



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS POR LA MICROALGA *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*
MEDIANTE METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y DISPERSIÓN DE
MATRIZ EN FASE SÓLIDA ACOPLADO A CLAR-UV**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

GABRIEL DÍAZ FLORES



MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ
VOCAL: JUAN MANUEL RODRIGUEZ
SECRETARIO: MARTHA PATRICIA GARCIA CAMACHO
1er. SUPLENTE: SILVIA CITLALLI GAMA GONZALEZ
2° SUPLENTE: ADRIAN DE SANTIAGO ZARATE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 3D ANEXO, EDIFICIO A 3ER PISO, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ANALÍTICA, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA**

ASESOR DEL TEMA:

MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO: _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

JOSÉ DE JESÚS OLMOS ESPEJEL: _____

SUSTENTANTE:

GABRIEL DÍAZ FLORES: _____

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
General.....	3
Particulares.....	3
1. ANTECEDENTES.....	4
1.1. Fuente, origen y formación de los HAPs.....	4
1.2. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs.....	4
1.3. HAPs en el ambiente.....	7
1.4. Exposición humana a los HAPs.....	7
1.5. Degradación de HAPs en el ambiente.....	10
1.6. Características de las microalgas.....	12
1.7. Metodología analítica para la determinación de los HAP.....	13
1.7.1. Extracción en Fase Sólida (EFS).....	14
1.7.1.1. Teoría de la EFS.....	14
1.7.1.2. Procedimiento de EFS.....	15
1.7.2. Dispersión en Matriz de Fase Sólida (DMFS).....	16
1.7.2.1. Teoría de la DMFS.....	17
1.7.2.2. Procedimiento de la DMFS.....	17
1.7.3. Análisis instrumental de los HAPs.....	18
1.7.3.1. Parámetros cromatográficos.....	19
2. Desarrollo Experimental.....	23
2.1. Material y equipo.....	23
2.1.1. Sistema cromatográfico.....	23
2.1.2. Preparación de la muestra.....	23
2.1.3. Disolventes y estándares.....	24
2.1.4. Cultivo axénico, mantenimiento de microalgas y ensayos de exposición.....	24
2.1.5. Preparación de disoluciones estándar de los HAPs.....	24
2.2. Experimentación.....	25
2.2.1. Condiciones óptimas para la detección de los HAPs.....	25
2.2.2. Determinación de k'	26
2.2.3. Determinación de la linealidad del sistema.....	26

2.2.4.	Determinación de la repetibilidad y reproducibilidad dentro del sistema	27
2.2.5.	Límites de detección y cuantificación teóricos	27
2.2.6.	Optimización de los métodos EFS y DMFS con estándares sin muestra.....	27
2.2.6.1.	Método EFS- CLAR UV para extraer los HAPs del medio líquido	28
2.2.6.1.1.	Frente de elución por EFS.....	29
2.2.6.2.	Método DMFS- CLAR UV para extraer HAPs de la biomasa.....	29
2.2.6.2.1.	Frente de elución por DMFS.....	29
2.2.7.	Optimización de los métodos EFS y DMFS con muestras fortificadas	30
2.2.8.	Ensayos de exposición.....	30
3.	Resultados y discusión	32
3.1.	Condiciones óptimas para la detección de los HAPs.....	32
3.2.	Determinación de k'	32
3.3.	Determinación de la linealidad del sistema	34
3.4.	Repetibilidad y reproducibilidad del sistema.....	35
3.5.	Límites de detección y cuantificación del sistema	36
3.6.	Optimización de los métodos EFS y DMFS con estándares sin muestra.....	37
3.6.1.	Optimización del método EFS CLAR-UV	37
3.6.2.	Optimización del método de DMFS CLAR-UV	38
3.7.	Optimización de los métodos EFS y DMFS con muestras fortificadas	39
3.7.1.	Interferencias	40
3.8.	Métodos de EFS y DMFS optimizados.....	41
3.9.	Ensayos de exposición.....	42
3.9.1.	Ensayos de exposición con hidrocarburos solos.....	42
3.9.1.1.	Benzo[a]antraceno	42
3.9.1.2.	Benzo[b]fluoranteno	43
3.9.1.3.	Benzo[k]fluoranteno	45
3.9.1.4.	Benzo[a]pireno.....	46
3.9.1.5.	Comparación entre ensayos de exposición.....	48
3.9.2.	Exposición de HAPs en combinación por pares	51
3.9.2.1.	Benzo[a]antraceno + Benzo[a]pireno	51
3.9.2.2.	Benzo[b]fluoranteno + Benzo[a]pireno	54
3.9.2.3.	Benzo[k]fluoranteno + Benzo[a]pireno.....	55
Conclusiones	56

Bibliografía	57
Anexo I.....	i
Anexo II.....	iii
Anexo III.....	vii

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes ubicuos en la naturaleza. De entre ellos, aquellos de alto peso molecular son relevantes ya que sus características fisicoquímicas los hacen poco propensos a ser degradados en condiciones naturales, por lo que persisten en el ambiente por largos periodos de tiempo. Estos compuestos son tóxicos, y carcinogénicos por lo que se les considera de interés prioritario y es necesario encontrar alternativas eficientes para su remoción del ambiente.

Algunos estudios han demostrado la capacidad de la microalga de agua dulce *Selenastrum capricornutum* para degradar Benzo[a]pireno, un HAP de alto peso molecular representativo de este grupo, con lo que se abre la posibilidad de emplear este microorganismo en situaciones de biorremediación. Sin embargo, es importante que para que esto sea posible, se evalúe correctamente la capacidad de esta alga para degradar otros HAPs de alto peso molecular y bajo diversas condiciones. Con esto en mente, es necesario contar con herramientas analíticas capaces de evaluar la cantidad de hidrocarburo presente no solo en el medio líquido donde las algas se desarrollan, sino también en matrices sólidas como la biomasa debido a los fenómenos de transporte que ocurren en sistemas acuosos con estos hidrocarburos.

Es por esto que en este trabajo de tesis se optimizaron dos métodos analíticos basados en la extracción con adsorbentes sólidos y la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica en la región del ultravioleta (CLAR-UV) para la cuantificación de HAPs a nivel de partes por millón en los diferentes componentes de los cultivos de *Selenastrum capricornutum*. Así, la Extracción en Fase Sólida (EFS) se usó para aislar a los HAPs del medio líquido y la Dispersión en Matriz de Fase Sólida (DMFS) para aislar a los HAPs de la biomasa; los extractos se analizaron por CLAR-UV. Estos métodos analíticos lograron ser lineales, sensibles y reproducibles por lo que se aplicaron con éxito en diversos ensayos de exposición del alga frente a cuatro HAPs de alto peso molecular: Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno y Benzo[a]pireno. En estos ensayos, el alga demostró poseer una excelente capacidad para degradar los cuatro HAPs en tiempos cortos, reduciendo importantemente la concentración de estos compuestos en las primeras 24 horas de exposición. Posteriormente, se probó la capacidad del alga para degradar estos mismos compuestos en distintas combinaciones por pares. En la mayoría de estos casos la degradación se vio disminuida, sin que esto signifique que el alga no sea apta para contextos de contaminación mixta de HAPs.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados en arreglos lineales, angulares o en racimo. Son originados tanto por fenómenos naturales como por actividades humanas; teniendo estas en común la combustión incompleta de materia orgánica (1). Los HAPs son considerados contaminantes peligrosos debido a que presentan toxicidad aguda y crónica, y aquellos de alto peso molecular (más de tres anillos) presentan capacidad mutagénica y carcinogénica (2).

Los HAPs en el ambiente pueden sufrir adsorción, volatilización, fotólisis, degradación química y degradación microbiana; sin embargo los HAPs de alto peso molecular son recalcitrantes y pueden permanecer en el ambiente sin sufrir alteración por años. La degradación microbiana es la principal ruta de desaparición de HAPs del ambiente, por lo que la utilización de microorganismos para la biorremediación de suelos contaminados con HAPs ligeros se ha realizado de forma eficiente con diversas especies de bacterias, hongos y algas (3). Sin embargo, se ha observado que la mayoría de ellos poseen limitada o nula capacidad de metabolizar HAPs de alto peso molecular, compuestos persistentes en el ambiente. La recalcitrancia de los HAPs de alto peso molecular y su resistencia al ataque microbiano se debe, en gran medida, a la poca solubilidad de estos en agua y por tanto su pobre biodisponibilidad.

Los HAPs pueden estar presentes en muchos escenarios de contaminación ambiental como son los derrames petroleros, los incendios forestales y la actividad industrial entre otros. Los HAPs se presentan en mezclas complejas de hasta 100 HAPs distintos, nunca una especie sola, y frecuentemente están acompañados de otros contaminantes como hidrocarburos de cadena larga y metales pesados (4). La presencia concomitante de HAPs y otros contaminantes hace más complejo el panorama de contaminación y remediación tanto por la toxicidad de cada una de las especies, como por su sinergia y/o competencia.

Dentro del grupo de los microorganismos, las microalgas han sido menos estudiadas en cuanto a su capacidad de remoción de HAPs, aún cuando tienen un alto potencial para efectuar esta tarea. Microalgas de agua dulce como *Selenastrum capricornutum* y *Chlorella vulgaris* han demostrado tolerancia hacia contaminantes comunes como pesticidas y HAPs (5). Se conoce también que algunas especies de microalgas, entre las que también se encuentra *S. capricornutum*, poseen la capacidad de metabolizar al Benzo[*a*]pireno a cis-dihidrodióles (6). Entonces, es necesario que los estudios de bioacumulación y/o biodegradación de HAPs de alto peso molecular en este tipo de microalgas sean efectuados con más detalle. Para esto, se requiere de la ayuda de metodología analítica eficiente para la extracción y análisis de trazas de los contaminantes en muestras

biológicas como son los cultivos de microalgas, considerados como altamente complejos desde el punto de vista analítico.

Para el aislamiento de los HAPs en muestras biológicas, como los cultivos de microalgas que se utilizan en los estudios de su bioacumulación y biodegradación, se han empleado las técnicas de extracción líquido-líquido clásica (4) (6) y la extracción asistida por sonicación (7). Estos métodos, aunque ampliamente utilizados, presentan desventajas como el elevado uso de disolventes tóxicos de alta pureza, los cuales generalmente deben ser evaporados para concentrar los analitos por analizar, y la gran cantidad de tiempo que estos métodos requieren.

Las técnicas de separación basadas en el uso de adsorbentes como la Extracción en Fase Sólida (EFS) y la Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (DMFS) representan una muy buena opción para la preparación analítica de muestras complejas como las provenientes de cultivos biológicos, ya que permiten realizar el aislamiento de los analitos con el uso de pequeñas cantidades de muestra y disolventes. Los principios fundamentales de la EFS y LA DMFS se basan en los de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, por lo que su combinación con ésta poderosa técnica de análisis, proporciona una excelente herramienta para la determinación de trazas de los HAPs en los principales componentes de los cultivos de microalgas (biomasa y medio líquido).

Trabajos anteriores en el grupo de investigación desarrollaron y validaron un método de separación y análisis por cromatografía de líquidos para algunos HAPs pesados y metabolitos del Benzo(a)pireno que emplea un detector de fluorescencia (8), el cual también está indicado para la detección y cuantificación de estos mismos analitos. La sensibilidad de este detector, al ser mucho mayor que un detector UV-DAD, lo hace más propicio para determinar las concentraciones de ng g^{-1} que presentan los metabolitos. Para el propósito del presente trabajo se optó por un detector UV-DAD acoplado al cromatógrafo de líquidos, ya que las concentraciones esperadas de los HAP en los extractos se encontraban en el orden de $\mu\text{g Kg}^{-1}$, suficientes para seguir en el tiempo, su desaparición en ensayos de exposición con las microalgas. Debido al cambio mencionado, fue necesario evaluar parámetros como el límite de detección, la linealidad del sistema y la precisión, así como optimizar la composición de la fase móvil isocrática para la óptima resolución de los analitos. Se hicieron también modificaciones al adsorbente utilizado en los métodos de preparación de muestra por lo que fue necesario volver a evaluar y optimizar el Volumen de Recobro.

OBJETIVOS

General

- Aplicar una metodología analítica para la determinación de cuatro HAPs de alto peso molecular: Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno y Benzo[a]pireno en cultivos de microalgas, con base en técnicas de extracción con adsorbentes (EFS y DMFS) seguidas de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector UV.

Particulares

- Optimizar la composición de la fase móvil del sistema cromatográfico para la óptima resolución y detección de cuatro HAPs de alto peso molecular
- Optimizar el volumen de recobro de un método basado en la técnica de Extracción en Fase Sólida para la extracción de HAPs de alto peso molecular del medio líquido de cultivo de microalgas.
- Optimizar el volumen de recobro de un método basado en la técnica de Dispersión en Matriz en Fase Sólida y para la extracción de HAPs de alto peso molecular en la biomasa de cultivos de microalgas.
- Realizar ensayos de exposición de *Selenastrum capricornutum* frente a los cuatro HAPs antes mencionados y diversas combinaciones de estos a diferentes tiempos de exposición, para evaluar su capacidad de degradación

1. ANTECEDENTES

1.1. Fuente, origen y formación de los HAPs

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), también conocidos como hidrocarburos aromáticos polinucleares son una clase de compuestos químicos formados solamente de carbono e hidrogeno, con dos o más anillos aromáticos fusionados en arreglos lineares, angulares o en racimo. Se presentan como contaminantes ubicuos volátiles, semivolátiles y en partículas (9).

Los HAPs se presentan de forma natural como componentes de las ceras de las plantas, aceites vegetales, cutículas de insectos y lípidos de microorganismos. El petróleo es la principal fuente de HAPs, aunque se ha demostrado que algunos procesos geológicos, principalmente la diagénesis, pueden generar también HAPs (10). Estos compuestos se forman siempre que la materia orgánica está expuesta a altas temperaturas y normalmente son más estables que sus precursores. La diagénesis del carbón y el carbón mineral sin quemar pueden ser fuentes importantes de HAPs en el ambiente, especialmente en aquellas regiones con una importante industria minera del carbón (11).

Las fuentes antropogénicas de los HAPs se pueden clasificar en dos: una es el derrame accidental o el vertido intencional de estos compuestos en forma de creosote, alquitrán de hulla, petróleo y sus derivados, mientras la otra es la combustión incompleta de diversos materiales, especialmente la quema de combustibles fósiles, la incineración de basura, o como productos secundarios de algunas actividades industriales como la gasificación del carbón y la refinación del petróleo; la quema de combustibles fósiles significa más del 75% de del total de emisiones de HAPs en países industrializados (12). Existen más de 100 HAPs diferentes, los cuales se presentan como mezclas complejas y nunca como un solo compuesto puro (13). La Agencia de Protección del Medio Ambiente (USEPA por sus siglas en inglés) de Estados Unidos considera a 16 de estos HAPs como prioritarios por su persistencia y toxicidad.

1.2. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs

Los HAPs son sólidos a temperatura ambiente con una baja presión de vapor. Pueden existir como hojas, láminas o agujas y presentar colores desde verde, amarillo, azul o incluso incoloro. Todos los HAPs son relativamente insolubles en agua y ligeramente solubles en etanol, acetona o ácido; la mayoría son solubles en benceno. (14). En general la solubilidad de los HAPs en agua decrece y su hidrofobicidad se incrementa entre mayor sea su número de anillos aromáticos fusionados. Además la volatilidad de los HAPs decrece conforme aumenta el número de anillos (1).

En la tabla 1.2.1 se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas de algunos de los HAPs de más de cuatro anillos aromáticos más representativos.

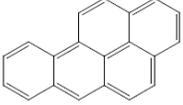
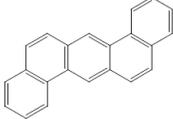
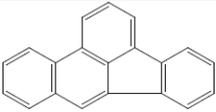
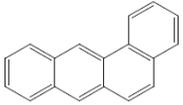
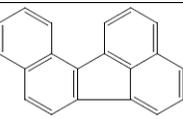
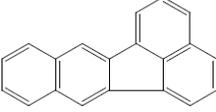
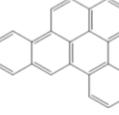
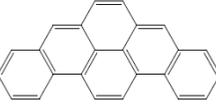
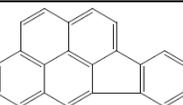
Nombre	Fórmula	Estructura	Peso molecular	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (µg/L)
Dibenzo[a,l]pireno	C ₂₄ H ₁₄		302	595	n.a
Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂		252	496	3.8
Dibenzo[a,h]antraceno	C ₂₂ H ₁₄		278	524	0.5
Benzo[b]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂		252	481	1.2
Benzo[a]antraceno	C ₁₈ H ₁₂		228	437	40
Benzo[j]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂		252	467	6.76
Benzo[k]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂		252	480	0.8
Dibenzo[a,e]pireno	C ₂₄ H ₁₄		302	552	0.2
Dibenzo[a,h]pireno	C ₂₄ H ₁₄		302	596	n.a
Dibenzo[a,i]pireno	C ₂₄ H ₁₄		302	552	0.5
Indeno[1,2,3-cd]pireno	C ₂₂ H ₁₂		276	497	27

Tabla 1.2.1: Propiedades fisicoquímicas de algunos HAPs de Alto Peso Molecular

1.3. HAPs en el ambiente

La concentración de los HAPs en el aire de las ciudades está menos relacionada con el tamaño de la ciudad y más relacionado con el tipo de industrias que ella alberga. La mayoría de los HAPs de alto peso molecular en el aire están asociados o fuertemente adsorbidos a partículas. En general los HAPs del alto peso molecular permanecen en fase gaseosa por encima de los 150°C pero se condensan rápidamente en las partículas de ceniza por debajo de esa temperatura, mientras que los de bajo peso molecular pueden permanecer en fase gaseosa hasta que son depositados mediante precipitación (12).

Los HAPs también pueden llegar al suelo mediante tratamientos de la tierra. Por ejemplo, en EUA y Europa, los sedimentos de las aguas residuales se aplican a las tierras cultivables como fertilizante y se ha demostrado que estos lodos contienen concentraciones significativas de HAPs (13). En los países industrializados se ha encontrado un crecimiento muy marcado en las concentraciones de HAPs en el suelo a partir de mediados de los 1800 y alcanzando un máximo en los años 1950/1960.

Los HAPs presentes en el agua se pueden originar por el lavado de la superficie, por ejemplo, de la erosión del pavimentado o de la deposición de partículas suspendidas en el aire. Los efluentes industriales también pueden contribuir a las concentraciones de HAPs en las aguas superficiales. Sin embargo, las concentraciones de HAPs en el agua son muy bajas generalmente, debido a su baja solubilidad en este medio. Las concentraciones de HAPs en el agua superficial normalmente no exceden los 50 ng/L; concentraciones más altas se encuentran en sitios contaminados. Las concentraciones de HAPs son más elevadas en el agua de lluvia que en el agua superficial (100 a 200 ng/L, con algunas muestras excediendo los 1 000 ng/L), y las concentraciones de HAPs en los sedimentos de los cuerpos acuáticos pueden ser muy elevadas, llegando a los varios miles de microgramos por kilogramo (14). Se acepta generalmente que si en los sedimentos predominan HAPs sustituidos (tal como derivados de alquilo), entonces el origen de la contaminación es por petróleo o sus derivados; sin embargo, si predominan HAPs sin sustituir, entonces el origen de la contaminación es por combustión (1)

1.4. Exposición humana a los HAPs

Las vías por las que los humanos estamos expuestos a los HAPs son varias y dependen en gran medida del estilo de vida y región geográfica. La exposición a los HAPs se puede dividir en tres grupos: cutánea, respiratoria y gástrica. La vía cutánea es importante en la exposición laboral,

siendo especialmente susceptibles a esta exposición aquellas personas que laboran en las plantas de gasificación del carbón, obtención de alquitrán de hulla, plantas siderúrgicas y bomberos; también aquellas personas que utilizan regularmente cremas a base de aceites minerales o alquitrán de hulla, para el tratamiento de eczema, psoriasis y dermatitis están expuestas a una importante concentración de HAPs por esta vía (15) (14).

La vía respiratoria es importante en la mayoría de la exposición no laboral de la población en general. Los incendios forestales y las erupciones volcánicas son la principal fuente natural de HAPs en el aire; sin embargo el uso de combustibles fósiles, la quema de basura, las actividades industriales y el uso de leña, petróleo y carbón para cocinar cuentan como la principal fuente de contaminación por HAPs total en áreas densamente pobladas (la quema de aceite o gas produce muchas menores cantidades de HAPs). En áreas urbanas, los gases de los automóviles, especialmente vehículos de diesel y el sellador del pavimento (chapotote) cuentan como las principales fuentes de HAPs en el aire, esta última contribuyendo más que la primera (16), haciendo que las áreas cercanas a las vialidades presenten una mayor concentración de HAPs que las áreas alejadas de estas. Las concentraciones medias de los HAPs individuales en el aire urbano oscilan entre 1 a 30 ng/m³ (2). En países nórdicos, las concentraciones de HAPs en el aire durante invierno, donde la calefacción residencial es una fuente importante de HAPs, son hasta 50 veces mayores que las concentraciones en verano (17). En el Distrito Federal de México, este fenómeno es menos marcado pero sigue la misma tendencia. Las concentraciones de HAPs en invierno pueden ser hasta de cuatro veces más que las concentraciones en verano (18)

Se estima que más del 85% de los HAPs en partículas en el aire se encuentran condensados o adsorbidos a partículas de un diámetro menor a 5 µm; estas partículas se consideran “partículas respirables” ya que pueden pasar las vías aéreas superiores y llegar a las vías aéreas inferiores e incluso a los alveolos, de forma que la mayoría de los HAPs en la atmósfera puede contribuir a problemas de salud (12). El humo de tabaco es una fuente principal de exposición a los HAPs en fumadores activos y pasivos. Las concentraciones totales de los HAPs en el humo directo (el que proviene de la boquilla e inhala el fumador) oscilan entre 1 a 1.6 µg/cigarro. El humo indirecto (de la punta del cigarro que se quema lentamente) es una fuente importante de HAPs en el ambiente del interior de hogares y oficinas. Las concentraciones de Benzo[a]pireno en el humo indirecto oscilan entre 52 a 95 ng/cigarro más de tres veces la concentración en el humo directo (14). Sin embargo, otras fuentes de exposición pueden superar al tabaquismo en cuanto a concentraciones de HAPs. El humo de fogata puede contener hasta 70 mg Kg⁻¹ de BaP, lo cual es aproximadamente 350 veces mayor a la concentración del humo de cigarro (1). El nivel aceptado por la OMS de BaP

es 0.01 ng/m^3 para que el riesgo de cáncer de pulmón sea 10^{-6} (un caso adicional de cáncer por exposición al BaP en un grupo de 10^6 personas).

La vía gástrica es una fuente importante de HAPs para la exposición de la población en general; hasta el 70% de la exposición a HAPs de un no-fumador es mediante la dieta (19). Los HAPs se encuentran presentes en vegetales de hoja verde como lechuga, espinaca, té y tabaco, principalmente por la deposición de partículas de la atmósfera sin embargo, menos del 10% de los HAPs presentes en los vegetales pueden ser removidos mediante lavado con agua (12). Los HAPs se encuentran también presentes en cereales, y leguminosas secadas mediante calor (20) y aquellos alimentos elaborados a base de estas semillas (14). Los HAPs se encuentran en carne y pescado frescos, principalmente por la contaminación de suelos y alimento de los animales de engorda, como también por derrames petroleros y otras fuentes de contaminación de los cuerpos de agua. Sin embargo, por mucho la mayor cantidad de HAPs en los alimentos se debe al proceso de cocción, siendo la cocción a altas temperaturas de la carne y vegetales al carbón los procesos que más contaminan los alimentos con HAPs. Se han identificado hasta 23 HAPs en el humo de carbón para cocción (21) y se considera que la carne a las brazas o al carbón –especialmente la “bien cocida” y “muy bien cocida”- es la que más contribuye al consumo de HAPs en la alimentación. Los HAPs también pueden encontrarse en los alimentos debido a algunos procesos de conservación, especialmente el ahumado (22).

Si bien las estimaciones de la ingesta diaria de HAPs provenientes de la comida varían ampliamente; oscilando desde unos pocos nanogramos, hasta algunos microgramos por persona, los métodos de preparación de la comida contribuyen significativamente a esta variación; por ejemplo, en comidas ahumadas en hornos convencionales de ahumado, la concentración promedio de Benzo[a]pireno fue de $1.2 \mu\text{g/Kg}$ y de $9 \mu\text{g/Kg}$ de HAPs totales, comparado frente a $0.1 \mu\text{g/Kg}$ de Benzo[a]pireno y $4.5 \mu\text{g/Kg}$ de HAPs totales en la comida tratada en hornos modernos (14). El agua potable no se considera una fuente importante de exposición a los HAPs por la vía gástrica. En el agua potable, los HAPs más comunes son el fluoranteno, fenantreno, antraceno y pireno, los cuales no se consideran carcinogénicos. Se estima que el consumo promedio de HAPs mediante el agua potable es apenas el 1% del nivel aceptable (19). Sin embargo, la presencia de HAPs aún en una concentración muy baja en el agua es suficiente para que ocurran fenómenos de bioacumulación en algunos organismos marinos como mejillones (23), anfibios (24), algas y moluscos los cuales tienen una limitada capacidad de metabolizar los HAPs. Los crustáceos y peces no presentan bioacumulación ni biomagnificación ya que poseen una capacidad adecuada de metabolizar estos compuestos (25).

La transformación metabólica de los HAPs en vertebrados resulta en un patrón complejo de quinonas isoméricas, fenoles, dihidrodioles y otros metabolitos. Las reacciones de oxidación se deben a la acción de las enzimas citocromo P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), mientras que las de hidroxilación son debidas a la enzima epóxido hidrolasa. El resultado final del metabolismo varía entre hidrocarburos. Mientras que la mayoría de los metabolitos son excretados como tales o como sus productos de conjugación con el glutatión, un porcentaje significativo se une covalentemente a macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos, especialmente el ADN llevando a la carcinogénesis. En el caso del Benzo[a]pireno, se ha demostrado que es el diol epóxido de este compuesto su principal metabolito reactivo carcinogénico (12).

1.5. Degradación de HAPs en el ambiente

El arreglo espacial de los anillos en la molécula de los HAPs afecta su estabilidad ambiental y por tanto su distribución natural. Por ejemplo, los arreglos lineales como el antraceno y el tetraceno son los menos estables, y generalmente no persisten en la naturaleza a menos que sean secuestrados en ciertas matrices orgánicas o inorgánicas. Por otro lado, el arreglo más estable es el del tipo anular, como el fenantreno, criseno y piceno (12). Los HAPs con cuatro o cinco anillos fusionados son más estables y resistentes al ataque microbiano que los de dos o tres anillos, y por tanto persistirán más en el ambiente. La resistencia de los HAPs al ataque microbiano aumenta directamente con el aumento en su peso molecular y su coeficiente de reparto octanol/agua ($\log K_{ow}$) (26)

Los HAPs en la atmósfera, tanto libres como asociados a partículas son sujetos a una variedad de reacciones químicas o foto-químicas. Entre las reacciones más importantes se encuentran las reacciones con los óxidos de nitrógeno y azufre, reacciones fotoquímicas con el oxígeno, y reacciones con otros contaminantes producidos por fotólisis como el ozono, peroxiacetilnitrato y los radicales peroxil e hidroxil (12). Se ha encontrado que la irradiación del polvo durante 6 horas resulta en una descomposición del 15 – 20% de los HAPs adsorbidos (19).

Los HAPs son compuestos hidrófobos y su persistencia en el ambiente se debe mayormente a su baja solubilidad en agua (26), adsorbiéndose rápidamente a partículas de suelo y sedimento marino, siendo directamente proporcional la cantidad de carbón orgánico presente en el suelo con la retención de los HAPs en este (27). Como regla general, entre mayor sea el peso molecular del HAP en cuestión, mayor su retención en suelo o sedimentos y menor su biodisponibilidad. Los HAPs son eliminados de los sitios contaminados, principalmente mediante la biodegradación microbiana (26) (1).

Los suelos y sistemas con alto contenido persistente de HAPs son abundantes en microorganismos con capacidad de metabolizar HAPs, principalmente bacterias. De estos ambientes se han aislado numerosas bacterias que además de su capacidad de degradar los HAPs, pueden usarlos como fuente de carbón, sin embargo muchos HAPs de Alto Peso Molecular (HAP-APM) son degradados solamente parcialmente o no lo son en absoluto por parte de bacterias, debido a su baja solubilidad en agua, alta energía de resonancia y su toxicidad. Se han identificado numerosos hongos filamentosos, especialmente los de la “podredumbre blanca” de la madera, capaces de co-metabolizar HAPs mediante mecanismos inespecíficos de degradación de compuestos orgánicos, especialmente de la lignina (1).

A pesar que se han identificado diferentes microorganismos capaces de metabolizar BaP, la biodegradación no se ha demostrado con otros de los HAPs-APM. Además, es necesario que se identifiquen aquellos microorganismos que tengan la capacidad de metabolizar diversos HAPs al mismo tiempo; esto porque los HAPs siempre se presentan en mezclas complejas y nunca como uno solo en el ambiente (13), además de que, por lo general los sitios contaminados con HAPs muestran contaminación significativa de otros compuestos como metales pesados e hidrocarburos alifáticos entre otros.

Algunos factores físicos, químicos o ambientales pueden influir en la tasa de biodegradación de los HAPs. La degradación de los HAPs puede no ocurrir debido a la falta de nutrientes esenciales (como el nitrógeno, fósforo o potasio) o substratos de crecimiento, temperaturas inferiores a las óptimas, disponibilidad de oxígeno o un pH diferente al óptimo. Los HAP-APM pueden no estar biodisponibles debido a su baja solubilidad en agua o, por el contrario, puede encontrarse a una concentración que resulte tóxica para los microorganismos. Debido a su estructura química, los HAPs absorben luz visible (400-750 nm) y ultravioleta (280-400 nm) y son particularmente sensibles al efecto fotoquímico de la luz UV, dando lugar a derivados, mucho más reactivos y tóxicos que los HAPs originales; esta toxicidad incrementada da lugar a una disminución en la capacidad de los microorganismos para degradar los hidrocarburos, ya que los efectos tóxicos de los productos de la fotooxidación, también llamada fototoxicidad, pueden mermar la población y disminuir el metabolismo de los organismos (28). En otros casos, los HAP-APM pueden no ser transportados adecuadamente al interior de la célula, pueden no ser un sustrato adecuado para las enzimas disponibles o pueden no inducir los transportadores o las enzimas necesarias. Cuando estos parámetros no son limitantes, es la biodisponibilidad el factor limitante de la biodegradación de los HAP-APM (1)

Pocos estudios han reportado la degradación de HAPs por parte de microalgas y cianobacterias; sin embargo Warshawsky y colaboradores han demostrado la capacidad de *Selenastrum capricornutum*, una alga verde unicelular de agua dulce, de degradar BaP; un HAP-APM a cis-dihidrodiol, lo cual sugiere una vía enzimática de dioxigenasa (6). Cabe destacar que el sistema enzimático de dioxigenasa es característico de vías metabólicas bacterianas, a diferencia de otros sistemas eucariontes como los de los hongos, que utilizan sistemas de mono-oxigenasa. Sin embargo, cabe recalcar que estos estudios adolecen de una metodología analítica limitada que consume gran cantidad de muestra, disolventes, tiempo y altos límites de detección.

1.6. Características de las microalgas

Las algas son Talófitas (plantas que carecen de raíces, tallos y hojas), que cuentan con clorofila a como su principal pigmento fotosintético y carecen de un recubrimiento de células estériles alrededor de las células reproductivas. Esta definición puede albergar un gran número de plantas que no son cercanas entre sí necesariamente por ejemplo, las cianobacterias se encuentran más cerca evolutivamente de las bacterias que al resto de las algas (29).

En la mayoría de los casos, las algas se encuentran en ambientes acuáticos, ya sea en agua dulce, agua de mar o salobre. Sin embargo estas pueden ser encontradas en cualquier otro ambiente, desde la nieve de las montañas, hasta en la arena de los desiertos. En la mayoría de los hábitats las algas funcionan como los primeros productores de la cadena alimenticia, produciendo material orgánico a partir de la luz solar, agua y el dióxido de carbono, y produciendo el oxígeno necesario para el metabolismo de los organismos depredadores. En ese sentido, los humanos rara vez entran en contacto directo con las algas, sino que consumen organismos más arriba de la cadena alimenticia como crustáceos y almejas.

Existen dos tipos básicos de microalgas: las procariontes y las eucariotas. Las células procariontes carecen de organelos envueltos en una membrana (plástidos, mitocondrias, núcleo, aparato de Golgi y flagelos) y solamente se encuentran las cianobacterias en este rubro. El resto de las microalgas, incluyendo *Selenastrum capricornutum*, son eucariontes y poseen organelos bien definidos.

El alga en cuestión, *Selenastrum capricornutum* (ver Figura 1) pertenece a la clase Chlorophyceae. Forma pequeñas colonias de 2 a muchas células, generalmente en números pares. Las colonias son de forma irregular rodeadas de un envoltorio mucilaginoso sin estructura. Las células son lunares, fusiformes o helicoidales con terminaciones puntiagudas o redondeadas. Las pareces de las células

son lisas, sin ornamentación. Las células contienen un solo núcleo, un solo cloroplasto parietal y sin pirenoide. Su reproducción es asexual mediante autoesporas, de 2 a 4 por esporangio; las cuales son liberadas mediante la ruptura longitudinal o transversal de la pared celular de la progenitora. No se conoce si tienen estadios flagelados o de reproducción sexual. Forma parte del microplancton de lagos y estanques de agua dulce y se ha reportado tanto en Europa como en América del Norte. Esta especie ha sido ampliamente utilizada como marcador en los estudios de calidad del agua tanto para herbicidas como para otros contaminantes debido a que su reproducción se ve disminuida con la presencia de contaminantes en el medio (30).



Figura 1: Microfotografía de *Selenastrum capricornutum*.

Fuente: http://www.ccap.ac.uk/strain_info.php?Strain_No=278/4

1.7. Metodología analítica para la determinación de los HAP

Para aislar a los HAPs de las muestras ambientales sólidas tradicionalmente se ha trabajado con métodos de extracción exhaustiva líquido-sólido, seguido del análisis cromatográfico. Uno de los métodos más populares de extracción líquido-sólido es la extracción Soxhlet que fue desarrollada desde finales del siglo 19, pero que aún sigue siendo popular en muchos laboratorios hoy en día. Sin embargo, esta técnica requiere de volúmenes muy grandes de disolventes orgánicos altamente purificados, con grandes costos tanto en su obtención como en su desecho y su uso por prolongados periodos de tiempo representa un riesgo para la salud de los analistas. Además se requieren largos tiempos de extracción debido a la lenta difusión de los analitos de la matriz al disolvente de extracción. Esta técnica además genera extractos sucios que requieren ser purificados en pasos subsecuentes, lo cual aumenta aún más los costos y tiempo de análisis. Se

calcula que el tiempo que requiere la preparación de la muestra por Soxhlet es cerca de dos tercios del tiempo total del análisis (31).

En el caso del aislamiento de HAPs y muchos otros contaminantes orgánicos, las matrices líquidas, la extracción líquido-líquido (ELL) clásica ha sido muy popular debido a su simplicidad, sin embargo adolece de problemas similares a los de la extracción Soxhlet para matrices sólidas: excesivo uso de disolventes orgánicos de alta pureza y la consecuente necesidad de desechar dichos solventes, largos tiempos de extracción y la necesidad de una limpieza posterior de los extractos. Aunque más selectiva que el Soxhlet, la ELL presenta algunas otras adversidades como son la necesidad de un estándar interno de extracción, la formación de emulsiones, la necesidad de controlar estrictamente las variables de temperatura, pH y fuerza iónica. Es por estas razones que ha existido una demanda cada vez mayor de técnicas que requieran una menor cantidad de disolventes orgánicos, menor tiempo de preparación y menor riesgo para la salud de los analistas. En estos aspectos, las técnicas de extracción con adsorbentes presentan muchas ventajas con respecto a las anteriormente descritas, como la posibilidad de realizar la extracción y concentración al mismo tiempo, la reducción del tamaño de muestra y materiales así como la facilidad para acoplarse directamente a las técnicas cromatográficas de análisis. A continuación se describen con más detalle los principios básicos y de operación de las dos técnicas basadas en el uso de adsorbentes utilizadas en el presente trabajo para la extracción de los HAPs de los cultivos de microalgas.

1.7.1. Extracción en Fase Sólida (EFS)

Si bien los instrumentos modernos de análisis como la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) poseen una alta sensibilidad y selectividad, las muestras no se analizan directamente, por lo que es frecuente que se requiera un paso de pre-concentración de los compuestos para analizar. En el caso de matrices complejas como los fluidos biológicos o como en nuestro caso, el sobrenadante de centrifugación proveniente de un medio de cultivo líquido de microorganismos, pueden encontrarse diversos interferentes que no solo alteren los resultados del análisis sino que pueden dañar el instrumental de análisis como serían proteínas, carbohidratos y las sales buffer, por lo que se requiere, además de concentrar los analitos, limpiar la matriz antes de analizarla por estos métodos.

Si bien la ELL ha sido ampliamente utilizada con estos propósitos, la EFS ofrece una alternativa con grandes beneficios: reduce el uso de disolventes orgánicos altamente purificados y onerosos, además de la exposición a estos, los costos y el tiempo de análisis. También, la EFS presenta la posibilidad de acoplarse en línea con los métodos instrumentales de análisis como la CLAR, presenta una alta selectividad con un espectro muy amplio de adsorbentes sobre los cuales elegir, se obtienen altos recobros con una selectividad muy alta dependiendo del adsorbente elegido y los disolventes de elución, los cuales son mínimos (32).

1.7.1.1. Teoría de la EFS

El principio de la EFS es similar al de la ELL, en que implican el reparto de los solutos entre dos fases diferentes. Sin embargo, en vez de dos fases líquidas inmiscibles como en la ELL, la EFS involucra la distribución de los analitos entre una fase líquida (en este caso la muestra) y un

adsorbente sólido. Sin embargo, los principios básicos de la EFS son más extensos porque ésta técnica representa a un sistema de cromatografía de líquidos simple en donde los mecanismos de retención no solo se basan en los fenómenos de reparto, sino en otras variadas interacciones que se dan entre los analitos, la fase estacionaria (equivalente al adsorbente de extracción) y la fase móvil (equivalente al disolvente de la muestra o de elución) (33). Los parámetros fundamentales de la EFS son el recobro y el volumen de rompimiento o fuga de los analitos.

1.7.1.1.1. Recobro

El recobro se define como la relación entre la cantidad de analito extraída y la cantidad de analito aplicada al cartucho en una muestra con contenido real o fortificada. Generalmente se reporta como % de recuperación (33). El recobro es un factor importante porque representa un factor de corrección en la cuantificación.

1.7.1.1.2. Volumen de Fuga (V_B)

El volumen de fuga o rompimiento (V_B) es el parámetro más importante para determinar qué tan apropiado es un dispositivo de EFS para recuperar los analitos de interés. El V_B es el volumen que indica cuando el compuesto comienza a ser eluido por el disolvente de la muestra del dispositivo de extracción (cartucho o pre columna) y se determina de la siguiente manera: Una muestra líquida de una concentración fija se hace pasar a través del cartucho de EFS a una velocidad de flujo constante. Los analitos son retenidos cuantitativamente durante la fase inicial de la aplicación al adsorbente hasta el punto en que el analito finalmente eluye. Si se continúa aplicando muestra al adsorbente, los analitos de ésta ya no serán retenidos, hasta llegar al punto en que las concentraciones de los analitos en la muestra entrante y saliente del cartucho sean idénticas. Aquel punto en el que una cantidad arbitraria de analitos de la muestra sea detectada en la muestra que sale del cartucho se denomina V_B . En general este valor se fija en 1% para el desarrollo de los métodos, ya que cumple con el objetivo de poder retener a los analitos en el cartucho con una pérdida mínima pero aceptable de estos. El V_B es un parámetro que depende del factor de retención cromatográfico k' del analito en cuestión. (34).

1.7.1.2. Procedimiento de EFS

Un método de EFS consiste normalmente en cuatro pasos sucesivos que se ilustran en la figura 1.7.1.2.1. Primero, el adsorbente sólido debe ser activado y acondicionado usando un disolvente apropiado, seguido del mismo disolvente en el que se encuentra la muestra que se aplicará. Este paso es crucial ya que permite mojar el material, la solvatación de los grupos funcionales, remueve las impurezas posibles que se puedan encontrar en el adsorbente y retira el aire que estuviera presente en la columna, llenando el volumen muerto con disolvente. El segundo paso es la aplicación de la muestra líquida a través de una columna, un cartucho, un tubo o un disco que contiene un adsorbente que retiene los analitos. La muestra puede pasar por la columna ayudada solo por la gravedad, vacío o por un sistema de bombeo automatizado. Durante este paso, los analitos son concentrados en el adsorbente. A pesar de que algunos componentes de la matriz pueden ser retenidos durante este paso, otros pasan sin retenerse, lográndose así una cierta purificación de la muestra; lo anterior debido a diferencias en la afinidad hacia la fase estacionaria y la fase móvil

Después de que toda la muestra ha pasado a través del adsorbente, se pueden llevar a cabo una serie de pasos de limpieza sobre el mismo adsorbente que retire aquellos interferentes que pueden alterar los resultados o dañar el equipo por su alta concentración. El paso final consiste en la elución de los analitos de interés por un disolvente adecuado sin remover algunos componentes de la matriz que pudieran seguir estando retenidos por el adsorbente (32).

⊗ = Impurezas presentes en el adsorbente

• y Δ = Interferentes en la muestra

° = Analitos de la muestra

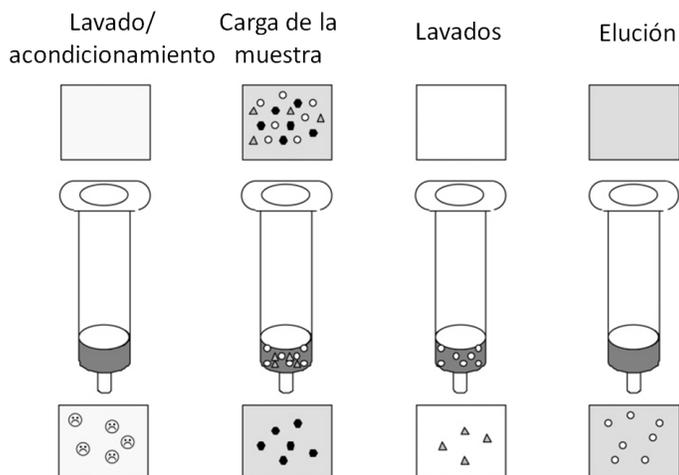


Figura 2.7.1.2.1: Pasos básicos de la EFS

1.7.2. Dispersión en Matriz de Fase Sólida (DMFS)

Aún cuando la técnica de EFS ha sido muy exitosa en la extracción, purificación y concentración de analitos a nivel de traza, esta técnica requiere que la muestra se encuentre en fase líquida y sin partículas que puedan obstruir el flujo a través del cartucho. Si bien existen algunas formas de preparar matrices sólidas o semi-sólidas para ser procesadas mediante la EFS, esto dificulta el análisis, aumenta los costos, el tiempo y la manipulación de la muestra por lo que se pierden muchas de las ventajas de la EFS para el análisis de muestras sólidas. Es por esto que en la década de los 80's se desarrolló un nuevo método para realizar al mismo tiempo la disgregación de la matriz y extracción de los componentes y analitos el cual sortea todos los inconvenientes aquí mencionados mientras que permite una efectiva y rápida preparación de muestra con resultados reproducibles, cuantitativos y lineales.

1.7.2.1. Teoría de la DMFS

La Dispersión en Matriz de Fase Sólida (DMFS) combina diferentes aspectos de las técnicas de extracción con adsorbentes y disgregación de la muestra, mientras que genera un material con características cromatográficas únicas para la extracción de compuestos de una muestra dada. La DMFS involucra la homogeneización de la muestra sólida, semi-sólida o viscosa con un soporte sólido, tal como la sílice virgen o derivatizada con una fase orgánica como el octadecilsilil (C-18) en su superficie. Estos materiales son los mismos utilizados en el empacamiento de las columnas de EFS. Para la DMFS simplemente son utilizados estos materiales de una manera diferente a la que originalmente estaban destinados. De esta manera, el soporte sólido funciona como un abrasivo que utiliza la fuerza de ruptura del mortero y pistilo para romper la arquitectura gruesa de la muestra, fraccionando el material en piezas más pequeñas. Sin embargo, la presencia de una fase orgánica o grupos funcionales químicamente unidos provee una dimensión adicional al proceso: los componentes de la muestra se disuelven y dispersan en la fase orgánica adherida a la superficie de la partícula, llevando a la completa disgregación y dispersión de la muestra. Los componentes de la muestra se distribuyen sobre la superficie de una sílice n-alkilo en base a polaridades relativas. Así, los componentes no polares se dispersan en la fase orgánica no polar de acuerdo a sus coeficientes de reparto y con la dinámica de distribución de la siguiente manera: las moléculas más pequeñas y polares (como el agua) se presume que se asocian con los silanoles libres en la superficie de la partícula de sílice y dentro de los poros del soporte sólido, así como con los componentes de la matriz capaces de formar puentes de hidrógeno. Las moléculas más grandes y menos polares se distribuirán a través de la superficie hidrófoba remanente, conformada por las cadenas C-18 adheridas (35).

1.7.2.2. Procedimiento de la DMFS

Los pasos básicos y generales de un procedimiento por DMFS se ilustran en la figura 1.7.2.2.1. Una muestra altamente viscosa, semi-sólida o sólida es colocada en un mortero que contiene un soporte sólido derivatizado (como sílice con C-18), para posteriormente ser homogeneizada mecánicamente hasta lograr la disrupción y dispersión total de la muestra. La mezcla resultante es lo suficientemente seca, en parte por la absorción del agua en los poros de la sílice, para ser transferida y empacada en una columna de material inerte, generalmente el barril de una jeringa o un cartucho para EFS con un "frit" en el fondo conteniendo así el total del material dentro. Después se aplica el enfoque clásico de elución de la EFS, que consiste en la limpieza con disolventes de los materiales adsorbidos en la superficie de las partículas del adsorbente y la

posterior desorción y recuperación de los analitos (35). Nuevamente, se puede lograr un flujo adecuado de los disolventes por la columna mediante la simple gravedad, aplicando vacío, o con bombas adecuadas que permitan en línea el análisis de los componentes (36).

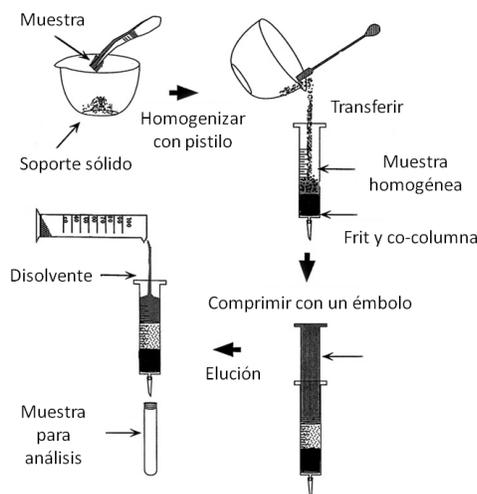


Figura 1.7.2.2.1: Pasos básicos de un procedimiento por DMFS

1.7.3. Análisis instrumental de los HAPs

El análisis de HAPs en el ambiente normalmente implica una dificultad, pues estos siempre se encuentran en mezclas complejas de HAPs y las matrices suelen contener muchos interferentes. Para hacer frente a estos retos, se requieren métodos analíticos de calibración multivariable que relacionen más de una señal instrumental con la concentración de los analitos en la muestra. En el caso especial del CLAR-UV-DAD, la respuesta del instrumento por muestra es una mezcla de señales que debe ser interpretada en base a una calibración de segundo orden. Una calibración de segundo orden permite modelar adecuadamente la contribución del analito aún en presencia de interferentes desconocidos que no hayan sido identificados y que no estén presentes en los estándares de calibración (37). En el caso del CLAR-UV-DAD el tiempo de retención, el valor de la absorbancia a una cierta longitud de onda y el espectro de absorción son diferentes variables que se conjugan para obtener la cuantificación de los analitos de interés.

La Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (USEPA por sus siglas en inglés) recomienda métodos basados en CLAR-UV para la determinación de HAPs a niveles de mg Kg^{-1} (38). Si bien otros métodos emplean la Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas (CG-EM) (39), estos requieren de la derivatización de los compuestos para ser analizados. Lo anterior presenta severos inconvenientes con el manejo de matrices ambientales, que por su complejidad pueden presentar interferentes no identificados y no derivatizables. En la legislación Mexicana,

NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 se recomienda el uso de un equipo CLAR-UV para el análisis de HAPs por su simplicidad, disponibilidad y rapidez. Solo en caso de que haya interferencias que no permitan identificar o cuantificar a los HAPs es que se recomienda una detección más selectiva como la detección por fluorescencia o la espectrometría de masas con monitoreo selectivo de iones.

La versión más popular de CLAR, y que es la recomendada en los métodos de la USEPA para el análisis de HAPs es la de fase reversa con una fase estacionaria de sílice C-18 y una fase móvil variable, pero consistiendo comúnmente en acetonitrilo y/o metanol en diferentes proporciones con el agua. Estas condiciones deben ser tomadas en cuenta a la hora de desarrollar el método de preparación de muestras, pues el extracto obtenido debe de ser compatible con la fase móvil del análisis instrumental (ACN o MeOH como disolvente) y los analitos del extracto deben encontrarse en una concentración por arriba de los límites de detección del instrumento.

Trabajos anteriores en el grupo de investigación desarrollaron y validaron un método de separación y análisis por cromatografía de líquidos para algunos HAPs pesados y metabolitos del Benzo(a)pireno que emplea un detector de fluorescencia (8), el cual también está indicado para la detección y cuantificación de estos mismos analitos. La sensibilidad de este detector, al ser mucho mayor que un detector UV-DAD, lo hace más propicio para determinar las concentraciones de ng g^{-1} que presentan los metabolitos. Para el propósito del presente trabajo se optó por un detector UV-DAD acoplado al cromatógrafo de líquidos, ya que las concentraciones esperadas de los HAP en los extractos se encontraban en el orden de $\mu\text{g Kg}^{-1}$, suficientes para seguir en el tiempo, su desaparición en ensayos de exposición con las microalgas.

1.7.3.1. Parámetros cromatográficos

En la cromatografía, los parámetros que definen a la Resolución (ver más detalle en la sección 1.7.3.1.4.), la cual se busca optimizar en la separación son: el factor de retención (k'), la eficiencia o número de platos teóricos (N) y el factor de selectividad (α). Estos se describen a continuación enfocados a la cromatografía de líquidos.

1.7.3.1.1. Factor de retención

El factor de retención (k') es un parámetro cromatográfico que relaciona la velocidad con la cual un soluto migra a través de una columna y sirve experimentalmente para comparar migración diferencial de los solutos en columnas. En cromatografía de líquidos es posible variar el factor de retención cambiando la fase móvil empleada. En el caso de mezcla de disolventes, el factor de

retención dependerá de la polaridad resultante de la mezcla de disolventes y guardará una relación logarítmica con la concentración porcentual de alguno de los disolventes.

En cromatografía de líquidos, el conocimiento de k' de los compuestos de interés a diferentes composiciones de la fase móvil hidroorgánica resulta útil para establecer la composición de la fase móvil definitiva que se empleará en la separación cromatográfica. Un factor de retención menor a la unidad significa que el soluto sale de la columna en un tiempo próximo al muerto, con la posible falta de resolución entre el analito deseado y algún interferente. Un factor de retención mayor a 20 implica tiempos de elución excesivamente largos, mientras que los picos cromatográficos se ensanchan y achatan. En el caso ideal, las separaciones se realizan en condiciones en las que los factores de retención de los solutos de la mezcla están dentro del intervalo de 1 a 5.

De manera teórica, k' se define de la siguiente manera:

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M}$$

Donde K_A es la constante de distribución, V_S es el volumen de la fase estacionaria y V_M es el volumen de la fase móvil.

También puede ser descrito en términos experimentales (tiempos) los cuales pueden ser tomados de un cromatograma:

$$k'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M}$$

Donde $(t_R)_A$ es el tiempo de retención del componente A y t_M es el tiempo muerto obtenido para una especie no retenida.

1.7.3.1.2. Eficiencia

La eficiencia de una columna cromatográfica suele expresarse en términos del Número de Platos teóricos por metro (N/m). El término de platos teóricos proviene de una extrapolación de otro método de separación, la destilación fraccionada, donde se asume que a lo largo de una columna ocurre una serie de equilibrios en cada segmento (N) de la misma. Cada uno de estos segmentos imaginarios se llama Plato Teórico. Una columna cromatográfica será más eficiente si cuenta con un mayor número de platos teóricos por metro.

Existen numerosas formas de calcular el número de platos teóricos mediante la medición del tiempo de retención y el ancho de banda para uno o varios compuestos. El número de platos teóricos puede aproximarse mediante la ecuación:

$$N = 5.54 \left(\frac{T_1}{W_h} \right)^2$$

Donde T_1 es el tiempo de retención del pico en minutos y W_h es el ancho a la mitad de la altura del pico. Cabe señalar que aunque existen diversas formas de calcular los platos teóricos, el método a la mitad de la altura del pico es el más empleado (40).

1.7.3.1.3. Factor de selectividad

El factor de selectividad (α), como su nombre lo indica, es un término que define que tan selectivo es un sistema cromatográfico para separar dos picos dados. Es de hacer notar, que la columna puede ser selectiva a una separación, que se identifica por un valor alto de este factor, pero si no se considera la mejora de los parámetros que pueden afectar el ancho de un pico, aún así no se lograría la separación de los mismos.

Entonces el factor de selectividad de una columna para dos especies A y B se define como:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Donde k'_B es el factor de capacidad del compuesto B, que es el más retenido y k'_A es el factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido. Con esta definición α es siempre mayor que la unidad. Para términos prácticos, a partir de datos tomados de un cromatograma, se puede encontrar el valor de α con la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

1.7.3.1.4. Resolución

La resolución (R_s) constituye una medida cuantitativa de la capacidad del sistema cromatográfico para separar dos analitos. Este término considera el ensanchamiento de los picos, la migración diferencial de los solutos y la selectividad, por lo que la magnitud de este valor permite conocer la

verdadera capacidad de separar los picos. La resolución expresada en términos teóricos depende de los tres parámetros cromatográficos antes descritos y se puede expresar así:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 - k'_B}{k'_B} \right)$$

Estadísticamente se puede demostrar que una resolución de 1.5 permite una separación esencialmente completa de los dos componentes, mientras que con una resolución de 0.75 no existe una separación satisfactoria. Este criterio solamente se cumple cuando ambos picos son gaussianos, es decir simétricos a ambos lados. Así con una resolución de 1.0, la zona del pico A contiene aproximadamente 2.3% del pico B y la zona del pico B contiene una cantidad similar de A. Con una resolución de 1.5 el solapamiento es aproximadamente de 0.1% (40). La resolución en términos que pueden ser medidos en un cromatograma es la siguiente.

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

2. Desarrollo Experimental

2.1. Material y equipo

2.1.1. Sistema cromatográfico

- Bomba ProStar 210 (Varian, CA, EUA)
- Detector UV-DAD Polychrom 9065 (Varian, CA, EUA)
- Columna Nucleosil 100-5 C-18 150/4.6 (Macherey- Nagel, Düren, Alemania)
- Pre columna de guarda de acero inoxidable 13/4.5 (Upchurch-Scientific, WA, EUA), empacada con sílice fase inversa Nucleosil C-18 (Phenomenex, CA, EUA)
- Inyector manual, Rheodyne 7725 (i), (IDEX Health & Science Group, CA, EUA), con bucle de inyección de 20 μ L.
- Jeringa Gastight de 50 μ L (Hamilton , NV, EUA)
- Software Star Workstation 6.0 (Varian, CA, EUA)

2.1.2. Preparación de la muestra

- Cartuchos Bond Elut y Frites de 1 y 6 mL (Varian, CA, EUA)
- Mortero y pistilo de Ágata de 20 mL
- Espátula de cromo-níquel
- Parrilla de calentamiento y agitación eléctrica (Daigger, IL, EUA)
- Baño de ultrasonido Branson 1510 (Branson, CT EUA)
- Centrífuga Sigma 2-5 (Osterode, Alemania)
- Balanza Analítica AG 245 (Mettler Toledo, Suiza)
- Tubos para centrífuga de 15 mL (BD Biosciences, CA, EUA)
- Micropipetas de 2 – 20, 20 – 200 y 100 – 1000 μ L (Eppendorf, Hamburg, Alemania)
- Jeringa y adaptador de polipropileno (Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Alemania)
- Cristalería diversa grado laboratorio
- Sílice C-18 Supelclean de 45 μ m (Supelco, PA, USA)

La sílice fue activada pasando MeOH 3 mL/g a través de una columna de EFS empacada con la sílice a utilizarse y posteriormente secada al aire con ayuda del vacío.

2.1.3. Disolventes y estándares

- Metanol y Acetonitrilo grado cromatográfico (JT Baker, DF, MEX)
- Isopropanol grado reactivo (EM Science, NJ, USA)
- Agua Tipo 1 obtenida de un equipo de purificación Simplicity UV (Millipore, MA, USA)
- Estándares de HAP: Benzo[a]pireno (BaP), Benzo[b]fluoranteno (BbF), Benzo[k]fluoranteno (BkF) y Benzo[a]antraceno (BaA) de pureza >99% (Chemservice, PA, USA)

2.1.4. Cultivo axénico, mantenimiento de microalgas y ensayos de exposición

- Foco de luz amarilla de 10 Watts (Osram, Edo. de México, MEX)
- Lámparas fluorescentes de luz blanca.
- Alga *Selenastrum capricornutum* (UTEX 1648) (Colección de Cultivos de Algas, Universidad de Texas, TX, EUA)
- Medio Bristol: NaNO₃ 2.94 mM, CaCl₂·2H₂O 0.17 mM, MgSO₄·7H₂O 0.3 mM, K₂HPO₄ 0.43 mM, KH₂PO₄ 1.29 mM, NaCl 0.43 mM (JT Baker, DF, México)
- Proteosa Peptona (MCD Lab, Edo. de México, México)

La microalga *Selenastrum capricornutum* fue cultivada en matraces Erlenmeyer de 300 mL con medio Bristol, adicionado con proteosa peptona 1 g/L y esterilizado en autoclave. La cantidad de algas se estandarizó mediante una curva de calibración en donde una absorbancia espectrofotométrica de valor 1.0 correspondió aproximadamente a 1×10^6 células \times mL⁻¹. Para lograr este número de organismos, se incubaron las algas por 10 días con agitación constante y ciclo de luz-oscuridad 16:8 horas.

Reservas de los cultivos fueron cultivadas en agar bajo luz fría blanca, y almacenados en oscuridad a 4°C. El agar utilizado para el mantenimiento de los cultivos fue preparado agregando 1% de agar al medio Bristol previamente preparado y esterilizando en autoclave.

2.1.5. Preparación de disoluciones estándar de los HAPs

Se prepararon las disoluciones estándar de cada uno de los HAPs a una concentración de 100 mg L⁻¹ en acetonitrilo (ACN) como disolvente. Las demás disoluciones se prepararon a partir de las disoluciones madre y estas se almacenaron en viales ámbar herméticamente cerrados a 4°C hasta su utilización.

2.2. Experimentación

Esquema general de la experimentación:

En la figura 2.2.1 se describen las etapas generales del trabajo de la presente tesis.



Figura 2.2.1: Esquema general de trabajo

2.2.1. Condiciones óptimas para la detección de los HAPs

Se realizaron inyecciones de los HAPs a una concentración de 10 mg L^{-1} en condiciones isocráticas a un flujo de 1 mL/min con MeOH 100% como fase móvil. Se obtuvo el espectro de absorción de cada uno de los HAPs con ayuda del detector de arreglo de diodos y se seleccionó de ahí la longitud de onda donde se obtuviera la absorbancia máxima característica de cada compuesto. Esta longitud de onda se utilizó en lo subsecuente para cuantificar a los compuestos.

2.2.2. Determinación de k'

Para la determinación de k' se ensayaron concentraciones de metanol en agua 100, 95, 90, 85 y 80% para eluir los cuatro HAPs de interés. Se registraron sus tiempos de retención y se graficó el $\log k'$, obteniéndose k' mediante la siguiente ecuación:

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

Donde t_r es el tiempo de retención del analito de interés y t_m es el tiempo muerto. El tiempo muerto se estableció en 1.46 min, inyectando NaNO_3 a 6 mg L^{-1} en el sistema.

También se calculó el Factor de Selectividad (α) para cada par adyacente de picos. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Donde k'_1 es el factor de retención del compuesto más retenido, mientras que k'_2 es el factor de retención del compuesto menos retenido.

Con estos resultados se establecieron las condiciones óptimas para la separación cromatográfica.

2.2.3. Determinación de la linealidad del sistema.

Se prepararon disoluciones estándar de los cuatro HAPs a una concentración de 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L^{-1} y se inyectaron por triplicado al sistema. Se integraron las áreas del pico de cada compuesto a su longitud de onda de absorbancia máxima y a partir de estos datos se construyeron curvas de calibración de cada analito. Se realizó la regresión lineal para cada curva y se evaluó la linealidad del sistema mediante el valor del coeficiente de correlación de cada curva (R^2).

A partir de los datos de las curvas de calibración construidas (Absorbancia vs concentración) se obtuvo la ecuación de la recta para cada compuesto y con ellas se cuantificó la recuperación en los ensayos subsiguientes interpolando los valores del área bajo el pico obtenidos en los cromatogramas de los extractos, tanto en la optimización de los métodos de preparación de muestra, como en los ensayos de exposición.

2.2.4. Determinación de la repetibilidad y reproducibilidad dentro del sistema

La repetibilidad y reproducibilidad del sistema se evaluaron durante el trabajo experimental mediante la inyección de estándares de los HAPs en estudio por triplicado a lo largo de la jornada. La repetibilidad se evaluó mediante la cuantificación del Coeficiente de Variación (CV) entre las inyecciones del mismo día, mientras que la reproducibilidad se evaluó mediante la cuantificación del CV entre las inyecciones de días diferentes, siendo el CV como sigue:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}}$$

Donde σ es la desviación estándar de los valores y \bar{x} es el promedio de los valores.

2.2.5. Límites de detección y cuantificación teóricos

Para determinar los límites tanto de detección (LD) como de cuantificación (LC) del sistema cromatográfico, a partir de los datos de linealidad del sistema se aplicaron las siguientes fórmulas (8):

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$$

$$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

Donde: $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la pendiente y b_1 es el valor promedio de la pendiente.

2.2.6. Optimización de los métodos EFS y DMFS con estándares sin muestra

En trabajos anteriores se desarrollaron y validaron metodologías analíticas para la extracción y análisis de Benzo[a]pireno y cuatro de sus metabolitos en los componentes del cultivo de microalgas: medio líquido y biomasa (8). En estos trabajos se usaron dos métodos de extracción con el adsorbente Chromabond C-18 PAH: para el medio líquido se usó un método basado en la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) y para la biomasa se recurrió a un método basado en la técnica de Dispersión en Matriz de Fase Sólida (DMFS). Los extractos obtenidos fueron analizados por CLAR y la detección de fluorescencia (DFL) logrando cuantificar concentraciones de los

metabolitos y HAPs muy bajas, del orden de ng mL^{-1} . Por lo tanto, en el presente trabajo se optimizaron los métodos de extracción mencionados considerando que se realizaría la determinación de cuatro de los HAPs de alto peso molecular (Benzo[a]antraceno (BaA), Benzo[b]fluoranteno (BbF), Benzo[k]fluoranteno (BkF) y Benzo[a]pireno (BaP) en concentraciones mayores, del orden de $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para esto se utilizó el adsorbente de extracción C-18 Supelclean y los extractos se analizaron por CLAR acoplada a un detector espectrofotométrico UV de arreglo de diodos (DAD), en vez del de DFL. Se requirió volver a evaluar recobros y precisión con las condiciones diferentes y se realizaron los ajustes necesarios

Con el propósito de evaluar los recobros bajo las condiciones en donde no hay influencia de la matriz, se emplearon ambos métodos sin muestra, fortificando directamente la sílice C-18 en el caso de la DMFS, y el agua purificada y desionizada, en el caso de la EFS con concentraciones conocidas de los estándares de los analitos. Por lo tanto, los métodos de preparación de muestras EFS y DMFS se aplicaron inicialmente a estas muestras simuladas, de la siguiente manera:

2.2.6.1. Método EFS- CLAR UV para extraer los HAPs del medio líquido

Primero se empacó un cartucho de 6 mL con 300 mg de sílice C-18, previamente acondicionada pasando por ella 3 mL de ACN, seguido de 10 mL de agua desionizada. A dicho cartucho se le cargaron 15 mL de agua purificada, adicionada con 20% de isopropanol como modificador orgánico y la cual fue fortificada previamente con 4 μg de cada uno de los HAPs. Se remarca que los ensayos se realizaron solo con BaA, BbF y BaP debido a que la cromatografía no permitía separar el BbF del BkF sino hasta una composición de fase móvil al 80% de metanol, pero a esta concentración los valores de k' son mayores a 20 con el consiguiente aumento del tiempo de elución y ensanchamiento de los picos. Debido a esto se decidió evaluar el recobro de los 3 HAPs, asumiendo que el comportamiento del HAP faltante sería muy similar al de su homólogo. Posteriormente, se aplicó al cartucho de EFS la siguiente secuencia de elución: a) 5 mL de agua, b) 4 mL de acetonitrilo:agua (10:90), c) 1 mL de acetonitrilo:agua (30:70), d) 3 mL de acetonitrilo:agua (55:45) y e) 2 mL acetonitrilo puro. Las fracciones a), b) y c) son desechadas, ya que se trata de eluentes débiles aplicados para la limpieza de interferencias y la fracción d), de fuerza eluente mayor, también considerada como eluente de limpieza, se fraccionó en 3 X 1 mL para detectar si existía fuga de los HAPs. Finalmente, la fracción e) se recuperó para el análisis CLAR-DAD, ya que en esta se desorben los HAPs. Cabe destacar que en el método original (8), posterior a la aplicación de las mezclas de limpieza, con los eluentes a-c, los metabolitos de los

HAPs son eluidos en la fracción d); sin embargo, en nuestro trabajo el eluyente d) se consideró como un eluyente de limpieza más, ya que los metabolitos no se analizaron. Las áreas de los picos detectados en los cromatogramas del extracto acetónitrílico fueron interpoladas con las curvas de calibración previamente obtenidas para calcularlas cantidades recuperadas de HAPs en los ensayos. Estos ensayos se realizaron por cuadruplicado a la misma concentración y se evaluó su repetitividad mediante el CV

2.2.6.1.1. Frente de elución por EFS

Se procedió como se describe anteriormente para llevar a cabo la EFS hasta la secuencia de limpieza (a-d), posteriormente eluyendo con 5 fracciones de 1 mL de acetonitrilo (eluyente e) para obtener los frentes de elución de los HAPs bajo estas condiciones. Cada fracción se llevo a análisis cromatográfico y se graficaron los recobros acumulados en función del volumen de eluyente.

2.2.6.2. Método DMFS- CLAR UV para extraer HAPs de la biomasa

En un mortero de ágata, se colocaron 100 mg de sílice C-18. Dicha sílice se fortificó directamente con 2 µg de los mismos HAPs mencionados anteriormente. Se permitió la evaporación del disolvente y posteriormente se homogenizó la sílice con la ayuda del pistilo, simulando el proceso de homogenización que se aplicaría con una muestra real. Posteriormente se empacó la fase dispersa en un cartucho de 1 mL en donde se aplicó la siguiente secuencia de elución: a) 10 mL de agua, b) 5 mL de acetonitrilo:agua (20:80), c) 1.5 mL de acetonitrilo:agua (40:60) y d) 1 mL de acetonitrilo:agua (90:10). Las fracciones a) – c) fueron desechadas. Posteriormente, se eluyeron los HAPs con el eluyente). Se efectuó un ensayo en donde se recuperaron dos fracciones de 0.5 mL de acetonitrilo:agua (90:10) posteriores a la elución para descartar la desorción incompleta de los HAPs. La recuperación por este método se realizó por cuadruplicado a la misma concentración para evaluar su repetitividad mediante el CV.

2.2.6.2.1. Frente de elución por DMFS

Se procedió como se describe anteriormente para DMFS hasta la aplicación de los eluentes de limpieza (a-c). Posteriormente eluyendo los HAPs con 3 fracciones de 0.33 mL de acetonitrilo: agua (90:10) para obtener sus frentes de elución bajo estas condiciones. Se graficó el porcentaje de recobro acumulado en función del volumen de eluyente.

2.2.7. Optimización de los métodos EFS y DMFS con muestras fortificadas

Los mismos métodos de EFS y DMFS fueron aplicados a muestras de cultivos fortificadas con 4 µg de BaA, BbF y BaP. Para la EFS se agregaron los HAPs al medio líquido del cultivo o sobrenadante después de la centrifugación al que, antes de aplicarse al cartucho, se le había adicionado 20% de isopropanol. Para efectuar el método por DMFS se recuperó el botón de microalgas (biomasa) después de la centrifugación y este se extendió en un portaobjetos limpio, el cual se dejó secar al aire. Las microalgas ya secas se recuperaron y pesaron antes de ser fortificadas con los HAPs a la misma concentración que en los ensayos sin muestra. Además se realizaron pruebas blanco, en donde se aplicaron los métodos de EFS y DMFS en muestras de algas sin fortificar. Esto para evaluar los interferentes propios de la matriz y verificar la no contaminación del material y equipo empleado. Ambos métodos fueron evaluados en ocho réplicas, a las cuales se evaluó su coeficiente de variación y porcentaje de recobro.

2.2.8. Ensayos de exposición

Para corroborar la capacidad de la microalga estudiada para degradar HAPs de alto peso molecular, se realizaron varias series de ensayos de exposición del alga frente a: BaP, BbF, BkF y BaA por separado. Para lo anterior, alícuotas de 15 mL del cultivo de *Selenastrum capricornutum* vivas (AV) y cultivos a la misma concentración de algas muertas mediante calor (HK) esterilizando los cultivos a 121°C por 25 min previo a los ensayos, fueron colocadas en matraces Erlenmeyer de 50 mL, en agitación constante e iluminados con un foco de luz amarilla. Los cultivos fueron fortificados a una concentración de 0.266 µg/mL de los cuatro HAPs por separado y el contenido de los frascos fue colectado a los 45 minutos, 1.5, 3, 6 y 24 horas de exposición por triplicado, tanto para AV como para HK.

Para evaluar si la capacidad metabólica del alga es igual para los HAPs por separado que en combinación, se realizaron ensayos de exposición para tres combinaciones de HAPs; concretamente: BaA + BaP, BbF + BaP y BkF + BaP; cada HAP a una concentración individual de 0.266 µg/mL. El motivo de utilizar algas muertas mediante calor (HK) como control, es poder evaluar la capacidad metabólica de las algas y separar esta de la posible pérdida de HAPs debida a la foto oxidación, adsorción y otros mecanismos abióticos que pudieran ocurrir. También se aplicaron las técnicas de EFS y DMFS en cultivos de algas que no fueron expuestos a los hidrocarburos (Blanco) con el objetivo de evaluar los interferentes propios de la matriz.

Acabado el tiempo de exposición, el contenido de los matraces fue transferido inmediatamente a tubos de centrifuga de 15 mL con tapa de rosca para ser centrifugado a 2300 g por 15 min. Se separó el sobrenadante y este fue adicionado con 3.75 mL de isopropanol como modificador orgánico para disminuir la adsorción de los HAPs a las paredes de vidrio del material. El sobrenadante fue sometido al método de EFS y por otra parte, el botón de microalgas o biomasa fue depositado sobre un portaobjetos limpio y se le permitió secar a temperatura ambiente para después ser sometido al método de DMFS. Los extractos fueron almacenados a 4°C hasta su análisis por no más de una semana.

3. Resultados y discusión

3.1. Condiciones óptimas para la detección de los HAPs

Con el detector espectrofotométrico de arreglo de diodos se seleccionó la longitud de onda óptima de detección de cada uno de los HAPs, las cuales se muestran en la tabla 3.1. Esta longitud se seleccionó en la región del espectro donde la absorbancia fue máxima y selectiva con respecto a las longitudes de onda bajas (cercasas a 200 nm) donde las interferencias de la matriz son máximas. Los espectros de absorción se presentan en el Anexo 1.

HAP	λ
BaA	287 nm
BbF	254 nm
BkF	234 nm
BaP	263 nm

Tabla 3.1.1: Longitudes de onda óptimas para la cuantificación de los HAPs

3.2. Determinación de k'

Como puede observarse en la figura 3.2.1, que representa al $\log k'$ en función del porcentaje de metanol en la fase móvil, la retención del BbF y BkF es muy similar a las concentraciones ensayadas, solo pudiéndose separar ambos picos con una fase móvil mayor al 80% de metanol. Sin embargo, a esta proporción de disolvente orgánico, los valores de k' son mayores a 20, con el consiguiente aumento del tiempo de elución y ensanchamiento de los picos. A partir de estos ensayos se decidió emplear solo tres HAPs en los experimentos de optimización: BaA, BbF y BaP, asumiendo que el comportamiento cromatográfico del BkF sería muy similar al de su homólogo al usar porcentajes altos de metanol en la fase móvil (80 a 100 %) y por tanto también en los sistemas de extracción, los valores de recobro debieran ser muy similares. Los resultados de este ensayo fueron también de importancia para los ensayos de exposición ya que parte de los objetivos es evaluar la biodegradación de combinaciones de los HAPs; en este escenario, la combinación de BbF y BkF quedó descartada, pues resultó difícil resolverlos y por tanto evaluar su degradación en co-existencia.

HAPs	k'				
	100%	95%	90%	85%	80%
BaA	2.1	2.8	4.3	7.9	13.5
BbF	2.8	4.1	6.4	12.3	22.1
BkF	2.8	4.1	6.6	12.8	23.6
BaP	3.2	4.8	7.6	14.4	26.1

Tabla 3.2.1: Factor de retención k'a vs % de Metanol en la fase móvil cromatográfica

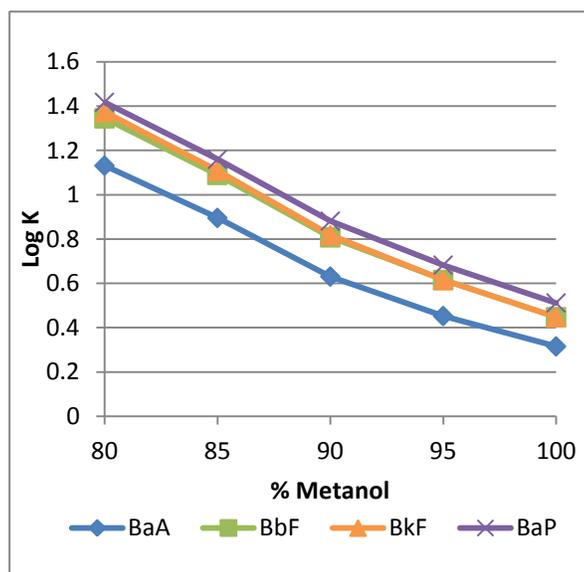


Figura.3.2.1: Variación del Log de k' vs con la composición de [MeOH]

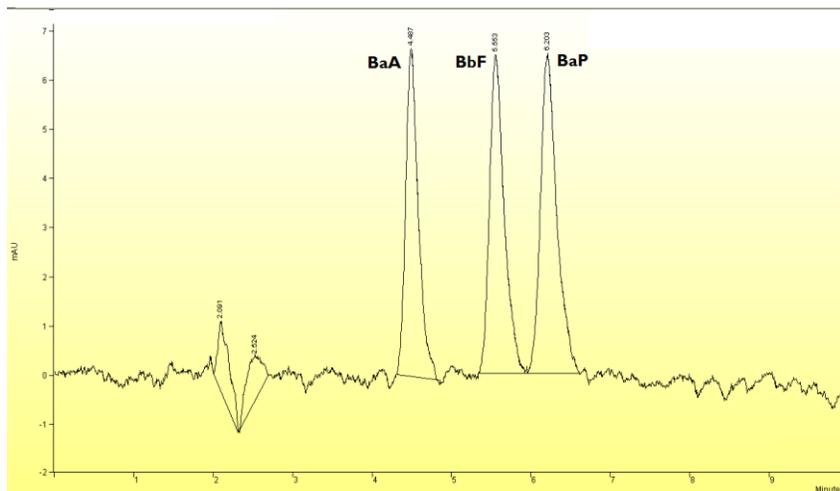


Figura 3.2.1: Cromatograma de una disolución estándar 2 ppm de los tres HAPs empleados en la optimización separados en una fase móvil de MeOH 100%, Vel. flujo =1 mL/min, λ = 263 nm

Debido a que 3 de los 4 HAPs se separaron satisfactoriamente al 100% de MeOH, se decidió utilizar esta fase móvil para los análisis de los extractos provenientes de los métodos de preparación de muestra ya que esta es la composición de fase móvil que requiere el menor tiempo de elución.

Par de especies	Resolución (R)	Factor de selectividad (α)
BaA-BbF	1.99	1.35
BbF-BaP	1.03	1.16

Tabla 3.2.2: Resolución y Selectividad alcanzados para los HAP con una fase móvil de MeOH 100%, flujo = 1 mL/min

3.3. Determinación de la linealidad del sistema

Como puede observarse en la figura 3.3.1, las curvas de calibración de los HAPs, en el intervalo de concentraciones ensayadas ($0.05 - 10 \text{ mg L}^{-1}$), son lineales y tienen un coeficiente de correlación (R^2) superior al 0.999. A partir de los datos de las curvas construidas (Absorbancia vs concentración) se obtuvo la ecuación de la recta para cada compuesto y a partir de estos datos, se

evaluó la concentración encontrada en los extractos con el fin de calcular los porcentajes de recuperación, interpolando los valores del área bajo el pico obtenidos, tanto en la optimización de los métodos de preparación de muestra como en los ensayos de exposición.

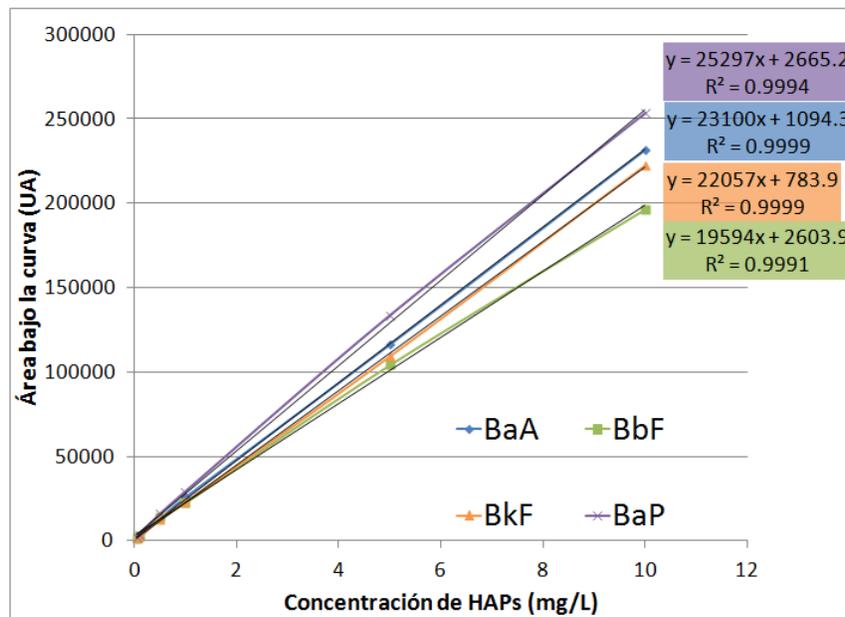


Figura 3.3.1: Curvas de linealidad de los 4 HAPs en el sistema cromatográfico

3.4. Repetibilidad y reproducibilidad del sistema

En la Tabla 3.4.1 se muestran los valores de repetibilidad y reproducibilidad en la inyección de estándares en el sistema.

Compuesto	Repetibilidad (% CV)	Reproducibilidad (% CV)
BaA	2.5	5.7
BbF	2.8	4.1
BkF	4.1	4.8
BaP	3.2	9.2

Tabla 3.4.1: Valores de Repetibilidad y Reproducibilidad para el sistema cromatográfico

Como se puede observar, los valores del CV entre días diferentes (reproducibilidad) son mayores a los valores del CV dentro del mismo día. Esto es de esperarse ya que las inyecciones que ocurren en el mismo día son a partir de un estándar que se prepara al momento y sirve para las repeticiones de las inyecciones; este estándar se prepara nuevo cada jornada de uso del cromatógrafo, por lo que la reproducibilidad no solo implica la propia variación dentro del equipo sino la variación entre la preparación del estándar.

3.5. Límites de detección y cuantificación del sistema

Como puede observarse en la tabla 3.5.1, los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC) de los cuatro HAPs en el sistema son diferentes para cada HAP, lo cual puede explicarse por su diferente coeficiente de absorptividad molar de cada uno y sus diferentes comportamientos en la columna.

Es también necesario dar cuenta que los límites de detección del método son diferentes ya que, como se observará en la sección 3.7, el método de EFS tiene capacidad de concentrar los HAPs 30 veces a partir de la muestra original, pues el volumen final del extracto analizable es 0.5 mL que se obtienen de una muestra de 15 mL de sobrenadante. En el caso de la DMFS, los HAPs se transfieren desde una matriz de 5 mg a un volumen final de 500 μ L.

Compuesto	Instrumental		Del método			
			EFS-CLAR-UV		DMFS-CLAR-UV	
	LD (mg L^{-1})	LC (mg L^{-1})	LD (mg L^{-1})	LC (mg L^{-1})	LD (mg KgAlga^{-1})	LC (mg KgAlga^{-1})
BaA	0.0655	0.1985	0.0024	0.0074	7.2778	22.0556
BbF	0.0954	0.2893	0.0035	0.0107	10.6000	32.1444
BkF	0.1010	0.3063	0.0037	0.0113	11.2222	34.0333
BaP	0.0402	0.1218	0.0015	0.0045	4.4667	13.5333

Tabla 3.5.1: Límites de Detección (LD) y de Cuantificación (LC) instrumental y del método de los cuatro HAPs estudiados

3.6. Optimización de los métodos EFS y DMFS con estándares sin muestra

En la tabla 3.6.1 se muestran los recobros y coeficientes de variación obtenidos de los dos métodos de extracción utilizados

HAPs	EFS-CLAR		DMFS-CLAR	
	Recuperación (%)	CV (%)	Recuperación (%)	CV (%)
BaA	88	6	85	8
BbF	89	9	88	7
BaP	88	3	90	6

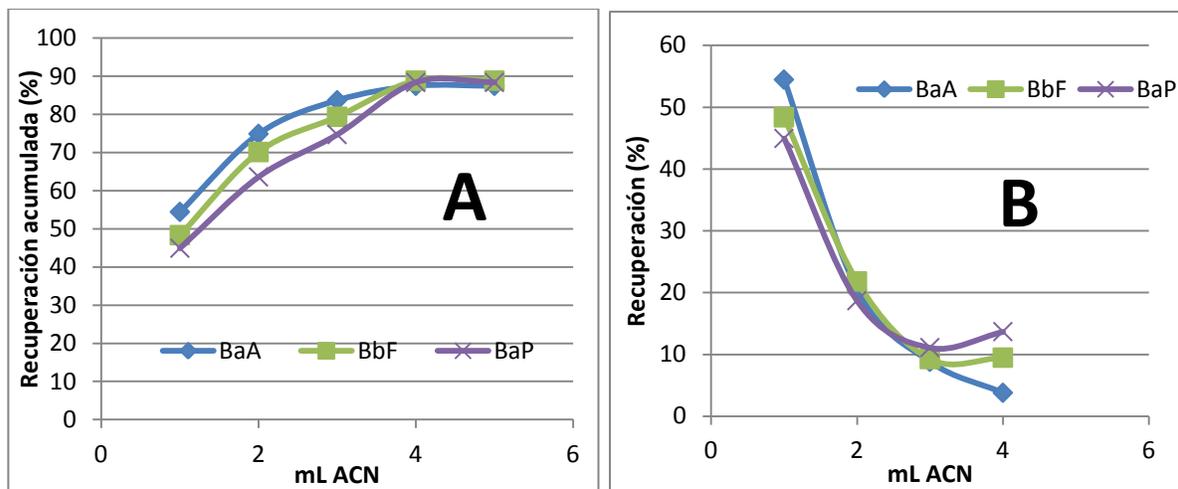
Tabla 3.6.1: Recuperación y CV de los HAPs con los métodos de EFS y DMFS sin muestra (n=9)

Como se observa, con ambos métodos de preparación de muestra se obtienen buenos recobros, superiores al 80% y coeficientes de variación en un rango aceptable para la concentración de los analitos en la muestra líquida (0.266 mg Kg^{-1}). Los recobros menores al 100% en la EFS son explicados en parte a la adsorción de los HAPs a las paredes de todo el material de vidrio. Esta adsorción es variable y continúa, a pesar de que se adiciona el isopropanol como modificador orgánico con el propósito de minimizarla. En el caso de la DMFS también ocurre una adsorción de los HAPs en el material de vidrio de los recipientes como sería el mortero de ágata, además de que la transferencia del material dispersado al cartucho se realiza de forma manual por lo que es difícil completarla, debido a cierta pérdida en las paredes del mortero.

3.6.1. Optimización del método EFS CLAR-UV

La Figura 3.6.1.1 A muestra el frente de elución de cada uno de los HAPs en la EFS. En la figura se observa que los HAPs eluyen en su mayoría en los primeros 2 mL (entre 60 y 80%), pero que continúan eluyendo aún después del 3er mililitro y se completa hasta el 4º ml. Los recobros en el 5º mililitro son despreciables ya que la señal observada en el cromatograma es muy pequeña y muy cercana al ruido basal. La figura 3.5.2 B guarda mucha similitud con la segunda mitad de una curva Gaussiana o de un pico cromatográfico. Se podría observar la primera parte de la curva Gaussiana si se analizaran fracciones con volúmenes mucho más pequeños. La EFS es, en muchos

sentidos, una cromatografía en columna donde los analitos abandonan la columna en forma de picos cromatográficos. Debido a la poca eficiencia a causa de la limitada longitud del cartucho de extracción, el tamaño grande de partícula y su empacamiento mullido, el pico de elución de los analitos es muy ensanchado y por tanto, la recuperación de cada analito es muy pequeña y lenta conforme salen los últimos mililitros de la columna o cartucho.



Figuras 3.6.1.1 A Recobros acumulados de HAPs en fraccionamiento de EFS y 3.6.1.1 B Recobro de HAPs en el mismo ensayo.

Siendo el frente de elución de los HAPs tan extendido, para completarlo se requería de un volumen de 5 mL. Debido a la alta dilución de los HAPs en el extracto se encontraron dificultades para su detección en el medio líquido mediante EFS, ya que la concentración de los HAPs caía por debajo del límite de cuantificación. Es por esto que se decidió agregar un paso adicional de concentración al método, en el cual la fracción e) de acetonitrilo puro usada como eluyente de los analitos, fue evaporada a sequedad mediante calor homogéneo a 76 °C y después fue reconstituido en tan solo 0.5 mL de ACN puro, de esta manera se ganó un factor de concentración de 10.

3.6.2. Optimización del método de DMFS CLAR-UV

En el caso del fraccionamiento de la DMFS, representada en la Figura 3.6.2.1 del recobro acumulado en función del volumen de eluyente, puede observarse que la mayoría de los HAPs, más del 70%, son recuperados en los primeros 0.3 mL del eluyente ACN:H₂O (90:10). Sin embargo, en la figura se muestra que después de la segunda fracción ya no se observa señal de los HAPs y por lo tanto el recobro acumulado se vuelve constante.

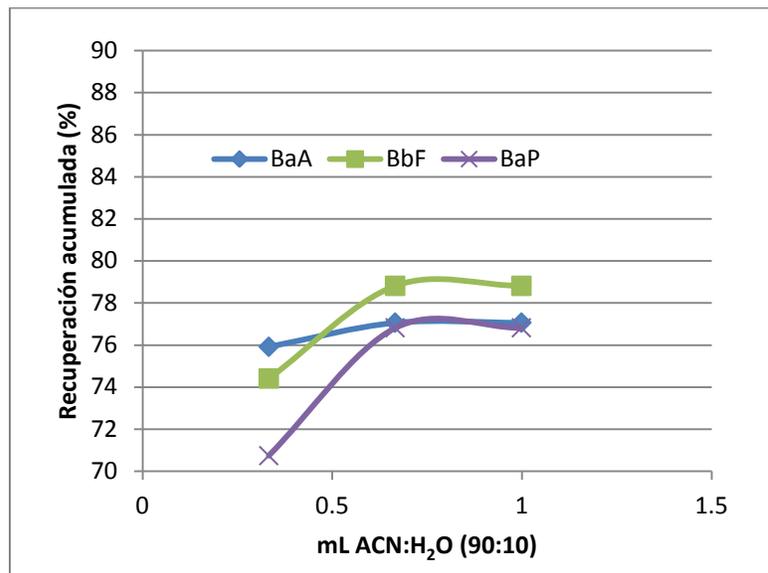


Figura 3.6.2.1: Recuperación fraccionada DMFS

Con esta información se decidió modificar el método para eluir los HAPs con solo 0.5 mL de ACN:H₂O (90:10) en vez de 1 mL; de esta forma se evita diluir innecesariamente la muestra, pudiéndose obtener mejor sensibilidad en el método

3.7. Optimización de los métodos EFS y DMFS con muestras fortificadas

La tabla 3.7.1 resume los resultados de los métodos de preparación con muestra, se incluyen los recobros globales y los coeficientes de variación de los ensayos con muestras fortificadas con 4 µg de cada uno de los HAPs, con las condiciones optimizadas

HAPs	EFS-CLAR		DMFS-CLAR		Recomendado*	
	Recobro (%)	CV (%)	Recobro (%)	CV (%)	Recobro (%)	CV (%)
BaA	78	7.0	82	8.8	70-125	15
BbF	70	8.3	77	6.3		
BaP	71	11.9	73	10.8		

Tabla 3.6.1: Recobros globales de los métodos de preparación de muestra en matrices reales (n=8)

*Ref 41

Como puede observarse en esta tabla; tanto los valores de recuperación son menores a los ensayos sin muestra, como los coeficientes de variación son más elevados. Todo esto era de esperarse, ya que una muestra biológica, por su complejidad, puede presentar múltiples interferentes y sitios de adsorción para los HAPs. Sin embargo, tanto el recobro, como el coeficiente de variación cumplen con los parámetros recomendados por la AOAC para matrices biológicas y concentraciones del orden de partes por millón (41). Por tanto, se puede considerar que los métodos de preparación de muestra tienen una buena recuperación y son reproducibles. El uso de cantidades pequeñas de muestra, combinado con un consumo reducido de solventes, lo que reduce gastos tanto en su adquisición como en su disposición final, hacen de estas técnicas unas alternativas muy competitivas frente a otros métodos clásicos a varios niveles y estas deben ser consideradas como una alternativa cuando se desarrollan métodos analíticos (42) (32).

3.7.1. Interferencias

Aún cuando los métodos de EFS y DMFS eliminan gran cantidad de interferentes de la muestra, en el caso de la DMFS, en la fracción d) los HAPs eluyeron junto con algunos interferentes de polaridad muy similar. Debido a que la retención de estos interferentes era muy similar al de los HAPs, no sería posible hacer otro paso de limpieza en el cartucho de DMFS, sin el riesgo de que los HAPs se fugaran. Afortunadamente el problema fue fácilmente resuelto en el análisis cromatográfico, cambiando la composición de la fase móvil al 95% de MeOH, de esta forma se obtuvo un cromatograma con los HAPs y los interferentes resueltos como se muestra la Figura 3.7.1.1. Cabe señalar que el pico marcado con un asterisco (*) se trata de una interferencia que, aunque no se separa de la señal del BaA, no representa un problema ya que a una $\lambda=287$ nm, que es la longitud de onda a la cual decidimos cuantificar el BaA (Véase sección 3.1), este interferente no presenta absorbancia alguna.

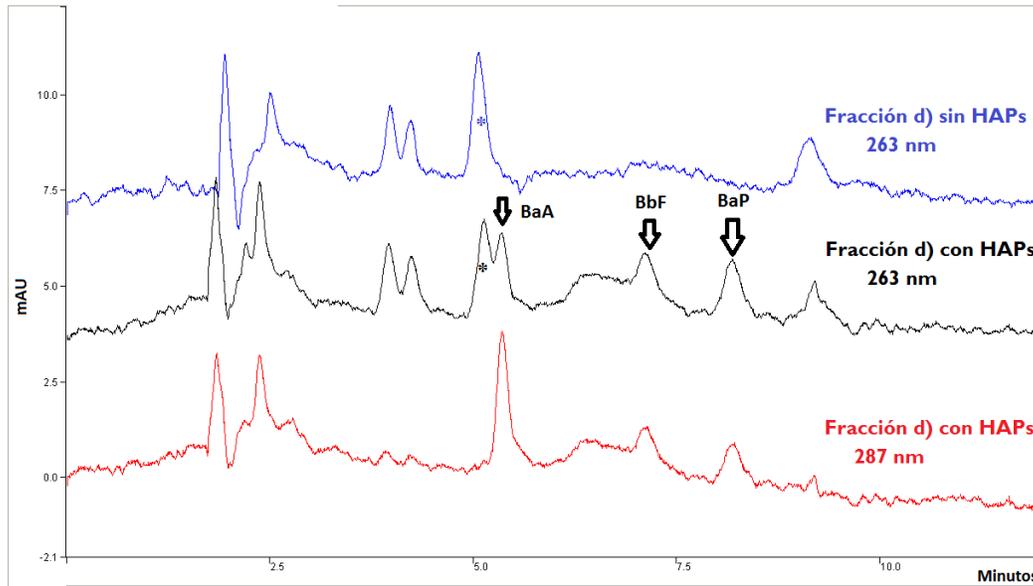


Figura 3.7.1.1: Cromatograma de HAPs e interferencias en extractos DMFS con una fase móvil cromatográfica de MeOH:H₂O (95:5).

3.8. Métodos de EFS y DMFS optimizados

Los protocolos completos de los métodos de de preparación de muestra ya optimizados se ilustran en las Figuras 3.8.1 y 3.8.2. . En el caso de la EFS, las modificaciones al método original consistieron en el aumento del volumen de elución (fracción e) de 2 a 4 mL y el paso adicional de evaporación a sequedad con reconstitución a 0.5 mL.

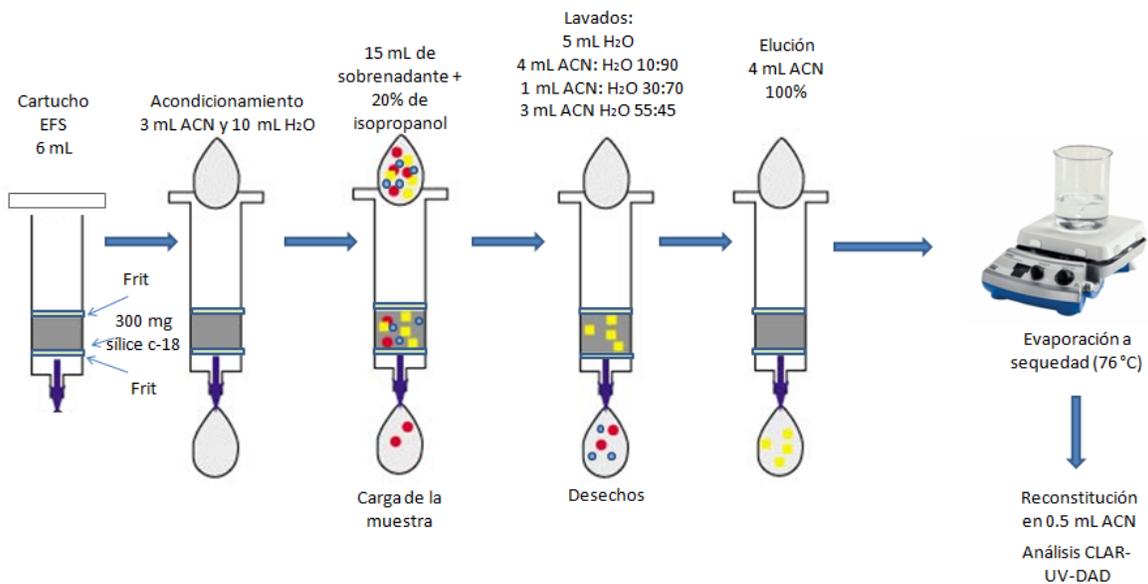


Figura 3.8.1: Método optimizado de EFS para medio líquido de cultivo

En el caso de la DMFS, la única modificación al método original, consiste en la disminución del volumen de elución (fracción d) de los HAPs a 0.5 mL, en vez de 1.0 mL del método original.

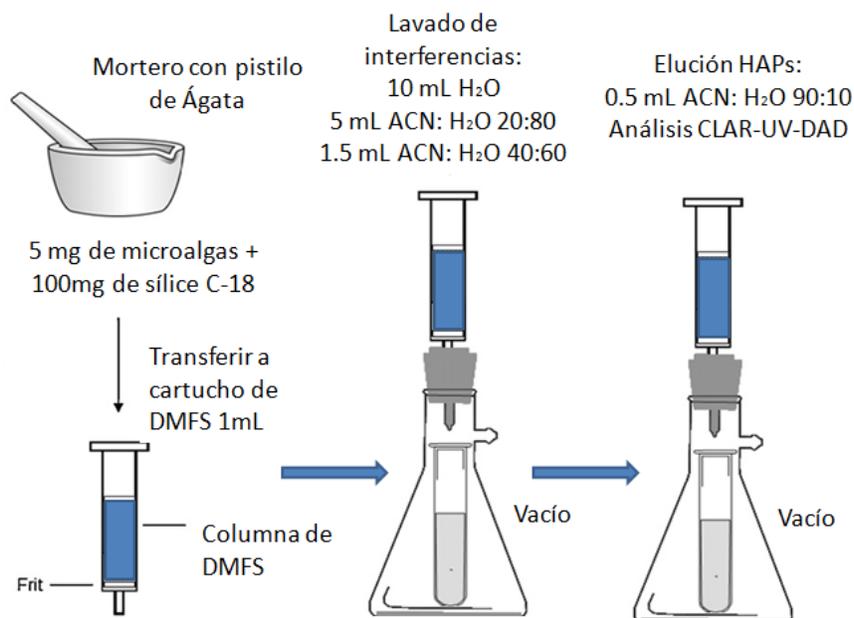


Figura 3.8.2: Método optimizado de DMFS para biomasa

3.9. Ensayos de exposición

3.9.1. Ensayos de exposición con hidrocarburos solos

3.9.1.1. Benzo[a]antraceno

En las figuras 3.9.1.1.1 A y B se observan las cantidades de hidrocarburo recuperadas en los ensayos de exposición del alga ante el BaA a los diferentes tiempos probados.

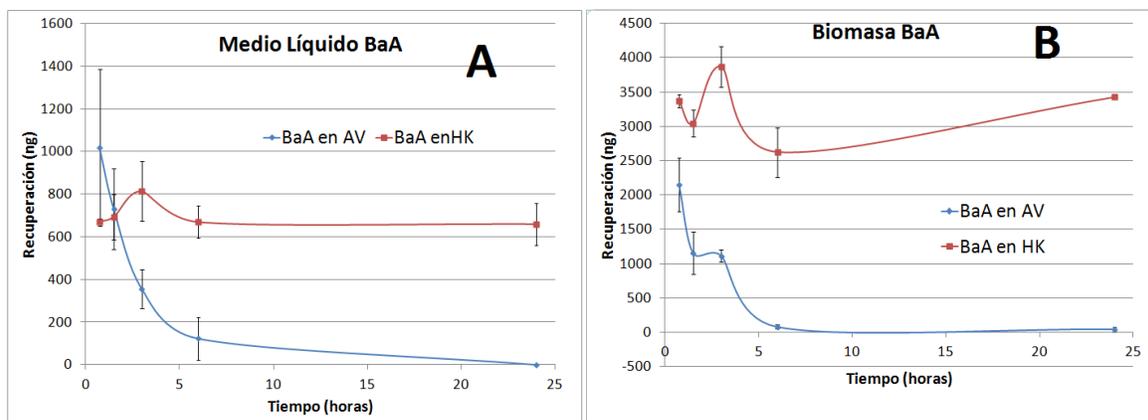


Figura 3.9.1.1.1 A. Recuperación de BaA en medio líquido y B. en la biomasa en función del tiempo

Tanto en el medio líquido como en la biomasa en AV se puede observar un decremento rápido y significativo de las cantidades del BaA en las primeras horas de exposición. La cantidad de hidrocarburo presente en el medio líquido a las 24 horas en AV es menor al límite de detección del equipo. Esto no implica que el 100% del BaA se haya metabolizado, sino que la concentración de este ha disminuido tanto que ya no es detectable mediante nuestro método.

En el caso de HK, en el medio líquido la cantidad de HAP presente se mantiene a un nivel que se puede considerar constante. Hay que recordar que estos hidrocarburos, al ser tan insolubles en agua y de alto peso molecular, tienden a alcanzar el equilibrio de disolución de forma muy lenta. Algunos trabajos de otros autores han encontrado que se alcanza un equilibrio bajo condiciones similares después del 4° día de exposición (4) y por tanto es de esperar tener mucha variabilidad en las cantidades de HAP recuperadas en HK en las primeras horas de exposición. Sin embargo, debe recalarse que el aparente aumento en la concentración del BaA en la biomasa de HK puede deberse a una transferencia de masa desde las paredes del material de vidrio hacia la biomasa en el tiempo, aunque esta hipótesis requiere ser corroborada.

En la figura 3.9.1.1.2 se puede observar la cantidad total de BaA recuperado cuando se suman los nanogramos recuperados del BaA del medio líquido con los de la biomasa.

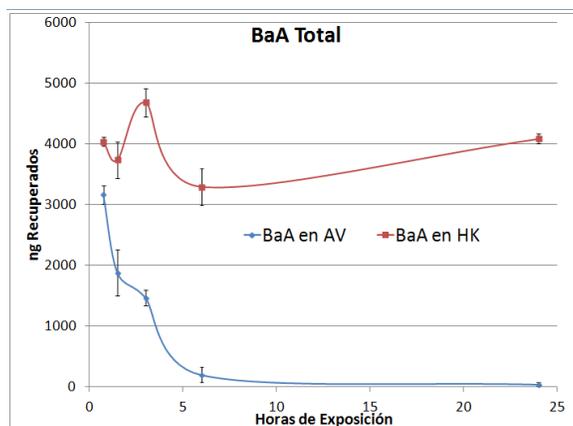


Figura 3.9.1.1.2: Cantidad total de BaA recuperado en los ensayos de exposición (biomasa + medio)

3.9.1.2. Benzo[b]fluoranteno

En las siguientes figuras se observan las cantidades de hidrocarburo recuperadas en los ensayos de exposición del alga ante el BbF a los diferentes tiempos.

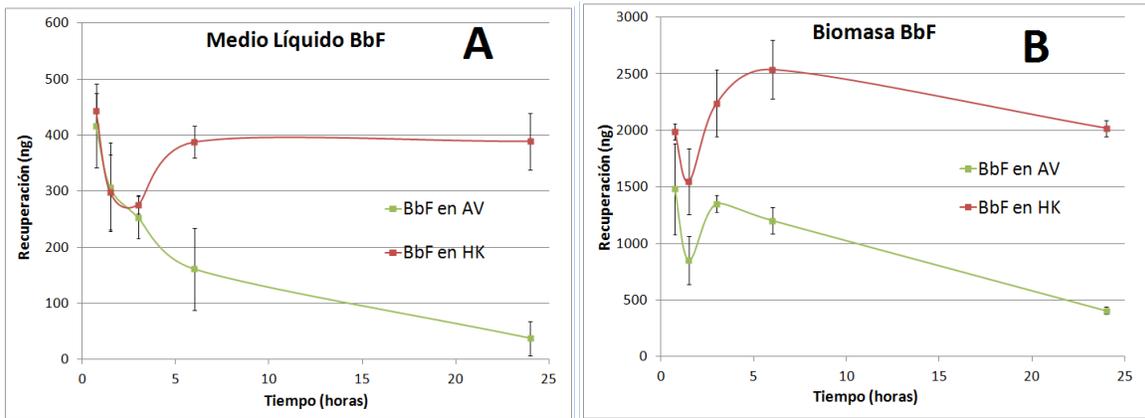


Figura 3.9.1.2.1 A. Recuperación de BbF en medio líquido y B. en la biomasa en función del tiempo

Nuevamente, tanto en el medio líquido como en la biomasa en AV se puede observar un decremento rápido y significativo en las primeras horas de exposición, sin embargo, en comparación con lo ocurrido en el caso del BaA, la pendiente es mucho menos pronunciada y a las 24 horas todavía existe una cantidad cuantificable de BbF tanto en el medio líquido (38 ng) como en la biomasa (405 ng), indicándonos que el BbF se metaboliza más lento que el BaA.

En la figura 3.9.1.2.2 se ilustra el total de BbF recuperado en biomasa más en el medio líquido. En esta figura se puede observar que aunque la cantidad de BbF presente en HK varía en el tiempo, no hay un decremento de importancia entre los 45 minutos y las 24 horas de exposición. Estas variaciones pueden deberse exclusivamente a que no se ha alcanzado el equilibrio en el sistema; en cambio, en AV se puede observar un decremento muy marcado en la concentración del hidrocarburo. Cabe resaltar que en este caso la pendiente de concentración vs tiempo es la menor entre los cuatro hidrocarburos ensayados.

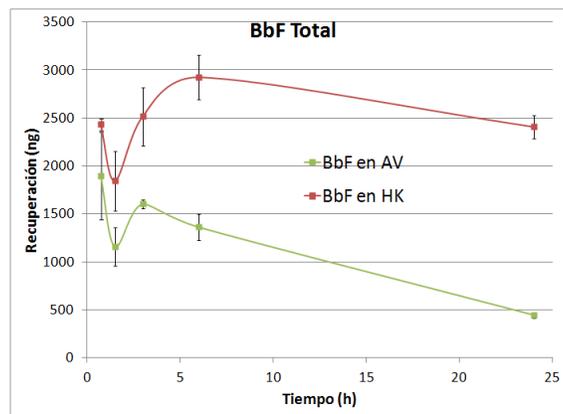


Figura 3.9.1.2.2: Cantidad total de BbF recuperado en los ensayos de exposición (biomasa + medio)

3.9.1.3. Benzo[k]fluoranteno

En las siguientes figuras se observan las cantidades de hidrocarburo recuperadas en los ensayos de exposición del alga ante el BkF a los diferentes tiempos.

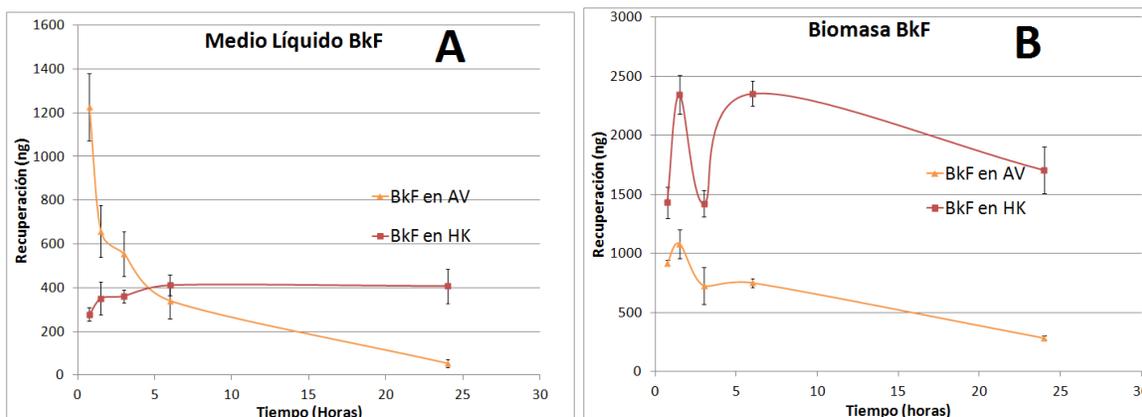


Figura 3.9.1.3.1 A. Recuperación de BkF en medio líquido y B. en la biomasa en función del tiempo

En el caso de este hidrocarburo llama la atención la mayor recuperación de BkF en el medio líquido de AV que en HK para las primeras horas de exposición (hasta las 5 hrs). Es difícil determinar la totalidad de las interacciones que ocurren en un sistema tan complejo como un cultivo de microorganismos, sin embargo es posible sugerir que en el caso del AV el alga activamente esté facilitando la migración del BkF al medio líquido como parte de su proceso de metabolismo, fenómeno no observado en HK dada la ausencia de metabolismo en este caso. Se ha reportado que algunas algas verdes o Clorófitas responden ante estímulos nocivos del ambiente liberando sustancias mucilaginosas –polisacáridos de alto peso molecular- desde vacuolas en el interior de la célula al exterior (29). Es posible que la liberación de estas sustancias, fenómeno solo posible en un alga metabólicamente activa, favorezca la el mantenimiento del hidrocarburo en el medio líquido. Es imposible verificar esto con los datos y alcances del presente trabajo, pero queda como una posibilidad para trabajos futuros.

En la figura 3.9.1.3.2 se ilustra el total de BkF recuperado en biomasa y medio líquido. En este caso observamos una intensa variación en la concentración del hidrocarburo recuperado en HK en las primeras horas de exposición. Nuevamente los tiempos ensayados son muy cortos como para llegar a un equilibrio, sin embargo en AV la concentración del hidrocarburo disminuye constantemente. En esta figura se puede apreciar claramente que en las primeras horas de exposición (entre 45 minutos y 3 horas) existe un decremento lineal en la concentración del hidrocarburo. Estas primeras horas de exposición se pueden considerar como la *zona lineal* del metabolismo ya que es muy probable que en estos tiempos el único factor involucrado en la

degradación sea la capacidad metabólica del alga para degradar el hidrocarburo o el número de recambio de las enzimas involucradas. Esta zona lineal será utilizada más adelante para comparar la velocidad de degradación entre los hidrocarburos ensayados.

En tiempos posteriores, otros factores como el equilibrio entre el hidrocarburo disuelto y el no disuelto, la internalización del hidrocarburo por otros mecanismos no osmóticos y las interacciones entre el hidrocarburo y los metabolitos u otros componentes del medio de cultivo, pueden estar afectando la velocidad de degradación.

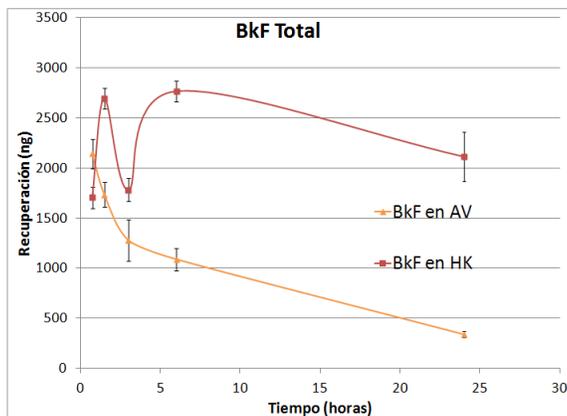


Figura 3.9.1.3.2: Cantidad total de BbF recuperado en los ensayos de exposición

3.9.1.4. Benzo[a]pireno

En las siguientes figuras se observan las cantidades de hidrocarburo recuperadas en los ensayos de exposición del alga ante el BaP a los diferentes tiempos.

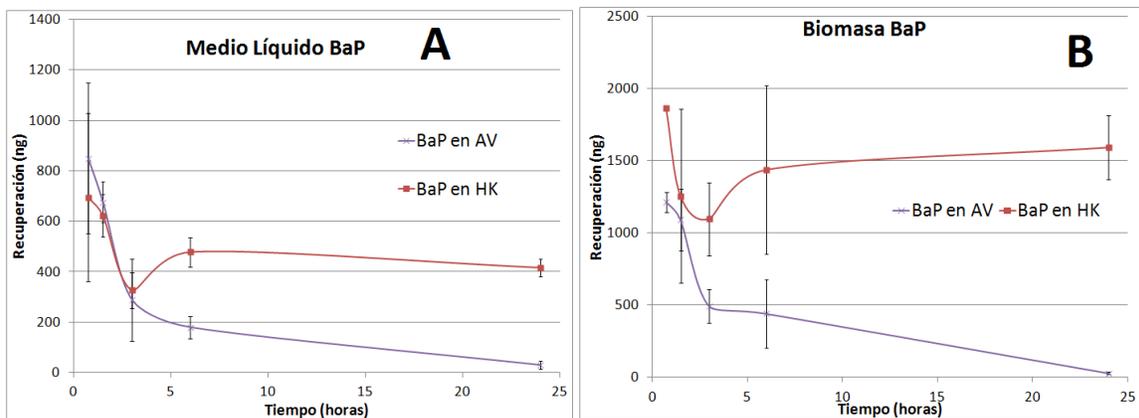


Figura 3.9.1.4.1 A: Recuperación de BaP en medio líquido y B en la biomasa.

El BaP es uno de los HAPs de alto peso molecular más estudiados y es considerado el hidrocarburo insignia de este grupo. En el caso del BaP podemos observar una disminución inicial en la

concentración tanto en AV como en HK en las primeras horas de exposición. Es difícil en este caso distinguir si el mecanismo es biológico o abiótico ya que en ambos casos ocurre una disminución en esta concentración. Debemos en este punto recordar lo dicho para los demás HAPs estudiados. Los tiempos son demasiado cortos como para alcanzar un equilibrio. A tiempos posteriores se observa que la disminución en la concentración de este hidrocarburo solamente sigue ocurriendo en AV mientras que la concentración se mantiene constante en HK.

En la figura 3.9.1.4.2 que muestra las cantidades totales, se puede apreciar que aunque el BaP disminuye a los primeros tiempos de forma similar en AV y HK, a los tiempos posteriores solamente se observa la disminución en la concentración del BaP en AV, corroborándose así la degradación.

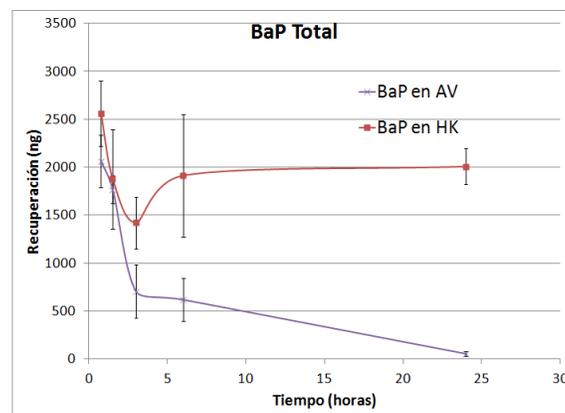
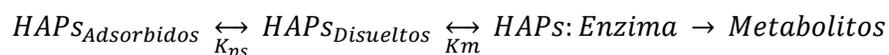


Figura 3.9.1.4.2: Cantidad total de BaP recuperado en los ensayos de exposición (biomasa + medio)

3.9.1.5. Comparación entre ensayos de exposición

Cuando se intentó comparar la capacidad del alga de degradar los hidrocarburos ensayados, se encontró con que la velocidad de degradación no era uniforme sino que iba variando con el tiempo. Tomando como ejemplo la figura 3.9.1.4.2 de la degradación total del BaP podemos observar que en AV durante las primeras horas, la cantidad de BaP recuperado disminuye linealmente con una pendiente negativa muy alta, sin embargo después de 3 horas la velocidad de degradación parece disminuir más lentamente. Conociendo la poca solubilidad de estos HAPs en el agua podemos suponer que la mayor cantidad de los HAPs en las primeras horas no se encuentran disueltos sino que están en la fase no acuosa del sistema, ya sea las paredes de vidrio de los matraces como adsorbidos sobre la biomasa. Un principio fundamental en los sistemas metabólicos, especialmente los osmóticos, como en el caso del alga estudiada, es que solo los compuestos en disolución son proclives al metabolismo, mientras que los compuestos en la fase no acuosa deben ser disueltos antes de poder ser metabolizados. De esta manera se propone el siguiente sistema:



En donde al metabolizarse los HAPs en disolución, el equilibrio de disolución se desplaza hacia la derecha, disolviéndose aquellos HAPs que se encontraban en los medios no acuosos. Este proceso al ser más lento que el metabolismo por parte del alga, se convierte entonces en el factor limitante en la velocidad de degradación de los hidrocarburos y por tanto la pendiente de la curva de degradación disminuye a tiempos posteriores. Por tanto, al comparar la velocidad de degradación de los hidrocarburos por parte del alga es menester enfocarse solo a la parte de la pendiente donde la degradación más rápida.

En la figura 3.9.1.5.1 se muestran las zonas de degradación lineal de los HAPs ensayados más la ecuación de la recta resultante de cada uno, tomadas de esta zona rápida de degradación.

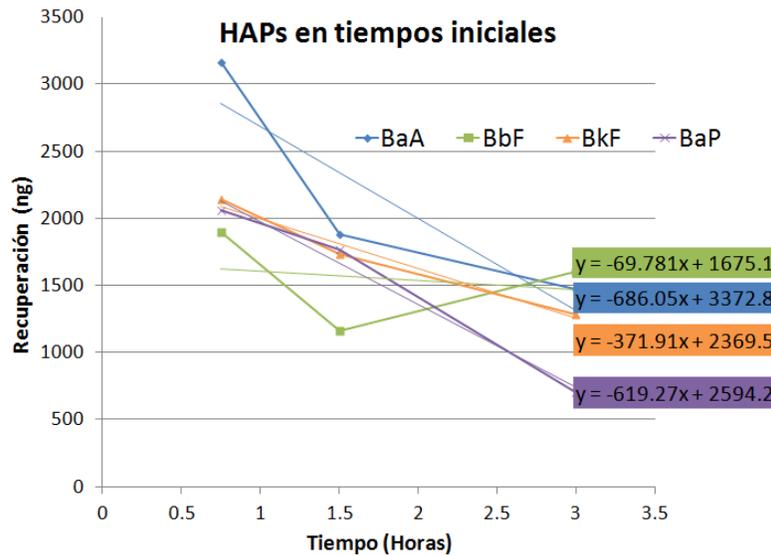


Figura 3.9.1.5.1: Velocidades iniciales en la parte lineal de la degradación de los HAPs

Al observar la gráfica anterior y las pendientes de las rectas, es fácil constatar que el orden en velocidad de degradación es $BaA > BaP > BkF > BbF$. Si bien existen muchos factores que pueden influir en la velocidad de degradación de cualquier compuesto como son los impedimentos estéricos, la afinidad enzimática por los compuestos, la capacidad de internalización para los compuestos de parte del alga, la capacidad de expulsar los metabolitos de estos o las interacciones de los HAPs con cualquiera de los componentes de la matriz o algún otro, el factor con mayor parsimonia que pueda determinar la velocidad de degradación de un compuesto, para un sistema osmótico, es la solubilidad de este en agua.

En la figura 3.9.1.5.2 se puede observar la relación que existe entre la solubilidad de los HAPs en el agua y su velocidad de degradación por parte del alga.

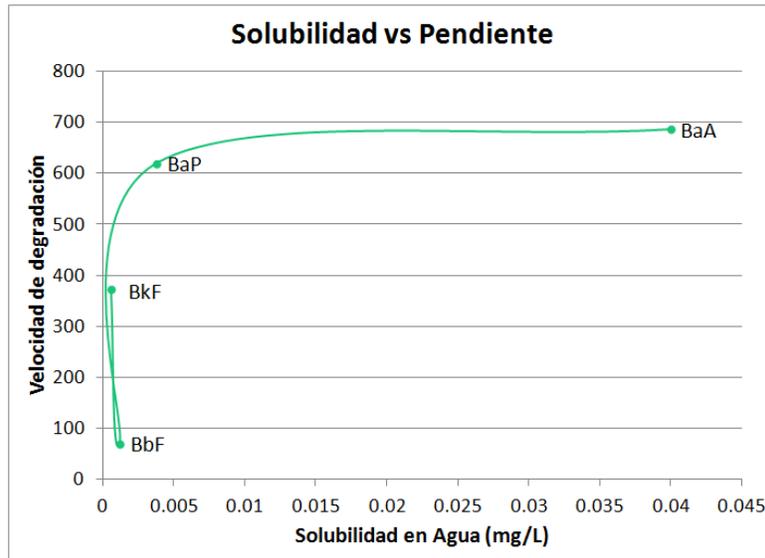


Figura 3.9.1.5.2: Relación entre la solubilidad de los HAPs y su pendiente de biodegradación

Como puede observarse, a excepción del BbF, entre mayor es la solubilidad en el agua de estos HAPs, mayor es su velocidad inicial de degradación. Esta relación corresponde muy bien con un sistema de obtención de los nutrientes del alga por ósmosis, el cual se ha reportado para las algas *Chlorophytas* (29) entre las cuales se encuentra *Selenastrum capricornutum*, pues en este caso la disponibilidad del hidrocarburo para ser degradado estará limitado por la concentración de este en el medio líquido y esta a su vez está determinada por la solubilidad en agua.

Por tanto, para tres de los cuatro HAPs estudiados, es su solubilidad en agua el factor limitante para la degradación de estos por parte del alga. En el caso del BbF puede que algún factor estérico esté entrando en juego pues desde la gráfica 3.9.1.2.2 se puede apreciar que el comportamiento de este HAP no es normal y su recuperación parece aumentar y disminuir de forma irregular a lo largo del tiempo, así como su velocidad de degradación parece asentarse mucho antes que las velocidades iniciales de los otros tres HAPs. Se requiere más trabajo de investigación para elucidar todos los pormenores del comportamiento de este hidrocarburo; sin embargo, esto no implica que la microalga estudiada deje de ser factible en un panorama de biorremediación pues esta, de todas formas, mostró tener capacidad para degradar este HAP en el tiempo estudiado.

3.9.2. Exposición de HAPs en combinación por pares

3.9.2.1. Benzo[a]antraceno + Benzo[a]pireno

En la Figura 3.9.2.1.1 se observan las gráficas de las cantidades de BaA recuperados cuando se realizó su exposición junto a BaP, tanto del medio líquido como de la biomasa y su comparación con los ensayos en los que no hay combinación.

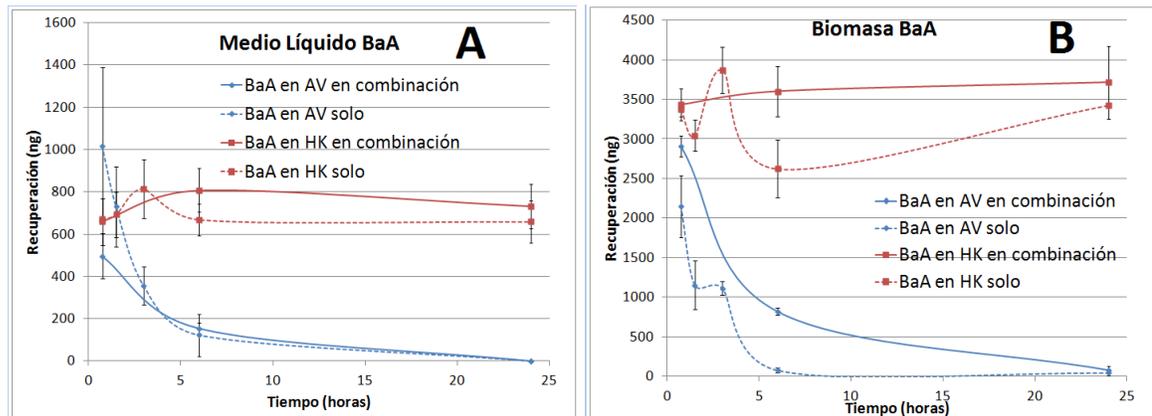


Figura 3.9.2.1.1 A: Recuperación de BaA en medio líquido y B en la biomasa en el ensayo combinado de exposición con el BaP

Se observa que en el medio líquido existe una menor recuperación inicial del BaA al estar este HAP en combinación con el BaP que cuando se encuentra solo, mientras que en la biomasa aparenta haber más de este hidrocarburo en la combinación que al encontrarse este solo.

En este punto es necesario tomar en cuenta lo siguiente: Para un compuesto que está presente en una mezcla orgánica en condiciones por encima de la saturación, la concentración en disolución disminuye conforme la concentración del compuesto en la mezcla disminuye. La concentración máxima disuelta, o solubilidad efectiva de un compuesto en una mezcla orgánica está en función de la solubilidad de ese compuesto puro y la fracción molar del compuesto en la fase orgánica. La ecuación que describe este fenómeno se le conoce como Ley de Raoult (43):

$$C_w = \chi * S$$

Donde:

C_w = Concentración del compuesto en el agua (mg L^{-1})

χ = Fracción molar del compuesto en la fase orgánica (mol de compuesto/mol de aceite)

S = Solubilidad de compuesto puro en el agua (mg L^{-1})

Esta ecuación fue desarrollada para predecir la concentración de un compuesto en el agua, al estar en contacto con una mezcla de hidrocarburos, generalmente petróleo por encima de la concentración de saturación. La ley de Raoult es válida para compuestos que se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente. Para compuestos sólidos como los HAPs de alto peso molecular se requiere tomar en cuenta la “solubilidad del líquido subenfriado” en vez de la solubilidad del compuesto puro (S).

De la ecuación anterior se desprende que la concentración en el agua de un HAP, al encontrarse en combinación con otro HAP siempre será menor que la concentración de este al encontrarse solo. Por tanto, al disminuir la concentración del HAP en el medio líquido, y al no tener los HAPs la capacidad de pasar a la fase gaseosa por su baja presión de vapor, aumentan sus concentraciones en la biomasa.

El mismo efecto se puede observar en el caso del BaP, como se puede apreciar en la Figura 3.9.2.1.2

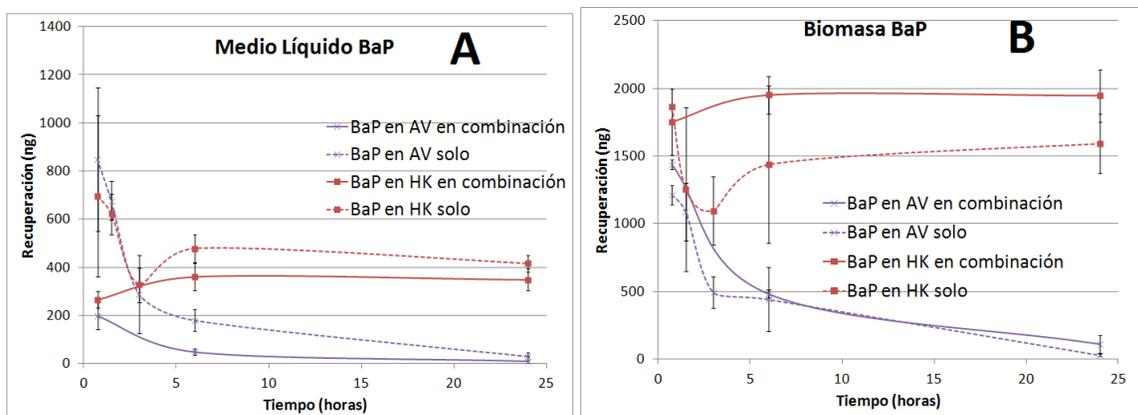
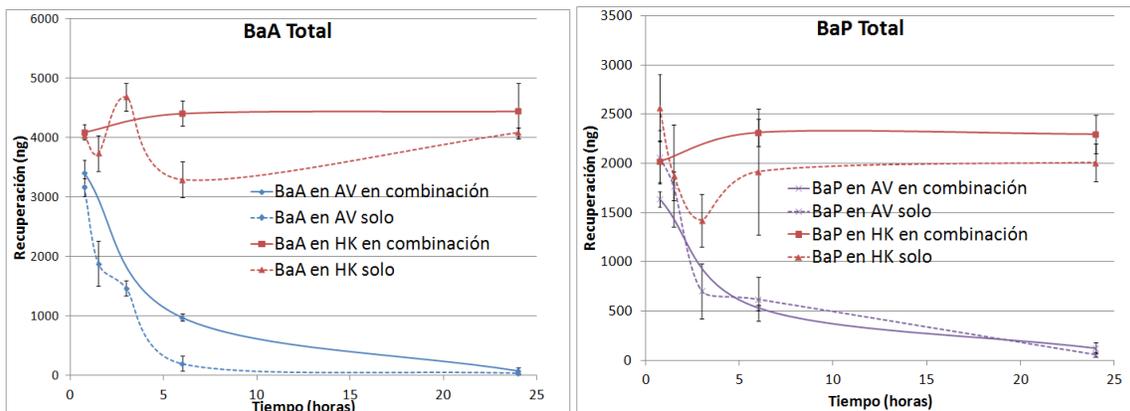


Figura 3.9.2.1.2 A: Recuperación de BaP en medio líquido y B en la biomasa.

Este fenómeno se presenta en las combinaciones subsecuentes de hidrocarburos. En todos los casos en el medio líquido la concentración de ambos hidrocarburos es menor cuando están combinados que cuando estos están solos, mientras que en la biomasa ocurre al revés; al estar combinados la presencia de HAP es mayor que cuando están solos. Por lo tanto, es de poca utilidad analizar uno a uno la presencia de los hidrocarburos en ambas fases, medio líquido y biomasa, y es de mayor utilidad considerar solo los totales de los hidrocarburos pues los totales resultan mucho más informativos en estos casos. En el Anexo 2 Se presentan las curvas de recuperación contra tiempo para las demás combinaciones y comparación con sus respectivos ensayos de exposición con los HAPs solos con algas vivas y muertas.

En las figuras 3.9.2.1.3 y 3.9.2.1.4 se muestran las recuperaciones totales de los hidrocarburos BaA y BaP en los ensayos combinados de exposición y su comparación con los ensayos de exposición de los hidrocarburos solos para algas vivas y muertas.

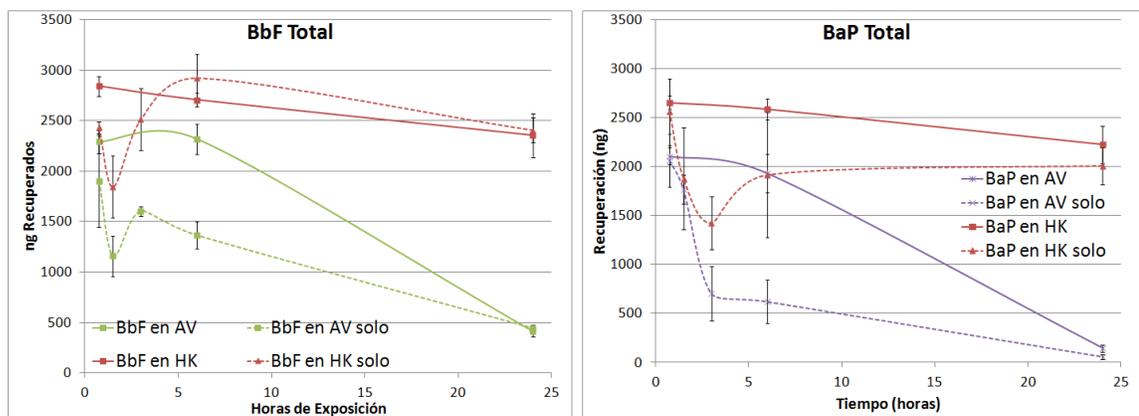


Figuras: Recuperación total de BaA en ensayo combinado de exposición con BaP (3.9.2.1.3) y recuperación total de BaP en el mismo ensayo (3.9.2.1.4)

Como puede observarse, en el caso del BaA existe una recuperación menor en los ensayos de exposición solos que en el ensayo de exposición combinado, lo que corrobora un metabolismo más acelerado cuando el alga está expuesta al BaA solo, que cuando se encuentra en combinación con el BaP. Sin embargo, a las 24 horas de exposición la recuperación del BaA es mínima, encontrándose cerca de nuestro límite de cuantificación, lo cual nos indica que aunque la capacidad del alga para metabolizar el BaA está disminuida, esto no necesariamente representa un problema para un posible uso en la biorremediación de ambientes contaminados. En el caso del BaP no encontramos diferencia entre la capacidad del alga de metabolizar este hidrocarburo cuando se encuentra solo que cuando está en combinación con el BaA. Esto puede significar que el BaP es más afín a las enzimas encargadas del metabolismo de esta clase de hidrocarburos y por tanto desplaza al BaA en el sitio metabólico. Esto también puede explicar el menor metabolismo del BaA bajo estas condiciones.

3.9.2.2. Benzo[b]fluoranteno + Benzo[a]pireno

En las siguientes Figuras se observan las cantidades totales de BbF y BaP recuperadas en los ensayos de exposición tanto combinados como solos.

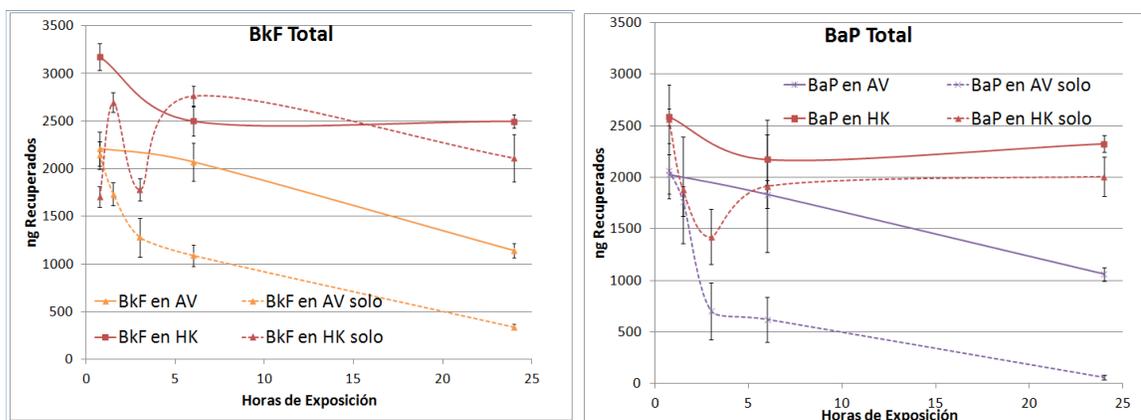


Figuras: Recuperación de BbF total en los ensayos solos y combinados con BaP (3.9.2.2.1) y de BaP en los mismos ensayos (3.9.2.2.2).

En estas gráficas es muy evidente que en los ensayos de exposición la degradación de ambos hidrocarburos es más lenta cuando están en combinación que cuando están solos. Es importante notar que a diferencia de los ensayos con la combinación BaA + BaP, en este ensayo la velocidad de degradación del BaP sí se ve afectada. En este caso también vale la pena notar que en los ensayos de exposición combinados, aún siendo la velocidad de degradación más lenta que en los ensayos de exposición con los hidrocarburos solos, a las 24 horas de exposición los niveles de recuperación ya son prácticamente iguales que en los últimos por lo que es poco probable, bajo estos criterios, que en el panorama de la biorremediación, el alga se vea afectada en su capacidad metabólica por la presencia de otro HAP de alto peso molecular. Esto, sin embargo, tiene la limitante de que solo se han hecho pruebas a las 24 horas de exposición y por tanto no conocemos si otras variantes como la capacidad reproductiva del alga o la capacidad de obtener nutrientes a largo plazo pueda verse afectada.

3.9.2.3. Benzo[k]fluoranteno + Benzo[a]pireno

En las siguientes Figuras se observan las cantidades totales de BkF y BaP recuperadas en los ensayos de exposición tanto combinados como solos.



Figuras: Recuperación de BkF total en los ensayos solos y combinados con BaP (3.9.2.3.1) y de BaP en los mismos ensayos (3.9.2.3.2).

Al igual que en los ensayos de exposición anteriores, la recuperación de los HAPs cuando están en combinación es mayor que cuando se exponen solos ante el alga. A diferencia de los ensayos anteriores, en este caso sí hay una diferencia importante en la recuperación a las 24 horas entre los ensayos de exposición con los HAPs solos que cuando se encuentran combinados. Es especialmente llamativo que para el BaP la capacidad de degradación del alga se ve severamente disminuida cuando este hidrocarburo se agrega en combinación con el BkF, sin embargo, aún con todo, se evidencia que existe una degradación de este hidrocarburo, y que en ambos casos, a las 24 horas de exposición la recuperación del BkF y del BaP es del 45% para ambos, en comparación con la recuperación al mismo tiempo en HK. Por tanto, si bien esta combinación de HAPs de alto peso molecular resulta en una degradación disminuida, esto no implica que el alga no degrade completamente ambos hidrocarburos en un tiempo más largo que el estudiado y de ahí que sea factible para utilizarse en la biorremediación de sitios contaminados.

Conclusiones

Los métodos basados en la Extracción en Fase Sólida para el medio de cultivo líquido y Dispersión en Matriz de Fase Sólida para la biomasa de la microalga *Selenastrum capricornutum* demostraron ser eficientes, y reproducibles. El sistema cromatográfico utilizado demostró ser lineal y con un límite de detección y cuantificación aceptables. Con el uso de estos métodos demostramos la capacidad del alga para metabolizar cuatro HAPs de alto peso molecular: Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno y Benzo[a]pireno. De estos cuatro HAPs solo uno: el BaP había demostrado ser susceptible del metabolismo por parte de esta microalga; para los tres HAPs restantes, esta es la primera vez que se demuestra su metabolismo por parte de esta microalga.

Todos los HAPs probados sufren un metabolismo rápido dentro de las primeras 24 horas de exposición, el cual se ve limitado por la solubilidad de estos hidrocarburos en el agua. El metabolismo parece estar en función de la cantidad de HAPs disueltos y por tanto su biodisponibilidad. La capacidad del alga para metabolizar estos hidrocarburos se ve disminuida cuando se expone a combinaciones de pares de estos HAPs. En la mayoría de las combinaciones el metabolismo de ambos hidrocarburos fue más lento que cuando se hallaban solos. Esto puede deberse tanto a una solubilidad menor cuando los HAPs existen como parte de una mezcla orgánica -fenómeno denominado ley de Raoult-, a la competencia de estos HAPs por el sitio catalítico de las enzimas responsables de su metabolismo o simplemente a la mayor concentración global de contaminantes a la que se expone el alga. Se debe considerar que todos los bioensayos se realizaron con número de células constante, sin embargo es importante considerar que aún bajo estas condiciones de degradación más difícil, al enfrentarse a la vez a dos compuestos en su medio, el alga logra degradar a los HAPs mencionados, con lo cual el alga es un organismo prometedor para la biorremediación en sitios contaminados con estos HAPs. Se requiere trabajo de campo para comprobar esto.

Bibliografía

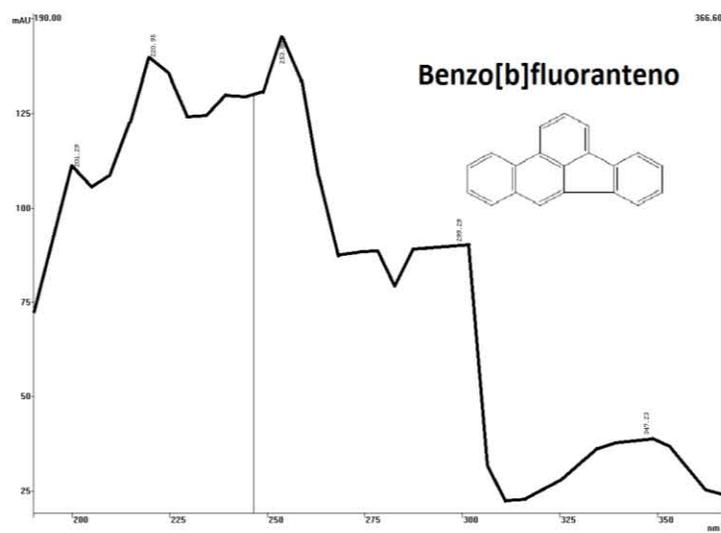
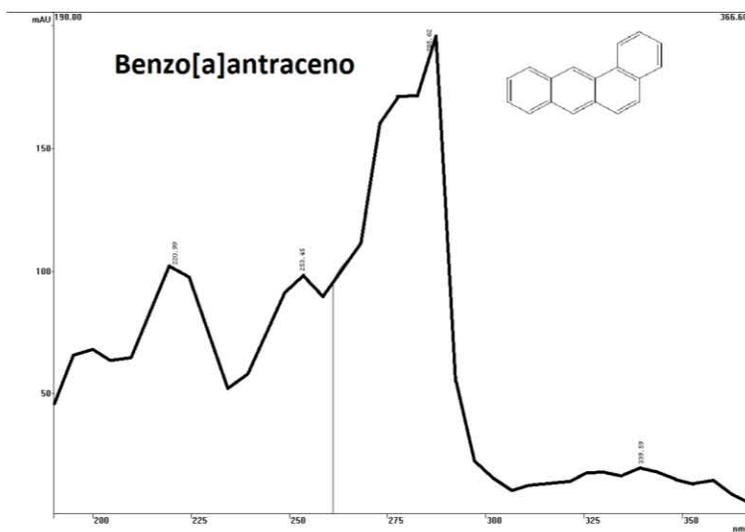
1. **Juhasz, Albert L y Naidu, Ravendra.** 2000. *Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene.* International Biodeterioration & Biodegradation, pp. 57-88.
2. **National Toxicology Program.** 2011. *Report on Carcinogens 12th Edition.* U.S. Department of Health and Human Services.
3. **Haritash, A.K. Caushik, C.P.** 2009. *Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review.* Journal of Hazardous Materials, Vol. 169, pp. 1-15.
4. **Ke, Lin, et al.** 2010. *Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga Selenastrum capricornutum.* Bioresource Technology, Vol. 101, pp. 6950–6961.
5. **Gao, Q.T., Tam, N.F.Y.** 2011. *Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, Chlorella vulgaris and Selenastrum capricornutum, to nonylphenol stress.* Chemosphere, pp. 346-354.
6. **Warshawsky, David, et al.** 1995. *Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light.* Chemico-Biological Interactions 97. pp. 131-148.
7. **Lei, An-Ping, et al.** 2007. *Removal of Fluoranthene and pyrene by different microalgal species.* Bioresource Technology 98, pp. 273-280.
8. **Velasco-Cruz, Marisol.** 2011. *Metodología analítica cromatográfica para la determinación de metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microalgas* Tesis para obtener grado de QFB. Distrito Federal. Facultad de Química, UNAM.
9. **Finlayson-Pitts, Barbara y Pitts Jr., James.** 1997. *Tropospheric Air Pollution: Ozone, Airborne Toxics, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Particles.* Science, Vol. 276, pp. 1045 - 1052.
10. **Wakeham, Stuart G., Schaffner, Christian y Giger, Walter.** 1980. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in Recent lake sediments--II. Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis.* Geochimica et Cosmochimica Acta, Vol. 44, pp. 415-429.
11. **Achten, C. y Hofmann, T.** 2009. *Native polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in coals – A hardly recognized source of environmental contamination.* Science of the Total Environment 407, pp. 2461 – 2473.
12. **Harvey, R. G.** 1991. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and carcinogenicity.* Cambridge: Cambridge University Press.
13. **Labana, Sumeet, et al.** 2007. *Diversity, Biodegradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.* [aut. libro] Shree N. Singh y Rudra D. Tripathi. *Environmental Bioremediation Technologies.* Springer. Berlin. pp. 409 - 443.

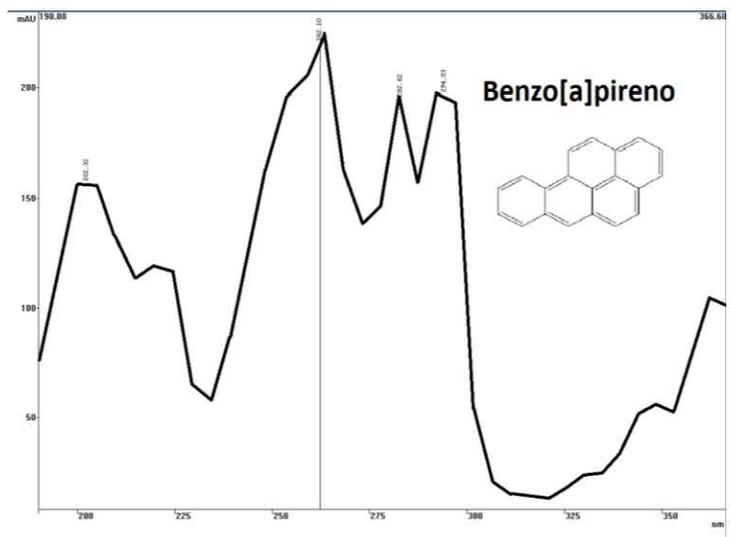
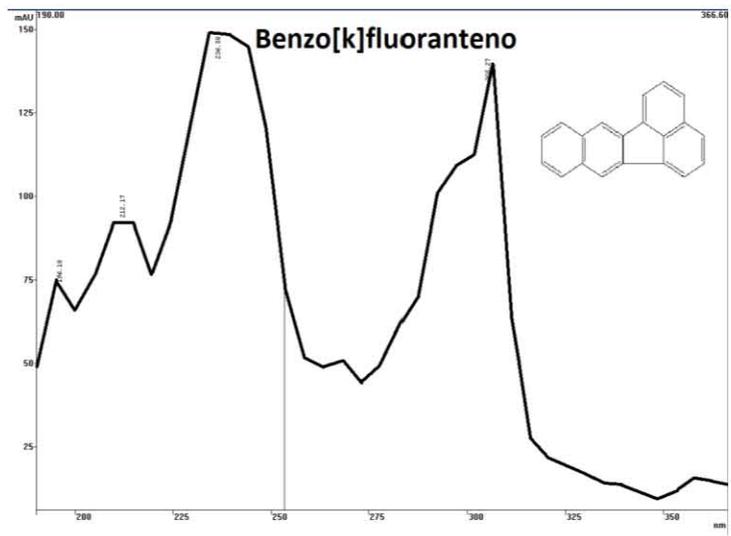
14. **International Agency for Research on Cancer.** 2005. *IARC Monographs on the Evaluations of Carcinogenic Risks to Humans.* Lyon : World Health Organization. Vol. 92.
15. **Godschalk, R. W. L., et al.** 1998. *Aromatic DNA Adducts in Human White Blood Cells and Skin after Dermal Application of Coal Tar.* *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Vol. 7, pp. 767-773.
16. **Van Metre, Peter, et al.** 2012. *PAH volatilization following application of coal-tar-based pavement sealant,* *Atmospheric Environment* 51, pp. 108-115.
17. **Greenberg, A, et al.** 1985. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in New Jersey: A Comparison of Winter and Summer Concentrations over a Two-Year Period.* *Atmospheric Environment* 8, Vol. 19, pp. 1325 - 1339.
18. **García, Apolinar Ibañez.** 2008. *Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en las PM10 de la Zona Metropolitana del Valle de México.* Distrito Federal : Facultad de Química. Tesis de Licenciatura.
19. **Skupinska, Katarzyna, Misiewicz, Irena y Kasprzycka-Guttman, Teresa.** 2004. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Physicochemical Properties, Environmental Appearance and Impact on Living Organisms.* *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 3, Vol. 61, pp. 233 - 240.
20. **Kazerouni, N., et al.** 2001. *Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study.* *Food and Chemical Toxicology* 39, pp. 423 - 436.
21. **Dyremark, Anders, et al.** 1995 *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Emissions from Charcoal Grilling.* *Atmospheric Environment* 13, Vol. 29, pp. 1553 - 1558.
22. **Lijinsky, William.** 1991 *The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food.* *Mutation Research* 259, pp. 251-261.
23. **Pérez-Cadahía, Beatriz, et al.** 2004. *Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil.* *Comparative Biochemistry and Physiology* 138, Vol. Part C, pp. 453–460.
24. **Landrum, Peter F, et al.** 2003. *Bioaccumulation and critical body residue of PAHs in the amphipod, *Diporeia* spp.: additional evidence to support toxicity additivity for PAH mixtures.* *Chemosphere* 51, pp. 481–489.
25. **Canadian Council of Ministers of the Environment.** *Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.* 1999.
26. **Cerniglia, Carl E.** 1993. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.* *Current Opinion in Biotechnology* 4, pp. 331-338.
27. **Luo, Lei, et al.** 2012. *Relationships between aging of PAHs and soil properties.* *Environmental Pollution* 170, pp. 177 - 182.

28. **Arfsten, Darryl P, Schaeffer, David J. y Mulveny, Daniel C.** 1996. *The Effects of Near Ultraviolet Radiation on the Toxic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Animals and Plants: A Review*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 33, pp. 1 - 24.
29. **Lee, Robert Edward.** *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, 2008.
30. **M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M.** AlgaeBase. [En línea] World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2012. [Citado el: 5 de Noviembre de 2012.] <http://www.algaebase.org>.
31. **Bjoörklund, Erland y Nilsson, Tobias.** 2000 *Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis*. *Trends in Analytical Chemistry* 7, Vol. 19.
32. **Camel, Valérie.** 2003 *Solid phase extraction of trace elements*. *Spectrochimica Acta Part B* 58.
33. **Hennion, Marie-Claire.** 1999. *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A* 856, pp. 3-54.
34. **Poole, Colin F., Gunatilleka, Ajith D. y Sethuraman, Revathy.** 2000. *Contributions of theory to method development in solid-phase extraction*. *Journal of Chromatography A* 885, pp. 17–39.
35. **Barker, Steven A.** 2000. *Matrix solid-phase dispersion*. *Journal Of Chromatography A* 885, pp. 115 - 127.
36. **Gutiérrez Valencia, Tania Milena.** 2012. *Extracción Miniaturizada de Contaminantes Orgánicos Presentes en Tejidos de Bovino Basada en la Técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida*. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Distrito Federal, Facultad de Química, UNAM.
37. **Mas, Sílvia, et al.** 2010. *Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review*. *Talanta* 80, pp. 1052 - 1067.
38. **EPA.** 1986. *Method 8310: Plynuclear Aromatic Hydrocarbons*. Environmental Protection Agency.
39. . —. 1996. *Method 8270C: SEMIVOLATILE ORGANIC COMPOUNDS BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC/MS)*. Environmental Protection Agency.
40. . **Harris, Daniel C.** 2001. *Análisis Químico Cuantitativo* . Reverte, Barcelona.
41. **AOAC International.** 2002. *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*. Gaithersburg, MA : AOAC International Guidelines.
42. **Barker, Steven A.** 2007. *Matrix solid phase dispersion (MSDP)*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, pp 151 - 162.
43. **O'Reilly, Kirk T, Magaw, Renae I y Rixey, William G.** 2001. *Predicting the effect of Hydrocarbon and Hydrocarbon-Impacted Soil on Groundwater*. American Petroleum Institute 14.

Anexo I

Relación de espectros de absorción UV de los cuatro HAPs utilizados en el desarrollo de la presente tesis. Fase móvil isocrática: MeOH 95% H₂O 5%, Velocidad de Flujo: 1 mL min⁻¹

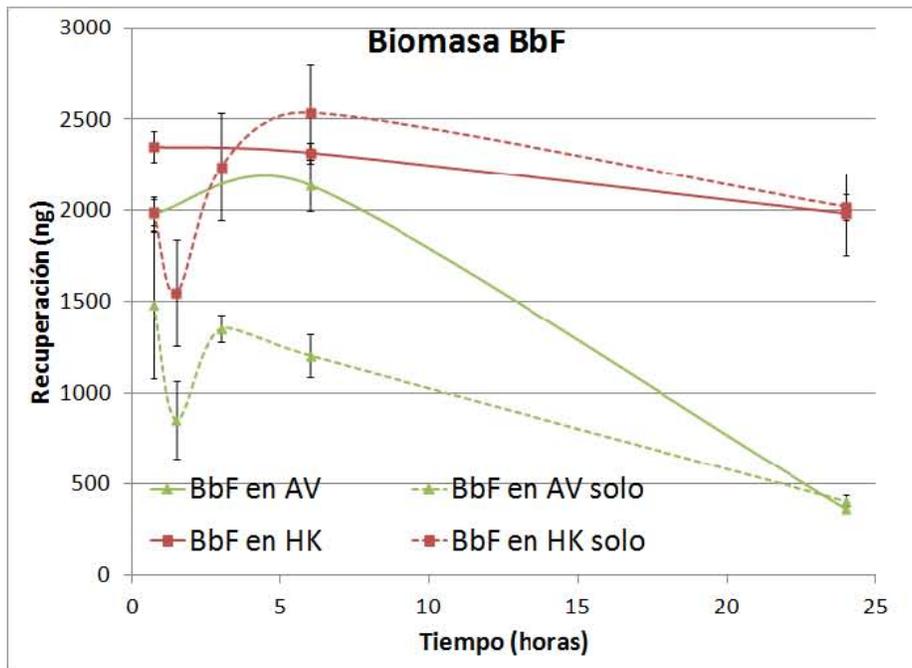
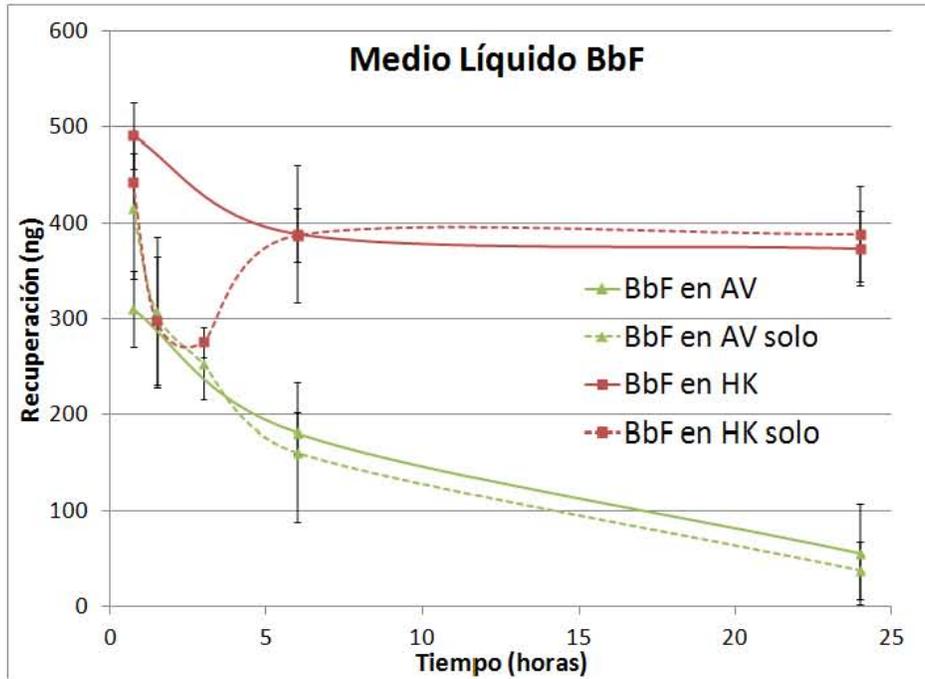


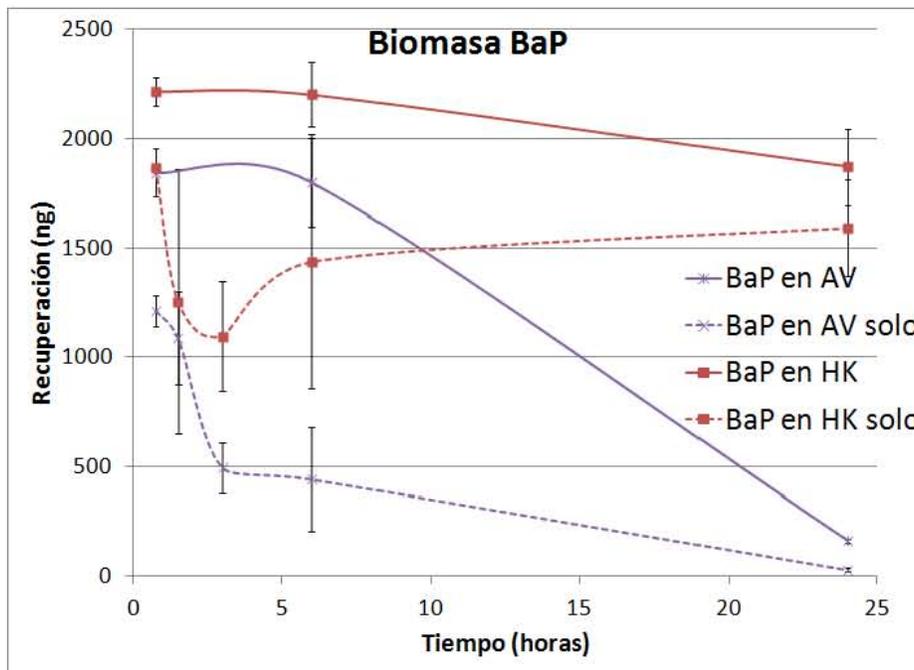
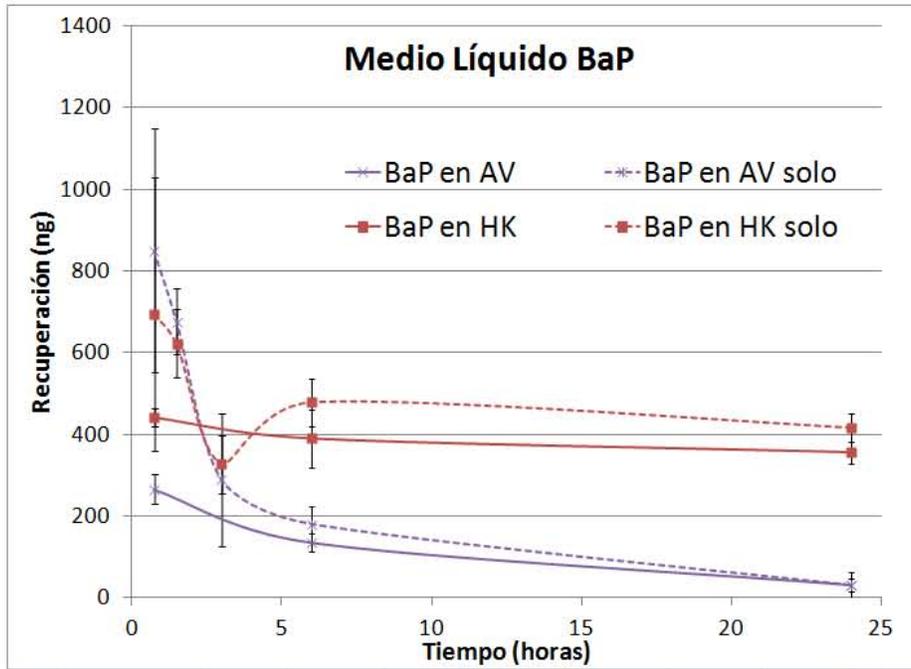


Anexo II

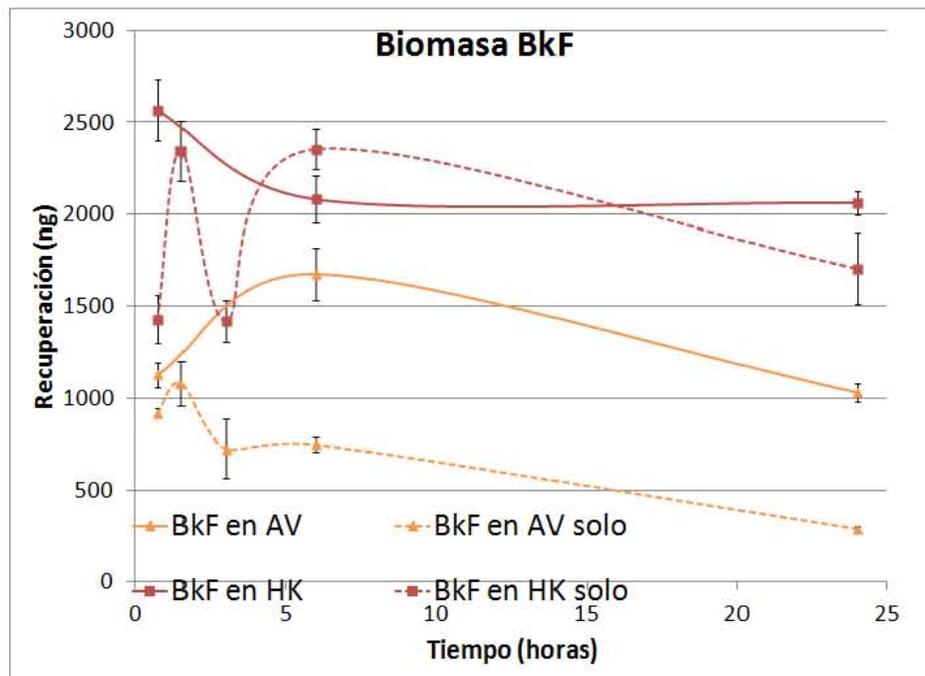
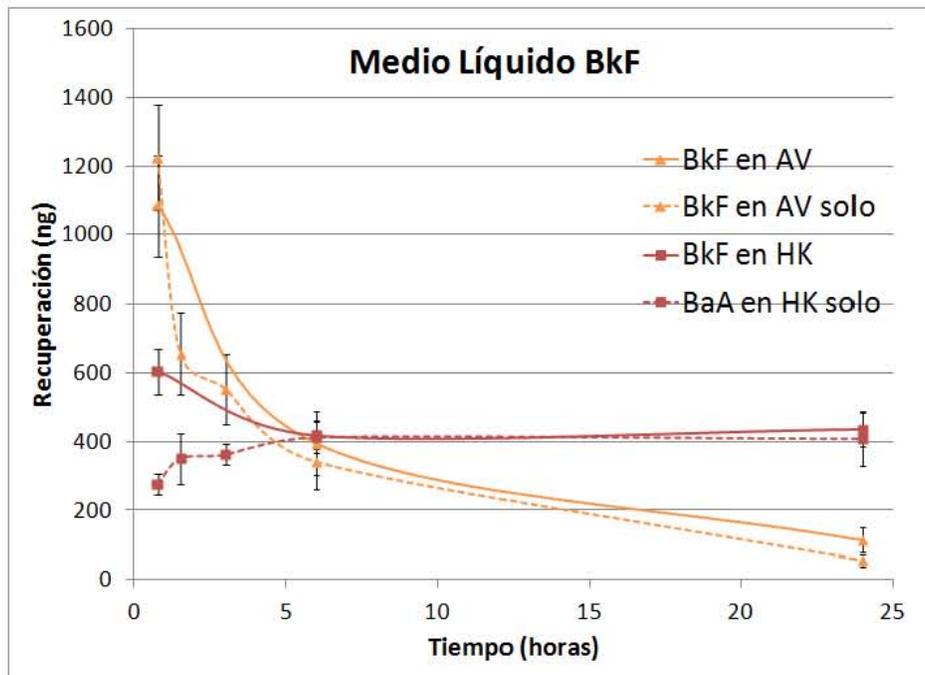
Comparación de las recuperaciones en los ensayos de exposición combinados vs los ensayos de combinación solos.

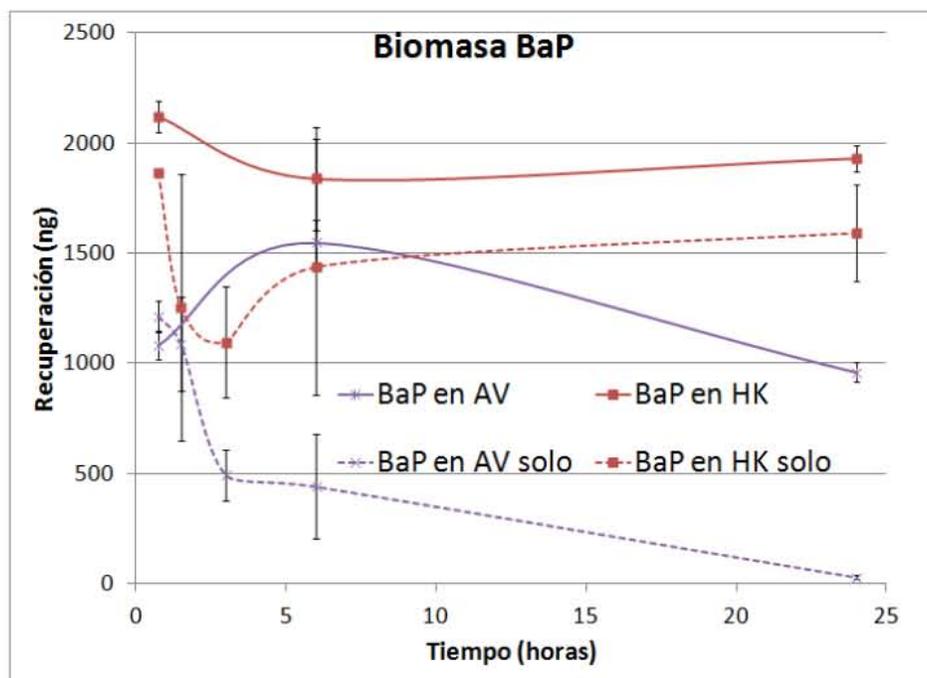
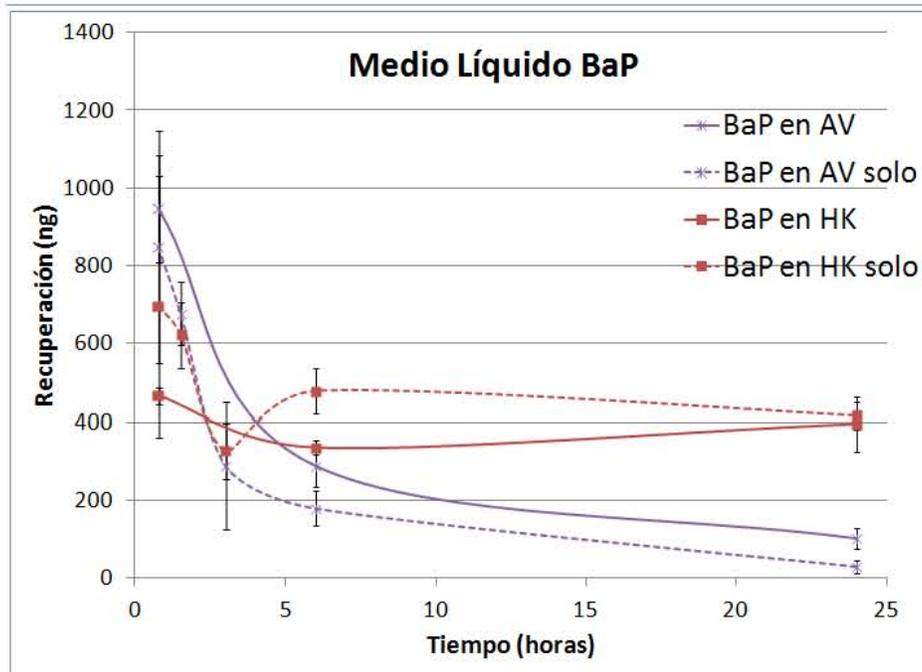
Benzo[b]fluoranteno + Benzo[a]pireno





Benzo[k]fluoranteno + Benzo[a]pireno





Anexo III

Comparación de las recuperaciones en los ensayos de exposición de los cuatro HAPs en medio líquido y biomasa

