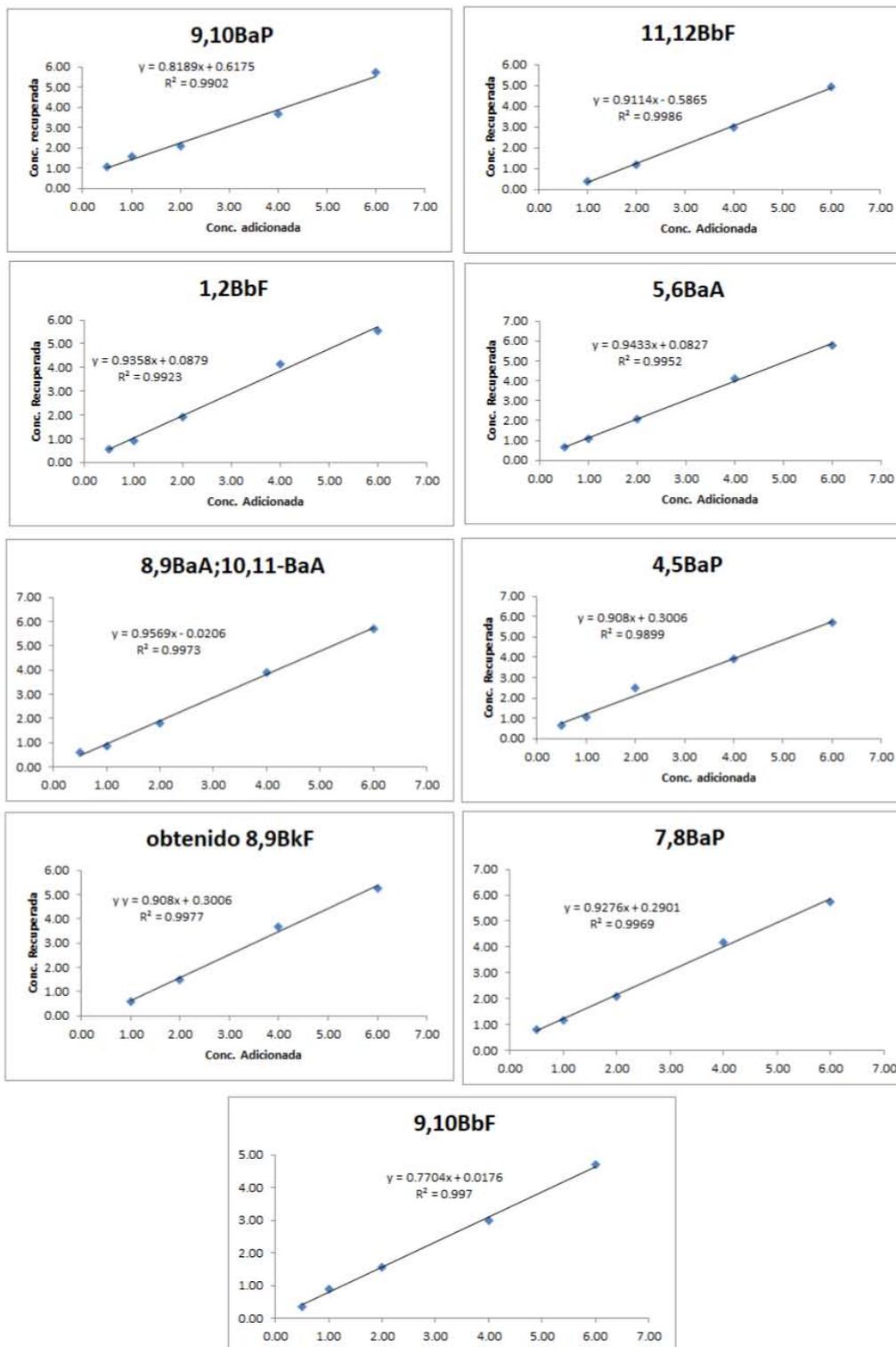
Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
BaP910	2.488E16	5	6	.000
BaA56	1.723E16	5	6	.000
BaA891011	5.592E15	5	6	.000
BaP45	6.691E16	5	6	.000
BaP48	2.936E16	5	6	.000
BbF910	8.277E15	5	6	.000

Curvas de recobro del método EFS-CLAR/FL



Curvas de recobro del método DMFS-CLAR/FL



Anexo 5 Comparación entre los valores medios del control y las diferentes mezclas adicionadas al cultivo para evaluar su crecimiento

Correlaciones de muestras relacionadas

	N	Correlación	Sig.
Par 1 control y BaP100	12	.992	.000
Par 2 control y Mezcla100	12	.968	.000
Par 3 control y BaP266	12	.978	.000
Par 4 control y Mezcla266	12	.970	.000

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 control - BaP100	7.33833E5	4.88977E5	1.41156E5	4.23152E5	1.04451E6	5.199	11	.000
Par 2 control - Mezcla100	1.97217E6	1.03368E6	2.98398E5	1.31540E6	2.62894E6	6.609	11	.000
Par 3 control - BaP266	1.51283E6	8.20289E5	2.36797E5	9.91646E5	2.03402E6	6.389	11	.000
Par 4 control - Mezcla266	2.58267E6	1.34373E6	3.87901E5	1.72890E6	3.43643E6	6.658	11	.000

Anexo 6. Prueba t de medias de muestras relacionadas para las concentraciones de HAPs recuperadas en la exposición con *S. capricornutum*.

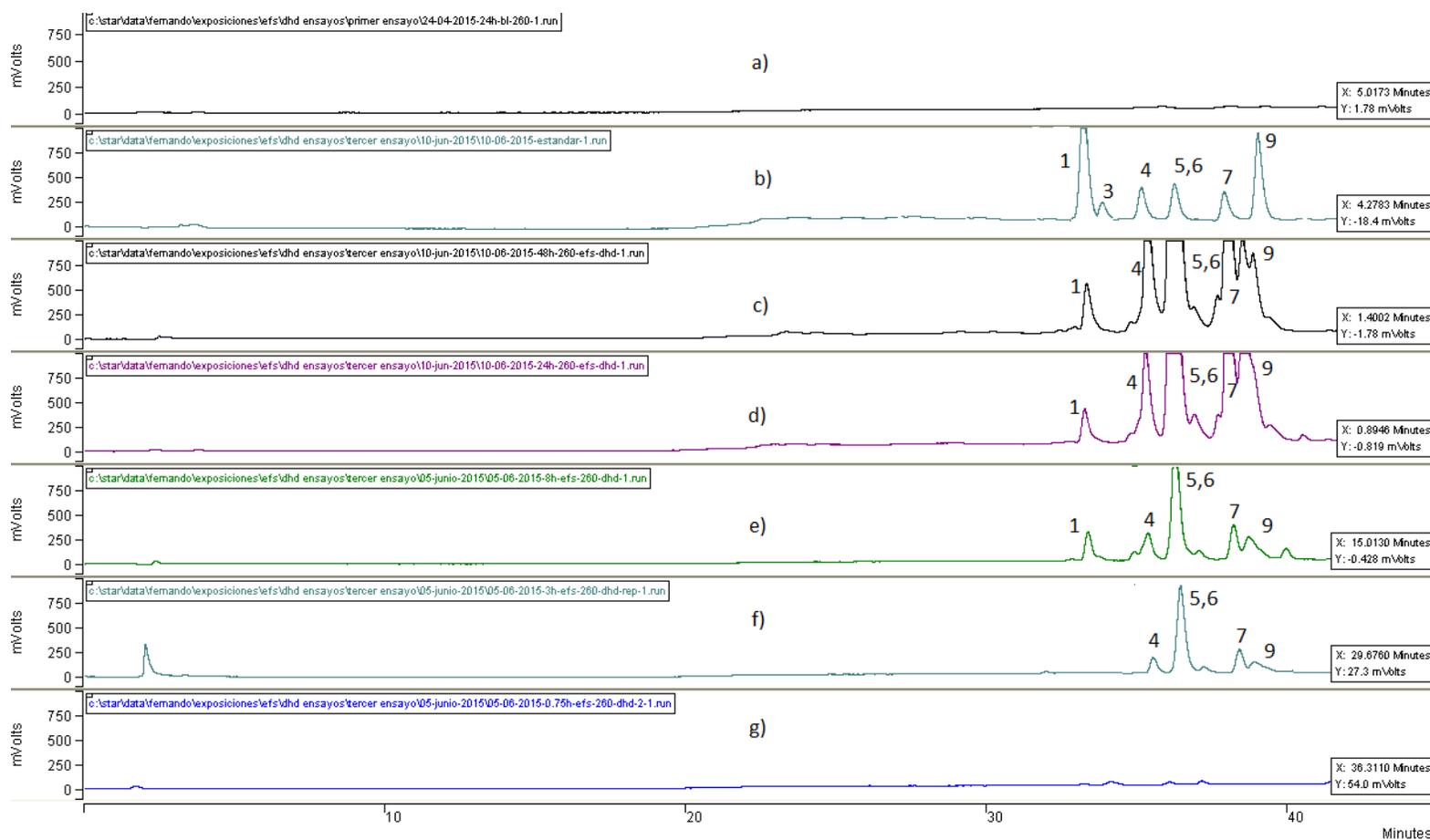
Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	BaA - BbF	-.18143	.16004	.06049	-.32945	-.03341	-2.999	6	.024
Par 2	BkF - BaP	-.56714	.44365	.16768	-.97745	-.15684	-3.382	6	.015
Par 3	BaA - BkF	.70286	.43824	.16564	.29755	1.10816	4.243	6	.005
Par 4	BaA - BaP	.13571	.35472	.13407	-.19235	.46378	1.012	6	.350

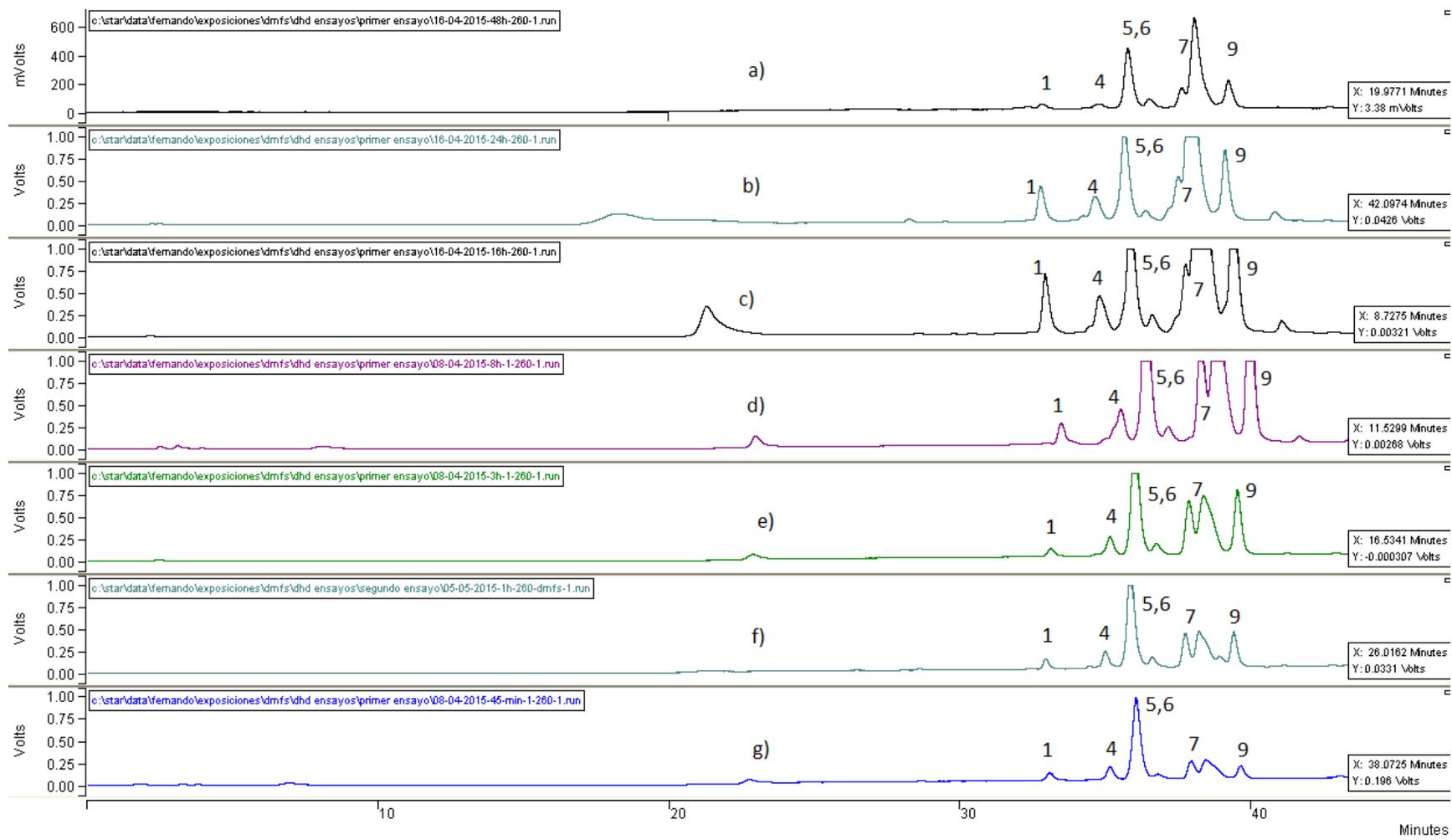
T para una muestra

	Valor test = 0					
	t	gl	Sig. (2 colas)	Diferencia de la media	Intervalo de confianza al 95%	
					Lower	Upper
BaA	11.078	6	.000	1.32857	1.0351	1.6220
BkF	35.087	6	.000	.89571	.8332	.9582
BaP	25.881	6	.000	1.87714	1.6997	2.0546
BbF	9.610	6	.000	1.15429	.8604	1.4482

Anexo 7 Cromatogramas de medio líquido y biomasa de la exposición de la mezcla de HAPs a *Selenastrum capricornutum* a diferentes tiempos.



Cromatograma de a) Blanco de algas sin HAPs b) Solución estándar de metabolitos a 12 µg/L (λ_{ex} . 260 nm y λ_{em} .410 nm); y extractos de medio (λ_{ext} . 260 nm and λ_{em} .410 nm); c) ME 48 h; d) ME 24 h; e) ME 8h f) ME 3h y g) ME 0.45 h



Cromatograma de extractos de biomasa (λ_{ex} . 260 nm y λ_{em} .410 nm); a) ME 48 h; b) ME 24 h; c) ME 16 h; d) ME 8 h; e) ME 3h f) ME 1h y g) ME 0.45 h.

Anexo 8. Análisis estadístico para los datos obtenidos en las exposiciones de BbF y BkF

Prueba t de muestras relacionadas para el 8,9-BkF en biomasa a las 24 y 48 h

		Diferencia pareada					t	df	Significancia
		Promedio	Desv. Estandar	Error Estand Media	diferencia				
					Bajo	Alto			
8,9-dBkF	ScenDMFS24 - ScenDMFS48	-2.76000	7.36279	4.25091	-21.05019	15.53019	-0.649	2	.583

Prueba t de muestras relacionadas para la cantidad de 9,10-dBbF a 72 y 96h de exposición a *S. acutus*

Test muestras pareadas									
		Diferencia pareada					t	df	Significancia
		Promedio	Desv. Estandar	Error Estand Media	diferencia				
					Bajo	Alto			
9,10-dBbF	ScenEFS72 - ScenEFS96	-1.69667	2.68950	1.55279	-8.37777	4.98443	-1.093	2	.389

Prueba t de muestras relacionadas para la cantidad total del metabolito 8,9-dBkF en las dos microalgas

		Diferencia pareada					t	df	Significancia
		Promedio	Desv. Estandar	Error Estand Media	diferencia				
					Bajo	Alto			
1,2-dBbF	Scentotal72h - Selentotal24h	15.06500	7.13471	5.04500	-49.03780	79.16780	2.986	1	.206

Prueba t de muestras relacionadas para la cantidad total de metabolito 9,10-dBbF en las dos microalgas

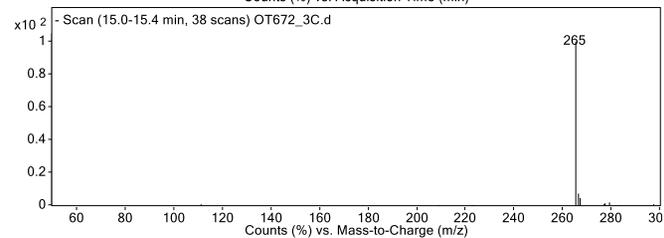
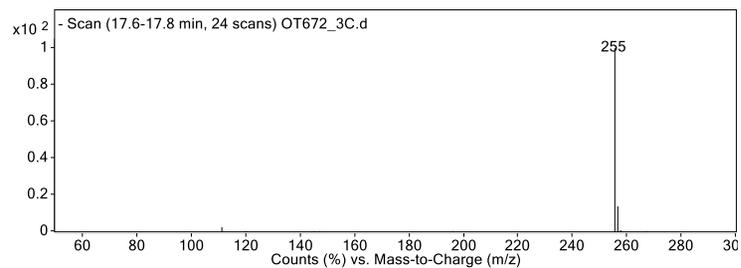
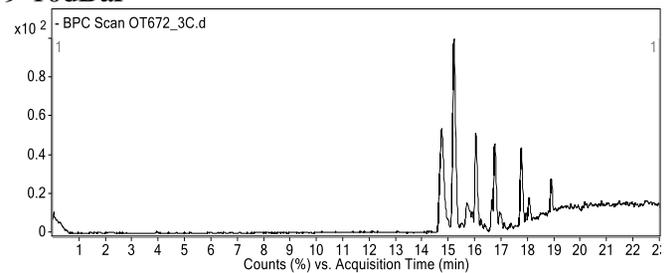
		Diferencia pareada					t	df	Significancia
		Promedio	Desv. Estandar	Error Estand Media	diferencia				
					Bajo	Alto			
9,10-dBbF	Scentotal96h - Selentotal24h	-1.39000	1.89958	1.09672	-6.10882	3.32882	-1.267	2	.333

Prueba t de medias relacionadas para 9,19-dBbF a las 48h, 72h y 96h de exposición

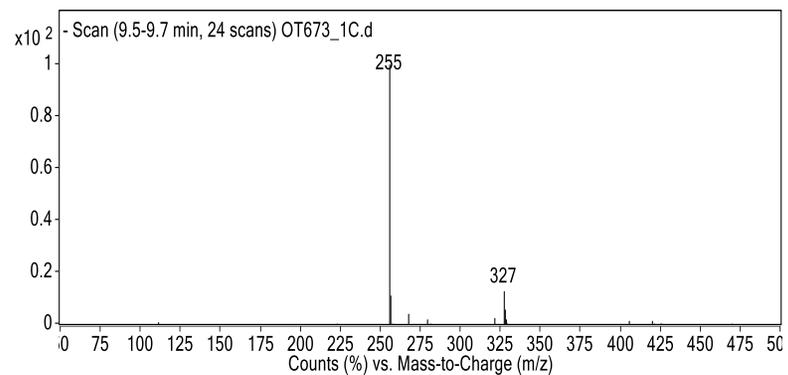
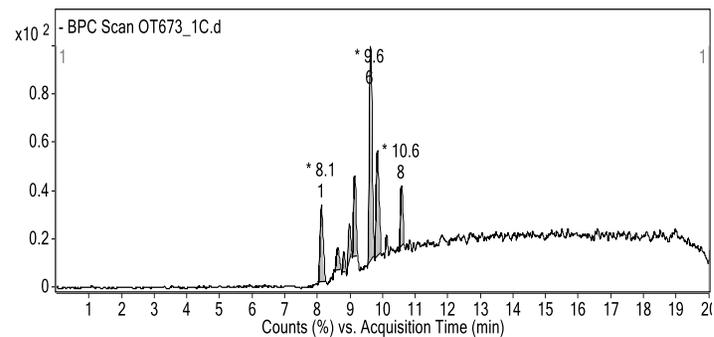
9,10-dBbF		Diferencia pareada					t	df	Significancia
		Promedio	Desv. Estandar	Error Estand Media	diferencia				
					Bajo	Alto			
Pair 1	Scen48h - Scen96h	-.84333	.49217	.28416	-2.06596	.37929	-2.968	2	.047
Pair 2	Scen72h - Scen96h	-1.47000	2.09492	1.20950	-6.67408	3.73408	-1.215	2	.348

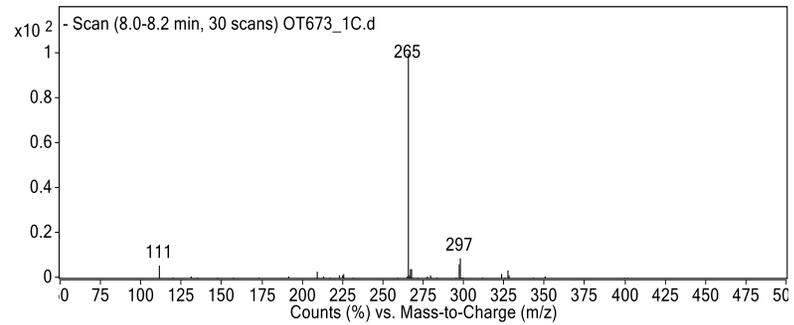
Anexo 9. Corriente iónica total y fragmentograma obtenido de cada metabolito

9-10dBaP

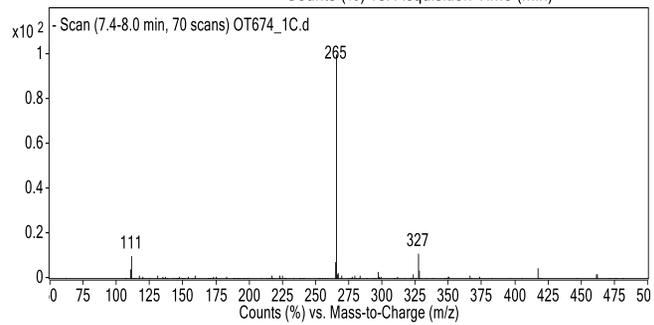
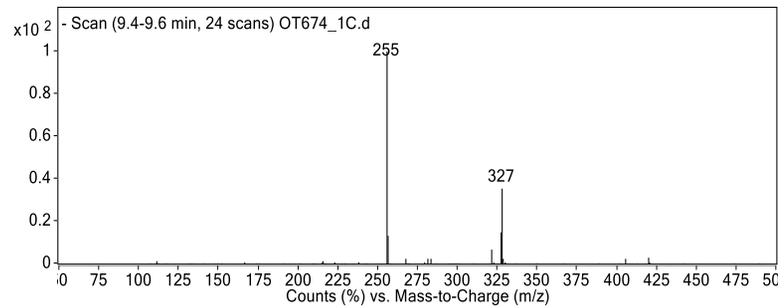
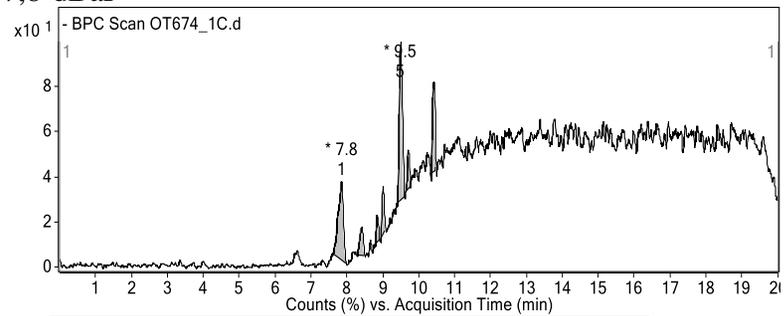


4,5-dBaP

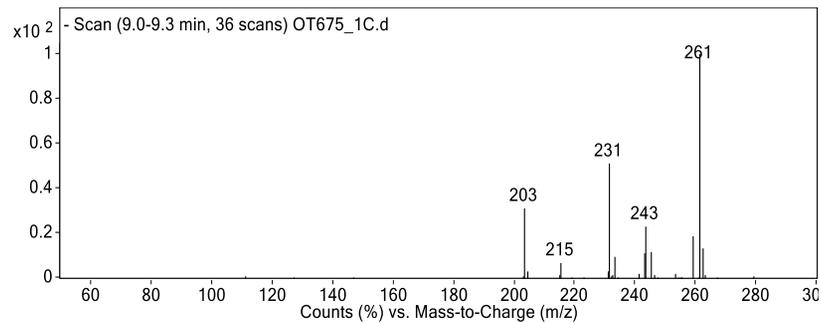
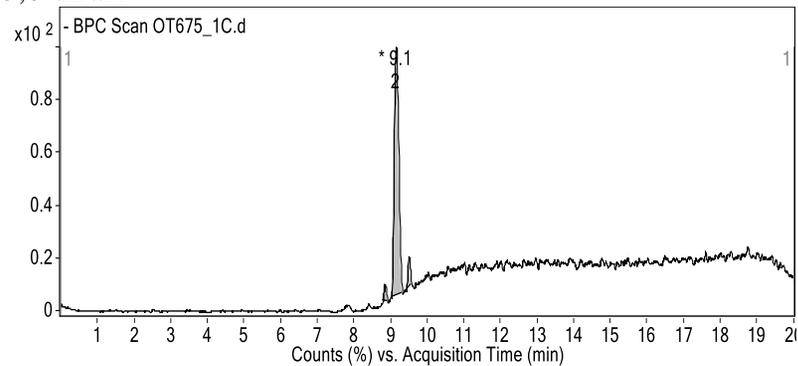




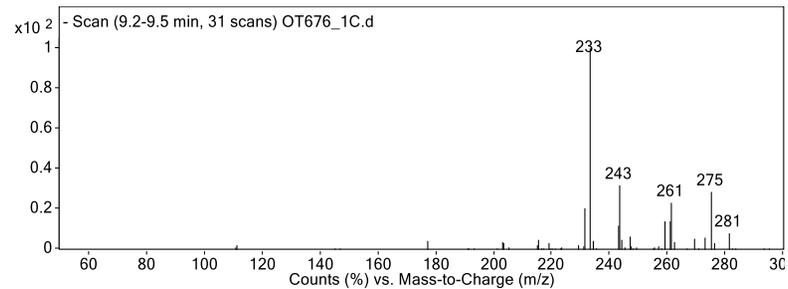
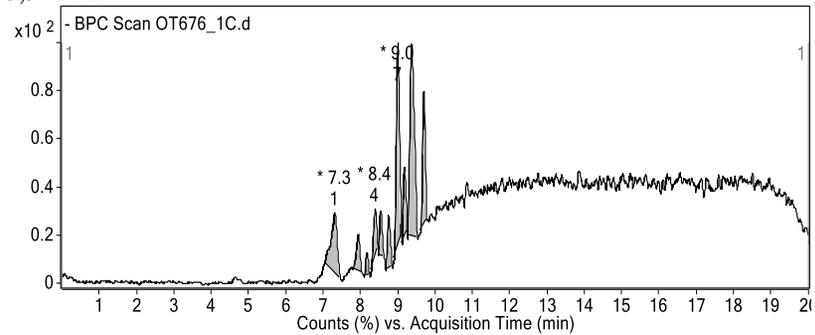
7,8-dBaP



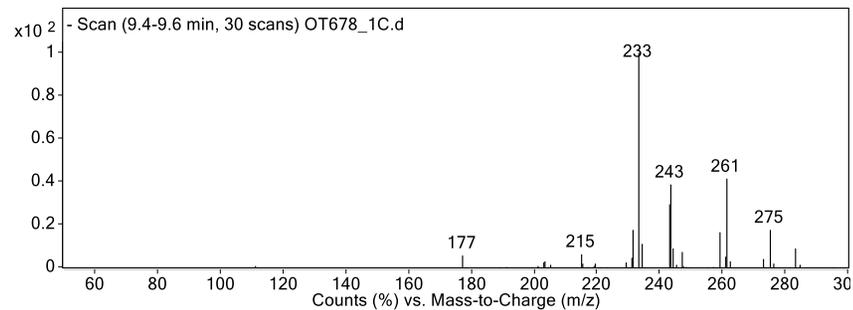
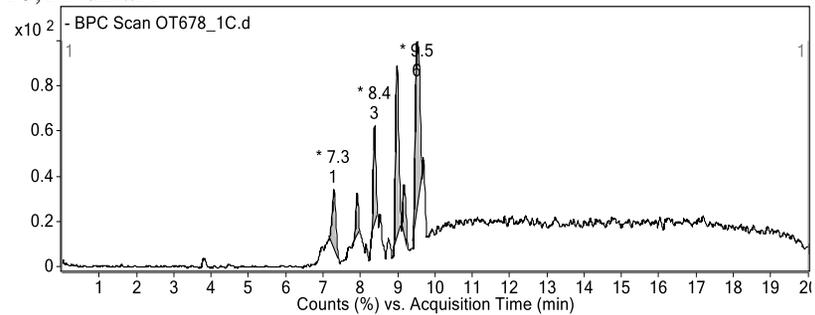
5,6-dBaA



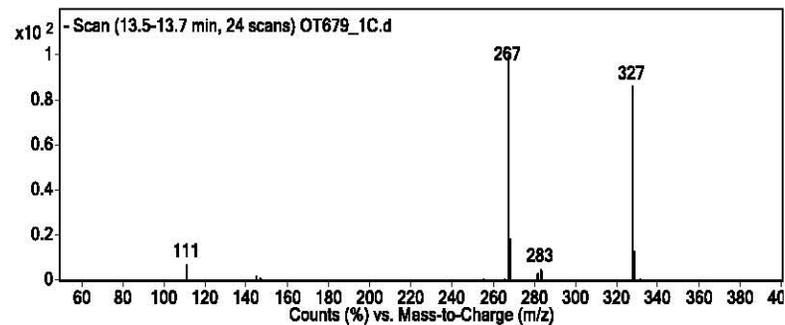
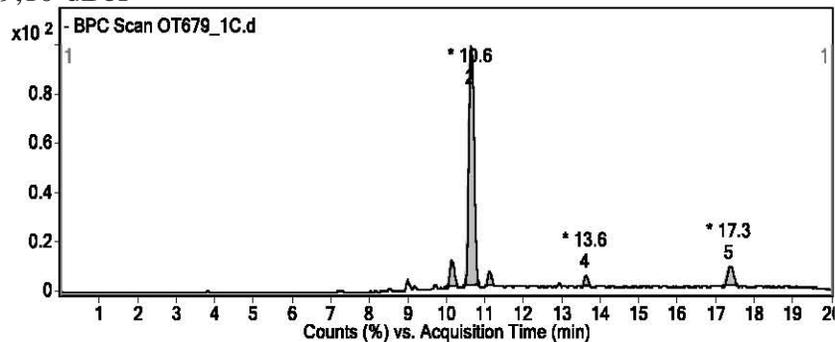
8,9-dBaA



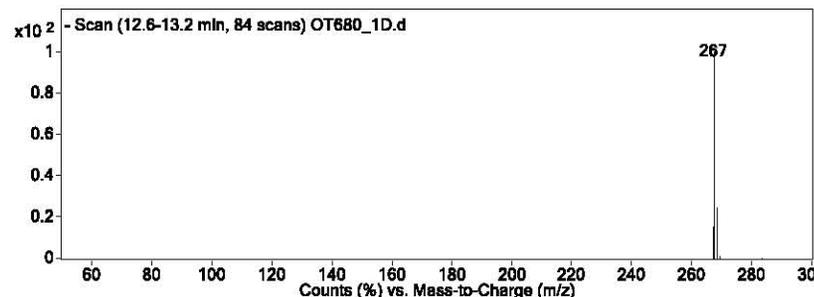
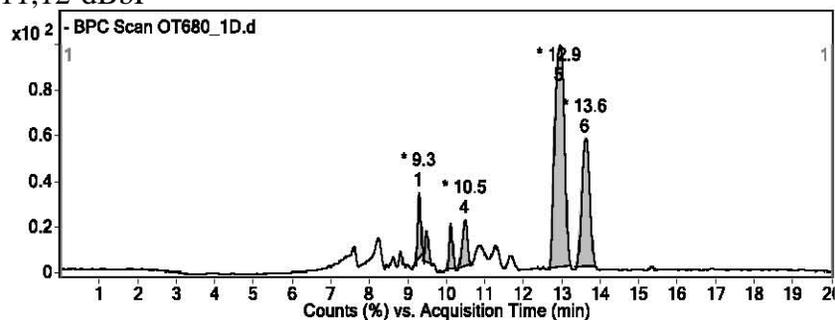
10,11-dBaA



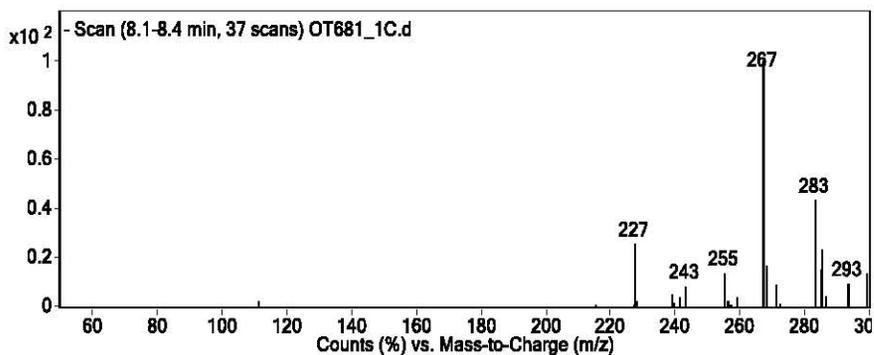
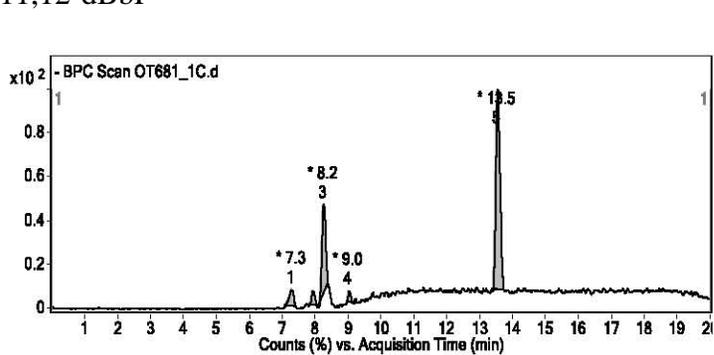
9,10-dBbF



11,12-dBbF



11,12-dBbF



Anexo 10. Resumen de fragmentos encontrados para los metabolitos tipo dihidrodiol en estándares y muestras

	Metabolito	Fragmento en estándar individual del metabolito	Muestra de medio líquido después de exposición		Muestra de biomasa después extracción	
			24h	48h	24h	48h
1	9,10-dBaP	265	265	265	265	NI
2	11,12-dBbF	267	NI	NI	NI	NI
3	1,2-dBbF	267	NI	NI	NI	NI
4	5,6-dBaA	261	233	233	233	233
5,6	8,9-dBaA, 10,11-dBaA	233	233	233	233	233
7	4,5-dBaP	265	265	NI	NI	NI
8	8,9-BkF	253	NI	NI	NI	NI
9	7,8-dBaP	265	265	NI	NI	NI
10	9,10-dBbF	267	NI	NI	NI	NI

NI No identificado

Compuestos desconocidos

	Metabolito	Muestra de medio líquido después de exposición		Posibilidad
		24h	48h	
1	D1	233, 137	233	Metabolito H ⁺ de BaA
2	D2	233	NI	Metabolito del BaA
3	D3	255	NI	Dihidrodiol BaP
4	D4	265,233	265	Metabolito H ⁺ de BaA ó BaP
5	D5	279, 233	279,233	Metabolito BaA
6	D6	279	279	Desconocido
7	D7	NI	NI	Desconocido
8	D8	NI	NI	Desconocido
9	D9	NI	NI	Desconocido

NI No identificado

Anexo 11 Artículo publicado como resultado de la investigación