



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“METODOLOGÍAS CROMATOGRÁFICAS EN LÍNEA PARA LA
DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS EN CULTIVOS DE MICROORGANISMOS”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JOSÉ DE JESÚS OLMOS ESPEJEL

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTORAL

DRA. LUZ ELENA VERA ÁVILA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ
FES-CUAUTITLAN, UNAM

MÉXICO, D. F. ABRIL DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por su asesoría y el apoyo que me ha dado durante todo el posgrado y en mi formación como profesor.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por darme la oportunidad de formarme como profesional y como persona.

A las Doctoras Luz Elena Vera y Alma Luisa Revilla por sus comentarios en cada evaluación semestral que enriquecieron mi formación.

A mis compañeros del laboratorio Marisol Velasco, Gabriel Díaz, Fernando Hernández, Adriana Montañó, Evelyn Beltrán al maestro Pedro Villanueva y al señor Javier Jiménez. En especial a Tania Gutiérrez y a la maestra Norma Ruth López por apoyarme durante todo el Doctorado.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) por la beca de Doctorado No. 204859 otorgada para mis estudios y por el apoyo asignado al proyecto No. 166389.

A la *Dirección General de Asuntos de Personal Académico* (DGAPA-UNAM) por el apoyo otorgado a los proyectos PAPIIT IN223111 y PAPIIME PE202310.

A mi familia Tania y Giovanni Olmos, Juan Manuel y Danna Paola Luna que siempre están conmigo.

A mis amigos Ruth Téllez, Roberto Rodríguez, Carlos Lozada, Esaú Solano, Irán Ocaña, Jessica Valdés y Félix Araujo, por los momentos compartidos en todos estos años.

A la familia Gabino Cruz por recibirme en su hogar, una estancia breve, pero que siempre recordaré.

A la Dra. Evangelina Camacho Frías y compañeros de laboratorio, por el apoyo brindado para la obtención de los espectros de masas en la CONADE.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones durante la revisión de este trabajo.

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

Dra. Luz Elena Vera Ávila

(Presidente del jurado)

Dra. Josefina de Gyves y Marciniak

(Vocal)

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

(Vocal)

Dra. Sandra Ignacia Ramírez Jiménez

(Vocal)

Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

(Secretario)

Dedico este trabajo con cariño a mis padres *Virginia* y *Camilo*, también a mi abuelita *Saturnina* por quienes nunca dejaré de sentir un gran cariño, admiración y respeto.

*Los chamanes me enseñaron la visión al interior,
Me dijeron que el desierto se camina con valor,
Que el guerrero llega lejos,
Aunque sea con bastón.*

José Cruz Camargo Zurita. Lección de vida.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de la
Dra. Martha Patricia García Camacho
en el Departamento de Química Analítica, laboratorio Anexo 3-D del edificio A de la
Facultad de Química, UNAM.

PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN

Publicaciones

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

Congresos

46° Congreso Mexicano de Química. 30° Congreso Nacional de Educación Química. Llevado a cabo del 10 al 14 de septiembre de 2011 en la ciudad de Querétaro, México. Título del trabajo “METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DE BaP EN CULTIVOS DE MICROALGAS”.

II Congreso de Docencia e Investigación en Química, realizado en la Ciudad de México del 7 al 11 de octubre de 2011. Título del trabajo “EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS Y METABOLITOS EN CULTIVOS DE MICROALGAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS EN LÍNEA”.

QUIMIUNAM 2011 llevado a cabo del 16 al 18 de noviembre de 2011 en la Ciudad de México. Título del trabajo “METODOLOGÍAS CROMATOGRÁFICAS EN LÍNEA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MICROORGANISMOS”.

38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2012) llevado a cabo del 16 al 21 de junio del 2012 en Anaheim, CA, USA. Título del trabajo “EXTRACTION AND ANALYSIS OF BENZO[a]PYRENE AND METABOLITES IN MICROALGAE CULTURES BY OFF-LINE/ON-LINE MSPD-SPE AND HPLC-FD METHODS”.

XXV Congreso Nacional de Química Analítica. XV Simposio Estudiantil, realizado en la Ciudad de México del 25 al 29 de junio de 2012. Título del trabajo “METODOLOGÍA ANALÍTICA CROMATOGRÁFICA APLICADA AL ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR *Selenastrum capricornutum*”.

QUIMIUNAM 2012 llevado a cabo del 14 al 16 de noviembre de 2012 en la Ciudad de México. Título del trabajo “DETERMINACIÓN DE BENZO[a]PIRENO Y METABOLITOS EN CULTIVOS DE MICROALGAS MEDIANTE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EN LÍNEA”.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	6
1. OBJETIVO	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	8
2.1.1. Propiedades fisicoquímicas	8
2.1.2. Fuentes de producción y usos de los HAPs	9
2.1.3. Riesgos de la exposición a los HAPs	12
2.1.3.1. Toxicología de los HAPs	12
2.1.3.2. Toxocinética de los HAPs	14
2.1.3.2.1. Absorción	14
2.1.3.2.2. Distribución	15
2.1.3.2.3. Metabolismo y excreción	15
2.1.4. Límites máximos permisibles de los HAPs	15
2.1.5. Estructura y propiedades de los metabolitos del BaP	17
2.2. Microorganismos y contaminación	19
2.2.1. Importancia de los microorganismos como indicadores de contaminación ambiental	19
2.2.2. Características de la microalga verde <i>Selenastrum capricornutum</i>	21
2.2.3. Características del protozooario <i>Colpoda cucullus</i>	22
2.3. Metodologías de extracción y análisis de contaminantes en microorganismos	24
2.3.1. Extracción en Fase Solida (EFS)	28
2.3.1.1. Parámetros que afectan el proceso de EFS en fase reversa	33
2.3.1.2. Ventajas y limitantes de la EFS	35
2.3.2. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)	37
2.3.2.1. Parámetros que afectan el proceso de DMFS	41
2.3.2.2. Ventajas y limitantes de la DMFS	42
2.3.3. Sistemas de extracción y análisis en línea	42
2.3.3.1. Sistema de EFS-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado en línea	43

3.DESARROLLO EXPERIMENTAL	46
3.1. Materiales y equipos	46
3.1.1. Disolventes y reactivos	46
3.1.2. Sistema cromatográfico	46
3.1.3. Técnicas de extracción de HAPs y metabolitos	47
3.1.4. Cultivos de protozoarios	48
3.1.5. Cultivos de microalgas	48
3.2. Preparación de las disoluciones estándar de HAPs y metabolitos del BaP	49
3.3. Mantenimiento de los cultivos de microorganismos	50
3.3.1. Cultivos de microalgas	50
3.3.2. Cultivos de protozoarios	51
3.4. Obtención de las muestras de cultivos de microorganismos	52
3.4.1. Monitoreo espectrofotométrico del crecimiento de los cultivos de <i>Selenastrum capricornutum</i>	52
3.4.2. Determinación de la biomasa recuperada de microalgas en función del tiempo de crecimiento del cultivo	52
3.4.3. Monitoreo del desarrollo de cultivos de <i>C. cucullus</i>	53
3.4.4. Determinación de la biomasa recuperada de los cultivos de protozoarios	53
3.5. Experimentación	53
3.5.1. Optimización de la separación cromatográfica de los HAPs y de metabolitos del BaP	54
3.5.2. Validación del sistema cromatográfico para los diferentes compuestos	55
3.5.3. Desarrollo del método de extracción de HAPs y metabolitos por EFS fuera de línea / EFS-CLAR en línea	56
3.5.3.1. Optimización de la extracción por EFS fuera de línea	56
3.5.3.2. Implementación de una secuencia de limpieza en el cartucho de EFS	57
3.5.3.3 Optimización de la elución de los analitos en dos fracciones diferentes E1 y E2	57
3.5.4. Montaje del sistema EFS-CLAR en línea	59
3.5.4.1. Optimización de la preconcentración y análisis en línea de los HAPs y metabolitos del BaP con disoluciones estándar a diferentes porcentajes de disolvente orgánico (extractos E1 y E2 simulados)	60

3.5.4.2. Validación del sistema de EFS-CLAR en línea con disoluciones estándar de los analitos	61
3.5.5. Optimización y validación del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-FD en línea para los HAPs y metabolitos del BaP con muestras de cultivos	62
3.5.5.1. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de E1 y E2 obtenidos de muestras de cultivos de microalgas	62
3.5.5.2. Optimización de los recobros del compuesto 3-OH BaP en los extractos de medio líquido de los cultivos de microalgas	63
3.5.5.3. Validación del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR-FD en línea con muestras de cultivos de microalgas	64
3.5.5.4. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de E1 y E2 obtenidos de muestras de cultivos de protozoarios	64
3.5.5.5. Validación del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR-FD en línea con muestras de cultivos de protozoarios	65
3.5.6. Desarrollo del método de extracción de HAPs y metabolitos por DMFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea	65
3.5.6.1. Ensayos de recobro preliminares de los analitos por DMFS fuera de línea sin muestra	65
3.5.6.2. Optimización de los recobros de los metabolitos OH-BaP	66
3.5.6.3. Implementación de una secuencia de limpieza en el cartucho de DMFS	67
3.5.6.4. Optimización de la elución de los analitos en la DMFS fuera de línea	67
3.5.6.5. Optimización de la preconcentración y análisis en línea de los HAPs y metabolitos del BaP con disoluciones estándar a diferentes porcentajes de disolvente orgánico (extractos D1 y D2 simulados)	68
3.5.7. Optimización y validación del método de extracción por DMFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-FD en línea para los HAPs y metabolitos del BaP con muestras de biomasa	69
3.5.7.1. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de D1 y D2 obtenidos de muestras de biomasa de microalgas	69

3.5.7.2. Validación del método de extracción por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea con muestras de biomasa de microalgas	70
3.5.7.3. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de D1 y D2 obtenidos de muestras de biomasa de protozoarios	71
3.5.7.4. Validación del método de extracción por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea con muestras de biomasa de protozoarios	71
3.5.8. Aplicación de las metodologías desarrolladas en ensayos de exposición a los HAPs	72
3.5.8.1. Toxicidad del BaP en las microalgas	72
3.5.8.2. Exposición de cultivos de microalgas al BaP	73
3.5.8.3. Obtención de los espectros de masas de los metabolitos del BaP	74
3.5.8.4. Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a cada uno de los HAPs	75
3.5.8.5. Toxicidad del BaP sobre las células de protozoarios	76
3.5.8.6. Exposición de cultivos de protozoarios a una concentración de 5 ng mL ⁻¹ de BaP	77
3.5.8.7. Ensayos de exposición de cultivos de protozoarios a cada uno de los HAPs	77
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	79
4.1. Obtención de las muestras de cultivos de microorganismos	79
4.1.1. Monitoreo del crecimiento de los cultivos de <i>Selenastrum capricornutum</i>	79
4.1.2. Determinación de la biomasa recuperada de microalgas en función del tiempo de crecimiento del cultivo	80
4.1.3. Monitoreo del crecimiento de cultivos de <i>Colpoda cucullus</i>	82
4.1.4. Determinación de la biomasa recuperada de protozoarios	83
4.2. Análisis de los HAPs y metabolitos por cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia (CLAR-DF)	84
4.2.1. Optimización de la separación cromatográfica	84
4.2.2. Validación del sistema cromatográfico para los compuestos	87
4.3. Desarrollo del método de extracción de HAPs y metabolitos por EFS fuera de línea	89
4.3.1. Optimización de la extracción por EFS fuera de línea	89

4.3.1.1. Implementación de una secuencia de limpieza del cartucho de EFS	90
4.3.1.2. Optimización de la elución de los analitos en dos fracciones diferentes E1 y E2	91
4.4. Montaje del sistema EFS-CLAR en línea	94
4.4.1. Optimización de la preconcentración y análisis en línea de los HAPs y metabolitos del BaP con disoluciones estándar a diferentes porcentajes de disolvente orgánico (extractos E1 y E2 simulados)	94
4.4.2. Validación del sistema de EFS-CLAR en línea con disoluciones estándar de los analitos	96
4.5. Optimización y validación del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-FD en línea para los HAPs y metabolitos del BaP con muestras de cultivos	99
4.5.1. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de E1 y E2 obtenidos de muestras de cultivos de microalgas	99
4.5.2. Optimización de los recobros del compuesto 3-OH BaP en los extractos de medio líquido de los cultivos de microalgas	103
4.5.3. Validación del método de EFS fuera de línea/EFS-CLAR-FD en línea con muestras de cultivos de microalgas	104
4.5.4. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de E1 y E2 obtenidos de muestras de cultivos de protozoarios	107
4.5.5. Validación del método de EFS fuera de línea/EFS-CLAR-FD en línea con muestras de con cultivos de <i>Colpoda cucullus</i> (protozoario)	108
4.6. Desarrollo del método de extracción de HAPs y metabolitos por DMFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea	110
4.6.1. Ensayos de recobro preliminares de los analitos por DMFS fuera de línea sin muestra	110
4.6.2. Optimización de los recobros de los metabolitos OH-BaP	112
4.6.3. Implementación de una secuencia de limpieza en el cartucho de DMFS	113
4.6.4. Optimización de la elución de los analitos en la DMFS fuera de línea	114
4.6.5. Desarrollo y validación del método de extracción por DMFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-FD en línea	115

4.6.5.1. Optimización de la preconcentración y análisis en línea de los HAPs y metabolitos del BaP con disoluciones estándar a diferentes porcentajes de disolvente orgánico (extractos D1 y D2 simulados)	115
4.6.5.2. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de D1 y D2 obtenidos de muestras de biomasa de microalgas	118
4.6.5.3. Validación del método de extracción por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea con muestras de biomasa de microalgas	119
4.6.5.4. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de D1 y D2 obtenidos de muestras de biomasa de protozoarios	120
4.6.5.5. Validación del método de extracción por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea con muestras de biomasa de protozoarios	122
4.7. Aplicación de las metodologías desarrolladas en ensayos de exposición a los HAPs	123
4.7.1. Toxicidad del BaP sobre las microalgas	123
4.7.2. Exposición de cultivos de microalgas a una concentración de 5 ng mL ⁻¹ de BaP	123
4.7.3. Exposición de cultivos de microalgas a una concentración de 50 ng mL ⁻¹ de BaP	131
4.7.4. Obtención de los espectros de masas de los metabolitos por CLAR-EM(Q-TOF)	134
4.7.5. Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a cada uno de los HAPs	139
4.7.6. Toxicidad del BaP sobre las células de protozoario	142
4.7.7. Exposición de cultivos de protozoarios a una concentración de BaP de 5 ng mL ⁻¹	142
4.7.8. Ensayos de exposición de cultivos de protozoarios a cada uno de los HAPs	145
5. CONCLUSIONES	148
BIBLIOGRAFÍA	150
ANEXOS	159
PUBLICACIÓN	164

ABREVIATURAS

MeCN	Acetonitrilo
BaA	Benzo[a]antraceno
BbF	Benzo[b]fluoranteno
BkF	Benzo[k]fluoranteno
BaP	Benzo[a]pireno
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
C. V.	Coficiente de variación
DF	Detector de Fluorescencia
DMFS	Dispersión de Matriz en Fase Sólida
EFS	Extracción en Fase Sólida
EM	Espectrometría de Masas
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
iPrOH	Isopropanol
k_w	Factor de retención cuando la fase móvil es agua pura
K_{ow}	Constante de reparto octanol/agua
R_s	Resolución
t_r	Tiempo de retención
V_b	Volumen de fuga
V_o	Volumen muerto
V_r	Volumen de retención
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs estudiados	10
Tabla 2.2. Datos relativos a los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos HAPs	12
Tabla 2.3. Potencia carcinógena relativa de diferentes HAPs en estudios realizados con ratas	13
Tabla 2.4. Porcentajes de benzo[a]pireno absorbidos por diferentes vías	14
Tabla 2.5. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo	17
Tabla 2.6. Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos del BaP estudiados	19
Tabla 2.7. Trabajos recientes que relacionan los contaminantes orgánicos con las microalgas y protozoarios	26
Tabla 2.8. Recomendaciones generales para la elección de los cartuchos de EFS	29
Tabla 2.9. Características de los disolventes comúnmente utilizados en la EFS	31
Tabla 2.10. Trabajos recientes que utilizan la EFS como técnica de extracción de HAPs	32
Tabla 2.11. Trabajos recientes que utilizan la DMFS como técnica de extracción de HAPs	40
Tabla 3.1. Condiciones de análisis de los HAPs y metabolitos del BaP con el sistema CLAR-FD	55
Tabla 3.2. Secuencia de elución optimizada para la recuperación de los analitos en dos extractos diferentes	58
Tabla 3.3. Secuencia de operaciones del sistema EFS-CLAR para el análisis de HAPs y metabolitos del BaP	60
Tabla 3.4. Condiciones de preconcentración y análisis con el sistema EFS-CLAR para los extractos simulados E1 y E2	61
Tabla 3.5. Concentraciones y porcentajes de MECN en los extractos E1 y E2 utilizados para la validación del sistema EFS-CLAR	62
Tabla 3.6. Disoluciones utilizadas para la evaluación de los frentes de elución de los analitos en el cartucho de DMFS empacado	66

Tabla 3.7. Disoluciones agregadas en volúmenes de 20 μ L a las muestras de sílice fortificadas con los analitos a una concentración de 0.15 ng mg^{-1}	67
Tabla 3.8. Condiciones de preconcentración y análisis con el sistema EFS-CLAR para los extractos simulados D1 y D2	69
Tabla 3.9. Porcentajes de MECN en los extractos obtenidos con el método de DMFS fuera de línea y diluciones que se deben hacer para su preconcentración por EFS-CLAR en línea	70
Tabla 3.10. Condiciones utilizadas en el sistema CLAR-EM para la obtención de los espectros de masas de los metabolitos del BaP producidos en cultivos de microalgas expuestos	74
Tabla 3.11. Muestras utilizadas para los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a los HAPs a una concentración de 0.5 ng mL^{-1}	76
Tabla 3.12. Muestras utilizadas para los ensayos de exposición de cultivos de protozoarios a los HAPs a una concentración de 0.5 ng mL^{-1}	78
Tabla 4.1. Tiempos de retención de los HAPs y metabolitos en estudio utilizando diferentes proporciones de metanol/agua en la fase móvil	84
Tabla 4.2. Resultados de la validación del sistema cromatográfico para los 4 metabolitos	88
Tabla 4.3. Evaluación de la fuga de los analitos del cartucho de EFS al aplicar diferentes disolventes de limpieza	91
Tabla 4.4. Recobros promedio al utilizar la secuencia de limpieza y elución completa para el método de EFS fuera de línea	94
Tabla 4.5. Porcentajes de MECN en los extractos obtenidos con el método de EFS-EFS/CLAR y diluciones que se deben hacer para su preconcentración en línea	96
Tabla 4.6. Resultados de la validación del sistema en línea EFS-CLAR	97
Tabla 4.7. Comparación entre los límites de detección teóricos (L. D.) obtenidos con los sistemas cromatográficos fuera de línea y en línea	98

Tabla 4.8. Resultados de la validación del método por EFS con preconcentración en línea EFS-CLAR utilizando muestras de cultivos de microalgas	105
Tabla 4.9. Comparación entre los límites de detección teóricos (L. D.) obtenidos con los sistemas cromatográficos fuera de línea y en línea	106
Tabla 4.10. Resultados de la validación del método por EFS con preconcentración en línea EFS-CLAR utilizando muestras de cultivos de protozoarios	109
Tabla 4.11. Resultados de la adición de diferentes modificadores para la optimización del rendimiento de extracción por DMFS de los compuestos	113
Tabla 4.12. Recobros obtenidos al aplicar diferentes disolventes de limpieza al cartucho de DMFS empacado con 100 mg de fase <i>Chromabond C18-PAH</i> fortificada a una concentración de 0.05 ng mg ⁻¹	114
Tabla 4.13. Recobros obtenidos al aplicar la secuencia de disolventes de limpieza y elución optimizada al cartucho de DMFS empacado con 100 mg de fase <i>Chromabond C18-PAH</i>	115
Tabla 4.14. Resultados de la validación del método por DMFS en línea con análisis por EFS-CLAR en línea utilizando muestras de biomasa de microalgas	120
Tabla 4.15. Resultados de la validación del método por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea utilizando muestras de biomasa de protozoarios	122
Tabla 4.16. Cantidades promedio (n=3) recuperadas de los HAPs en los ensayos de exposición con cultivos de microalgas	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura química de los 16 HAPs prioritarios señalados por la USEPA	8
Figura 2.2. Diagrama general del proceso de formación de los HAPs en el proceso de combustión	11
Figura 2.3. Representación esquemática del metabolismo del Benzo(a)pireno en humanos	14
Figura 2.4. Micrografía óptica de una muestra de cultivo de <i>S. capricornutum</i>	22
Figura 2.5. A. Célula vegetativa de <i>C. cucullus</i> . B. Quiste de resistencia formado a partir de la célula vegetativa	23
Figura 2.6. Esquema del ciclo de vida de una célula de <i>C. cucullus</i> ilustrando la secuencia de eventos durante la reproducción y la formación de quistes de resistencia. (A-J) Actividad reproductiva. (J-B) La reproducción se repite en condiciones ambientales de favorables. (K-N) Formación de quistes de resistencia en condiciones desfavorables. (O-A) Exquistamiento de la célula al volver a condiciones favorables	24
Figura 2.7. (A) Ejemplos de diferentes cartuchos de extracción comerciales. (B) Esquema general de las partes que componen un cartucho de EFS	28
Figura 2.8 Esquema general del proceso de extracción utilizando la técnica de EFS	31
Figura 2.9 Formas de promover el paso del disolvente o muestra a través del cartucho de EFS	37
Figura 2.10 Diagrama general del proceso de DMFS	38
Figura 2.11 Sistema de EFS-CLAR acoplado en línea	44
Figura 3.1. Cultivos de microalgas mantenidos con las condiciones óptimas	50
Figura 3.2. Cultivos de protozoarios.	51
Figura 3.3. Esquema general de la metodología experimental para el desarrollo y aplicación de las metodologías analíticas de EFS y DMFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea	54
Figura 3.4. Esquema general del sistema EFS-CLAR en línea utilizado	59
Figura 3.5. Metodología utilizada para evaluar la toxicidad del BaP sobre el organismo <i>S. capricornutum</i>	72
Figura 3.6. Muestras utilizadas para los ensayos de exposición del BaP sobre el organismo <i>S. capricornutum</i>	73

Figura 4.1. Seguimiento del crecimiento del cultivo de <i>Selenastrum capricornutum</i> en 50 mL de medio proteosa peptona	79
Figura 4.2. Relación entre la cantidad de biomasa seca de <i>S. capricornutum</i> recuperada a partir de alícuotas de 15 mL de cultivo colectadas a diferentes tiempos de desarrollo	80
Figura 4.3. Relación entre la absorbancia medida a 685 nm con la cantidad en peso seco de la biomasa recuperada de 15 mL de medio de cultivo de <i>S. capricornutum</i>	81
Figura 4.4. Variación del número de células del protozooario <i>C. cucullus</i> por mL de cultivo durante diferentes tiempos de desarrollo del cultivo	82
Figura 4.5. Cantidad de biomasa seca de protozoarios recuperada a partir de cultivos desarrollados en un volumen de 90 mL a diferentes tiempos de crecimiento	84
Figura 4.6. Variación del log del factor de capacidad (k') de (A) los HAPs y (B) metabolitos del BaP en estudio	85
Figura 4.7. Cromatograma obtenido con una mezcla de HAPs y metabolitos del BaP todos a una concentración de 2 ng mL ⁻¹ , utilizando una fase móvil MeOH/Agua (85:15) y flujo de 1 mL min ⁻¹	86
Figura 4.8. (A) Cromatograma obtenido para una mezcla de los dos dihidrodioles del BaP utilizando una fase móvil MeOH/Agua (65:35) y (B) Cromatograma obtenido para una mezcla de los cuatro HAPs y los dos OH-BaP con una fase móvil MeOH/Agua (85:15)	87
Figura 4.9. Efecto del porcentaje (v/v) de isopropanol (iPrOH) en los recobros por EFS usando un cartucho con 300 mg de fase <i>C-18 PAH Chromabond</i> y un volumen de 15 mL de agua fortificada con los analitos a una concentración de 2 ng mL ⁻¹	90
Figura 4.10. Frentes de elución de los analitos en el cartucho de EFS	92
Figura 4.11. Optimización de la dilución de extractos simulados para la preconcentración por EFS-CLAR en línea. Efecto del porcentaje de MECN en el recobro de los analitos al preconcentrar 20 mL (E1) o 8 mL (E2) de disoluciones acuosas a una concentración de 8 pg mL ⁻¹ and 27 pg mL ⁻¹ , respectivamente.	95
Figura 4.12. Esquema del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea desarrollado	98

Figura 4.13. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis en línea de extractos obtenidos de muestras de medio líquido proveniente de cultivo de <i>Selenastrum capricornutum</i> fortificados a 10 pg mL ⁻¹ . A) Separación con fase móvil MEOH/Agua (80:20); B) Separación con fase móvil MeOH/Agua (65:35)	99
Figura 4.14. Cromatogramas obtenido a partir del análisis en línea de extractos E1 obtenidos de muestras de cultivos de <i>Selenastrum capricornutum</i> a diferentes tiempos de crecimiento. A) 6 semanas y B) 4 semanas	100
Figura 4.15. Porcentajes de recobro obtenidos al aplicar disolventes de limpieza en la precolumna previo al análisis en línea	101
Figura 4.16. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis en línea de extractos obtenidos de muestras de medio líquido proveniente de cultivos de <i>S. capricornutum</i> . Separación con fase móvil MeOH/Agua (65:35)	102
Figura 4.17. Cromatograma obtenido a partir del análisis en línea de extractos obtenidos de muestras de medio líquido de cultivos de <i>Selenastrum capricornutum</i> . Tiempo del cultivo = 4 semanas	102
Figura 4.18. Porcentajes de recobro al aplicar el método de EFS-CLAR en línea desarrollado a muestras de cultivos de microalgas conteniendo diferentes porcentajes de ácido ascórbico	104
Figura 4.19. Cromatogramas obtenidos a partir del análisis en línea de extractos obtenidos de medio líquido proveniente de cultivos del protozooario <i>Colpoda cucullus</i> . (A) Extracto E1: Fase móvil MeOH:Agua (65:35). (B) Extracto E2: Fase móvil MeOH/Agua (85:15)	108
Figura 4.20. Comparación de los recobros globales obtenidos con el método de EFS fuera de línea/EFS-CLAR online aplicado a diferentes tipos de muestras	110
Figura 4.21. Frentes de elución de los analitos en el cartucho de DMFS sin muestra	111
Figura 4.22. Optimización de la dilución de extractos simulados para la preconcentración Por EFS-CLAR en línea de los extractos obtenidos por DMFS. Efecto del porcentaje de MECN en el recobro de los analitos al preconcentrar 6 mL (D1) y 2 mL (D2) de disoluciones acuosas a una concentración de 45 pg mL ⁻¹ and 160 pg mL ⁻¹ , respectivamente	116

Figura 4.23. Esquema del método de extracción por DMFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea desarrollado	117
Figura 4.24. Cromatogramas obtenidos con el análisis en línea de extractos D1 provenientes de biomasa de <i>S. capricornutum</i> fortificada a una concentración de 32 pg mg ⁻¹ . Disolución estándar 8 ng mL ⁻¹	118
Figura 4.25. Cromatogramas obtenidos con el análisis en línea de extractos D2 provenientes de biomasa de <i>S. capricornutum</i> fortificada a una concentración de 32 pg mg ⁻¹ . Disolución estándar 8 ng mL ⁻¹	119
Figura 4.26. Cromatogramas obtenidos con muestras extractos D1 provenientes de biomasa de <i>C. cucullus</i> fortificada a una concentración de 90 pg mg ⁻¹ . Disolución estándar 8 ng mL ⁻¹	121
Figura 4.27. Cromatogramas obtenidos con muestras extractos D2 provenientes de biomasa de <i>C. cucullus</i> fortificada a una concentración de 90 pg mg ⁻¹ . Disolución estándar 8 ng mL ⁻¹	121
Figura 4.28. Evaluación de la toxicidad del BaP en cultivos de microalgas iluminadas con luz amarilla. Los cultivos fueron expuestos a cada concentración del contaminante por 24 h.	124
Figura 4.29. Cantidades de BaP recuperadas en el ensayo de exposición de cultivos de microalgas a una concentración de 5 ng mL ⁻¹ de BaP	124
Figura 4.30. Desaparición del BaP en los cultivos de microalgas a diferentes tiempos de exposición. (A) Inyección directa del extracto E2 al sistema CLAR-FD y (B) Inyección directa del extracto D2	126
Figura 4.31. Cromatogramas obtenidos al analizar con el método desarrollado los extractos E1 (A) y D1 (B) provenientes de muestras expuestas a 5 ng mL ⁻¹ de BaP durante 3 h	127
Figura 4.32. Cantidades de (A) 9,10-dihidrodiol BaP y (B) 4,5-dihidrodiol BaP recuperadas en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas al BaP a una concentración de 5 ng mL ⁻¹	128
Figura 4.33 Cromatogramas obtenidos al analizar con los métodos desarrollados los Extractos (A) E1 y (B) D1 provenientes de cultivos expuestos a una concentración de 5 ng mL ⁻¹ de BaP	129

Figura 4.34 Cantidades de 9-OH BaP recuperadas de cultivos de microalgas expuestos a una concentración de 5 ng mL ⁻¹ de BaP	130
Figura 4.35 Cromatogramas obtenidos al analizar extractos D2 provenientes de la biomasa de un cultivo de microalgas expuestos a una concentración de 5 ng mL ⁻¹ de BaP	130
Figura 4.36 Cantidades recuperadas de BaP a partir de muestras de cultivo de microalgas expuestos a una concentración de 50 ng mL ⁻¹	131
Figura 4.37 Cantidades recuperadas de 9-OHBaP a partir de muestras de cultivo de microalgas expuestos a una concentración de 50 ng mL ⁻¹ de BaP	132
Figura 4.38 Cantidades recuperadas de dihidrodioles BaP a partir de muestras de cultivo de microalgas expuestos a una concentración de 50 ng mL ⁻¹ de BaP	133
Figura 4.39 Espectros de masas obtenidos para los metabolitos del BaP a una concentración de 2 ppm utilizando el sistema CLAR-EM(Q-TOF)	135
Figura 4.40 Comparación entre los cromatogramas obtenidos por inyección directa de Extractos E1 de muestras de cultivos expuestos durante 1.5 h a diferentes concentraciones de BaP	136
Figura 4.41 Cromatograma y espectros de masas obtenidos a partir de la inyección de una muestra de extracto E1 en el sistema CLAR-EM	138
Figura 4.42 Porcentajes degradados de los HAPs al exponer diferentes cultivos de <i>S. capricornutum</i> a una concentración individual de cada HAPs de 0.5 ng mL ⁻¹ durante 3 h	140
Figura 4.43 Cromatogramas de extractos E1 obtenidos durante la exposición de cultivos de <i>S. capricornutum</i> a una concentración de 0.5 ng mL ⁻¹ de BaA	141
Figura 4.44 Cromatogramas de extractos D1 obtenidos durante la exposición de cultivos de <i>S. capricornutum</i> a una concentración de 0.5 ng mL ⁻¹ de BkF y BbF	142
Figura 4.45 Variación del número de células de protozoarios por mL de cultivo en muestras con BaP (5 ng mL ⁻¹) y sin contaminante	143
Figura 4.46 Cantidades de BaP recuperadas en la biomasa y medio líquido de los cultivos expuestos a una concentración de 0.5 ng mL ⁻¹ . Total = cantidad en medio líquido + cantidad en biomasa	143
Figura 4.47 Cromatogramas de extractos D1 obtenidos durante la exposición de cultivos de <i>C. cucullus</i> a una concentración de 5 ng mL ⁻¹ de BaP	144

Figura 4.48 Cromatogramas de extractos E2 obtenidos durante la exposición de cultivos de <i>C. cucullus</i> a una concentración de 5 ng mL ⁻¹ de BaP	145
Figura 4.49 Cantidades de HAPs recuperadas en la biomasa y medio líquido de los cultivos expuestos durante 3 h a una concentración de 0.5 ng mL ⁻¹ . Total = cantidad en medio líquido + cantidad en biomasa	146
Figura 4.50 Cromatogramas de extractos E1 analizados con el método desarrollado. Los cultivos se obtuvieron de la exposición de cultivos de <i>C. cucullus</i> a una concentración de 0.5 ng mL ⁻¹ de cada HAPs durante 3 h	147
Figura 4.51 Cromatogramas de extractos D2 analizados con el método desarrollado. Los cultivos se obtuvieron de la exposición de cultivos de <i>C. cucullus</i> a una concentración de 0.5 ng mL ⁻¹ de cada HAPs durante 3 h	147

RESUMEN

Este trabajo describe el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de cuatro hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) como son el benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno y benzo[a]pireno, y cuatro metabolitos del benzo[a]pireno (BaP) como son el 4,5-dihidrodiol BaP, 9,10-dihidrodiol BaP, 3-hidróxi-BaP y 9-hidróxi-BaP utilizando las técnicas de extracción en fase sólida (EFS), dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detector de fluorescencia (DF) en muestras de cultivos líquidos de microorganismos. Se utilizaron cultivos de la microalga verde *Selenastrum capricornutum* y cultivos del protozooario ciliado *Colpoda cucullus*, organismos que han demostrado ser resistentes a la contaminación por diferentes compuestos orgánicos, entre ellos los HAPs. La metodología consta de tres partes fundamentales: (1) obtención de las muestras mediante centrifugación de los cultivos de microorganismos, (2) extracción de los analitos presentes en la biomasa mediante la técnica de DMFS fuera de línea y de los analitos presentes en el medio líquido mediante la técnica de EFS fuera de línea, (3) preconcentración y análisis de los extractos obtenidos a partir de cada muestra mediante el uso de un sistema de EFS-CLAR-DF acoplado en línea. El método de DMFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR-DF en línea fue validado en los intervalos de concentraciones de 20 a 200 pg mg^{-1} (utilizando muestras de 5 mg de biomasa seca de microalgas) y de 50 a 400 pg mg^{-1} (utilizando muestras de 2 mg de protozoarios). En ambos casos se obtuvieron buenos coeficientes de correlación ($r^2 > 0.9911$), buena precisión con coeficientes de variación (C.V.) menores al 5% y recobros entre 40 y 70 %. Los límites de detección (L. D.) estuvieron entre 2 y 6.5 pg mg^{-1} al analizar muestras de microalgas, y entre 5.7 y 16.2 pg mg^{-1} al analizar muestras de protozoarios. El método de EFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR-DF en línea, fue validado en el intervalo de concentraciones de 5 a 120 pg mL^{-1} (utilizando muestras de 15 mL de cultivo líquido de microalgas o protozoarios). En ambos casos se obtuvieron buenos coeficientes de correlación ($r^2 > 0.9913$), buena precisión con C.V. menores al 7.99 % y recobros entre 38 y 90%. Los L. D. estuvieron entre 0.8 y 2.3 pg mL^{-1} al analizar muestras de medio líquido de cultivo de microalgas, y entre 0.6 y 2.1 pg mL^{-1} al analizar muestras de medio líquido de cultivo de protozoarios. Los métodos desarrollados se aplicaron satisfactoriamente en muestras de cultivos de *S. capricornutum* expuestos al BaP, demostrándose la capacidad que tiene este organismo para degradar a este contaminante hasta alcanzar niveles en el medio líquido por debajo de los límites permitidos por la *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) y la Comisión Nacional del Agua de México (CONAGUA), 0.2 y 0.1 ng mL^{-1} , respectivamente. Los métodos desarrollados también permitieron cuantificar las cantidades de metabolitos formados utilizando concentraciones de exposición al BaP que son cercanas a las que este contaminante presenta en el ambiente. Mediante exposiciones individuales de cada uno de los HAPs a cultivos de *S. capricornutum* y *C. cucullus* se demostró que la microalga es capaz de bioacumular y degradar a cada uno de los HAPs mientras que el protozooario solo tiene la capacidad de bioacumularlos.

ABSTRACT

This work describes the development of an analytical methodology useful for the quantification of four polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) such as benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene and benzo[a]pyrene (BaP), also four BaP metabolites as 4,5-dihydrodiol BaP, 9,10-dihydrodiol BaP, 3-hydroxi BaP and 9-hydroxi BaP. Solid Phase Extraction (SPE), Solid Phase Matrix Dispersion (MSPD) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detector (FD) were applied to determine analytes in liquid cultures of the green microscopic algae *Selenastrum capricornutum* and the ciliated protozoa *Colpoda cucullus*. These organisms showed a good resistance to different kinds of organic contaminants like PAH's. The methodology consists of three main parts: (1) obtaining samples by centrifugation of microorganism's cultures, (2) extraction of the analytes from the biomass by off-line MSPD and analytes present in the liquid media through off-line SPE, (3) preconcentration and analysis of the extracts obtained from each sample by using an on-line SPE/HPLC-FD system. The off-line MSPD- on-line SPE/HPLC-FD method was validated in the concentration range of 20 to 200 pg mg^{-1} (using 5 mg of dry biomass of microalgae samples) and 50 to 400 pg mg^{-1} (using 2 mg of protozoa samples). In both cases, the methods showed good correlation coefficients ($r^2 > 0.9911$), good precision with relative standard deviation (RSD) of less than 5% and recoveries between 40 and 70%. The limits of detection (LOD's) were between 2 and 6.5 pg mg^{-1} to analyze samples of microalgae, and between 5.7 and 16.2 pg mg^{-1} to analyze samples of protozoa. The off-line SPE -on-line SPE-HPLC-FD method was validated in the concentration range of 5 to 120 pg mL^{-1} (using 15 mL of liquid media of microalgae and protozoa). In both cases, the methods showed good correlation coefficients ($r^2 > 0.9913$), good precision with RSD less to 7.99% and recoveries between 38 and 90%. The LOD's were between 0.8 and 2.3 pg mL^{-1} analyzing liquid media of microalgae cultures, and between 0.6 and 2.1 pg mL^{-1} analyzing samples of liquid media of protozoa cultures. The developed methods were successfully applied to samples of *S. capricornutum* cultures exposed to BaP. *S. capricornutum* was able to degrade this pollutant unto levels in the liquid medium below the limits allowed by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) and the *Comisión Nacional del Agua de México* (CNA), 0.2 and 0.1 ng mL^{-1} , respectively. The developed methods were able to quantify the amounts of metabolites formed by exposure to BaP concentrations that were close to concentrations presented by this pollutant in environment. Individual exposures assays of cultures of *S. capricornutum* and *C. cucullus* to each HAP, demonstrated that the microalga was able to bioaccumulate and degrade each HAP while the protozoa only has the ability to bioaccumulate.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de más de 100 compuestos químicos diferentes que son formados por la combustión incompleta de materiales orgánicos; por lo tanto pueden originarse de manera natural y por diferentes actividades humanas. Durante su formación, los HAP's se adhieren a partículas de polvo y pueden contaminar diferentes matrices ambientales como agua, suelo y aire. De esta forma, se puede estar expuesto a estos contaminantes al inhalar aire, ingerir alimentos o beber agua contaminada (ATDSR, 1995).

La capacidad de producir cáncer es sin duda el principal motivo de preocupación en cuanto a los efectos sobre la salud atribuibles a los HAPs. Existen centenares de HAPs, pero hasta el momento sólo una veintena han mostrado posibles efectos sobre la salud, especialmente como agentes carcinogénicos. El principal mecanismo para la inducción de tumores por parte de los HAPs es su genotoxicidad. El efecto cancerígeno de los HAPs ha sido claramente demostrado en los seres humanos para diversos tumores y para varios tipos de exposición. Diversos aspectos de los HAPs son importantes para determinar sus posibles efectos sobre la salud: en primer lugar la vía de entrada al organismo; en segundo lugar su metabolismo, es decir, la serie de transformaciones que sufren los HAPs una vez absorbidos; y por último las características químicas de estos compuestos y de sus derivados (Agudo, 2010).

Los HAPs pueden entrar a las aguas de superficie a través de las descargas de plantas industriales y de tratamiento de aguas residuales. En el suelo los HAPs se unen a otras partículas y algunos pueden contaminar los acuíferos. La eliminación de los HAPs se puede llevar a cabo mediante procesos de adsorción, foto-oxidación, volatilización, degradación química y degradación microbiológica, siendo esta última la que genera los mayores índices de remoción (Haritash & Kaushik, 2010).

Se han realizado diferentes estudios de biodegradación de los HAP's con diferentes tipos de bacterias y hongos, mientras que los trabajos reportados con microalgas y protozoarios son escasos. Estos dos grupos de microorganismos han demostrado poseer una elevada resistencia hacia este tipo de contaminantes, por lo cual su estudio se ha incrementado en los últimos años. La microalga verde *Selenastrum capricornutum* ha demostrado ser un organismo capaz de bioacumular y degradar a los HAP's (Warshawsky et al., 2007; Ke et al. 2010). Mientras que el protozoario ciliado *Colpoda cucullus* es capaz de sobrevivir en presencia de diferentes contaminantes orgánicos, entre ellos hidrocarburos y pesticidas organoclorados y organofosforados (Maeda et al., 2005; Castro et al., 2007; Trielli et al., 2007).

El proceso de bioacumulación de los contaminantes en los microorganismos juega un papel importante, ya que de esta forma los compuestos nocivos dejan de estar disponibles para el resto de los seres vivos en el ambiente contaminado. Sin embargo, si organismos superiores se alimentan del organismo bioacumulador, algunos compuestos como los HAPs pueden ser transferidos a niveles superiores en la cadena alimenticia. Por otra parte, mediante diferentes procesos del metabolismo, los contaminantes pueden ser transformados en sustancias inocuas o al contrario, aumentar la peligrosidad de ellos debido principalmente a un aumento en la biodisponibilidad que presentan los metabolitos formados. Considerando lo anterior, es tan importante medir la disminución del contaminante progenitor como también las concentraciones y peligrosidad de los metabolitos producidos por la acción de los microorganismos (Torres et al., 2008).

Por lo tanto, el desarrollo de metodologías analíticas rápidas y sensibles es primordial para el entendimiento de las rutas y mecanismos mediante los cuales los microorganismos son capaces de disminuir la contaminación por estos compuestos. Actualmente, existe un interés creciente por el desarrollo de procedimientos estandarizados para la evaluación ecotoxicológica de los compuestos o elementos químicos potencialmente dañinos (Pica-Granados et al., 2008), aunque hasta el momento, no existen trabajos publicados que reporten métodos analíticos bien validados para la determinación de los contaminantes orgánicos presentes en los propios microorganismos (Lindquist & Warshawsky, 1985; Kirso & Irha, 1998; Warshawsky et al., 1995 y 2007).

Los escasos trabajos en que se describen los métodos de extracción de contaminantes como los HAPs en microorganismos, solo se enfocan al análisis y metabolismo de los compuestos más ligeros y del benzo[a]pireno (BaP), un agente altamente cancerígeno, considerado como indicador de contaminación por HAPs de más de 4 anillos. Sin embargo, éste no es el único compuesto de esta familia que presenta esta propiedad, por lo que también es importante considerar a otros contaminantes aromáticos pesados.

Los métodos analíticos utilizados en estos trabajos se basan en la técnica de extracción con disolventes clásica (Warshawsky et al., 1995 y 2007; Okay et al., 2000; Richardson et al., 2004) aun cuando existen otras técnicas más ventajosas que se han desarrollado ampliamente en las últimas décadas para la extracción de trazas de compuestos orgánicos de matrices complejas, como las biológicas (Tondeur & Hart, 2009; Anitescu & Tavlarides, 2012; Matamoros *et al.*, 2012; Sun et al. 2012). La extracción en fase sólida (EFS), aunque conocida también desde hace varios años, es una técnica más versátil porque permite la extracción selectiva y concentración simultánea de diferentes tipos de compuestos presentes en muestras líquidas mediante el uso de cartuchos de extracción rellenos con el adsorbente adecuado. La EFS es una técnica que consiste de una serie de pasos y materiales muy sencillos lo cual hace que los tiempos de extracción sean cortos. La dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) es una técnica más reciente y muy parecida a la EFS, ampliamente utilizada

para la extracción de diferentes analitos presentes en muestras sólidas, semi-sólidas y líquidos viscosos. Mediante la dispersión de la muestra en un adsorbente sólido adecuado, se forma una columna similar a las usadas en EFS, pero de características únicas que permite la extracción selectiva de los analitos de interés.

El análisis de los HAPs se lleva a cabo principalmente con Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Los detectores utilizados principalmente son el Espectrómetro de Masas (EM) y el Detector de Fluorescencia (DF), siendo este último el detector más sensible para este tipo de compuestos, permitiendo alcanzar límites de cuantificación del orden de 1 ppb. Sin embargo, estos límites pueden resultar insuficientes para el análisis de los HAPs en muestras provenientes de cultivos de microorganismos expuestos a los HAPs, debido a que regularmente solo se puede obtener cantidades de muestra muy pequeñas (algunos mL ó mg); esto resulta un impedimento para la detección y cuantificación de los metabolitos producidos en las exposiciones, ya que estos últimos se forman en pequeñas cantidades respecto al hidrocarburo progenitor. Por sus características, la EFS ha sido acoplada exitosamente a la CLAR para el análisis de diferentes tipos de muestras como orina, agua y plasma, mejorando considerablemente los límites de detección respecto a las metodologías desarrolladas fuera de línea. De esta forma, es posible utilizar el acople EFS-CLAR para la concentración y análisis de los extractos obtenidos a partir de la DMFS y la EFS aplicadas fuera de línea a las muestras de biomasa y cultivos líquidos, respectivamente.

El presente trabajo representa uno de los escasos trabajos donde se demuestran las ventajas que tiene el uso de las técnicas de extracción por adsorbentes sólidos y las metodologías de preconcentración y análisis en línea al ser aplicadas a la determinación de trazas de los HAPs y metabolitos presentes en muestras de biomasa y medio líquido nutritivo del cultivos de microorganismos.

Se desarrollaron dos metodologías analíticas simples y rápidas que utilizaron las técnicas de extracción DMFS y EFS con la preconcentración y análisis en línea de extractos con cuatro HAPs y metabolitos del benzo(a)pireno por EFS-CLAR-DF. Los compuestos en estudio son considerados entre los compuestos de este tipo como prioritarios por la EPA (benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno y benzo(a)pireno) así como 4 metabolitos del BaP (4,5-dihidrodiol BaP, 9,10-dihidrodiol BaP, 3-hidróxi BaP y 9-hidróxi BaP) en muestras de cultivos de microalgas y protozoarios. Una vez desarrolladas y validadas las metodologías analíticas se aplicaron a muestras de cultivos de los microorganismos *S. capricornutum* y *C. cucullus* expuestas en ensayos por separado a cada uno de los HAPs. Se determinaron las cantidades de cada analito bioacumuladas en la biomasa y residuales en el medio de cultivo líquido para determinar la capacidad de biodegradación y/o bioacumulación de los organismos. De igual forma se lograron identificar y cuantificar los metabolitos producidos a partir de la exposición al BaP.

HIPÓTESIS

La combinación de la EFS o DMFS como técnicas de aislamiento de los compuestos de interés junto con el sistema de preconcentración EFS/CLAR-DF en línea permitirá desarrollar metodologías prácticas y con límites de detección suficientemente bajos para el monitoreo de HAPs y metabolitos del BaP durante la realización de ensayos de exposición de cultivos de microorganismos a estos contaminantes, utilizando concentraciones de exposición que semejen a las que se presentan en el ambiente. Con ayuda de estas metodologías analíticas se podrá demostrar que:

La microalga *Selenastrum capricornutum* es capaz de metabolizar a los HAPs si se observa que las cantidades totales recuperadas (biomasa + medio líquido) en muestras expuestas son menores a las cantidades recuperadas de un cultivo control adicionado con los HAPs pero sin microalgas.

El protozoario *Colpoda cucullus* es capaz de retirar a los HAPs del medio líquido mediante procesos de bioadsorción y/o bioacumulación si se observa que las cantidades totales recuperadas (biomasa + medio líquido) son iguales a las cantidades recuperadas de un cultivo control adicionado con los HAPs pero sin protozoarios.

1. OBJETIVOS

1) Desarrollar y validar métodos de determinación por DMFS-EFS-CLAR acoplados para Benzo[a]pireno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[a]antraceno y Benzo[k]fluoranteno y los principales metabolitos del benzo[a]pireno (9,10-benzo[a]pireno dihidrodiol, 4,5-benzo[a]pireno-dihidrodiol, 3-hidroxibenzo[a]pireno y 9-hidroxibenzo[a]pireno) en microorganismos del tipo de las microalgas verdes y protozoarios, así como en sus medios de cultivo líquidos.

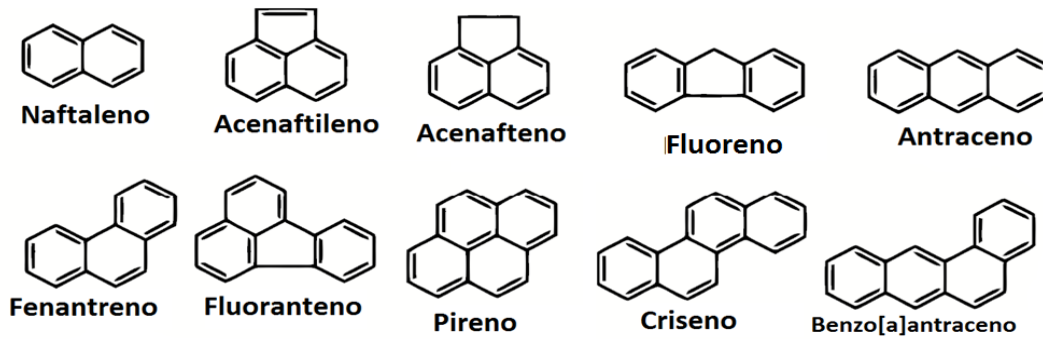
2) Aplicar las metodologías desarrolladas para cuantificar las cantidades de HAP's y sus metabolitos presentes en los propios microorganismos y sus medios de cultivo líquido provenientes de ensayos de exposición.

2. ANTECEDENTES

2.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

2.1.1. Propiedades fisicoquímicas

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos formados por tres o más anillos aromáticos condensados, en donde algunos átomos de carbono son comunes a dos o tres anillos. Esta estructura se denomina también sistema de anillos fusionados. Los anillos pueden estar en línea recta, angulados o en racimos. Entre los HAPs se encuentran cientos de compuestos que han sido objeto de gran atención por ser muchos de ellos cancerígenos, especialmente los HAPs que contienen entre cuatro y seis anillos aromáticos (Stellman & McCan, 1998). En la figura 2.1 se presentan las estructuras químicas de los 16 HAPs denominados prioritarios por la *US Environmental Protection Agency* (USEPA), clasificados en grupos que fácilmente y difícilmente son degradados por microorganismos.



Compuestos de 2, 3 y 4 anillos son fácilmente degradados por microorganismos

Compuestos de 5 y 6 anillos son degradados con mayor dificultad

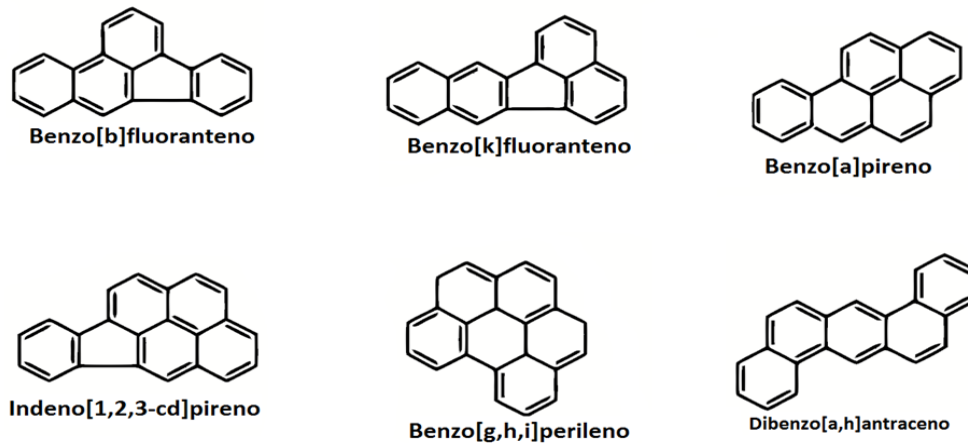


Figura 2.1 Estructura química de los 16 HAPs prioritarios señalados por la USEPA.

Los sistemas conjugados π -electrón de los HAPs son los responsables de su estabilidad química. Son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es muy pequeña. Dependiendo de su carácter aromático, los HAPs absorben luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico. Son solubles en muchos disolventes orgánicos, pero muy poco solubles en agua, tanto menos cuanto mayor sea su peso molecular. Sin embargo, los detergentes y compuestos que forman emulsiones en agua, o los HAPs adsorbidos en partículas en suspensión, pueden aumentar el contenido de HAPs en aguas residuales o naturales (Buseti et al., 2006)

Desde el punto de vista químico, los HAPs reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce su saturación. Generalmente se conserva el sistema de anillos. La mayoría de los HAPs se foto-oxidan formando endoperóxidos que pueden convertirse después a quinonas. Por razones estéricas, un endoperóxido no puede formarse por foto-oxidación del benzo(a)pireno; en este caso se forman 1,6-diona, 3,6-diona y 6,12-diona. Se ha observado que la foto-oxidación de los HAPs adsorbidos es mayor que la de los HAPs en disolución.

Los HAPs reaccionan rápidamente con óxidos de nitrógeno o HNO_3 . Por ejemplo, el antraceno puede oxidarse a antraquinona por acción del HNO_3 o dar un derivado nitrogenado mediante una reacción de sustitución con NO_2 . Los HAPs pueden reaccionar con SO_2 , SO_3 y H_2SO_4 .

El hecho de que los HAPs cancerígenos reaccionen con otras sustancias no significa necesariamente que se inactiven como tales; por el contrario, muchos HAPs que contienen sustituyentes son carcinógenos más potentes que el correspondiente compuesto progenitor (ATSDR, 1995; Mastandrea et al., 2005).

En la tabla 2.1 se resumen las propiedades fisicoquímicas de los 4 HAPs estudiados en este trabajo.

2.1.2. Fuentes de producción y usos de los HAPs

Los HAPs se forman por pirólisis o combustión incompleta de materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno. A elevadas temperaturas, la pirólisis de compuestos orgánicos produce fragmentos de moléculas y radicales que se combinan para formar HAPs, un diagrama general se presenta en la figura 2.2. De esta forma, los HAPs se originan por fuentes naturales (incendios,

erupciones volcánicas) y antropogénicas (emisiones provenientes del uso de combustibles fósiles, cigarrillos y en general cualquier proceso de incineración incompleta).

Tabla 2.1
Propiedades fisicoquímicas de los HAPs estudiados (ATSDR, 1995)

Compuesto	Benzo[a]antraceno	Benzo[a]pireno	Benzo[b]fluoranteno	Benzo[k]fluoranteno
Sinónimos	BA; benz[a]antraceno; 1,2-benzantraceno; benzo[b]fenantreno; 2,3-benzofenantreno; tetrafeno	BP; benzo[d,e,f]criseno; 3,4-benzopireno; 3,4-benzopireno; benz[a]pireno	3,4-Benz[e]acefenantrileno; 2,3-benzfluoranteno; 3,4-benzfluoranteno; 2,3-benzofluoranteno; 3,4-benzofluoranteno; benzo[e]fluoranteno	8,9-Benzfluoranteno; 8,9-benzofluoranteno; 11,12-benzofluoranteno; 2,3,1,8-binaftileno; dibenzo[b,j,k]fluoreno
Estructura				
Fórmula condensada	$C_{18}H_{12}$	$C_{20}H_{12}$	$C_{20}H_{12}$	$C_{20}H_{12}$
Peso molecular	228.29	252.3	252.3	252.3
Color	Azul verdoso fluorescente	Amarillo pálido	Incoloro	Amarillo pálido
Estado físico	Sólido (placas)	Sólido (placas o agujas)	Sólido (agujas)	Sólido (agujas)
Punto de fusión	158-159 °C	179-179.3 °C	168.3 °C	215.7 °C
Punto de ebullición	400 °C; 435 °C (sublima)	495 °C	No reportado	480 °C
Densidad a 20 °C	1.274 g/mL	1.351 g/mL	No reportado	No reportado
Olor	No reportado	Olor aromático débil	No reportado	No reportado
Solubilidad:				
en agua	0.01 mg/L	0.0023 mg/L	0.0012 mg/L	0.00076 mg/L
en disolventes orgánicos	Ligeramente soluble en ácido acético y etanol caliente; soluble en acetona y dietil éter; muy soluble en benceno	Escasamente soluble en etanol y metanol; soluble en benceno, tolueno, xileno y éter.	Ligeramente soluble en benceno, acetona	Soluble en benceno, ácido acético y etanol
log Kow	5.61	6.06	6.04	6.06
log Koc	5.30	6.74	5.74	5.74
Presión de vapor	2.2E-8 mm Hg	5.6E-9 mm Hg	5.0E-7 mm Hg	9.59E-11 mmHg
Constante de la ley de Henry	1E-6 atm*m ³ /mol	4.9E-7 atm*m ³ /mol	1.22E-5 atm*m ³ /mol	3.87E-5 atm*m ³ /mol

Kow= coeficiente de reparto octanol-agua; Koc= coeficiente de adsorción de carbono orgánico o coeficiente de adsorción suelo/agua

Los HAPs se liberan de la zona de combustión en forma de vapores y debido a sus bajas presiones de vapor, la mayoría se condensan sobre partículas de hollín o forman ellos mismos partículas muy pequeñas. Los HAPs liberados a la atmósfera en forma de vapor son adsorbidos por las partículas presentes en ella. Por ello, se producirá una diseminación de aerosoles que contienen HAPs, que pueden ser transportados a grandes distancias por los vientos (Lavery, 2002; Sánchez et al, 2012).

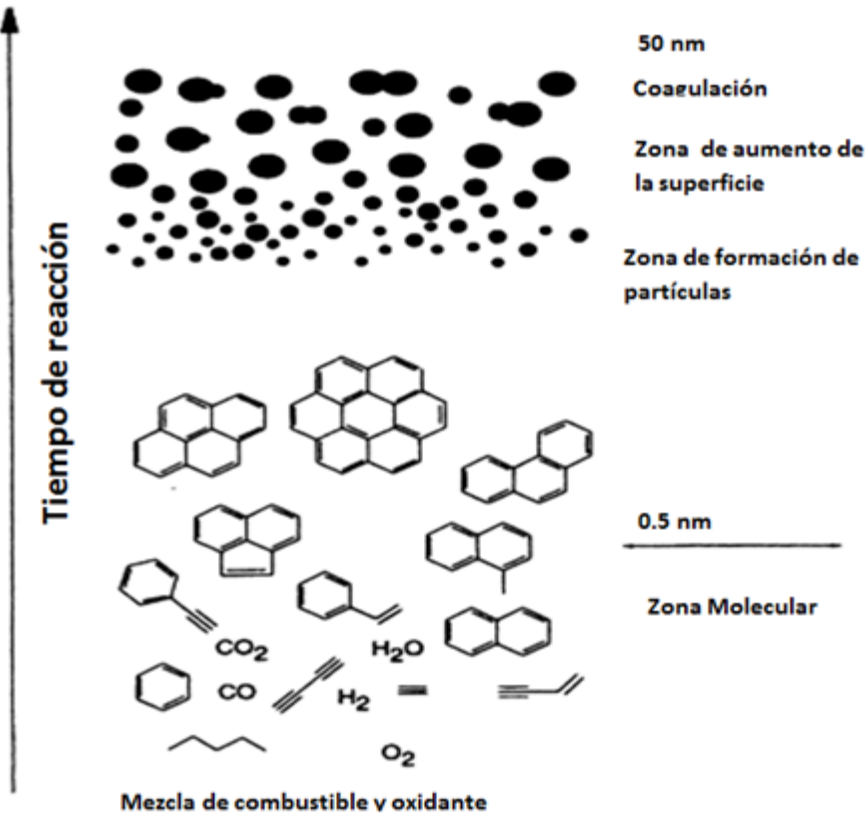


Figura 2.2 Diagrama general del proceso de formación de los HAPs en el proceso de combustión (Richter& Howard, 2000).

Los combustibles que pueden formar HAPs son metano, otros hidrocarburos, hidratos de carbono, ligninas, péptidos, etc. Los compuestos que contienen cadenas laterales, los compuestos insaturados y las estructuras cíclicas suelen favorecer la formación de HAPs.

En los trabajos siderometalúrgicos y en las fundiciones se produce exposición a HAPs liberados por los productos de alquitrán al entrar en contacto con el metal fundido. Los preparados de brea se utilizan en hornos, canales de colada y lingoteras. El asfalto que se utiliza para pavimentar las calles y las carreteras procede principalmente de los residuos de destilación del petróleo crudo. El asfalto de petróleo contiene pocos HAPs superiores. No obstante, en algunos casos este asfalto se mezcla con alquitrán de hulla, lo que aumenta el riesgo de exposición a HAPs cuando se trabaja con el asfalto caliente. En otros trabajos en los que se utiliza alquitrán derretido y se rocía sobre una gran superficie, los trabajadores pueden sufrir una intensa exposición a HAPs. Tales operaciones incluyen los trabajos de recubrimiento de oleoductos, el aislamiento de paredes y el calafateado de tejados (Stellman & McCan, 1998).

Los HAPs se usan principalmente en la fabricación de colorantes y en síntesis químicas. El antraceno se utiliza en la producción de antraquinona, una importante materia prima para la fabricación de colorantes y también se emplea como diluyente para conservantes de la madera y en la producción de fibras sintéticas, plásticos y monocristales. El fenantreno se emplea en la fabricación de colorantes y explosivos, en la investigación clínica y en la síntesis de fármacos. Algunos HAPs de cuatro o más anillos, como el benzo[a]pireno, son utilizados para inducir cáncer en animales de laboratorio (Crépeaux et al., 2012).

2.1.3. Riesgos de la exposición a los HAPs

2.1.3.1. Toxicología de los HAPs

En 1933 se demostró que un hidrocarburo aromático policíclico aislado del alquitrán de hulla era cancerígeno. El compuesto aislado resultó ser benzo(a)pireno. Desde entonces se han descrito varios HAPs que tienen la misma propiedad. Sin embargo, no todos los HAPs han mostrado poseer efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutagénicos y muchas veces el efecto se atribuye a la presencia conjunta de más de un compuesto de la familia y de algunos de sus derivados. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 2.2, resaltando en negritas los compuestos usados en este trabajo.

Tabla 2.2

Datos relativos a los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos HAPs (ATDSR, 1995)

<i>Compuesto</i>	<i>Carcinogenicidad</i>	<i>Genotoxicidad</i>	<i>Mutagenicidad</i>
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Pireno	N	L	+
Benzofluorenos	I	I	?
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Benzo [e]pireno	I	L	+
Benzo [b]fluoranteno	S	S	+
Benzo[k]fluoranteno	S	S	+
Benzo[a]pireno	S	S	+
Dibenz[a]antraceno	S	S	+
Benzo[ghi]perileno	I	I	+
Dibenzopirenos	S	I	+
2-Nitronaftaleno	N	L	-
1-Nitropireno	I	S	+

(S= suficiente; I= insuficiente; N= no carcinogénico; L= limitados.)
Mutagenicidad (Test de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconcluso).

Una ruta general propuesta para la carcinogenicidad por exposición ambiental a los HAPs considera las siguientes etapas: exposición, activación metabólica, formación de aductos entre HAPs y ADN, mutaciones en genes críticos como, por ejemplo, el p53 (gen represor de tumores) y sucesión de mutaciones en otros genes.

Es importante recalcar que la aparición del cáncer es un proceso que involucra varias etapas, siendo también influenciado por susceptibilidad individual y otros factores, tales como la edad, sexo, etnia, estado de salud, nutrición y polimorfismo genético. En general, una mayor concentración de aductos HAP-ADN se encuentra en personas ocupacionalmente expuestas.

La biotransformación de los HAPs involucra una serie de enzimas que catalizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis (enzimas del citocromo P 450- CYP) y de enzimas que catalizan reacciones de conjugación (sulfotransferasa, epóxido hidrolasa, glutatión- S-transferasa y UDP-glicotransferasa). Estos sistemas enzimáticos están distribuidos en todos los tejidos del organismo. Las enzimas responsables de la activación metabólica de los HAPs, incluyendo el benzo(a)pireno son la CYP1A1, CYP1B1 y mucho menos la CYP1A2 conjuntamente con la epóxido hidrolasa. Estas dos enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en el pulmón humano. En la figura 2.3 se representa la ruta metabólica del BaP en humanos (Mastandrea et al., 2005).

La potencia carcinógena suele ser diferente entre un compuesto y otro. Aunque hay compuesto más potentes que el benzo[a]pireno, existe una clasificación de potencia relativa hecha en base a este compuesto ya que fue el primer HAP identificado como cancerígeno. En la tabla 2.3 se presentan los valores de potencia carcinogénica relativa de algunos HAPs.

Tabla 2.3

Potencia carcinógena relativa de diferentes HAPs en estudios realizados con ratas. (ATDSR, 1995)

<i>Compuesto</i>	<i>Potencia relativa</i>
Benzo[a]pireno	1.0
Benzo[a]antraceno	0.145
Benzo[b]fluoranteno	0.167
Benzo[k]fluoranteno	0.02
Criseno	0.0044
Dibenzo[a,h]antraceno	1.11
Indeno[1,2,3c-d]pireno	0.055

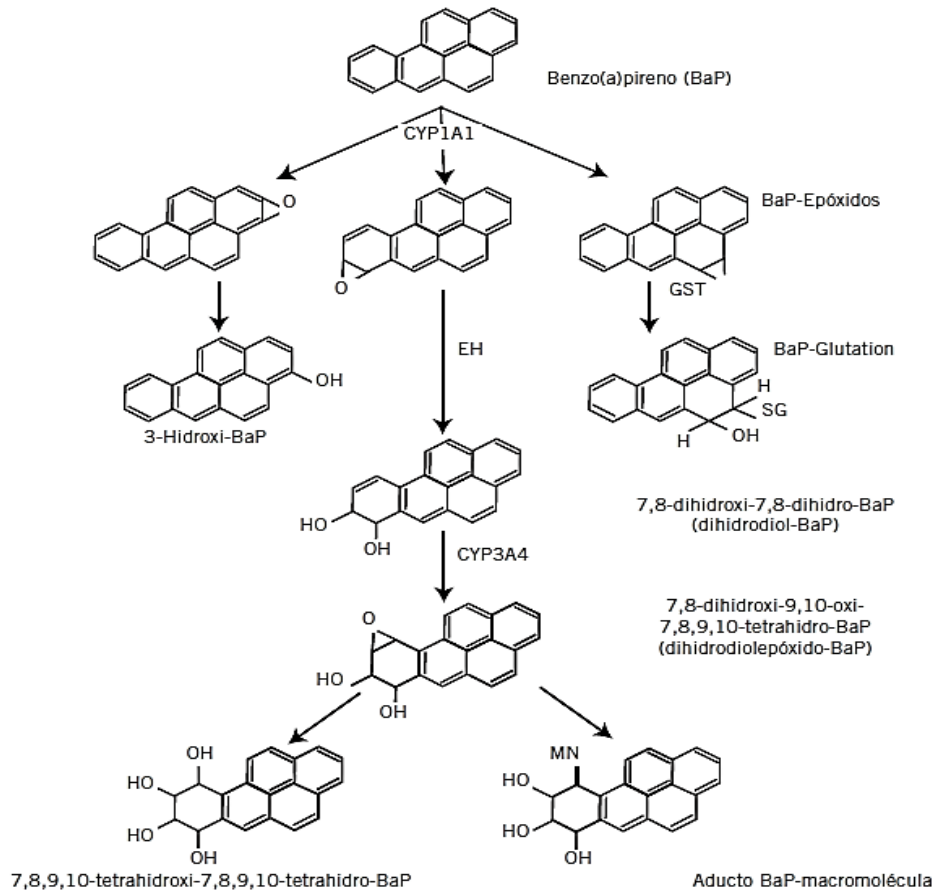


Figura 2.3 Representación esquemática del metabolismo del Benzo(a)pireno en humanos (Mastrandea et al., 2005). EH: Epóxido hidrolasa. GST: Glutation-S-Transferasa.

2.1.3.2. Toxicinética de los HAPs

2.1.3.2.1. Absorción

Los HAP pueden entrar al organismo humano por diferentes vías como son: inhalación, cutánea y oral; principalmente. La tabla 2.4 presenta los porcentajes de benzo[a]pireno absorbidos a través de las diferentes vías de exposición.

Tabla 2.4
Porcentajes de benzo[a]pireno absorbidos por diferentes vías. (ATDSR, 1995)

Vía	% absorbido
Inhalación ^a	<75
Oral ^a	<58
Cutánea ^b	<51

a=estudios realizados en ratas; b=estudios realizados con monos

2.1.3.2.2. Distribución

Dependiendo de la vía de exposición, los HAPs se distribuyen en los pulmones, riñones, hígado y tracto gastrointestinal. Después de varias horas o incluso semanas de ocurrir la exposición, los HAPs se distribuyen hacia los intestinos, lo cual sugiere la intervención de las secreciones biliares como medio de eliminación de los HAPs.

Algunos HAPs como el benzo[a]pireno han demostrado ser teratogénicos. Estudios realizados en ratas preñadas han demostrado que la velocidad con la que el benzo[a]pireno cruza la placenta es lenta. De esta forma el efecto teratogénico es atribuido a la elevada absorción gastrointestinal del benzo[a]pireno.

2.1.3.2.3. Metabolismo y excreción

Una vez en el organismo, las enzimas monoxigenasas dependientes del citocromo P450 (CYP1A) son responsables de la oxidación enzimática de los HAPs. Ellas actúan sobre una zona de elevada densidad electrónica al nivel de la región angular de la molécula de los HAPs formando epóxidos que pueden espontáneamente formar fenoles, o por acción de las epóxido hidrolasas, producir dihidrodioles. De estos fenoles algunos son oxidados a quinonas y otros producen epóxidos secundarios (di-hidrodiolepóxidos), que son las formas más reactivas con el ADN. Los dihidrodiolepóxidos son altamente inestables y cuando no reaccionan rápidamente, son hidrolizados a tetroles, cuya formación puede ser utilizada como bioindicador de formación de diolepóxidos. Los fenoles, las quinonas y los dihidrofenoles pueden sufrir conjugación formando sulfatos y glucuronatos. Las quinonas y los diolepóxidos también reaccionan con el glutatión (mediante una glutatión-S-transferasa) y pueden ser eliminados por orina como tioéteres.

2.1.4. Límites máximos permisibles de los HAPs

Los estudios epidemiológicos indican una mayor frecuencia de cáncer de pulmón en los trabajadores de las industrias de coque, aluminio y acero. Aproximadamente un siglo después se han regulado algunos de los HAPs como cancerígenos laborales.

El largo período de latencia entre la primera exposición y la aparición de los síntomas, junto con muchos otros factores, han hecho que el establecimiento de valores límite umbral para los HAPs en la atmósfera del lugar de trabajo sea una tarea ardua y difícil. También existe un largo período de latencia para la formulación de normas.

Hasta 1967, prácticamente no existían Valores Límite Umbral (TLV, por sus siglas en inglés) para los HAPs, año en el que la Conferencia Americana de Higienistas Industriales del Gobierno (ACGIH, por sus siglas en inglés) adoptó un TLV de 0.2 mg/m^3 para los alquitranes de hulla volátiles, definiéndose como el peso de una fracción soluble en benceno de las partículas recogidas en un filtro.

En 1970, la URSS estableció una concentración máxima admisible (MAC, por sus siglas en inglés) para el benzo(a)pireno basándose en estudios de laboratorio realizados con animales. En 1978 se estableció en Suecia un TLV de 10 g/m^3 para el BaP. En 1997, la *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) de Estados Unidos estableció un límite de exposición permisible (PEL) para el BaP de 0.2 mg/m^3 .

El límite de exposición recomendado (REL) por el *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) de Estados Unidos es de 0.1 mg/m^3 (fracción extraíble en ciclohexano).

En la siguiente lista se han utilizado las mediciones de benzo(a)pireno en distintos tipos de lugares de trabajo para clasificarlos según el grado de exposición:

- exposición muy alta a benzo(a)pireno ($\text{más de } 10 \text{ mg/m}^3$)—trabajos en fábricas de gas y coque; plantas de aluminio; fábricas de electrodos de grafito; manipulación de alquitranes y breas calentados
- exposición moderada ($0.1 \text{ a } 10 \text{ g/m}^3$)—trabajos en fábricas de gas y coque; acerías; fábricas de electrodos de grafito; plantas de aluminio; fundiciones
- exposición baja ($\text{menos de } 0.1 \text{ g/m}^3$)—fundiciones; producción de asfaltos; plantas de producción de aluminio con electrodos precocidos; talleres de reparación de automóviles y garajes; minas de hierro y construcción de túneles.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) contempla solo al benzo[a]pireno en su lista de contaminantes regulados. Para este compuesto se permite un nivel máximo de contaminante (MCL) de 200 ng L^{-1} en muestras de agua potable.

Cabe señalar que la mayoría de las normas se enfocan en la medición de los niveles de benzo[a]pireno. Sin embargo, este compuesto no es el único HAPs que se produce y tampoco es el único con propiedades cancerígenas y mutagénicas.

En México, la norma NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 hace referencia a límites máximos permisibles de los HAPs en suelo. En la tabla 2.5 se presentan dichos valores.

La Comisión Nacional del Agua, en la Ley Federal de Derechos Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales, establece límites máximos permitidos para los HAPs en general de 100 ng L⁻¹ para cuerpos de agua de abastecimiento para uso público urbano y de 100,000 ng L⁻¹ para aguas costeras y estuarios (CONAGUA, 2009).

Tabla 2.5

Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo (NOM-138-SEMARNAT, 2003).

Hidrocarburos específicos	Uso de suelo predominante ¹ (mg/kg base seca)		
	Agrícola ²	Residencial ₃	Industrial
Benceno	6	6	15
Tolueno	40	40	100
Etilbenceno	10	10	25
Xilenos (suma de isómeros)	40	40	100
Benzo[a]pireno ⁴	2	2	10
Dibenzo[a,h]antraceno ⁴	2	2	10
Benzo[a]antraceno ⁴	2	2	10
Benzo[b]fluoranteno ⁴	2	2	10
Benzo[k]fluoranteno ⁴	8	8	80
Indeno (1,2,3-cd)pireno ⁴	2	2	10

1. Para usos de suelo mixto, deberá aplicarse la especificación al menor valor de los usos de suelo involucrados.

2. Agrícola incluye suelo forestal, recreativo y de conservación. 3. Industrial incluye comercial.

4. La determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares deberá realizarse únicamente en los casos que se pretende demostrar que se está cumpliendo con los límites máximos permisibles.

2.1.5. Estructura y propiedades de los metabolitos del BaP

La búsqueda de los metabolitos de los HAPs es importante, ya que una degradación incompleta de los HAPs en lugar de disminuir su peligrosidad puede provocar el efecto contrario. La mayoría de los HAPs cancerígenos o mutagénicos necesitan una activación para causar estos efectos. Existen diferentes rutas por las cuales los HAPs pueden ser degradados al igual que un gran

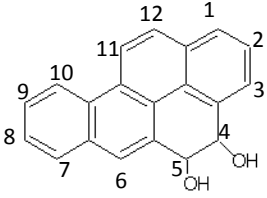
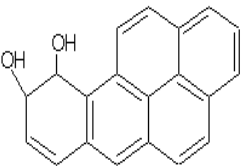
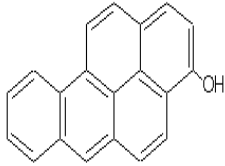
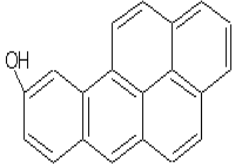
número de compuestos formados en cada una de ellas. En casos de exposición a los HAPs, los metabolitos monitoreados suelen ser aquellas moléculas grandes (por ejemplo los aductos del BaP) que son capaces de unirse a las proteínas o al ADN, las cuáles son identificadas prácticamente cuando el daño a los organismos está hecho (Flowers-Geary et al., 1996; Juhasz & Naidu, 2000). En este trabajo se estudia la determinación de los metabolitos que aparecen en primer orden en los ensayos de exposición realizados con organismos eucariontes del tipo de las microalgas verdes como son los dihidrodioles del BaP (más comúnmente producidos por organismos procariontes) y también algunos metabolitos que son producidos por la mayor parte de los organismos eucariontes, como son los OH-BaP. En la tabla 2.6 se presentan las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos estudiados.

La mayoría de las rutas de degradación de HAPs por la acción metabólica de bacterias y algas están parcialmente descritas debido a que no ha sido posible identificar la totalidad de los metabolitos formados por acción de los microorganismos. En la tabla 2.6 se aprecia que la mayoría de los metabolitos presentan una alta inestabilidad, lo que dificulta su determinación en los ensayos, además de que éstos se producen en muy bajas concentraciones.

Una biotransformación inicial del contaminante, aun cuando no conduce a una degradación completa, resulta muy importante en el medio ambiente, ya que puede cambiar la naturaleza físico-química de los contaminantes mediante la reducción de los valores del coeficiente de reparto octanol/agua (K_{ow}) o hacerlos más susceptibles al ataque de otros microorganismos como las bacterias u hongos (Semple et al., 1999; Muñoz & Guieysse, 2006). De igual forma, se observa que la polaridad de los metabolitos es mayor respecto al HAP progenitor. En este caso, si se compara el valor de $\log K_{ow}$ para el BaP (6.02) con los valores para los metabolitos mostrados en la tabla 1.6, se observa una disminución en los valores de $\log K_{ow}$ para los metabolitos, principalmente los dihidrodioles. Esto puede provocar que las condiciones de análisis utilizadas para la determinación de los HAPs no resulten adecuadas para la identificación y determinación de los metabolitos.

Por otra parte, el aumento en la polaridad de los metabolitos se verá reflejado en una mayor biodisponibilidad de los compuestos a los demás seres vivos que habiten el ambiente contaminado. De esta forma, el desarrollo de metodologías analíticas rápidas y sensibles es primordial para el entendimiento de las rutas y mecanismos mediante los cuales los microorganismos son capaces de disminuir la contaminación por estos compuestos.

Tabla 2.6 Propiedades fisicoquímicas de los metabolitos del BaP estudiados (Clark, 1993).

Compuesto	4,5-dihidrodiol BaP	9,10-dihidrodiol BaP	3-OH BaP	9-OH BaP
CAS No.	37571-88-3	58886-98-9	13345-21-6	17573-21-6
Estructura				
Fórmula Molecular	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	C ₂₀ H ₁₄ O ₂	C ₂₀ H ₁₂ O	C ₂₀ H ₁₂ O
Peso molecular (g mol ⁻¹)	286.3	286.3	268.3	268.3
Estado físico	Sólido blanco	Polvo blanquecino	Agujas color café claro	Sólido cristalino café claro
Punto de fusión (°C)	212-214	209-210	209-210	201-202
Punto de ebullición (°C) *	499	499	478	478
Soluble en:	Tetrahidrofurano y benceno	Dimetilsulfóxido, acetona, cloroformo y metanol	Cloroformo, acetona y benceno	Acetona, benceno, tetrahidrofurano y acetonitrilo
Solubilidad en agua (mg L ⁻¹) *	0.43	0.61	0.09	0.09
Log Kow*	4.01	3.83	5.63	5.63
Estabilidad	Sensible al calor, luz y aire	Sensible al calor, luz, aire, ácidos y bases	Sensible al calor, luz y aire	Sensible al calor, luz y aire. Inestable en disoluciones con tetrahidrofurano

*Valores estimados con el software US EPA, [2012], Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v 4.10. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.

2.2. Microorganismos y contaminación.

2.2.1. Importancia de los microorganismos como indicadores de contaminación ambiental

En la actualidad, un gran número de contaminantes son descargados a la naturaleza ocasionando el deterioro de los diferentes compartimientos ambientales. La intensidad de estos efectos nocivos depende de la concentración en la que se encuentren las sustancias, de su persistencia y de su biodisponibilidad (Pica-Granados et al., 2008). Por esta razón, es necesario

realizar estudios enfocados al monitoreo y control de los contaminantes en las diferentes matrices de los ecosistemas como son agua, suelo y biota.

Dentro de éste último grupo, se destacan los microorganismos por estar ampliamente distribuidos en el ambiente y ser contribuyentes fundamentales en la calidad, el control y la sustentabilidad a largo plazo de los ecosistemas (Díaz et al., 2006; Bending et al., 2007). Ciertas especies de bacterias, hongos, protozoarios y algas son capaces de adsorber, bioacumular y/o degradar diversos contaminantes, por lo que han sido utilizados como indicadores de contaminación ambiental mediante el monitoreo de los efectos en su desarrollo y reproducción producidos por diferentes contaminantes. La degradación total de los contaminantes en esas condiciones por lo general involucra la participación de dos o más microorganismos, ya que es muy difícil encontrar un solo microorganismo que sea capaz de degradar completamente a un contaminante o mezclas de ellos (Gutiérrez et al., 2003; Campbell et al., 1997; Ekelund et al., 1994; Foissner, 1997; Trielli et al., 2006).

Las algas microscópicas como componentes del fitoplancton, constituyen el grupo de productores primarios que son fundamentales en todos los ecosistemas acuáticos, ya que determinan la productividad de los mismos y permiten el desarrollo de consumidores de diferente nivel trófico (Martínez-Jerónimo, 2008). Este tipo de organismos han demostrado resistencia a los metales pesados gracias a sus mecanismos de remoción (Muñoz & Guieysse, 2006). Por esta razón, el uso de las microalgas en los programas de biorremediación es un campo en pleno crecimiento dentro de las investigaciones en microbiología ambiental. Así, estudios recientes han demostrado que algunas microalgas cultivadas en el laboratorio son capaces de biodegradar contaminantes orgánicos peligrosos, como los HAPs, comúnmente encontrados en aguas naturales y residuales (Okay et al., 2000; Tam et al., 2002; Luan et al., 2006; Gourlay et al., 2005; Warshawsky et al., 2007; Hong et al., 2008).

Otro grupo de microorganismos ampliamente distribuido sobre el planeta son los protozoarios, organismos capaces de resistir diferentes condiciones ambientales como sequedad, temperaturas altas y bajas. Inclusive se ha reportado que ciertos tipos de protozoarios pueden crecer apropiadamente en suelos y aguas contaminados (Maeda et al., 2005). A diferencia de las bacterias, los protozoarios son organismos eucariotas y los estudios de sus reacciones a los cambios ambientales pueden estar mejor relacionados con los efectos que estos cambios producirían en organismos superiores (Campbell et al., 1997). En el reino protozoa, se distingue al

grupo de los ciliados edáficos (por ejemplo, *Colpoda steinii*, *Colpoda inflata* y *Cyrtolophosis elongata*), los cuales han demostrado ser resistentes a la contaminación por metales pesados en comparación con los ciliados provenientes de otros ambientes. Al respecto, se han efectuado numerosos experimentos donde la bioacumulación parece ser el principal mecanismo involucrado en su resistencia a los contaminantes (Díaz et al., 2006). Es por esto que recientemente, los ciliados se han contemplado como potenciales bioindicadores de la contaminación por contaminantes inorgánicos (Díaz et al., 2006; Gutiérrez et al., 2003, Martín-González et al., 2006). Sin embargo, los estudios realizados con la exposición a contaminantes orgánicos aún no ha sido abordada con estos microorganismos, por lo que ésta área tiene una buena perspectiva de desarrollo.

Por esta y muchas otras razones, algunas microalgas y protozoarios pueden ser indicadores de contaminación de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos (Warshawsky, 1995 y 2007).

2.2.2. Características de la microalga verde *Selenastrum capricornutum*

El género y la especie *S. capricornutum* fueron modificados formalmente a *Pseudokirchnella subcapitata* (Pica-Granados, 2008). Sin embargo, para mantener consistencia con la literatura que la refiere, se emplea en este trabajo su nombre original *S. capricornutum*.

S. capricornutum es una microalga verde (clorofita) unicelular, no móvil, de reproducción asexual. Tiene forma de media luna y un volumen celular aproximado entre 40 y 60 μm^3 , que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos. Es una especie moderadamente sensible a diferentes sustancias tóxicas por lo que el desarrollo de sus cultivos se utiliza como prueba en análisis de la calidad de agua en diferentes países (ISO, 1989; Environment Canada, 1992; USEPA, 1992, Arensberg et al., 1995). En la figura 2.4 se presenta una imagen microscópica de un cultivo de *S. capricornutum*.

Se ha encontrado que este tipo de algas son capaces de llevar a cabo biotransformaciones de contaminantes aromáticos, tales como la hidroxilación de naftaleno, antraceno y benzo[a]pireno (Schoeny et al., 1998, Ke et al., 2010).

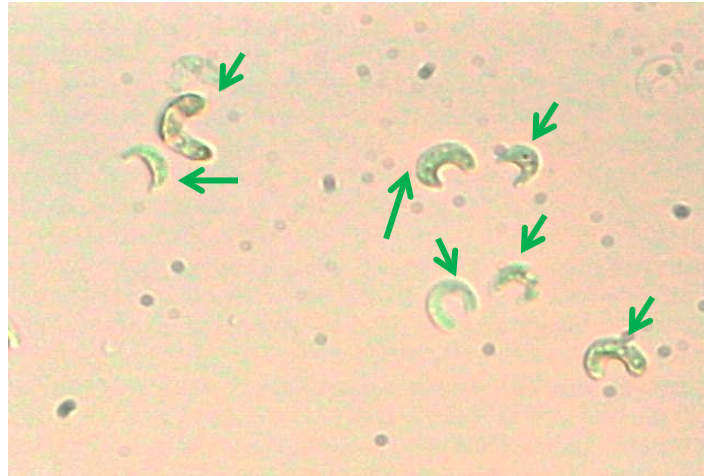


Figura 2.4 Micrografía óptica de una muestra de cultivo de *S. capricornutum*. Aumento 10X (Imagen propia). Las flechas indican células de las microalgas.

2.2.3. Características del protozooario *Colpoda cucullus*

C. cucullus es un protozooario ciliado que mide entre 40 y 120 μm de forma semicircular excavada en la apertura oral, mitades anterior y posterior aproximadamente iguales en tamaño y ligeramente aplanado. Presenta un macronúcleo globular o ligeramente elipsoidal, de ubicación muy variable. Vacuola contráctil y poro excretor en el extremo posterior. La mayoría o todas las poblaciones tienen canales finos asociados con la vacuola contráctil. El citoplasma es incoloro y sin inclusiones cristalinas, en especímenes bien nutridos se presentan hasta 200 vacuolas digestivas. Presenta un movimiento a la izquierda en espiral, irregular y a una velocidad de 310-700 $\mu\text{m s}^{-1}$. A menudo, *C. cucullus* aparece inmóvil durante la ingesta de alimentos. Presenta cilios de aproximadamente 10 μm de largo. *Colpoda cucullus* se alimenta de bacterias, pero también puede hacerlo con materia orgánica en descomposición (Mueller & Mueller, 1970). En la figura 2.5 se presentan micrografías de células de *C. cucullus*.

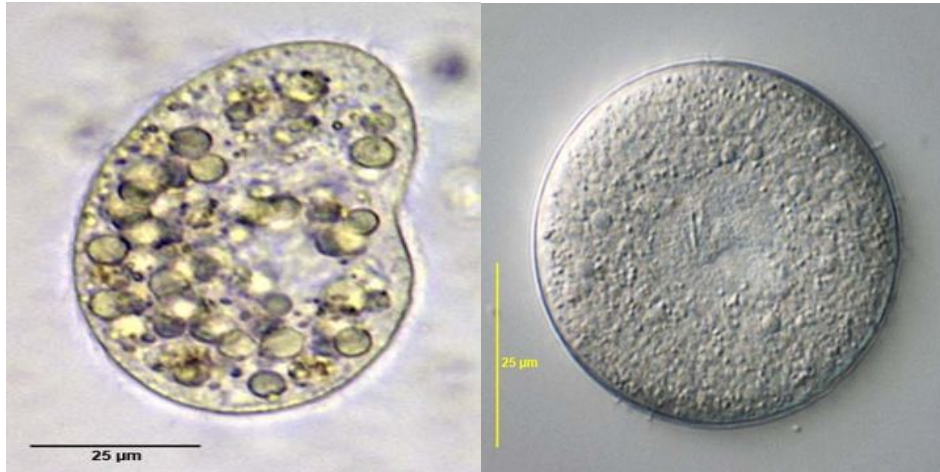


Figura 2.5 A. Célula vegetativa de *C. cucullus*. B. Quiste de resistencia formado a partir de la célula vegetativa (EOL, 2012)

En particular, *C. cucullus* es considerado como una especie capaz de habitar diferentes ambientes, tanto en suelo, agua y aire. Desde el punto de vista funcional, en su forma trófica, cada célula cuenta con una delicada membrana externa, lo que le confiere la posibilidad de responder de forma inmediata a los cambios ambientales, y en consecuencia, a la presencia de contaminantes (Castro-Ortíz et al., 2007), por lo que es posible el uso de *C. cucullus* como organismo indicador en pruebas de toxicidad ya que al ser un organismo muy sensible es posible obtener resultados en tiempos relativamente cortos.

En condiciones favorables es capaz de reproducirse formando 2 ó 4 células a partir de un solo individuo y su ciclo de reproducción ocurre en períodos entre 4 y 6 h, por lo que es factible obtener cultivos con un alto número de organismos en períodos de tiempo cortos. Un ejemplo del ciclo de vida de *C. cucullus* se muestra en la figura 2.6. Cuando el alimento o las condiciones ambientales no son óptimos, las células forman quistes de resistencia. En estos últimos, la división celular no se lleva a cabo, así que una vez que las condiciones ambientales sean favorables este quiste de resistencia se romperá, emergiendo de él una sola célula.

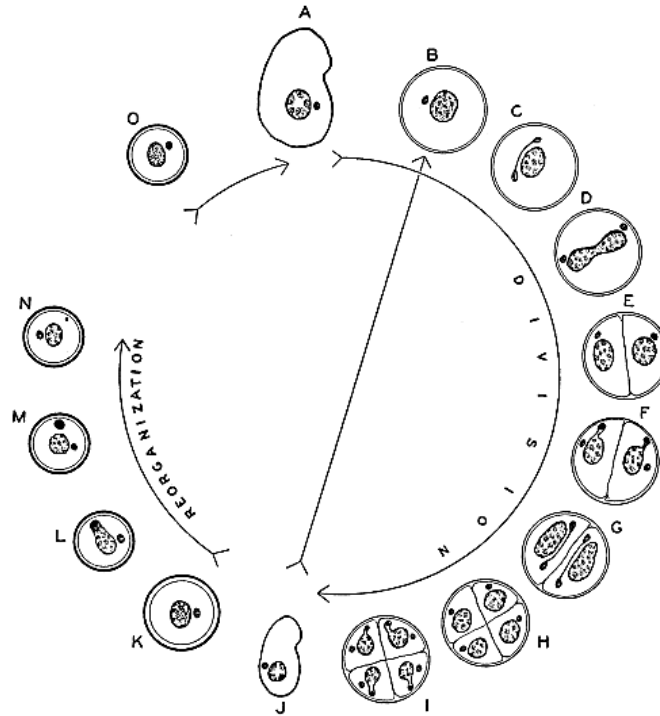


Figura 2.6 Esquema del ciclo de vida de una célula de *C. cucullus* ilustrando la secuencia de eventos durante la reproducción y la formación de quistes de resistencia. (A-J) Actividad reproductiva. (J-B) La reproducción se repite en condiciones ambientales favorables. (K-N) Formación de quistes de resistencia en condiciones desfavorables. (O-A) Exquistamiento de la célula al volver a condiciones favorables (Kidder & Claff, 1938).

2.3. Metodologías de extracción y análisis de contaminantes en microorganismos

Los estudios para la determinación de contaminantes en microorganismos adquieren cada vez mayor importancia en el área de las ciencias ambientales. Los resultados de las pruebas de laboratorio son aceptados como estimaciones conservadoras de los efectos potenciales de las sustancias en el ambiente y se reconoce su utilidad para los programas de monitoreo ambiental.

Actualmente, existe un interés creciente por el desarrollo de procedimientos estandarizados para la evaluación ecotoxicológica de los compuestos o elementos químicos potencialmente dañinos (Pica-Granados et al., 2008), aunque en su gran mayoría, se refieren a ensayos completamente biológicos como pruebas de toxicidad o experimentos de biorremediación. Hasta el momento, no existen trabajos publicados que reporten métodos analíticos bien validados para la determinación de los contaminantes orgánicos presentes en los propios microorganismos; solo algunos de ellos describen como se llevan a cabo las metodologías de extracción (Lindquist & Warshawsky, 1985; Kirso & Irha, 1998; Warshawsky et al., 1995 y 2007).

Cabe destacar que los escasos trabajos en que se describen los métodos de extracción de contaminantes como los HAPs en microorganismos, solo se enfocan al análisis y metabolismo del benzo[a]pireno, considerado como indicador de contaminación por HAPs de más de 4 anillos. Sin embargo, éste no es el único compuesto de esta familia que presenta esta propiedad, por lo que también es importante considerar a otros contaminantes aromáticos pesados. Además, los métodos analíticos de aislamiento de los contaminantes utilizados en estos trabajos se basan en la técnica de extracción con disolventes clásica, la cual presenta muchos inconvenientes prácticos como son un gran consumo de disolventes, materiales y tiempos de extracción. Se observa también que no se reportan estudios de recobro que amparen la validez de la cuantificación y por lo tanto los balances de materia y la interpretación de los resultados (Warshawsky et al., 1995 y 2007; Okay et al., 2000; Richardson et al., 2004).

En la tabla 2.7 se resumen algunos trabajos recientes publicados que relacionan contaminantes orgánicos con protozoarios y microalgas. Se observa que la mayoría de los trabajos que realizan análisis de los HAP's utilizan cultivos de microalgas y la técnica de extracción más utilizada es la ELL.

A diferencia de las microalgas, para los ensayos con protozoarios es más común encontrar ensayos de toxicidad en lugar de la determinación analítica de contaminantes.

Solo se encontraron dos referencias donde se utilizan como técnicas de extracción a la Extracción en fase sólida (EFS) y la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) (Cameán, 2004; González-Barreiro, 2006). Estas dos técnicas de extracción son más recientes que la extracción líquido-líquido y han demostrado un buen desempeño en la extracción de diferentes tipos de contaminantes. La EFS y la DMFS se utilizaron en el presente trabajo por lo que se describen con mayor detalle a continuación.

Tabla 2.7

Trabajos recientes que relacionan los contaminantes orgánicos con las microalgas y protozoarios

Autor (año)	Organismo	Analitos	Extracción	Análisis	Recobros	L. D. y L. C
Borde (2003)	Algas (<i>Chlorellasorokiniana</i>) y bacterias	Fenantreno, fenol y salicilato.	EPD	CLAR-UV y CG-DCE	NR	NR
Da Silva (2004)	Hongos filamentosos <i>Cylothrium</i> sp.	Antraceno, fenantreno, pireno y Benzo[a]Pireno	EPD	CLAR-UV-DAD	NR	NR
Gramss (1999)	Cultivos de hongos	Fenantreno, antraceno, perileno, pireno	EPD-AU	CLAR-DF	NR	NR
Hong (2008)	Algas diatomeas.	Fluoranteno y fenantreno	ELL y EPD-AU	CG-EM	75-89 %	NR
Ke (2010)	Algas. <i>Selenastrum capricornutum</i>	Fluoreno, fenantreno, fluoranteno y BaP.	ELL	CG-EM	NR	0.2-0.28 µg
Lei (2007)	Microalgas. <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i> y <i>Selenastrum</i>	Fluoranteno y pireno	ELL	CG-DIF	NR	NR
Lindquist (1985)	Microalgas. <i>Selenastrum capricornutum</i>	BaP	ELL	CLAR-UV; EM	NR	NR
Warshawsky (1995)	Microalgas	BaP y metabolitos	ELL	CLAR-CF. ECL	NR	NR

EPD = extracción por disolventes; AU = Asistida por ultrasonido; ELL = Extracción líquido-líquido; CLAR = Cromatografía de líquidos de alta resolución; UV = Detector ultravioleta; CG = Cromatografía de gases; DCE = Detector de captura de electrones; DAD = Detector de arreglo de diodos; EM = espectrometro de masas; DIF = Detector de ionización de flama; CF = Colector de fracciones; ECL = Espectrómetro de centelleo líquido. NR = No reportado

Tabla 2.7 continuación
Trabajos recientes que relacionan los contaminantes orgánicos con las microalgas y protozoarios

Autor (año)	Organismo	Analitos	Extracción	Análisis	Recobros	L. D. y L. C
Moody (2004)	Bacterias. <i>Mycobacterium vanbaaleni</i>	BaP y metabolitos	ELL	CLAR-UV y CG-EM	NR	NR
González-Barreiro (2006)	Microalgas. <i>Chlorella vulgaris</i> (microalga) <i>Synechococcus elongatus</i> (cianobacteria)	Triazinas. Herbicidas.	EFS (C18)	CG-EM	96-98 %	NR
Cameán (2004)	<i>Microcystis aeruginosa</i> (cianobacterias)	Microcistinas (Hepatotoxinas)	DMFS (C18)	CLAR-EM	85-92 %	300 µg kg ⁻¹
Autor	Organismo	Analitos	Estudio		Análisis	
Trielli (2006)	Protozoarios. <i>Colpoda inflata</i>	Organofosforados	Evaluación de la toxicidad de pesticidas en el desarrollo de las células		NR	
Hussain (2008)	Protozoario. <i>Paramecium caudatum</i>	Carbofurano (pesticida)	Medición de la toxicidad aguda e impacto fisiológico del analito en el protozoario que aparece comúnmente en muestras de agua		NR	
Bending (2007)	Microfauna de una muestra de suelo (protozoarios hongos, bacterias)	Tebuconazol, Azoxystrobin y clorotalonil (Fungicidas)	Persistencia en el medio ambiente y efecto en las poblaciones microbianas.		CLAR-UV	
Gentry (2003)	Microfauna de una muestra de suelo (bacterias y hongos)	Pireno y fluoranteno	Observar el comportamiento de poblaciones degradadoras de estos compuestos		CLAR-UV	
Trielli (2007)	<i>Euplotescrassus</i> (Protozoario)	Diazinon, Dicofol	Observar la viabilidad del microorganismo como indicador de la toxicidad de los compuestos en sedimentos marinos.		NR	

ELL = extracción líquido-líquido; EFS = extracción en fase sólida; DMFS = Dispersión de matriz en fase sólida; C18 = adsorbente C18; CLAR = Cromatografía de líquidos de alta resolución; UV = Detector ultravioleta; GC = Cromatografía de gases; EM = espectrómetro de masas. NR = No reportado

2.3.1. Extracción en Fase Sólida (EFS)

La propiedad que tienen algunas fases sólidas de unirse a diferentes tipos de compuestos mediante diversos mecanismos de afinidad se conoce desde hace más de 50 años. Este fenómeno de retención diferencial ha permitido el desarrollo de variadas técnicas cromatográficas y debido a la diferencia de afinidades entre los compuestos retenidos en la fase sólida, se ha logrado establecer una amplia variedad de métodos de separación de mezclas de diferentes compuestos o separaciones de interferencias y un solo compuesto de interés en específico.

La EFS tuvo sus inicios con el grupo de investigadores de la US Public Health Service (Cincinnati, OH, EU), los cuáles utilizaban un tubo de acero relleno con carbón granulado para la retención de compuestos presentes en muestras de agua de lluvia y agua superficial. En este trabajo los investigadores lograron demostrar la presencia de contaminantes provenientes del petróleo en concentraciones de ppm (Braus et al., 1951). Sin embargo, la EFS tuvo su mayor crecimiento en la década de 1990 cuando diferentes investigadores y proveedores realizaron grandes avances en la búsqueda y fabricación de nuevos materiales sólidos para la separación de una amplia gama de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos (Liska, 2000)

La EFS es una técnica de extracción que se utiliza para la separación selectiva de los analitos de interés presentes en una muestra líquida, comunmente mediante el uso de cartuchos de extracción como los mostrados en la figura 2.7.

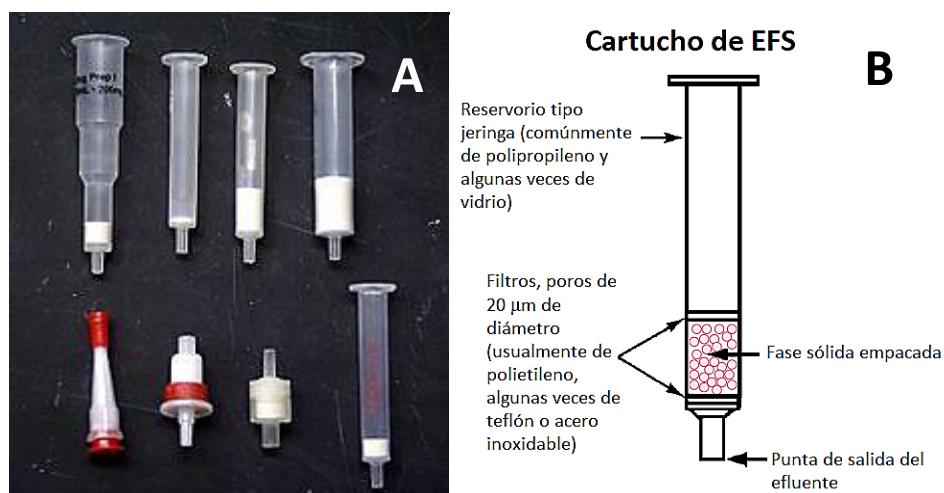


Figura 2.7 (A) Ejemplos de diferentes cartuchos de extracción comerciales. (B) Esquema general de las partes que componen un cartucho de EFS (Sigma-Aldrich Co., 1998).

El proceso de extracción por EFS consiste regularmente en una serie de cinco sencillos pasos como son:

- [1] **Elección del cartucho de extracción** (tamaño, cantidad y tipo de fase sólida empacada): Depende de la naturaleza de la muestra, el volumen de la muestra, el nivel de contaminación y el tipo de disolvente de la muestra. Las recomendaciones generales para la elección de cartuchos para EFS se presentan en la tabla 2.8.

Tabla 2.8

Recomendaciones generales para la elección de los cartuchos de EFS. (Sigma-Aldrich Co., 1998)

Elección del tamaño del cartucho de extracción		
Si el tamaño de la muestra es:	El cartucho recomendado es:	
< 1ml	1 mL	
1 mL a 250 mL	3 mL	
1 mL a 250 mL (velocidad de extracción rápida)	6 mL	
10 a 250 mL (alta capacidad de retención)	12, 20 ó 60 mL	
250 mL a 1 L	12, 20 ó 60 mL	
Elección del diámetro de poro de los filtros (frits)		
Si el tamaño de la muestra es:	El diámetro de poro recomendado es:	
< 100 mL	20 µm	
100 mL a 1 L	47 µm	
> 1 L	90 µm	
Elección del contenido de adsorbente empacado		
Tipo de separación	Cantidad de adsorbente recomendada	
Fase reversa, fase normal, adsorción	La masa de los compuestos a extraer no debe ser mayor al 5% del contenido de fase sólida, por ejemplo: a 100 mg de fase sólida no se le deben cargar más de 5 mg de los compuestos a extraer	
Intercambio iónico	La capacidad de las resinas de intercambio iónico debe ser evaluada para cada ensayo.	
Elección del tipo de adsorbente		
Si la muestra es:	Carga del analito	Fase recomendada
Acuosa	Polar	Intercambio iónico
	Neutra	Fase reversa
Disolvente orgánico	Polar	Evaporar a sequedad. Reconstituir con disolvente acuoso y aplicar EFS de intercambio iónico.
	Neutro	Evaporar a sequedad y reconstituir con el disolvente adecuado para aplicar EFS en fase normal.

En el caso particular de la extracción de HAPs por esta técnica, se utilizan adsorbentes de tipo fase reversa como las sílices enlazadas y fases poliméricas. Las más utilizadas son las fases C18

que permiten una buena retención de estos compuestos y una eficiente recuperación posterior de los analitos (Bouzige et al, 1998).

- [2] **Acondicionamiento del cartucho:** Una vez empacado el cartucho, se suele pasar una secuencia de disolventes de diferente fuerza eluente para dejar en óptimas condiciones el cartucho que recibirá a la muestra. De esta forma, se hace pasar cierto volumen de un disolvente de fuerza eluente alta para retirar del cartucho impurezas que estén retenidas en la fase y puedan ser recuperadas junto con los analitos de interés. Después se aplica un disolvente de fuerza eluente baja, regularmente igual al de la muestra, para permitir que la muestra se distribuya homogéneamente sobre el adsorbente durante la extracción.
- [3] **Carga de la muestra a través del cartucho de extracción:** La muestra se hace pasar por el cartucho a un flujo constante. Lo más conveniente es dejar que la muestra caiga por goteo continuo. Sin embargo, en ocasiones las extracciones se deben llevar a cabo a velocidades mayores. Para los cartuchos de intercambio iónico, se recomienda un flujo $\leq 2 \text{ mL min}^{-1}$; para el resto (fase reversa, fase normal, adsorción) se recomienda un flujo $\leq 5 \text{ mL min}^{-1}$. Cuando se utilizan discos de EFS en lugar de cartuchos, las muestras se hacen pasar a velocidades hasta de 50 mL min^{-1} .
- [4] **Lavado del cartucho:** Una de las ventajas de la EFS es que permite la elución selectiva de los analitos de interés. De esta forma, después de cargar la muestra es posible aplicar al cartucho disolventes de fuerza eluente creciente que permitan la salida de interferentes presentes en la muestra que son retenidos con una fuerza menor en el cartucho sin provocar la elución de los analitos de interés.

En la tabla 2.9 se presenta de forma general la fuerza eluente de diferentes disolventes utilizados comúnmente en la EFS.

En el caso particular de la EFS en fase reversa, los disolventes de limpieza aplicados suelen ser agua y mezclas de agua con diferentes proporciones de algún disolvente orgánico miscible con ella, regularmente metanol, acetonitrilo e isopropanol.

- [5] **Recuperación de los analitos de interés:** Finalmente, aplicando un disolvente de fuerza eluente alta se pueden recuperar a los analitos. En la mayoría de los casos si se aplica el disolvente con la fuerza eluente adecuada, se logran recuperar los

compuestos de interés dejando en el cartucho interferentes provenientes de la muestra que son retenidos con mayor fuerza en el cartucho de extracción.

Tabla 2.9

Características de los disolventes comúnmente utilizados en la EFS. (Sigma-Aldrich Co., 1998)

Polaridad	Fuerza eluyente en fase reversa	Fuerza eluyente en fase normal	Disolvente	Miscible en agua
No polar	Alta	Baja	Hexano	No
			Tetracloruro de carbono	No
			Iso-octano	No
			Diclorometano	No
			Cloroformo	No
			Tetrahidrofurano	Sí
			Dietiléter	No
			Acetato de etilo	Ligeramente
			Acetona	Sí
			Isopropanol	Sí
			Acetonitrilo	Sí
			Metanol	Sí
			Agua	Sí
			Ácido acético	Sí
Polar	Baja	Alta		

Un esquema general del proceso de EFS se presenta en la figura 2.8.

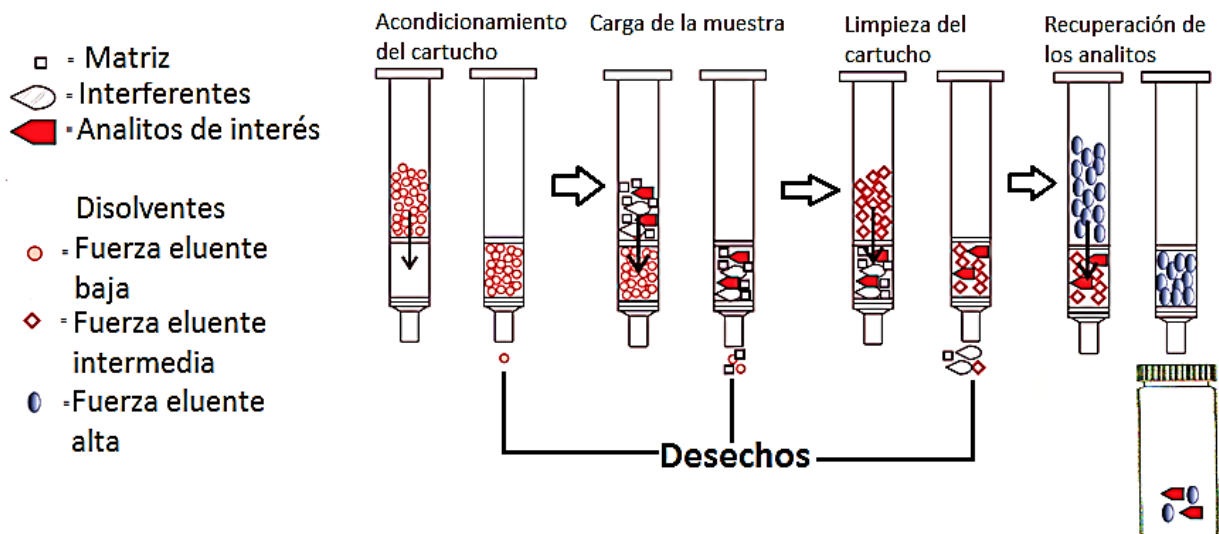


Figura 2.8 Esquema general del proceso de extracción utilizando la técnica de EFS.

En el caso particular de extracción de los HAPs en diferentes tipos de muestras, la EFS ha tenido una amplia aplicación. Algunos trabajos publicados se muestran en la tabla 2.10.

Tabla 2.10

Trabajos recientes que utilizan la EFS como técnica de extracción de HAPs

Autor (año)	Muestra (Cantidad)	Analitos	Adsorbente	Limpieza del cartucho	Elución	Análisis	Recobros	L. D.
Gündel (2000)	Orina (20 mL)	3-OH BaP y 3-OH BaA	C18	20 mL agua desionizada	15 mL dietiléter	CLAR-DF	102 a 124 %	6 a 8 $\mu\text{g L}^{-1}$
Barranco (2003)	Aceite comestible (0.5 g)	14 HAPs	C18	No reportado	No reportado	CLAR-DF	80 %	0.3 a 1 ng g^{-1}
Mazéas (2005)	Bilis de pescado	Diferentes OH-HAPs	C18	2 mL agua; 2 mL agua: metanol (70:30)	6 mL metanol	CG-EM	36 a 96 %	NR
Fan (2006)	Orina (10 mL)	1-OH Pireno y 3-OH BaP	C18	10 mL agua: metanol (70:30)	4 mL metanol	CLAR-EM	60 a 91 %	0.49 a 1.03 $\mu\text{g L}^{-1}$
Campo (2008)	Orina (2 mL)	12 OH-HAPs	C18	Sin limpieza	2 mL metanol	CG-EM	NR	0.1 a 1.4 $\mu\text{g L}^{-1}$
Rey-Salgueiro (2009)	Leche (1 g)	11 diferentes HAPs, 1-OH pireno y 3-OH BaP	C18	Sin limpieza	10 mL de metanol : acetato de etilo (50:50)	CLAR-DF y CLAR-EM	79 a 116 %	0.01 a 0.70 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
Buseti (2006)	Agua residual (1 L)	16 HAPs	C18	30 mL agua: iPrOH (90:10)	Hexano: iPrOH: acetona (90:5:5)	CLAR-DF	73 a 92 %	0.52-1.2 ng L^{-1}
Ma (2010)	Agua de ríos, lagos y de mar (500 mL)	16 HAPs	NTC-MP y C18	Sin limpieza	15 mL hexano	CG-EM	75 a 125 %	2 a 8 ng L^{-1}
Song (2012)	Agua de mar (30 mL)	16 HAPs	PMI	2 mL metanol:agua (10:90)	2 mL DCM: ácido acético (90:10)	CG-EM	85 a 113 %	5 a 12 ng L^{-1}

NTC-MP = Nanotubos de carbono de multipared. PMI = Polímeros molecularmente impresos. CLAR = Cromatografía de líquidos de alta resolución; CG = Cromatografía de gases; EM = espectrómetro de masas; DF = Detector de fluorescencia; NR = No reportado; iPrOH = isopropanol; DCM = Diclorometano

2.3.1.1. Parámetros que afectan el proceso de extracción por EFS en fase reversa

Existen diferentes parámetros que deben ser controlados para obtener recobros altos en el proceso de extracción por EFS, los más importantes son:

- [1] **Factor de retención k_w** : Es una medida de la polaridad de los analitos, la cual influye en la retención que éstos tendrán en los adsorbentes de tipo fase reversa. Se pueden medir utilizando una fase móvil compuesta solo de agua pura. En la mayoría de los casos, sobretodo con compuestos no polares, no es tan fácil medirlo experimentalmente con estas condiciones por lo que se suelen hacer extrapolaciones de las curvas de $\log k' = f(\% \text{MeOH en fase móvil acuosa})$. Si se extrapolan los resultados obtenidos hasta un porcentaje de cero en el contenido de metanol en la fase móvil, el factor k' se conoce como k_w . Hennion et al. (1998) recopilan información importante sobre los valores de este factor en la predicción de volúmenes máximos de muestra que se le pueden aplicar a un cartucho de EFS. Los valores de este factor k_w dependerán del tipo y cantidad de fase sólida utilizados. El tipo de fase más común en los ensayos de determinación de contaminantes es la fase C18 y se han realizado diferentes ensayos para determinar los valores de k_w para diferentes compuestos en cartuchos empacados con esta fase. En estos ensayos se encontró que el valor de $\log k_w$ guarda un comportamiento lineal con el valor del logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua ($\log K_{ow}$) de los compuestos, siempre que los valores de K_{ow} sean mayores a 1.5. De esta forma, teóricamente mientras el valor de k_w aumente, se podrán cargar volúmenes de muestra mayores al cartucho obteniendo valores de recobro satisfactorios. Por ejemplo, utilizando un cartucho con 500 mg de fase C18, se pueden obtener recobros mayores al 50% si se cargan en el cartucho 500 mL de algún compuesto que tenga un valor de $\log k_w$ mayor a 2.5. Pero si se usa un cartucho y volúmenes de muestra similares, los recobros aumentan a 85% si se extrae un compuesto con valor de $\log k_w$ de 2.9.

De igual forma se han realizado cálculos teóricos que muestran que el valor de K_w es aproximado al valor de K_{ow} , cuando la estimación de k'_w se hace en sílice C18 y

fase móvil metanol:agua. Sin embargo, se debe recordar que es solo una aproximación y que experimentalmente se deben corroborar estos resultados.

- [2] **Volumen de retención (V_r)**: Es un parámetro importante que nos indica el volumen de disolvente necesario para recuperar del cartucho, el 50% de los analitos retenidos. Este valor se puede predecir a partir del valor de k'_w con la siguiente relación:

$$V_r = V_0(1 + k'_w) \quad \text{ec. 2.1}$$

Dónde: V_r = Volumen de retención; k'_w =factor de retención cuando la fase móvil es agua.

Finalmente, el término V_0 depende de la porosidad del adsorbente (ϵ) y del volumen geométrico de la precolumna o del lecho del adsorbente en el cartucho (V_c). La relación es la siguiente:

$$V_0 = \epsilon V_c \quad \text{ec. 2.2}$$

Para la sílice C18 se considera que el factor de porosidad está entre 0.65 y 0.7. Mientras que la densidad promedio de la sílice C18 es 0.6 g mL^{-1} .

De esta forma, se ha determinado que la sílice C18 tiene un $V_0 = 0.12 \text{ mL} / 100 \text{ mg}$ de adsorbente.

- [3] **Volumen de fuga (V_b , del inglés “*breakthrough volume*”)**: Es el parámetro más importante por lo cuál debe conocerse o aproximarse. Se define como el volumen de disolvente necesario para obtener el 1% de la señal total producida por la cantidad de analito retenida en el cartucho o precolumna. De esta forma, cuando el disolvente aplicado al cartucho es igual al de la muestra, V_b nos indica el volumen máximo de muestra que podemos aplicar al cartucho sin que comiencen a fugarse los analitos del cartucho.

Al igual que V_r , el volumen de fuga, V_b , también se puede predecir utilizando la siguiente relación:

$$V_b = V_r - 2.3\sigma_v \quad \text{ec. 2.3}$$

Donde σ_v es la dispersión estándar del volumen del pico cromatográfico. Este valor puede calcularse a través de la siguiente relación:

$$\sigma_v = \frac{V_0}{\sqrt{N}} * (1 + k_w) \quad \text{ec. 2.4}$$

Donde N es el número de platos teóricos que tiene el cartucho, el cual es un parámetro difícil de medir en estos últimos. Sin embargo, se han realizado mediciones y se ha determinado un número de 20 platos teóricos por cada 500 mg de fase C18.

2.3.1.2. Ventajas y limitantes de la EFS

Las ventajas de la EFS respecto a las técnicas clásicas como la extracción líquido-líquido son diversas como:

- **Menor riesgo de la ruptura de los materiales.** La EFS usa materiales resistentes (la mayoría de las veces plásticos) y hay menor riesgo de romper los utensilios respecto al uso de embudos de vidrio.
- **Menor consumo de disolventes de extracción.** Dependiendo de la complejidad de la muestra y el tamaño del cartucho utilizado, los volúmenes de disolventes utilizados suelen ser menores a los 20 mL en cada ensayo de extracción. En comparación, las extracciones líquido-líquido implican un mayor consumo de disolventes y en ocasiones se deben hacer repeticiones para obtener recobros satisfactorios.
- **Menor generación de residuos.** Se utilizan volúmenes muy pequeños de disolventes.
- **Permite una separación selectiva de los analitos.** Obteniendo extractos limpios que mejoran el análisis de los mismos.
- **Requiere menor cantidad de muestra.** Regularmente los analitos son recuperados del cartucho en volúmenes de disolvente que son menores a los de la muestra. De esta forma la EFS permite concentrar a los analitos al mismo tiempo que los separa de los demás componentes de la muestra. Por ejemplo, si se pasan al cartucho 100 mL de muestra y los analitos se recuperan en 2 mL de disolvente, se tiene un factor de concentración de 50. Dependiendo de la sensibilidad del instrumento con el que

se analizará el extracto, estos factores de concentración suelen ser suficientes para analizar directamente el extracto obtenido.

- **Los accesorios para promover el paso de la muestra a través del cartucho son simples.** En ocasiones el disolvente puede pasar por gravedad (dejando que el disolvente pase solo a través del cartucho o colocando este último en un tubo de centrifuga). En otras se puede aplicar una fuerza positiva al cartucho (mediante adaptadores y jeringas o bombas de vacío). Un ejemplo de estos procedimientos se presenta en la figura 2.9.

Las desventajas de la EFS son menores como:

- **No es adecuada para las muestras sólidas o líquidos con viscosidad elevada.** Sin embargo, se han reportado trabajos donde el sólido es sometido previamente a una extracción por disolventes y este extracto se acondiciona para pasarlo a través de un cartucho de EFS.
- **Compuestos con elevados coeficientes K_{ow} producen recobros bajos.** Esto se debe a que los compuestos tienden a adherirse a las paredes del recipiente que contiene a la muestra y al trasvasar la muestra al cartucho se tienen pérdidas considerables. Sin embargo, esto se puede subsanar agregando a la muestra diferentes sustancias como tensoactivos y disolventes orgánicos solubles en agua para mejorar la solubilidad de los analitos en la muestra acuosa. En estos casos donde se adicionan estas sustancias, la medición del volumen de fuga debe ser crítico para evitar pérdidas al momento de cargar la muestra (Bouzigé et al. 1998; Busetti, 2006).

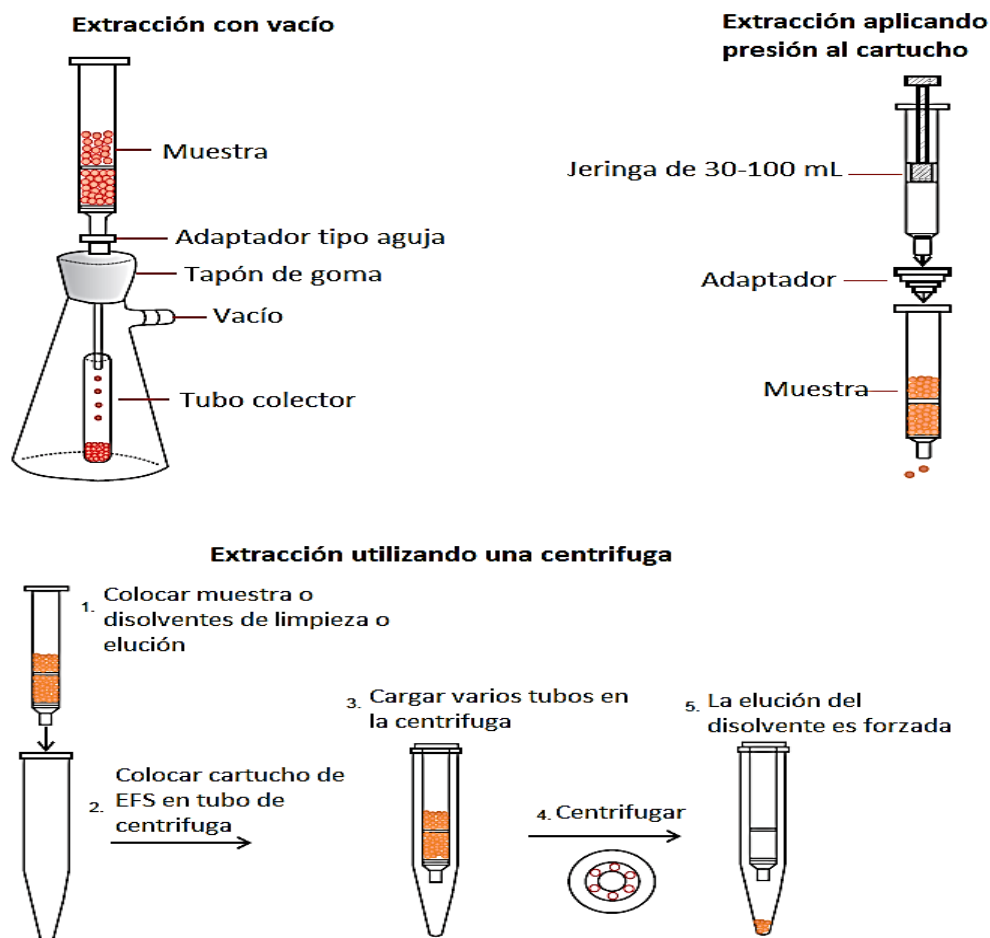


Figura 2.9 Formas de promover el paso del disolvente o muestra a través del cartucho de EFS.

2.3.2. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)

La Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) fue introducida por Barker en el año de 1989 para el análisis de muestras de tejido bovino y desde entonces ha sido una técnica de preparación de muestra con alta eficiencia para la separación de una amplia variedad de fármacos, pesticidas y otros compuestos de diversos tipos de muestras sólidas o semisólidas, ya sean vegetales o animales (Capriotti et al, 2010).

La técnica consiste en dispersar la propia muestra en los adsorbentes convencionales utilizados en la EFS, después se empaqueta la mezcla homogenizada en un cartucho de EFS formando una columna de carácter cromatográfico único donde los componentes de la muestra son a su vez fraccionados por eluentes apropiados, siguiendo el mismo procedimiento que la EFS (Barker,

2007). Un diagrama general de los pasos que se siguen en esta técnica se presenta en la figura 2.10.

De esta forma, se tienen diferentes tipos de adsorbentes donde se puede dispersar la muestra como son:

- **Adsorbentes de fase reversa (sílices enlazadas C8 y C18):** Son adsorbentes de tipo lipofílico que favorecen la ruptura de las membranas celulares o solubilizan los componentes orgánicos de las matrices favoreciendo la dispersión y extracción de los componentes de las muestras.

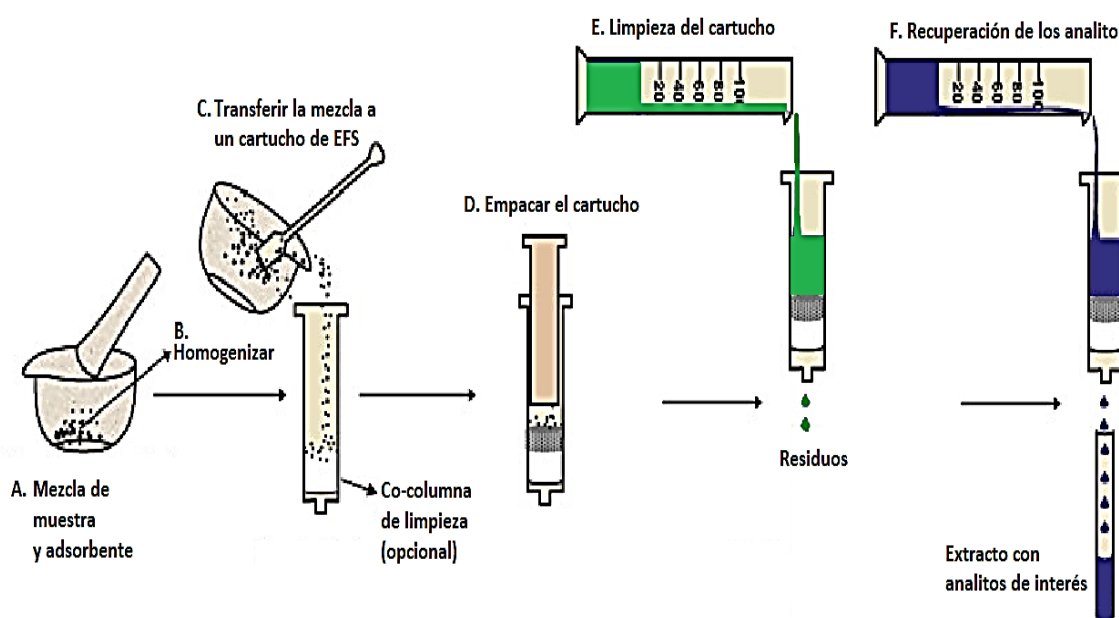


Figura 2.10 Diagrama general del proceso de DMFS (Capriotti, 2010).

- **Adsorbentes de fase normal**

Alumina y florisil: Estos materiales no son capaces de provocar la ruptura de las membranas celulares pero mediante mecanismos de ablación son capaces de adsorber a los componentes de la muestra.

Sílice sin derivatizar y fases polares de sílice enlazada: Poseen una retención menor al florisil y la alumina y son ampliamente utilizados para la extracción de contaminantes polares en alimentos. Son adsorbentes muy utilizados como co-columnas para la purificación del extracto obtenido durante el proceso de DMFS.

- **Materiales que no tienen propiedades de retención (tierras de diatomeas y diferentes tipos de arenas):** Utilizadas para la extracción de algunos contaminantes polares. La extracción se basa en las diferencias de solubilidad de los distintos compuestos. Una de las ventajas que tienen es que los analitos se extraen con agua caliente pero tienen la desventaja que los volúmenes de extracto son elevados.
- **Materiales altamente selectivos (polímeros molecularmente impresos):** Actúan de igual forma a los anticuerpos y enzimas atrapando un solo compuesto o grupo de compuestos. Como ventaja tienen una elevada selectividad y como desventaja es que no funcionan para el análisis multi-residuos, por ejemplo, como las fases C18 que pueden retener una amplia gama de contaminantes.
- **Nanopartículas (nanotubos de carbono):** En los años recientes se han desarrollado adsorbentes que contienen nanotubos de carbono de multi-pared. Debido a su estructura y elevada área superficial, pueden ser una buena opción para la retención de diferentes compuestos como pesticidas y herbicidas.

Debido a su flexibilidad y simplicidad la DMFS se ha convertido en una excelente alternativa en comparación con las técnicas de extracción con disolventes, como la extracción asistida por microondas (en inglés *Microwave Assisted Extraction*), la extracción por fluidos supercríticos (en inglés *Supercritical Fluid Extraction*), la extracción con líquidos presurizados (en inglés *Pressurized Liquid Extraction*) y la extracción por Soxhlet. En la tabla 2.11 se resumen algunos trabajos publicados recientemente que relacionan el uso de la DMFS como técnica de extracción en el análisis de diferentes tipos de muestras.

Tabla 2.11

Trabajos recientes que utilizan la DMFS como técnica de extracción de HAPs

Autor (año)	Muestra (Cantidad)	Analitos	Adsorbente	Limpieza en cartucho	Elución	Análisis	Recobros	L. D.
Sánchez-Brunete (2007)	Sedimentos marinos (2 g)	27 HAPs	Alumina y C18	Sin limpieza	6 mL DCM	CG-EM	85-108 %	0.03 a 0.45ng g ⁻¹
Pena (2008)	Sedimentos marinos (0.5 g)	17 HAPs	C18	Sin limpieza	6 mL DCM: metanol (90:10)	CLAR-DF	76 a 103 %	0.1 a 0.5 ng g ⁻¹
Pena (2007)	Suelo (0.5 g)	16 HAPs	C18	Sin limpieza	6 mL hexano: acetona (1:1)	CLAR-DF	96-116 %	0.01 a 0.6 ng g ⁻¹
Campins-Falcó (2008)	Mejillón (0.5 g)	6 HAPs	C18	Sin limpieza	1.2 mL MeCN	CLAR-DF	52 a 100 %	< 0.6ng g ⁻¹
Pensado (2005)	<i>Tejido de Pez</i> (0.6 g)	6 HAPs	C18	Sin limpieza	10 mL MeCN	CLAR-DF	> 80 a 105 %	0.04 a 0.32ngg ⁻¹
Loveland (2001)	Alimento para ratas (0.5 g)	Dibenzo[a,l]pyrene	C18	Sin limpieza	30 mL hexano: benceno (4:1)	CLAR-DF	101 a 107 %	0.014ppm
Fernandez-González (2010)	Mejillón (0.5 g)	Alquil-HAPs	Tierra de diatomeas, florisil	Sin limpieza	Acetato de etilo : hexano (1:1)	CG-EM	73 a 92 %	0.01- 0.67 ng g ⁻¹

CLAR = Cromatografía de líquidos de alta resolución; CG = Cromatografía de gases; EM = espectrómetro de masas; DF = Detector de fluorescencia; NR = No reportado. DCM=Diclorometano. MeCN= acetonitrilo.

2.3.2.1. Parámetros que afectan el proceso de DMFS

Después de empacar la muestra homogenizada en el cartucho de EFS, la DMFS se verá afectada por los mismos factores descritos en la sección 1.7.1.1. Además de estos, existen otros factores que son críticos para el desarrollo de una extracción por DMFS como son:

- **Tiempo de fortificación de las muestras:** Durante el proceso de desarrollo de los métodos por DMFS se trabaja con muestras a las que se adicionan los analitos de interés para evaluar el recobro. Debido a que existen diferencias entre las interacciones de los analitos y la matriz, es importante permitir que estas interacciones se lleven a cabo durante la fortificación. De esta forma, se sugiere dejar un tiempo de equilibrio entre 15 min y 2 h antes de realizar el proceso de DMFS (Kristenson et al, 2001).
- **Relación de las cantidades de muestra y adsorbente:** Las cantidades de muestra utilizadas en los ensayos de DMFS son variados, pero lo más común es utilizar 0.5 g de muestra. La relación entre la cantidad de muestra y de adsorbente más utilizadas son 1:1 y 1:4. Sin embargo, la DMFS se vuelve muy útil si la cantidad de muestra disponible es muy pequeña, ya que permite la posibilidad de miniaturizar los métodos de extracción, disminuyendo la cantidad de fase dispersante, la cantidad de muestra y volúmenes de disolventes de limpieza y elución (Kristenson et al, 2001).
- **Adición de sustancias que mejoran el proceso de extracción:** Es común la adición de sustancias como ácidos, bases, sales, surfactantes y agentes quelatantes que pueden promover la interacción de la muestra con el adsorbente.
- **Material de fabricación del mortero:** El mortero donde se homogeniza la muestra y adsorbente deberá ser de un material inerte, la mayoría de las veces ágata y en algunas ocasiones vidrio. Deben evitarse los materiales porosos como la porcelana ya que se generan pérdidas considerables en los recobros.

2.3.2.2. Ventajas y limitantes de la DMFS (Kristenson et al, 2006; Barker, 2007; Capriotti et al, 2010)

Entre las ventajas de la DMFS están:

- Requiere pequeñas cantidades de muestra.
- El proceso de extracción es rápido.
- No requiere de condiciones de trabajo ni equipos especiales.
- Permite recuperar a los analitos selectivamente.
- Es versátil ya que se puede aplicar a muestras sólidas (suelo, plantas, medicamentos, cereales), semi-sólidas (tejidos, fruta) y líquidos viscosos (sangre, leche, aceites).
- Los métodos se pueden miniaturizar.

La principal desventaja que se tiene es que no se pueden automatizar los métodos ya que es necesaria la participación del analista en el proceso de homogenización de la muestra y el adsorbente.

De esta forma, las características de la DMFS, la hacen idónea para ser aplicada a la extracción de los HAPs de microorganismos, donde la cantidad de muestra referente a estos últimos suele ser del orden de algunos mg. Debido al carácter apolar de los HAPs, estos compuestos tienden a retenerse con gran fuerza en materiales como la sílice C18, por lo cual, si la muestra es pequeña, se podría utilizar una cantidad de fase similar sin riesgo de que los analitos se perdieran en la limpieza de interferentes al aplicar disolventes polares.

Además, si se miniaturiza el método de extracción, la cantidad de volumen en que se podrían recuperar los HAPs sería menor, lo cual evitaría la necesidad de realizar concentraciones a los extractos para mejorar la respuesta en el sistema cromatográfico de análisis.

2.3.3. Sistemas de extracción y análisis en línea.

Aunque algunos métodos reportados en la literatura incluyen el uso de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y la Cromatografía de Gases (CG) para el análisis de los metabolitos producidos en los bioensayos de exposición a los HAPs, resulta muy difícil detectar

este tipo de compuestos simultáneamente a los hidrocarburos progenitores debido a los efectos de la matriz y el pre-tratamiento de la muestra. Además, se necesitan grandes volúmenes de muestra para alcanzar la sensibilidad necesaria, lo cual es difícil de lograr cuando se analizan los metabolitos de HAPs durante el proceso de degradación (Luan, 2007).

Una forma de resolver estas dificultades es utilizando metodologías acopladas en línea, las cuales son útiles cuando la cantidad de muestra es limitada, los analitos son lábiles o se necesita una sensibilidad muy alta para realizar la determinación analítica. Existen diferentes técnicas de preparación de muestra que se han podido acoplar satisfactoriamente a la CLAR y CG. Por ejemplo, para el aislamiento de los analitos de muestras líquidas se ha utilizado la Extracción en Fase Sólida (EFS) y la Extracción Asistida con Membranas, mientras que para las muestras sólidas, la Extracción con Líquidos Presurizados (ELP), la Extracción Asistida por Microondas (EAM) o Ultrasonidos (EAUS) y la Extracción por Fluidos Supercríticos (SFC) (Hyötylainen, 2007).

2.3.3.1. Sistema de EFS-CLAR acoplado en línea

Los pasos generales de la EFS (acondicionamiento, carga de la muestra, limpieza del cartucho y elución de analitos de interés) se pueden llevar a cabo satisfactoriamente en un sistema acoplado en línea con la CLAR. Este acople se lleva a cabo mediante el uso de una válvula de conmutación o multipuertos a la cual se conecta un cartucho de EFS (regularmente una precolumna), una bomba de concentración y la bomba del cromatógrafo de líquidos. Controlando la posición de la válvula se permite el paso de la muestra a través del cartucho de EFS para extraer a los analitos y posteriormente al cambiar la válvula de posición, se lleva a cabo la elución de los analitos retenidos mediante el paso de la fase móvil adecuada para llevarlos a la columna analítica y realizar el proceso de separación cromatográfico. Un esquema general de este tipo de acople se presenta en la figura 2.11.

La principal ventaja que proporciona este tipo de acoples en línea es un gran aumento en la sensibilidad de los métodos desarrollados ya que generalmente en las metodologías fuera de línea o en tiempo diferido “*off-line*” se pierde sensibilidad porque solo una parte de la muestra o del extracto proveniente de ella se inyecta al sistema cromatográfico. Así, en las metodologías en línea el extracto completo es inyectado al sistema.

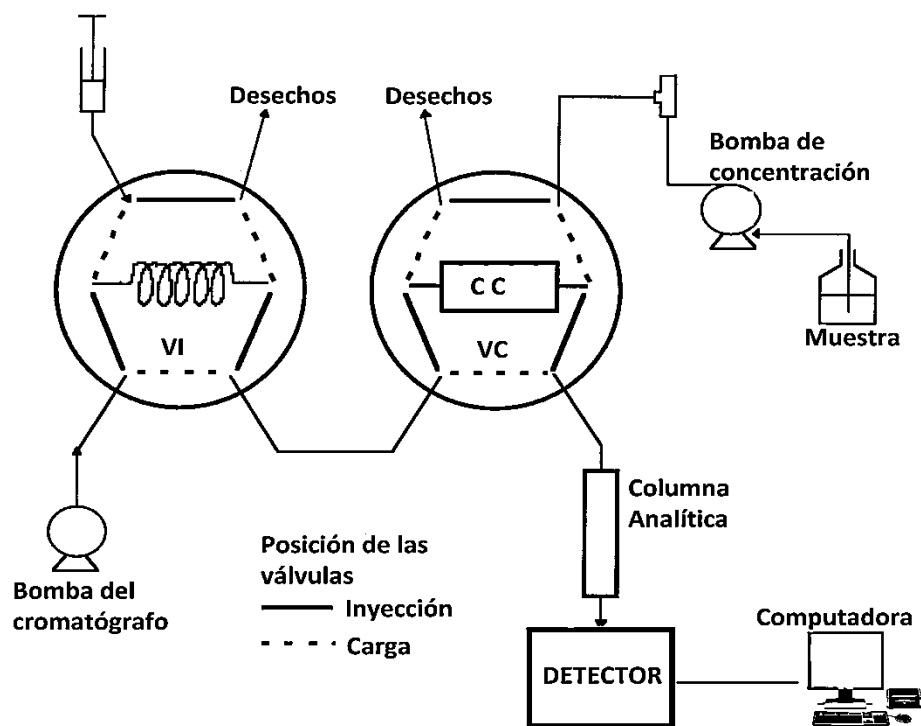


Figura 2.11 Sistema de EFS-CLAR acoplado en línea. CC = columna de concentración; VI = Válvula del inyector manual; VC= Válvula de concentración. Bouzige et al. (1998)

Sin embargo, a menudo esto conduce a una sobrecarga en el sistema por lo cual es necesario, en la mayoría de los casos, miniaturizar el volumen del extracto que es transferido al sistema analítico (Slobodník et al, 1996, Hennion, 1999).

Algunos otros factores que deben controlarse son:

- Compatibilidad de la fase móvil. El disolvente de extracción debe ser compatible con dicho sistema para evitar precipitaciones o la formación de emulsiones en el sistema.
- Efectos de memoria. Es esencial utilizar una secuencia con disolventes de limpieza adecuados para eliminar residuos de los analitos de interés en el sistema cromatográfico e inclusive si la muestra es muy compleja, cambiar cartuchos y filtros del sistema con el fin de evitar aumentos en la señales de los analitos por la presencia de dichos residuos.

- Precolumnas. Para la preconcentración de los analitos, las precolumnas típicas tienen tamaños de 2 a 15 mm de longitud por 1 a 4.6 mm de diámetro interno empacadas con fases de estireno-divinilbenceno o de sílice enlazadas de alta retención para compuestos orgánicos como la C18. Si se realiza la separación cromatográfica en modo isocrático, se deben utilizar precolumnas de tamaños pequeños para evitar el ensanchamiento de los picos (Louter et al, 1996 y 1999; Slobodník et al, 2000; Nielen et al, 1987).

- Cantidad de adsorbente de relleno en la precolumna. Cuando se trabaja en modo fuera de línea u “*off-line*”, puede modificarse la cantidad de adsorbente en el cartucho de EFS si se necesita alcanzar valores de volúmenes de fuga mayores y aumentar la retención de los analitos. Sin embargo, en el modo en línea, la cantidad de adsorbente en el cartucho es limitada por el tamaño de la precolumna por lo cual si se necesita alcanzar una mayor retención será necesario cambiar el tipo de adsorbente por uno más adecuado.

Las limitantes que tiene este proceso de análisis en línea son dos principalmente:

- Muestras sólidas. Cuando la muestra es sólida se tiene que realizar forzosamente una extracción por separado, por ejemplo utilizando la DMFS. Sin embargo, los extractos recuperados se pueden cargar al sistema de EFS-CLAR en línea para ser analizados y mejorar la sensibilidad de los métodos.

- Muestras líquidas que presentan un elevado número de partículas. Este tipo de muestras puede tapar los filtros del sistema cromatográfico por lo cual, las muestras deben ser filtradas previamente. A menudo este paso provoca pérdidas de los analitos de interés, sobretodo en los analitos con baja polaridad, por lo cual los recobros obtenidos deben ser optimizados.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y equipos

3.1.1. Disolventes y reactivos

- ❖ Disolventes grado cromatográfico marca J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA): acetonitrilo, isopropanol, metanol.
- ❖ Agua grado cromatográfico obtenida con un desionizador marca Millipore modelo Simplicity UV (Bedford, MA, USA).
- ❖ Estándares de HAPs CHEMSERVICE, PA, EUA) pureza > 99%: benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*a*]pireno.
- ❖ Estándares de metabolitos del BaP adquiridos de NCI “Chemical Carcinogen Reference Standards Repository” (Kansas, MO, USA): 4,5-dihidrodiol BaP; 9,10-dihidrodiol BaP; 9-OH BaP y 3-OH BaP.
- ❖ Reactivos marca J. T. Baker: ácido ascórbico (C₆H₈O₆), nitrato de sodio (NaNO₃), cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂ · 2H₂O), sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄ · 7H₂O), fosfato de sodio dibásico (K₂HPO₄), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄), ácido nítrico concentrado (HNO₃) y ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄).
- ❖ Reactivos marca SIGMA-ALDRICH: Lauril sulfato de sodio (LS-Na), heptan sulfonato de sodio (HS-Na) y cloruro de sodio (NaCl).

3.1.2. Sistema Cromatográfico

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución VARIAN Inc., Palo Alto, CA, EUA, con bomba isocrática modelo 210.
- Válvula de inyección manual RHEODYNE 7725i (Berkeley, CA, EUA) con rizo (“loop”) de 20 µL.
- Detector de fluorescencia VARIAN, modelo 363.
- Tarjeta de interface VARIAN, modelo “Star” 800.

- “Software” de control y procesamiento de datos “Star Workstation” VARIAN, versión 6.0 1989-2003
- Columna analítica de acero inoxidable HICHROM, de 250 x 4.60 mm d. i., empacada con sílice fase reversa SPHERISORB ODS, tamaño de partícula 5 µm.
- Columnas de guarda de acero inoxidable de 13 x 4.5 mm d. i. UPCHURCH SCIENTIFIC (Oak, WA, EUA), empacadas con sílice fase inversa Nucleosil C18 Phenomenex (Torrance, CA, EUA) tamaño de partícula 10 µm.
- Jeringa marca Hamilton (Reno, NV, EUA) de 50 µL.
- Bomba peristáltica ELDEX modelo DUROS SERIES 1000-C (Napa, CA, USA).
- Válvula multipuertos REHODYNE.
- Bomba cromatográfica binaria Marca Agilent Technologies 1200 series (Santa Clara, CA, USA).
- Alltima HPC18 AQ. Marca Grace Division Discovery Science (Way Albany, Or, USA) Diámetro de partícula 3 µm, dimensiones: 100 mm x 2.1 mm
- Detector de masas Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS. Con fuente de ionización: Agilent ESI-Jet Stream Thermal Focusing.

3.1.3. Técnicas de extracción de HAPs y metabolitos

- ✓ Microbalanza analítica Mettler Toledo, OH, EUA, modelo AG245.
- ✓ Jeringa de plástico de 25 mL con adaptador para reservorios de 1 a 6 mL.
- ✓ Cámara de vacío con regulador de presión marca Ashcroft (CT, EUA).
- ✓ Viales ámbar de 2, 12 y 50 mL de capacidad con tapón de rosca.
- ✓ Sílice C18, CHROMABOND C18-PAH, marca Macherey – Nagel (PA, EUA), tamaño de partícula 40 µm.
- ✓ Reservorios de polipropileno de 1.5 y 8 mL, VARIAN, EUA.
- ✓ Filtros para reservorios de 1.5 y 8 mL, Macherey – Nagel.
- ✓ Mortero de ágata de 30 mL con pistilo.

3.1.4. Cultivos de protozoarios

- Frascos de vidrio cuadrados de 250 mL.
- Incubadora marca Quincy Lab Inc. (Chicago, IL, EUA) modelo 10-140.
- Cepas puras de *Colpoda cucullus* ATCC ® 30916 y *Enterobacter aerogenes* ATCC ® 13048. Adquiridos de *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manasas, VA, EUA).
- Microscopio estereoscópico modelo SMZ-168, marca MOTIC (Richmond, British Columbia, Canadá).
- Granos de cebada.
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- Tripié con tela de asbesto.
- Buchner y kitasato de 125 mL Kymax.
- Papel filtro Whatman #41.
- Medio de cultivo extracto de levadura adquirido de MCD LAB (Tlalnepantla, MEX, México), para mantenimiento de la bacteria *E. aerógenes*.
- Cajas Petri de vidrio de 100 x 20 mm, marca MERINFIELD (Lauda-Königshofen Alemania).

3.1.5. Cultivos de microalgas

- Microscopio óptico marca National (Carnation, WA, EUA) modelo B2-220.
- Matraces de 20 y 50 mL PYREX.
- Agitador orbital THERMO SCIENTIFIC modelo 2346 (Dubuque, IA, USA).
- Lámparas fluorescentes de 14 W modelo T5.
- Cepa pura de la microalga *Selenastrum capricornutum* adquirida de *The Culture Collection of Algae* (UTEX) de la Universidad de Texas, (Austin, TX, USA).
- Ingredientes proteosa peptona, agar bacteriológico, adquiridos de MCD LAB.
- Lámparas incandescentes de 4 W de luz cálida.
- Temporizador (“timer”) para controlar los ciclos de luz/oscuridad.
- Espátula de acero inoxidable.
- Autoclave eléctrica a vapor Modelo 25X, marca ALL AMERICAN Manitowoc, WI, EUA.
- Mecheros Bunsen.

- Alcohol etílico al 75% v/v.
- Asa bacteriológica.
- Pinzas de disección.
- Algodón y gasas.
- Tubos de plástico para centrifuga de 15 mL.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Pipeta Pasteur de 2.5 mL con bulbo.
- Centrifuga marca SIGMA (Osterode am Harz, Germany) modelo 2-5.
- Pipetas graduadas de 10 mL con perilla de succión.

3.2. Preparación de las disoluciones estándar de HAPs y metabolitos del BaP

Todas las disoluciones fueron preparadas con acetonitrilo como disolvente y mantenidas en refrigeración a 4°C en viales de color ámbar.

Se prepararon disoluciones individuales “stock” de cada analito a una concentración de 1 mg L⁻¹. A partir de éstas, se prepararon disoluciones individuales de cada analito a una concentración de 500 ng mL⁻¹.

Con estas últimas disoluciones se realizaron las diluciones necesarias para realizar la calibración del sistema y el desarrollo de los métodos de extracción en tiempo diferido fuera de línea.

A partir de las disoluciones de 500 ng mL⁻¹ se prepararon las siguientes mezclas para el desarrollo de los métodos en línea:

[1] 4,5- dihidrodiol BaP y 9,10-dihidrodiol BaP a una concentración de 32 ng mL⁻¹.

[2] 9-OH BaP; BaA; BbF; BkF y BaP a una concentración de 50 ng mL⁻¹.

[3] 3-OH BaP a una concentración de 50 ng mL⁻¹.

La estabilidad de los analitos en disolución fue monitoreada periódicamente. Solo las mezclas del compuesto 3-OH BaP en concentraciones menores a 50 ng mL⁻¹ resultaron inestables. Debido a esto, las disoluciones de este compuesto se trabajaron por separado preparándolas mensualmente.

3.3. Mantenimiento de los cultivos de microorganismos

3.3.1. Cultivos de microalgas

La cepa de *S. capricornutum* se mantuvo en condiciones axénicas sembrándola en tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio Bristol sólido. En el ANEXO I se presenta el procedimiento general para preparar el medio Bristol. Los cultivos se resembraron cada dos meses para mantener la cepa.

Los cultivos de microalgas que se utilizaron en los ensayos para el desarrollo y validación de los métodos se mantuvieron en 200 mL de medio Bristol colocados en matraces Erlenmeyer de 250 mL. A partir de los cultivos sólidos y en condiciones de esterilidad, se tomó cierta cantidad de biomasa con un asa bacteriológica y se transfirió al matraz con cultivo líquido. Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital a una velocidad de 100 rpm a temperatura ambiente e iluminado con lámparas fluorescentes de luz fría con períodos de luz/oscuridad de 16/8 h. Los cultivos sólidos y líquidos de microalgas se muestran en la figura 3.1.



Figura 3.1. Cultivos de microalgas mantenidos con las condiciones óptimas (imagen propia).

3.3.2. Cultivos de protozoarios

La cepa del protozooario *C. cucullus* se sembró en condiciones axénicas en 20 mL de medio líquido de infusión de cebada.

Después de 24 h de desarrollo y en condiciones de esterilidad:

1. 10 mL del cultivo se colocaron en cajas Petri que contenían trozos de algodón estéril. Para fomentar el enquistamiento de las células, las cajas Petri se mantuvieron en incubación a 28 °C. En estas condiciones, el microorganismo puede mantenerse por períodos mayores a un año. En caso de perder la cepa en los cultivos líquidos se toma un trozo de algodón y se coloca en medio de infusión de cebada para fomentar el exquistamiento de las células. En el ANEXO II se presenta el procedimiento general para la obtención de la infusión de cebada.
2. Los 10 mL restantes se colocaron en un frasco de vidrio cuadrado de 250 mL con 80 mL de infusión de cebada. El frasco se mantuvo en posición horizontal y se incubó a 28 °C durante 24 h. A partir de este cultivo líquido se realizaron resiembras de 5 mL de cultivo en diferentes frascos con 90 mL de infusión de cebada para realizar los ensayos para el desarrollo de los métodos y la validación. Estos cultivos se resembraron cada tercer día en infusión de cebada fresca.



Figura 3.2. Cultivos de protozoarios.

3.4. Obtención de las muestras de cultivos de microorganismos

3.4.1. Monitoreo espectrofotométrico del crecimiento de los cultivos de *Selenastrum capricornutum*

Diferentes matraces Erlenmeyer que contenían 250 mL de medio Bristol fueron inoculados con la microalga *S. capricornutum* tomada de cultivos sólidos, utilizando un asa bacteriológica (se tomó 1 azada). Los cultivos fueron mantenidos en las mismas condiciones descritas en la sección 3.1.6.1.

En condiciones estériles se tomaron de cada matraz, alícuotas de 5 mL cada 2 días de crecimiento, hasta llegar a los 16 días y después cada 5 días hasta llegar a los 55 días de crecimiento del cultivo. Se midió la absorbancia de cada alícuota en un espectrofotómetro UV/Vis a 685 nm, utilizando el medio de cultivo Bristol sin inocular como blanco.

3.4.2. Determinación de la biomasa recuperada de microalgas en función del tiempo de crecimiento del cultivo

Diferentes matraces Erlenmeyer de 250 mL fueron inoculados y mantenidos en las mismas condiciones de la sección anterior. Se tomaron alícuotas de 15 mL de cultivo a los 3, 4, 5, 6, 10, 15 y 20 días de desarrollo del cultivo. Se midió la absorbancia de cada alícuota a 685 nm y después se centrifugó a 3900 rpm durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y el botón con la biomasa fue suspendido en 0.5 mL de agua destilada y extendido en un portaobjetos de vidrio. Esta muestra se dejó secar a temperatura ambiente. Después, se pesó la biomasa seca proveniente de cada uno de los muestreos. Se graficaron por separado la cantidad de biomasa seca recuperada en función del tiempo de crecimiento del cultivo y la variación de la absorbancia respecto a la cantidad de biomasa en el cultivo.

3.4.3. Monitoreo del desarrollo de cultivos de *C. cucullus*

Con alícuotas de 2.5 mL de un cultivo de *C. cucullus* que tenía de 2 a 4×10^4 células mL⁻¹ se inocularon diferentes muestras de 90 mL de medio infusión de cebada.

Para observar el desarrollo de los cultivos de protozoarios, se contó por triplicado, a diferentes tiempos de desarrollo del cultivo, el número de células por cada 50 μ L de cultivo utilizando un microscopio estereoscópico. Los tiempos monitoreados fueron 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días. Después se obtuvo el número promedio de células por mL de cultivo a diferentes tiempos de desarrollo.

3.4.4. Determinación de la biomasa recuperada de los cultivos de protozoarios

Se inocularon diferentes frascos con 90 mL de infusión de cebada con las mismas condiciones descritas en la sección anterior. Cada cultivo completo se centrifugó a un tiempo de desarrollo entre 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días.

Se desechó el sobrenadante y el botón con la biomasa fue suspendido con 0.5 mL de agua potable¹. La muestra se colocó en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente.

Finalmente se pesó la cantidad de biomasa recuperada de los 90 mL de cultivo y se graficó su cambio respecto al tiempo de desarrollo del cultivo.

3.5. Experimentación

En la figura 3.3 se presenta un esquema general de los pasos que se siguieron para desarrollar las metodologías analíticas, su validación y aplicación en bioensayos de exposición a los HAPs.

¹ No se utiliza agua destilada porque las células revientan por el cambio a una disolución hipotónica.

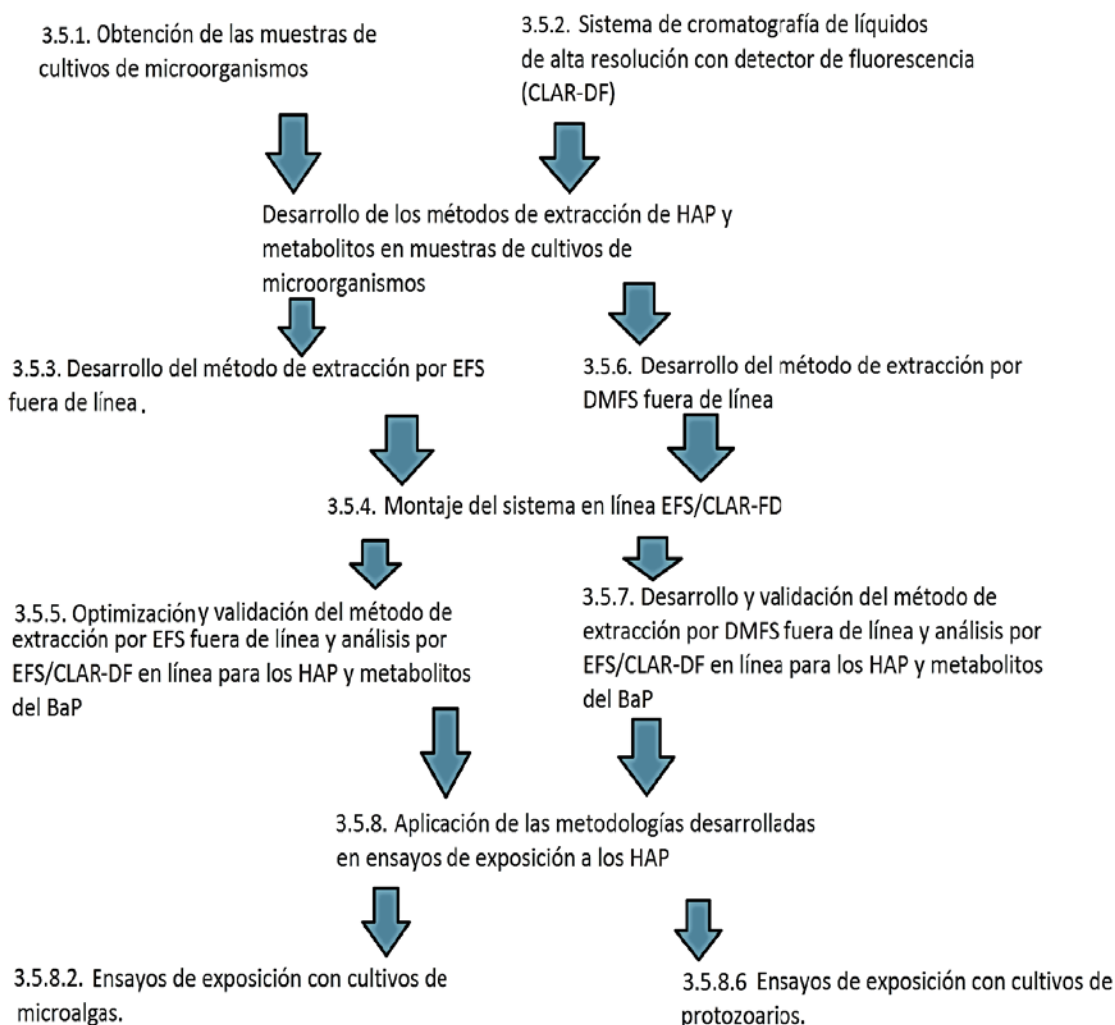


Figura 3.3 Esquema general de la metodología experimental para el desarrollo y aplicación de las metodologías analíticas.

3.5.1. Optimización de la separación cromatográfica de los HAPs y metabolitos del BaP

Para efectuar la optimización de la separación cromatográfica, se midieron los tiempos de retención (t_r) de cada analito inyectando al sistema CLAR-FD 20 μL de una mezcla de los 4 HAPs y los 4 metabolitos del BaP a una concentración de 2 ng mL^{-1} , utilizando como fase móvil las mezclas de MeOH/agua: 100/0; 95/5; 90/10; 85/15; 80/20; 70/30 65/35 y 60/40. El resto de las condiciones cromatográficas de todos los ensayos fueron las siguientes: columna HICHROM Spherisorb 5 ODS2 250 A C18 de 25 cm x 4 mm, flujo de la fase móvil = 1 mL min^{-1} , detección por fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}}=263 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=410 \text{ nm}$).

Después, los valores del factor de capacidad (k') fueron obtenidos utilizando un valor de tiempo muerto (t_0) de 1.3 min, medido con la inyección de 20 μL de una disolución de NaNO_3 a una concentración de 1 mM. Los valores de k' se calcularon con la relación (3.1):

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} \quad \text{ec. 3.1}$$

3.5.2. Validación del sistema cromatográfico para los diferentes compuestos

Para evaluar la linealidad, se inyectaron al sistema CLAR-FD 20 μL de los analitos a cinco diferentes concentraciones con las condiciones señaladas en la tabla 3.1.

Tabla 3.1

Condiciones de análisis de los HAPs y metabolitos del BaP con el sistema CLAR-FD

Compuesto	Concentraciones (ng mL^{-1})	Fase móvil * MeOH/Agua v/v	Detector de fluorescencia	
			λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
4,5-dihidrodiol BaP	1, 4, 8, 12 y 15	65/35	263	430
9,10-dihidrodiol BaP				
9-OH BaP	0.7, 2, 4, 8 y 10	85/15	284	410
3-OH BaP				
BaA				
BbF			263	430
BkF				
BaP				

*Flujo de 1 mL min^{-1} .

Los análisis se hicieron por triplicado obteniendo la curva de calibración con la variación de las áreas de los picos cromatográficos en función de la concentración de los analitos. Mediante el ajuste de mínimos cuadrados se evaluó la linealidad del sistema con el coeficiente de correlación (r^2).

Por otra parte, se determinó el límite de detección experimental (LDE) inyectando disoluciones estándar de cada compuesto cada vez más diluidas, hasta que las señales de los picos fueran parecidas a 3 veces la señal del ruido de fondo. También, se determinó el límite de detección teórico (LDT) y el límite de cuantificación (LC) del sistema con base en la curva de

calibración y con la desviación estándar de regresión, para cada compuesto. Para esto, se hicieron inyecciones, por triplicado, de disoluciones estándar de concentraciones cercanas al LDE. Las concentraciones estuvieron en el intervalo de 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6 ng mL⁻¹. Finalmente, los límites fueron estimados estadísticamente utilizando las fórmulas 3.2. y 3.3. (García, 2002):

$$LD = (3.3 * S_{y/x}) / b_1 \quad \text{ec. 3.2}$$

$$LC = (10 * S_{y/x}) / b_1 \quad \text{ec. 3.3}$$

Donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de regresión y b_1 es la pendiente de la curva de calibración. En el Anexo III se presenta un ejemplo detallado con los datos y cálculos necesarios para obtener estos valores.

La precisión del sistema se evaluó con la repetibilidad al calcular el coeficiente de variación (C. V. %) obtenido con 5 inyecciones en un mismo día, utilizando una disolución de HAPs de concentración 10 ng mL⁻¹. También se evaluó la reproducibilidad en 3 diferentes días, utilizando dos mezclas de los HAPs de concentraciones 1 y 10 mL⁻¹, respectivamente.

3.5.3. Desarrollo del método de extracción de HAPs y metabolitos por EFS fuera de línea / EFS-CLAR en línea

3.5.3.1. Optimización de la extracción por EFS fuera de línea

La optimización se realizó utilizando muestras de 15 mL de agua pura, fortificadas con cada compuesto a una concentración de 2 ng mL⁻¹. En ensayos diferentes se agregó isopropanol a diferentes volúmenes de las muestras para tener mezclas al 15, 20 y 25% v/v de isopropanol. Se dejaron equilibrar durante 5 minutos y se hicieron pasar por diferentes cartuchos de EFS empacados con 300 mg de fase Chromabond C18-PAH. El efluente se desechó y los analitos se recuperaron con 5 mL de ACN 100%. Se inyectaron 20 µL de cada extracto al sistema cromatográfico y se evaluó el recobro obtenido como señala la ecuación 3.4. El área del compuesto en el extracto se compara con la obtenida por la inyección del mismo volumen de una disolución estándar con los analitos a una concentración de 6 ng mL⁻¹. Los ensayos se realizaron por triplicado.

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Área del extracto}}{\text{Área de la disolución estándar}} \times 100 \quad \text{ec.3.4}$$

3.5.3.2. Implementación de una secuencia de limpieza en el cartucho de EFS

Se fortificaron diferentes muestras de 15 mL de agua pura con los analitos a una concentración de 0.8 ng mL^{-1} . Se agregaron 3.75 mL de isopropanol para tener una disolución al 20% v/v y se dejó equilibrar por 5 minutos. Cada muestra se pasó a través de un cartucho de EFS empacado con 300 mg de fase C18-PAH. El efluente se desechó.

Se aplicaron 10 mL de agua seguidos por 10 mL de una disolución acuosa de ACN al 10%, ambos efluentes se desecharon. Después se agregaron 3 x 1 mL de ACN al 20%, 1 x 1 mL de ACN al 30% y 1 x 1 mL de ACN al 40%; cada una de las fracciones se recuperó y se analizó inyectando 20 μL en el sistema HPLC-FD. Si se supone un 100% de recuperación de los analitos, se inyectarían al sistema 0.24 ng de cada compuesto. De esta forma, se calcularon los recobros comparando las áreas obtenidas por la inyección de cada fracción contra las obtenidas por la inyección de 20 μL una disolución de los analitos de concentración 12 ng mL^{-1} (0.24 ng inyectados).

Finalmente, los analitos se recuperaron del cartucho de EFS con 5 mL de ACN al 100%. Se inyectaron 20 μL al sistema cromatográfico. De nueva cuenta suponiendo un 100% de recuperación, se inyectarían al sistema 0.048 ng. Así, se calcularon los recobros comparando las áreas obtenidas por la inyección de cada fracción contra las áreas obtenidas por la inyección de 20 μL de una disolución de concentración 2.4 ng mL^{-1} (0.048 ng).

3.5.3.3. Optimización de la elución de los analitos en dos fracciones diferentes E1 y E2

Se fortificaron diferentes muestras de 15 mL de agua pura con los analitos a una concentración de 0.8 ng mL^{-1} . Se agregó isopropanol hasta tener disoluciones al 20% v/v y se dejaron equilibrar por 5 minutos. Las muestras se hicieron pasar por diferentes cartuchos de EFS como en la sección anterior.

En ensayos por separado se hicieron pasar por el cartucho 5 fracciones de 1 mL de las disoluciones acuosas de ACN al 50, 55, 60 y 100%. Cada fracción se recuperó y fue analizada inyectando 20 μL de cada fracción en el sistema HPLC-FD. Se calcularon los recobros comparando las áreas obtenidas por la inyección de cada fracción contra las obtenidas por la inyección de 20 μL una disolución de los analitos de concentración 12 ng mL^{-1} (0.24 ng inyectados)..

Para cada mezcla de agua con ACN, se determinaron los recobros por fracción y se realizó la gráfica de los recobros acumulados en función del volumen de eluente con el fin de representar a los frentes de elución de cada compuesto. A partir de éstos, se seleccionaron 2 mezclas hidro-orgánicas; la primera para la elución de los dihidrodioles (extracto E1) y la segunda para la elución de los Hidroxi-BaP y de los HAPs (extracto E2).

Finalmente, para evaluar la reproducibilidad de la secuencia de limpieza y elución optimizada, se prepararon por triplicado diferentes muestras con las condiciones de fortificación y porcentaje de isopropanol anteriormente descritas. Las muestras se pasaron por el cartucho de EFS y se aplicó la secuencia de disolventes de limpieza y elución de los analitos presentada en la tabla 3.2.

Tabla 3.2

Secuencia de elución optimizada para la recuperación de los analitos en dos extractos diferentes. La concentración de los analitos en la muestra de 15 mL de agua fue 0.8 ng mL^{-1} .

No.	Disolvente	Volumen (mL)	Acción	Concentración del estándar para comparar recobros (ng mL^{-1})
1	Agua pura	10	Limpieza	NA
2	ACN 10%	10		
3	ACN 20%	2.5		
4	ACN 30%	1		
5	ACN 55%	3	Elución de dihidrodioles (Extracto E1)	4
6	ACN 100%	3	Elución de OH-BaP y HAPs (Extracto E2)	

NA = No aplica ya que solo las fracciones de los disolventes 5 y 6 se recuperan y analizan.

3.5.4. Montaje del sistema EFS-CLAR en línea.

Para concentrar los extractos, se realizó el montaje de un sistema EFS-CLAR en línea en el que se utilizó una precolumna empacada con sílice C18 para atrapar a los analitos, una bomba peristáltica de flujo variable para introducir muestra y disolventes a la precolumna y una válvula multipuertos para controlar el paso de los disolventes suministrados, ya sea por la bomba peristáltica o la bomba del cromatógrafo de líquidos, a través de la precolumna o de la columna analítica. La precolumna se rellenó con 35 mg (\pm 4%) de fase C18 de 10 μ m de tamaño de partícula. Un esquema general del sistema utilizado se presenta en la figura 3.4.

Con este sistema se procedió a estudiar las condiciones óptimas para la preconcentración y análisis de los HAPs.

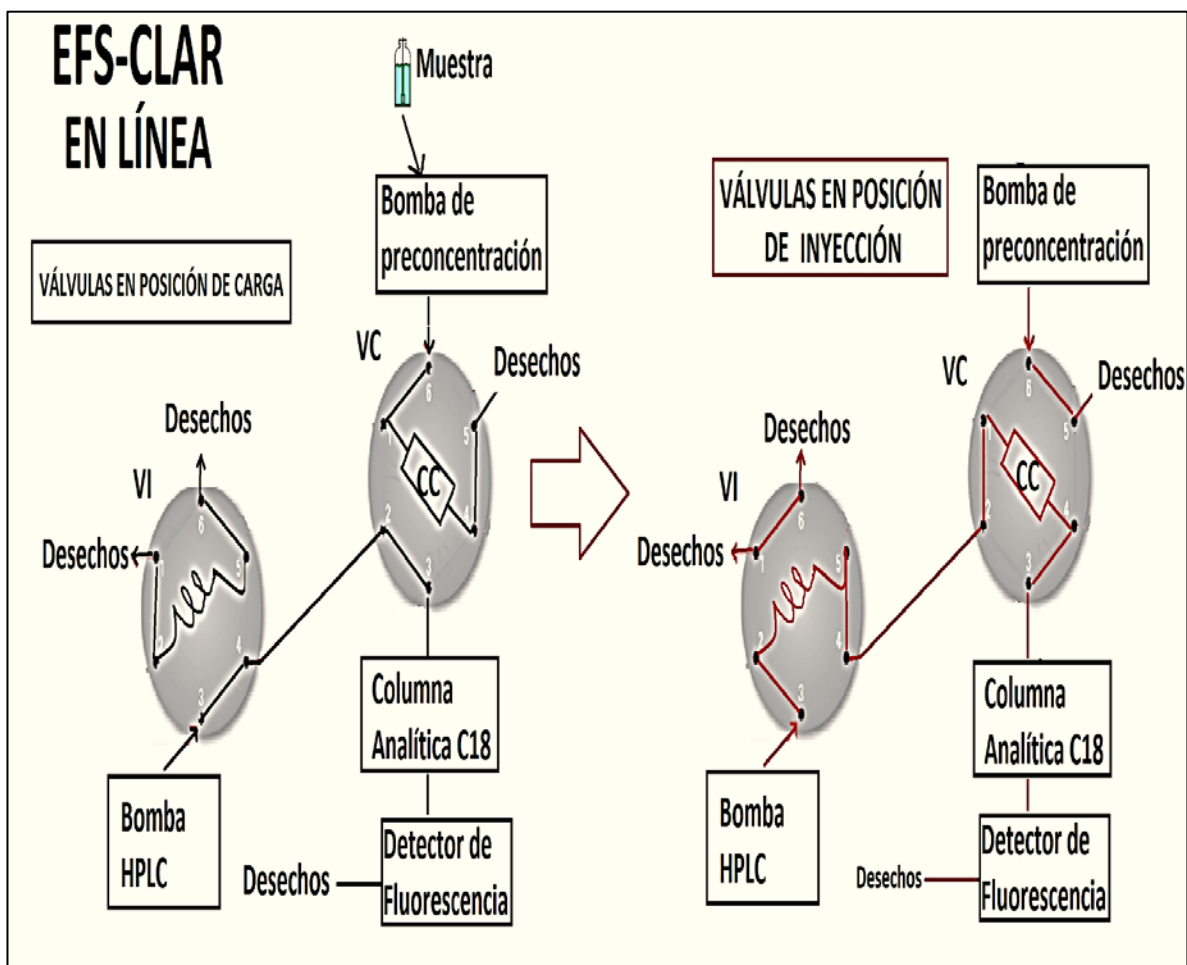


Figura 3.4 Esquema general del sistema EFS-CLAR en línea utilizado. VI = Válvula del inyector; VC = Válvula de concentración; CC = Columna de concentración rellena con fase C18.

En la tabla 3.3 se resumen las operaciones que se llevan a cabo durante el análisis cromatográfico en línea utilizando el sistema descrito.

Tabla 3.3
Secuencia de operaciones del sistema EFS-CLAR para el análisis de HAPs y metabolitos del BaP.

Acción		Análisis en línea					Inyección de disolución estándar
		Acondicionamiento de CC	Carga del extracto diluido	Limpieza de CC	Elución de analitos ^d	Acondicionamiento y carga del siguiente extracto diluido	
	Tiempo de análisis (min)	---	---	---	0	10-40	
Posición de las válvulas	VI	C	C	C	I	C	I
	VC	C	C	C	I	C	I
Estado de las bombas	Bomba de preconcentración ^a	E	E	E	A	E	A
	Bomba CLAR ^b	E	E	E	E	E	E

VI= Válvula del inyector; VC= Válvula de concentración; a = flujo de 2 mL min⁻¹; b = Flujo de 1 mL min⁻¹; C= Carga; d = extractos E1 y D1 con fase móvil 65% MeOH y 35% agua; extractos E2 y D2 con fase móvil 85% MeOH y 15% agua; CC=Columna de concentración; I= Inyección; E = Encendido; A= Apagado.

3.5.4.1. Optimización de la preconcentración y análisis en línea de los HAPs y metabolitos del BaP con disoluciones estándar a diferentes porcentajes de disolvente orgánico (extractos E1 y E2 simulados)

Para simular la dilución y preconcentración de los extractos E1, se prepararon disoluciones acuosas con un volumen de 20 mL a diferentes porcentajes de ACN como fueron: 10, 20 y 30 %. Las muestras se fortificaron a una concentración de 8 pg mL⁻¹ (160 pg) de los compuestos 4,5-dihidrodiol BaP y 9,10-dihidrodiol BaP. Estos extractos simulados se cargaron a la precolumna y se analizaron con las condiciones mostradas en la tabla 3.4.

Para simular la dilución y preconcentración de los extractos E2, se prepararon disoluciones acuosas con un volumen de 8 mL a diferentes porcentajes de ACN como fueron: 20, 30, 40, 45, 50, 55 %. Las muestras se fortificaron a una concentración de 27 pg mL⁻¹ (216 pg) para los dos OH-BaP y los cuatro HAPs. Las muestras se preconcentraron y analizaron con las condiciones mostradas en la tabla 3.4.

Tabla 3.4

Condiciones de preconcentración y análisis con el sistema EFS-CLAR para los extractos simulados E1 y E2.

Extracto diluido	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Volumen de extracto diluido (mL)	Análisis en línea			Inyección de estándar	
			Flujo de carga del extracto	Limpieza de líneas	Fase móvil*	Concentración disolución estándar	Volumen inyectado
E1	8	20	2 mL min^{-1}	5 mL agua	MeOH/Agua 65:35 v/v	8 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	20 μL
E2	27	8			MeOH/Agua 85:15 v/v	10.8 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	20 μL

*Flujo = 1 mL min^{-1}

Se obtuvieron los recobros de los analitos con la preconcentración en línea comparando las áreas obtenidas en los cromatogramas con las áreas provenientes de la inyección directa de la misma cantidad de cada analito. Se seleccionaron los porcentajes de ACN que proporcionaron los mejores recobros.

3.5.4.2. Validación del sistema de EFS-CLAR en línea con disoluciones estándar de los analitos

Para evaluar la linealidad y exactitud del sistema en línea EFS-CLAR se prepararon 5 diferentes disoluciones acuosas de cada analito a las concentraciones y porcentajes de ACN señaladas en la tabla 3.5. Cada muestra fue preconcentrada utilizando las mismas condiciones descritas en la sección anterior.

Se graficó la cantidad recuperada en función de la cantidad agregada para cada analito. Se ajustó la recta con el método de mínimos cuadrados y la linealidad fue evaluada con el coeficiente de regresión (r^2). Se obtuvo la ecuación de la misma recta ajustada y la pendiente multiplicada por 100 proporcionó el valor del recobro global.

Tabla 3.5

Concentraciones y porcentajes de MeCN en los extractos E1 y E2 utilizados para la validación del sistema EFS-CLAR.

Extracto	Compuestos	Concentraciones pg mL ⁻¹	% MeCN en extracto preconcentrado	Volumen de extracto preconcentrado (mL)
E1	Dihidrodióles	7, 14, 28, 49 y 67	10	20
E2	OH-BaP	20, 60, 100, 150, 200	30	8
	PAH	5, 10, 30, 60, 80		

Los límites de detección (L. D.) y cuantificación (L. C.) se obtuvieron con el mismo procedimiento estadístico utilizado en la validación del sistema cromatográfico fuera de línea, el cual se describe en el Anexo III.

La repetibilidad se evaluó con 5 muestras fortificadas con 30 pg mL⁻¹ de cada analito y analizadas en días diferentes cada una. Se obtuvieron los recobros y se calculó el % de C.V. para cada analito.

3.5.5. Optimización y validación del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-FD en línea para los HAPs y metabolitos del BaP con muestras de cultivos

3.5.5.1. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de E1 y E2 obtenidos de muestras de cultivos de microalgas

Para probar la validez con las muestras de cultivos del método de extracción EFS fuera de línea/ EFS-CLAR-FD en línea desarrollado, se requirió primero corroborar que en los cromatogramas no se presentaran picos interferentes que co-eluían con los compuestos de interés en los extractos E1 y E2.

Para cada ensayo, se utilizaron 15 mL de muestra de cultivo de microalgas que tuviera un tiempo de desarrollo cercano a 2 semanas y que proporcionaran un valor de absorbancia aproximado a 1.00 medida a 685 nm, ya que esto nos aseguraba la obtención de 5 mg de peso seco de biomasa. Los cultivos se centrifugaron a 3900 rpm durante 15 min; se decantaron los

sobrenadantes, los cuales se fortificaron a una concentración de 10 pg mL^{-1} para cada analito. Se agregó isopropanol para tener una mezcla al 20% v/v y se dejó equilibrar por 5 min. Cada una de las muestras o medios líquidos de cultivo libres de microalgas se pasaron por diferentes cartuchos de EFS empacados con 300 mg de fase C18-PAH y se aplicó la secuencia de elución optimizada previamente para la extracción fuera de línea y mostrada en la tabla 3.2.

Los extractos E1 se diluyeron con agua hasta a un volumen de 16.5 (para alcanzar un contenido de 10% de MeCN). Se preconcentraron y analizaron con el sistema en línea a las condiciones mostradas en la tabla 3.5. Los extractos E2 se diluyeron hasta 10 mL con agua y fueron analizados con las condiciones mostradas en la tabla 3.5.

Se evaluó el perfil de los cromatogramas obtenidos para cada extracto preconcentrado.

Se realizó el mismo procedimiento utilizando cultivos que tuvieran 4 y 6 semanas de crecimiento para evaluar el comportamiento de los interferentes con el tiempo.

3.5.5.2. Optimización de los recobros del compuesto 3-OH BaP en los extractos de medio líquido de los cultivos de microalgas

El compuesto 3-OH BaP presentó muy bajos recobros con la metodología de extracción, por lo que se decidió agregar un agente químico que facilitara la desorción de este compuesto del cartucho de EFS. Para esto, se centrifugaron muestras de 15 mL de cultivos de microalgas y los sobrenadantes fueron fortificados con los analitos a las siguientes concentraciones: dihidrodioles 5 pg mL^{-1} (75 pg totales agregados); OH-BaP 17 pg mL^{-1} (255 pg totales agregados) y HAPs 3 pg mL^{-1} (45 pg totales agregados). Se probaron los porcentajes peso/volumen (p/v) de ácido ascórbico: 0.5, 1, 2 y 4%. El cultivo se dejó equilibrando 5 min y se realizó la extracción y análisis de las muestras con las condiciones en línea establecidas.

Se evaluaron los recobros comparando las áreas de los picos en los cromatogramas obtenidos para cada analito con la preconcentración y el análisis en línea de los extractos contra las áreas producidas por la inyección directa de la misma cantidad de cada analito al sistema

cromatográfico. El volumen de inyección directa fue de 20 μL . De esta forma, los recobros de los dihidrodioles se obtuvieron comparando con la inyección de una disolución de concentración 3.75 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$. y los recobros de los OH-BaP y HAPs se obtuvieron comparando con disoluciones de concentraciones 12.75 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ y 2.25 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente.

3.5.5.3. Validación del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR-FD en línea con muestras de cultivos de microalgas

Para evaluar la linealidad se fortificaron diferentes muestras en el intervalo de concentraciones de 5 a 120 pg mL^{-1} para los dihidrodioles y de 10 a 120 pg mL^{-1} para el resto de los analitos. Las muestras fueron analizadas con el método desarrollado y se obtuvo la recta de “cantidad recuperada en función de cantidad agregada para cada compuesto”. La curva se ajustó con el método de los mínimos cuadrados y se obtuvo el coeficiente de regresión (r^2) para evaluar la linealidad del método. Se obtuvo la ecuación de la recta y la exactitud fue evaluada con el recobro global obtenido multiplicando la pendiente por 100.

La repetibilidad se evaluó a dos niveles de concentración, 20 y 80 pg mL^{-1} , para todos los compuestos, obteniendo el % de C. V. de 5 inyecciones a cada concentración en 3 días diferentes.

Los límites de detección (L.D.) y cuantificación (L. C.) se calcularon con el procedimiento descrito en el ANEXO III.

3.5.5.4. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de E1 y E2 obtenidos de muestras de cultivos de protozoarios

Se utilizaron muestras de cultivos de protozoarios con 1 día de desarrollo. Se tomaron 15 mL de cultivo y se centrifugaron a 3900 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes se decantaron y se fortificaron a una concentración de 10 pg mL^{-1} . Se agregó isopropanol para tener una mezcla al 20% v/v y se dejó equilibrar por 5 min. Las muestras de medios líquidos de cultivo libres de protozoarios se extrajeron y analizaron con las mismas condiciones para las muestras de

microalgas descritas en la sección anterior. Se evaluó el perfil de los cromatogramas obtenidos para cada extracto preconcentrado.

3.5.5.5. Validación del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR-FD en línea con muestras de cultivos de protozoarios

Para evaluar la linealidad se fortificaron diferentes muestras en el intervalo de concentraciones de 5 a 120 pg mL^{-1} para los dihidrodioles y de 10 a 120 pg mL^{-1} para el resto de los analitos. Las muestras fueron analizadas con el método desarrollado y se obtuvo la recta de “cantidad recuperada en función de cantidad agregada para cada compuesto”. La curva se ajustó con el método de los mínimos cuadrados y se obtuvo el coeficiente de regresión (r^2) para evaluar la linealidad del método. Se obtuvo la ecuación de la recta y la exactitud fue evaluada con el recobro global obtenido multiplicando la pendiente por 100.

La reproducibilidad se evaluó a dos niveles de concentración, 20 y 80 pg mL^{-1} , para todos los compuestos, obteniendo el % de C. V. de 5 inyecciones a cada concentración en 3 días diferentes.

Los límites de detección (L.D.) y cuantificación (L. C.) se calcularon con el procedimiento descrito en el ANEXO III.

3.5.6. Desarrollo del método de extracción de HAPs y metabolitos por DMFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea

3.5.6.1. Ensayos de recobro preliminares de los analitos por DMFS fuera de línea sin muestra

En un mortero de ágata se fortificaron diferentes porciones de 100 mg de sílice C18-PAH a una concentración de 0.05 ng mg^{-1} (5 ng totales agregados) para todos los compuestos. El adsorbente fortificado se homogenizó en el mortero y se empacó en un cartucho de EFS de 1.5 mL. En ensayos diferentes los analitos se recuperaron de los cartuchos con las disoluciones señaladas en la tabla 3.6.

Tabla 3.6

Disoluciones utilizadas para la evaluación de los frentes de elución de los analitos en el cartucho de DMFS empacado.

Ensayo	No. de fracciones recuperadas	Porcentaje de ACN del disolvente de elución
1	5 x 0.5 mL	30
2	5 x 0.5 mL	40
3	5 x 0.5 mL	50
4	5 x 0.5 mL	85

Cada una de las fracciones se analizaron inyectando 20 μL al sistema cromatográfico usando una fase móvil de MeOH/agua (85:15 v/v). Los recobros se obtuvieron comparando las áreas producidas por cada fracción con el área obtenida al inyectar el mismo volumen de 20 μL de una disolución de concentración de 10 ng mL^{-1} para cada analito.

Con la gráfica de los recobros acumulados en función del volumen se obtuvieron los frentes de elución para cada analito al usar las diferentes mezclas de ACN y agua. Con ayuda de estos frentes se seleccionaron los eluentes de limpieza y de desorción de los analitos y los volúmenes óptimos de los mismos.

3.5.6.2. Optimización de los recobros de los metabolitos OH-BaP

Con el propósito de mejorar los recobros de los hidróxi-BaP, se probaron diferentes agentes químicos agregados al adsorbente. Así, se fortificaron diferentes porciones de 100 mg de fase C18-PAH a una concentración de 0.15 ng mg^{-1} (15 ng totales agregados). En ensayos diferentes se agregaron 20 μL de cada una de las disoluciones señaladas en la tabla 3.7.

Los adsorbentes fortificados se dejaron secar a temperatura ambiente y se homogenizaron en el mortero de ágata. Después, se empacaron en un cartucho de 1.5 mL. Se recuperaron los analitos con 1.5 mL de ACN al 85%. Se inyectaron 20 μL al sistema cromatográfico, realizando la separación analítica con una fase móvil de MeOH/agua (85:15 v/v). Los recobros se obtuvieron comparando las áreas de los picos de los compuestos de interés producidas en los cromatogramas de cada extracto con el área obtenida al inyectar el mismo volumen de una disolución estándar de concentración de 10 ng mL^{-1} (0.2 ng inyectados) para cada analito.

Tabla 3.7

Disoluciones agregadas en volúmenes de 20 μL a las muestras de sílice fortificadas con los analitos a una concentración de 0.15 ng mg^{-1}

Ensayo	Disolución	Característica
1	Ninguna	Control
2	Heptano sulfonato de sodio (HSNa) 1 M	Tensoactivo
3	Lauril sulfato de sodio (LSNa) 1 M	
4	HNO_3 0.1 M	Ácido
5	HNO_3 1 M	
6	H_2SO_4 1 M	
7	Ácido ascórbico 15% p/v	Antioxidante
8	Ácido ascórbico 20% p/v	
9	Ácido ascórbico 40% p/v	

3.5.6.3. Implementación de una secuencia de limpieza en el cartucho de DMFS

En ensayos por triplicado, se fortificaron porciones de 100 mg de fase C18-PAH con cada uno de los compuestos a una concentración de 0.05 ng mg^{-1} . Se agregaron 20 μL de una disolución de ácido ascórbico de concentración 20% p/v. La muestra se dejó secar a temperatura ambiente y se homogenizó en un mortero de ágata. Se empacó un cartucho con la fase homogenizada y se aplicó la siguiente secuencia de disolventes: 10 mL de agua; 10 mL de una disolución acuosa de ACN 10%; 6 fracciones de 1 mL de ACN 20% y 1 mL de ACN 85%. Las fracciones de agua y ACN 10% se desecharon y el resto fueron analizadas por inyección directa de 20 μL al sistema cromatográfico. La separación analítica se realizó utilizando una fase móvil MeOH/agua (85:15 v/v). Los recobros se obtuvieron comparando el área de los picos en los cromatogramas de cada fracción contra las obtenidas al inyectar el mismo volumen de una disolución de los analitos a 5 ng mL^{-1} .

3.5.6.4. Optimización de la elución de los analitos en la DMFS fuera de línea

Se empacaron diferentes cartuchos con el mismo procedimiento descrito en la sección anterior y se aplicó la siguiente secuencia de disolventes para la limpieza de interferentes: 10 mL de agua; 10 mL de una disolución acuosa de ACN 10%; 5 mL de ACN 20%.

Los analitos se recuperaron del cartucho de forma selectiva en dos extractos diferentes denominados como D1 = 1.5 mL ACN 40% (dihidrodióles) y D2 = 1 mL ACN 85% (hidróxi-BaP y HAPs). Cada uno de estos extractos fue analizado por inyección directa de 20 μL al sistema cromatográfico. La separación analítica se realizó utilizando una fase móvil MeOH/agua (85:15 v/v).

Los recobros se obtuvieron comparando el área de los picos en los cromatogramas de cada extracto contra el área obtenida al inyectar 20 μL de una disolución de los analitos a 5 ng mL^{-1} .

3.5.6.5. Optimización de la preconcentración y análisis en línea de los HAPs y metabolitos del BaP con disoluciones estándar a diferentes porcentajes de disolvente orgánico (extractos D1 y D2 simulados)

Se utilizó el mismo sistema EFS-CLAR en línea descrito en la sección 3.5.4 y siguiendo la misma estrategia que en el desarrollo del método EFS fuera de línea / EFS-CLAR en línea se optimizó la preconcentración de los analitos en dos extractos simulados diferentes denominados como D1 (con dihidrodióles) y D2 (con OH-BaP y HAPs).

Para los extractos D1, se prepararon diferentes disoluciones acuosas que simularan el extracto diluido con un volumen de 6 mL cada una. Se evaluaron los porcentajes de ACN en la muestra: 10, 20, 30 y 40%. Cada muestra se fortificó con los dihidrodióles a una concentración de 45 pg mL^{-1} y se preconcentraron y analizaron con las condiciones presentadas en la tabla 3.8.

Para los extractos D2, se prepararon diferentes disoluciones acuosas con un volumen de 2 mL cada una. Se evaluaron los porcentajes de ACN en la muestra: 30, 40, 45, 50 y 55%. Cada muestra se fortificó con los dihidrodióles a una concentración de 160 pg mL^{-1} , se preconcentraron y analizaron con las condiciones presentadas en la tabla 3.8.

Tabla 3.8

Condiciones de preconcentración y análisis con el sistema EFS-CLAR para los extractos simulados D1 y D2.

			Análisis en línea			Inyección de disolución estándar	
			Bomba de preconcentración		Bomba CLAR	Cálculo de los recobros con:	
Extracto diluido	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Volumen de extracto diluido (mL)	Flujo de carga del extracto	Limpieza de líneas	Fase móvil Flujo = 1 mL min^{-1}	Concentración disolución estándar	Volumen inyectado
D1	45	6	2 mL min^{-1}	5 mL agua	MeOH/Agua 65:35 v/v	13.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	20 μL
D2	160	2			MeOH/Agua 85:15 v/v	16 $\mu\text{g mL}^{-1}$	20 μL

Se obtuvieron los recobros de la preconcentración en línea comparando las áreas obtenidas con las áreas producidas por la inyección fuera de línea de la misma cantidad de cada analito.

3.5.7. Optimización y validación del método de extracción por DMFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-FD en línea para los HAPs y metabolitos del BaP con muestras de biomasa

3.5.7.1. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de D1 y D2 obtenidos de muestras de biomasa de microalgas

Para probar la validez con las muestras de biomasa del método de extracción DMFS fuera de línea / EFS-CLAR-FD en línea desarrollado, se requirió primero corroborar que en los cromatogramas no se presentaran picos interferentes que co-eluían con los compuestos de interés en los extractos D1 y D2.

Se centrifugaron diferentes muestras de 15 mL de cultivo de microalgas a 3900 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes se decantaron y el botón con la biomasa se recuperó y se resuspendió con 0.5 mL de agua pura. Se colocó en un portaobjetos de vidrio y se dejó secar a temperatura ambiente. Diferentes muestras de 5 mg de biomasa seca fueron fortificadas con los analitos a una concentración de 32 $\mu\text{g mg}^{-1}$ para cada analito.

Se siguió el procedimiento de extracción y análisis optimizado y los extractos D1 y D2 se analizaron con las condiciones en línea presentadas en la tabla 3.9.

Tabla 3.9

Porcentajes de ACN en los extractos obtenidos con el método de DMFS fuera de línea y diluciones que se deben hacer para su preconcentración por EFS-CLAR en línea.

Método	Extracto	Compuestos	% ACN inicial en el extracto	Volumen del extracto (mL)	Volumen de agua agregado (mL)	% ACN del extracto diluido
DMFS fuera de línea / EFS-CLAR en línea	D1	Dihidrodióles	40	1.5	4.5	10
	D2	OH-BaP, HAPs	85	1	1.1	40

El extracto D1 fue analizado utilizando una fase móvil de MeOH/agua (65:35 v/v) y el extracto D2 con una fase móvil MeOH/agua (85:15 v/v). Se evaluó el perfil del cromatograma obtenido comparando con muestras sin fortificar para verificar que no se presentaran interferentes co-eluidos en los mismos tiempos de retención de los analitos.

3.5.7.2. Validación del método de extracción por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea con muestras de biomasa de microalgas

Se validó el método utilizando muestras de 5 mg de biomasa seca de microalgas.

Para evaluar la linealidad se fortificaron diferentes muestras a las concentraciones de 20, 40, 80, 120 y 200 pg mg^{-1} para todos los analitos. Las muestras fueron analizadas con el método desarrollado y se obtuvo la recta de “cantidad recuperada en función de cantidad agregada para cada compuesto”. La curva se ajustó con el método de los mínimos cuadrados y se obtuvo el coeficiente de regresión (r^2) para evaluar la linealidad del método. Se obtuvo la ecuación de la recta y la exactitud fue evaluada con el recobro obtenido multiplicando la pendiente por 100.

La repetibilidad se evaluó a dos niveles de concentración, 18 y 120 pg mg^{-1} , para todos los compuestos, obteniendo el % de C. V. de 5 inyecciones a cada concentración en 3 días diferentes.

Los límites de detección (L.D.) y cuantificación (L. C.) se calcularon con el procedimiento descrito en el ANEXO III.

3.5.7.3. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de D1 y D2 obtenidos de muestras de biomasa de protozoarios

Se centrifugaron muestras de 90 mL de cultivo de protozoarios y se recuperó el botón con la biomasa suspendiéndola con 0.5 mL de agua potable (para evitar la ruptura de las células). La muestra se dejó secar a temperatura ambiente colocándola sobre un portaobjetos.

Diferentes muestras de 2 mg de biomasa seca de protozoarios fueron fortificadas con los analitos a una concentración de 90 pg mg^{-1} para cada analito y se siguió el procedimiento descrito en la sección anterior para las muestras de microalgas.

Se evaluó el perfil del cromatograma obtenido comparando con muestras sin fortificar para verificar que no se presentaran interferentes co-eluidos en los mismos tiempos de retención de los analitos.

3.5.7.4. Validación del método de extracción por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea con muestras de biomasa de protozoarios

Se validó el método utilizando muestras de 2 mg de biomasa seca de protozoarios.

Para evaluar la linealidad se fortificaron diferentes muestras a las concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 pg mg^{-1} para todos los analitos. Las muestras fueron analizadas con el método desarrollado y se obtuvo la recta de "cantidad recuperada en función de cantidad agregada para cada compuesto". La curva se ajustó con el método de los mínimos cuadrados y se obtuvo el coeficiente de regresión (r^2) para evaluar la linealidad del método. Se obtuvo la ecuación de la recta y la exactitud fue evaluada con el recobro global obtenido multiplicando la pendiente por 100.

La repetibilidad se evaluó a dos niveles de concentración, 60 y 120 pg mg^{-1} , para todos los compuestos, obteniendo el % de C. V. de 5 inyecciones a cada concentración en 3 días diferentes.

Los límites de detección (L.D.) y cuantificación (L. C.) se calcularon con el procedimiento descrito en el ANEXO III.

3.5.8. Aplicación de las metodologías desarrolladas en ensayos de exposición a los HAPs

3.5.8.1. Toxicidad del BaP en las microalgas

Para evaluar la posible toxicidad del BaP sobre las células de microalgas, se utilizaron cultivos de microalgas que proporcionaban una absorbancia a 685 nm de 1 unidad. La lectura anterior corresponde a un número aproximado de 4.5×10^6 células mL^{-1} de cultivo.

A partir de este cultivo y en condiciones estériles se prepararon los cultivos necesarios a los que se agregaron las diferentes concentraciones de BaP mostradas en la figura 3.5.

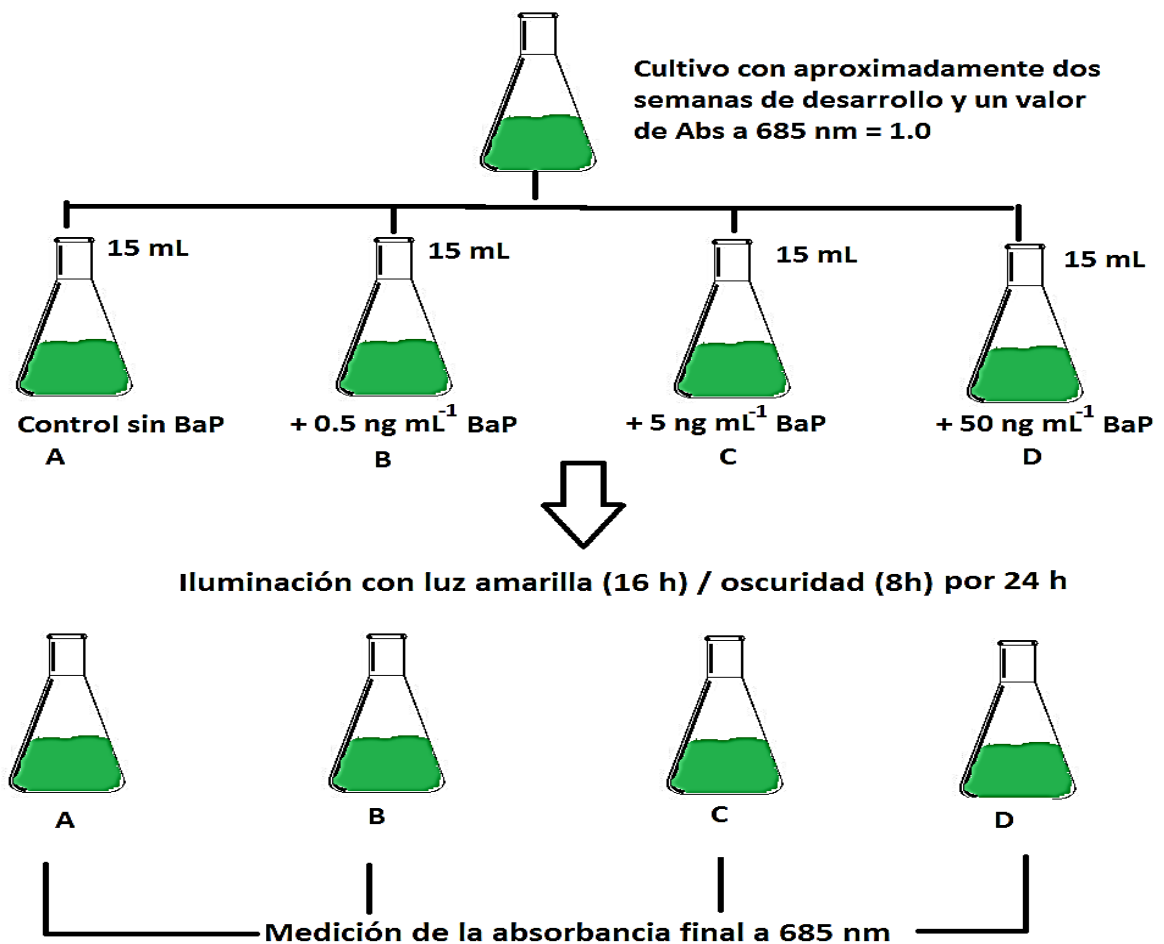


Figura 3.5 Metodología utilizada para evaluar la toxicidad del BaP sobre el organismo *S. capricornutum*.

Transcurrido un tiempo de 24 h se midió de nueva cuenta la absorbancia. Se compararon los resultados obtenidos en el cultivo control sin BaP con los resultados obtenidos en las muestras donde se agregó el BaP a diferentes concentraciones. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.5.8.2. Exposición de cultivos de microalgas al BaP

Se realizaron exposiciones a dos diferentes concentraciones de BaP, 5 y 50 ng mL⁻¹. En todos los ensayos de exposición a los HAPs realizados, los cultivos se mantuvieron usando las condiciones mencionadas en la sección 3.3.1. Solo se cambió la iluminación de los cultivos de microalgas de luz blanca a luz amarilla.

Por cada bioensayo de exposición al BaP, se utilizaron 3 diferentes muestras, como están representadas en la figura 3.6.

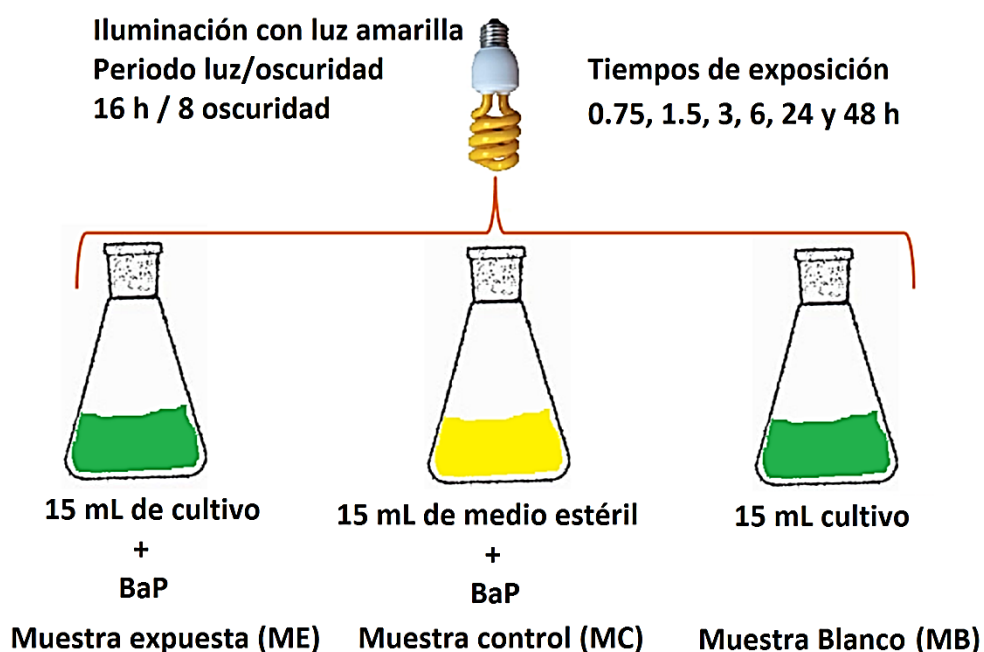


Figura 3.6 Muestras utilizadas para los ensayos de exposición del BaP sobre el organismo *S. capricornutum*.

La muestra control (MC) se utilizó para evaluar las pérdidas de BaP debidas a procesos biológicos (foto-oxidación y adsorción al matraz). La muestra blanco (MB) fue utilizada para evaluar la evolución de los interferentes de la muestra en los diferentes tiempos de exposición.

Todas las muestras se mantuvieron en agitación bajo luz amarilla en períodos de luz/oscuridad de 16 h / 8 h y fueron mantenidas en diferentes períodos de tiempo: 0.75 h, 1.5, 3, 6, 24 y 48 h.

Transcurrido cada tiempo, las muestras se centrifugaron a 3900 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue analizado con el método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-DF en línea. La biomasa se dejó secar sobre un portaobjetos a temperatura ambiente. Una vez seca se analizó utilizando el método de extracción por DMFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-DF en línea.

Los ensayos se realizaron por triplicado y se calculó la cantidad de BaP y metabolitos recuperados en la biomasa y el medio de cultivo líquido de cada muestra a los diferentes tiempos de exposición.

3.5.8.3. Obtención de los espectros de masas de los metabolitos del BaP

Se inyectaron 25 μL de una disolución estándar 5 mg L^{-1} de los metabolitos (4,5 dihidrodiol BaP, 9,10-dihidrodiol BaP, 3-OHBaP y 9-OH BaP) a un sistema cromatográfico CLAR-EM, compuesto por una bomba binaria con automuestreador y un espectrómetro de masas con cuadrupolo y detector de tiempo de vuelo (Q-TOF, por sus siglas en inglés). Las condiciones del sistema se presentan en la tabla 3.10.

Tabla 3.10

Condiciones utilizadas en el sistema CLAR-EM para la obtención de los espectros de masas de los metabolitos del BaP producidos en cultivos de microalgas expuestos.

Sistema CLAR-EM	
Bomba binaria	Flujo 0.3 mL min^{-1} Composición de la fase móvil: A) 50% ACN con 0.01% ácido fórmico y B) 50% agua con 0.01% ácido fórmico
Columna	Alltima HPC18 AQ. Diámetro de partícula 3 μm , dimensiones: 100 mm x 2.1 mm
Detector de Masas	Q-TOF LC/MSFuente de ionización: Agilent ESI-Jet Stream Thermal Focusing Polaridad (+). Gas: N_2 , flujo de 13 L min^{-1} , voltaje del fragmentor: 140 V.

Se obtuvo el espectro de masas de cada compuesto en el intervalo de relaciones m/z de 50 a 350.

Se compararon los espectros obtenidos con los de una muestra concentrada que contenía a los dihidrodioles producidos en un ensayo de exposición a una concentración de 240 ng mL^{-1} de BaP durante 6 h. La muestra concentrada se formó por acumulación de extractos provenientes de diferentes cultivos expuestos y aplicación en un cartucho de EFS y posterior evaporación, por lo que el detalle de su obtención se describe a continuación:

- a) 5 diferentes muestras de 15 mL de cultivo de microalgas fueron expuestas al BaP.
- b) Cada muestra se centrifugó a 3900 rpm durante 15 min.
- c) Los sobrenadantes fueron extraídos con el método de EFS fuera de línea y se recuperaron los extractos E1 que contenían a los dihidrodioles producidos presentes en el medio líquido.
- d) Cada extracto se diluyó hasta tener un porcentaje de ACN de 10% y se pasaron por diferentes cartuchos de EFS de 1 mL empacados con 100 mg de fase Chromabond C18. El efluente se desechó.
- e) Los analitos se recuperaron de cada cartucho con 1 mL de ACN 100%.
- f) Se mezclaron los 5 extractos obtenidos y se evaporó el disolvente con nitrógeno hasta sequedad.
- g) La muestra se reconstituyó con 100 μL de una mezcla ACN/agua (50:50) que contenía 0.01% v/v de ácido fórmico.

3.5.8.4. Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a cada uno de los HAPs

Se realizaron diferentes ensayos por triplicado preparando muestras de cultivo de microalgas y medio de cultivo estéril de la forma que se señala en la tabla 3.11. La concentración de exposición de cada HAP fue de 0.5 ng mL^{-1} .

Para cada muestra se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 3.5.8.2, pero a un solo tiempo de exposición de 3 h. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 3.11

Muestras utilizadas para los ensayos de exposición de cultivos de microalgas a los HAPs a una concentración de 0.5 ng mL^{-1} .

Ensayo	Muestra (15 mL)	HAPs agregado	Tipo de muestra
1	Cultivo de microalgas	Ninguno	Blanco
2	Cultivo de microalgas	BaA	Expuesta
3	Medio estéril	BaA	Control
4	Cultivo de microalgas	Ninguno	Blanco
5	Cultivo de microalgas	BaP	Expuesta
6	Medio estéril	BaP	Control
7	Cultivo de microalgas	Ninguno	Blanco
8	Cultivo de microalgas	BbF	Expuesta
9	Medio estéril	BbF	Control
10	Cultivo de microalgas	Ninguno	Blanco
11	Cultivo de microalgas	BkF	Expuesta
12	Medio estéril	BkF	Control

3.5.8.5. Toxicidad del BaP sobre las células de protozoarios

Se realizaron ensayos por triplicado con cultivos de 90 mL de infusión de cebada que fueron inoculados con 2.5 mL de un cultivo de protozoarios que tenía un número de células por mililitro aproximado de 3.5×10^3 . Cada cultivo fue mantenido en incubación a 28°C y se agregó BaP al cultivo hasta tener una concentración de 5 ng mL^{-1} .

Se monitoreo el número de células por mililitro a diferentes tiempos de desarrollo del cultivo. Los resultados se compararon con un cultivo sembrado en las mismas condiciones pero sin BaP.

3.5.8.6. Exposición de cultivos de protozoarios a una concentración de 5 ng mL⁻¹ de BaP

Por cada ensayo se utilizaron 3 diferentes tipos de muestras como fueron:

- a) Muestras expuestas (ME): muestras de cultivos de protozoarios con un volumen de 90 mL, con un tiempo de crecimiento de 1 día y número aproximado de 4×10^3 células mL⁻¹. Cada muestra se fortificó a una concentración de 5 ng mL⁻¹ de BaP.
- b) Muestras blanco (MB): muestras de cultivo a las mismas condiciones que las muestras expuestas pero sin BaP.
- c) Muestras control (MC): muestras de 90 mL de infusión de cebada sin protozoarios fortificadas con BaP a 5 ng mL⁻¹.

Todas las muestras se mantuvieron en incubación a 28 °C y fueron expuestas al contaminante en diferentes períodos de tiempo: 3, 24 y 48 h.

Transcurrido cada tiempo, las muestras se centrifugaron a 3900 rpm durante 15 min. Un volumen de 15 mL del sobrenadante fue analizado con el método de EFS fuera de línea con preconcentración y análisis por EFS-CLAR-DF en línea. A la biomasa se agregaron 20 µL de una disolución de ácido ascórbico 20% p/v y se dejó secar sobre un portaobjetos a temperatura ambiente. Una vez seca, se aplicó el método de DMFS fuera de línea con preconcentración y análisis por EFS-CLAR-DF en línea.

Los ensayos se realizaron por triplicado y se calculó la cantidad de BaP en la biomasa y el medio de cultivo líquido de cada muestra a los diferentes tiempos de exposición.

3.5.8.7. Ensayos de exposición de cultivos de protozoarios a cada uno de los HAPs

En estos experimentos se utilizó una concentración de 0.5 ng mL⁻¹ de cada HAP. Se realizaron diferentes ensayos por triplicado preparando muestras de cultivo de protozoarios e infusión de cebada en la forma que se señala en la tabla 3.12.

Tabla 3.12

Muestras utilizadas para los ensayos de exposición de cultivos de protozoarios a los HAPs a una concentración de 0.5 ng mL^{-1} .

Ensayo	Muestra (90 mL)	HAP agregado	Tipo de muestra
1	Cultivo de protozoarios	Ninguno	Blanco
2	Cultivo de protozoarios	BaA	Expuesta
3	Infusión de cebada	BaA	Control
4	Cultivo de protozoarios	Ninguno	Blanco
5	Cultivo de protozoarios	BaP	Expuesta
6	Infusión de cebada	BaP	Control
7	Cultivo de protozoarios	Ninguno	Blanco
8	Cultivo de protozoarios	BbF	Expuesta
9	Infusión de cebada	BbF	Control
10	Cultivo de protozoarios	Ninguno	Blanco
11	Cultivo de protozoarios	BkF	Expuesta
12	Infusión de cebada	BkF	Control

Para cada muestra se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección anterior, pero a un solo tiempo de exposición de 24 h.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. Obtención de las muestras de cultivos de microorganismos

4.1.1. Monitoreo del crecimiento de los cultivos de *Selenastrum capricornutum*

Debido al alto contenido en clorofila que tienen las células de microalgas verdes, se logró seguir el desarrollo o crecimiento de los cultivos mediante la medición de su absorbancia a 685 nm utilizando un espectrofotómetro de UV/Vis.

El muestreo se realizó periódicamente leyendo en el espectrofotómetro la absorbancia hasta que la muestra llegara a un valor constante. Las mediciones se hicieron por triplicado y los resultados promedio obtenidos se presentan en la figura 4.1, en la cual se muestra que la densidad celular máxima en el cultivo, reflejada por el valor de absorbancia, se alcanza en un tiempo aproximado de 35 días. Al ser las microalgas organismos autótrofos, pueden mantener este valor máximo de densidad celular indefinidamente mientras las condiciones del cultivo no sean alteradas.

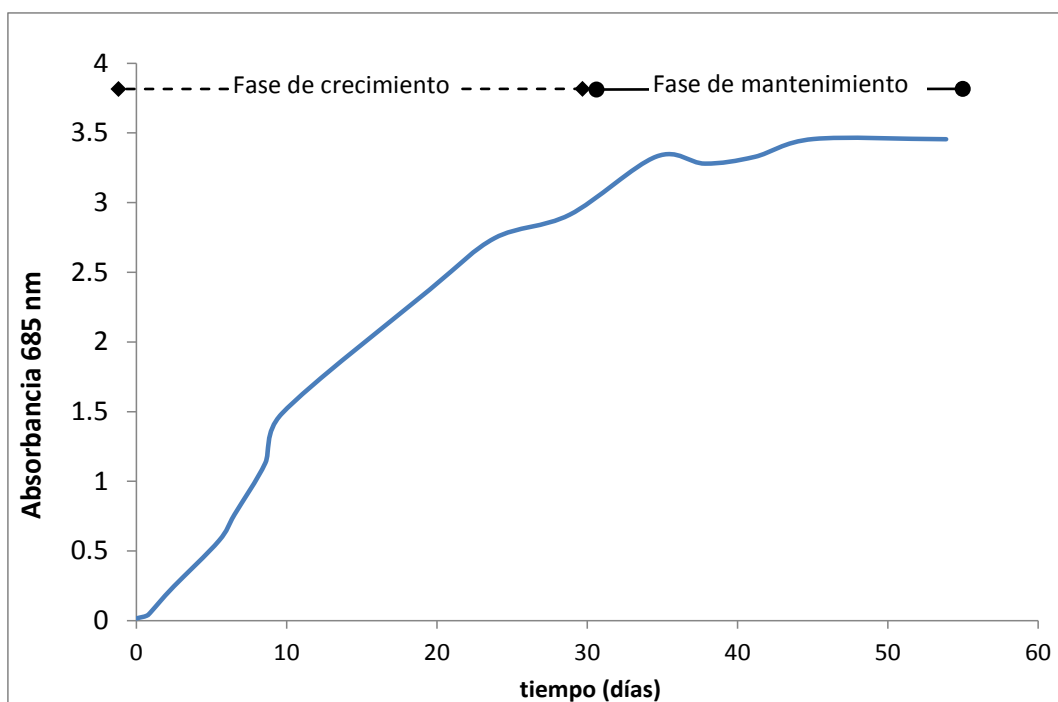


Figura 4.1 Seguimiento del crecimiento del cultivo de *Selenastrum capricornutum* en 50 mL de medio proteosa peptona.

En la parte de la curva donde el crecimiento tiene un comportamiento exponencial, el cultivo presenta un metabolismo más activo, por tanto existe un mayor intercambio de componentes entre el medio y las células debido a sus funciones de reproducción y mantenimiento. De esta forma, se decidió trabajar con cultivos que estuvieran en la fase logarítmica para promover el metabolismo de los HAPs.

4.1.2. Determinación de la biomasa recuperada de microalgas en función del tiempo de crecimiento del cultivo

Se realizaron ensayos por triplicado, donde se pesó la biomasa seca que se podía recuperar de 15 mL de cultivo de microalgas con diferentes tiempos de desarrollo. Los resultados se presentan en la figura 4.2.

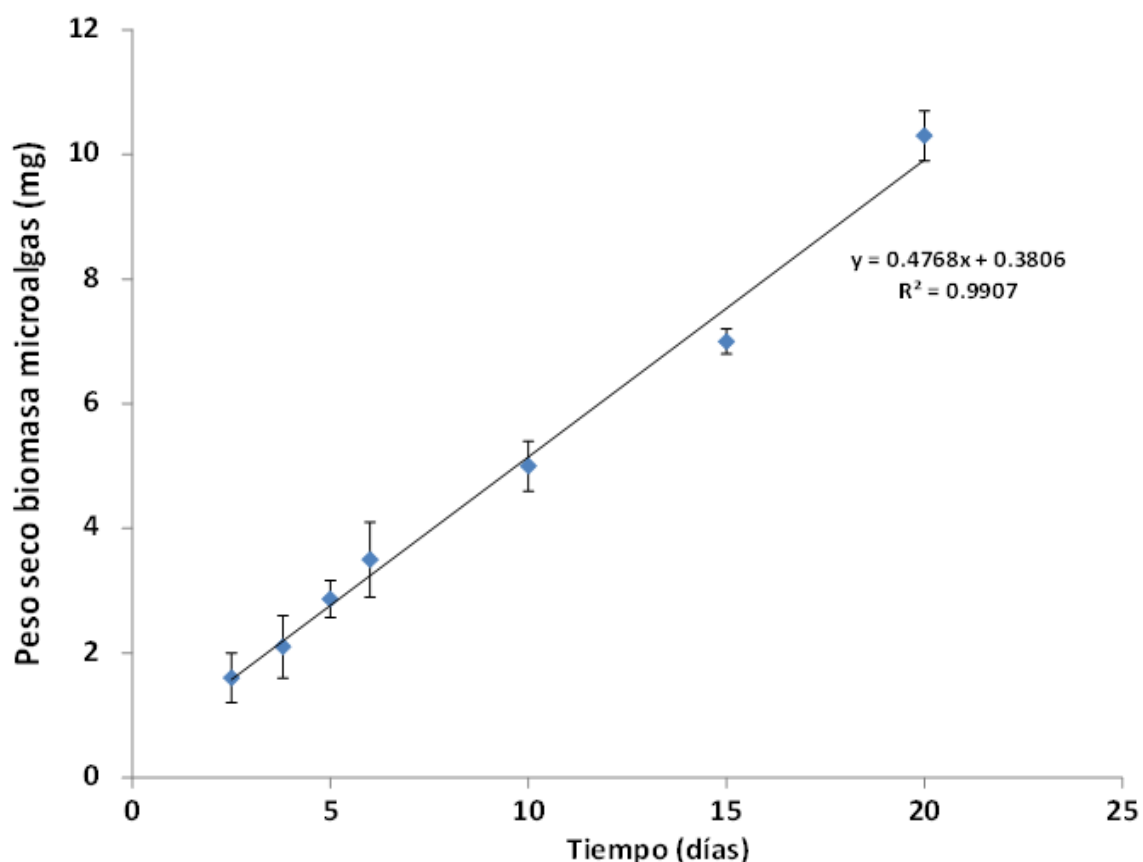


Figura 4.2 Relación entre la cantidad de biomasa seca de *S. capricornutum* recuperada a partir de alícuotas de 15 mL de cultivo colectadas a diferentes tiempos de desarrollo.

También se evaluó la dependencia de la absorbancia a 685 nm de las alícuotas de 15 mL de cultivo colectadas a diferentes tiempos con el peso de biomasa seca. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4.3.

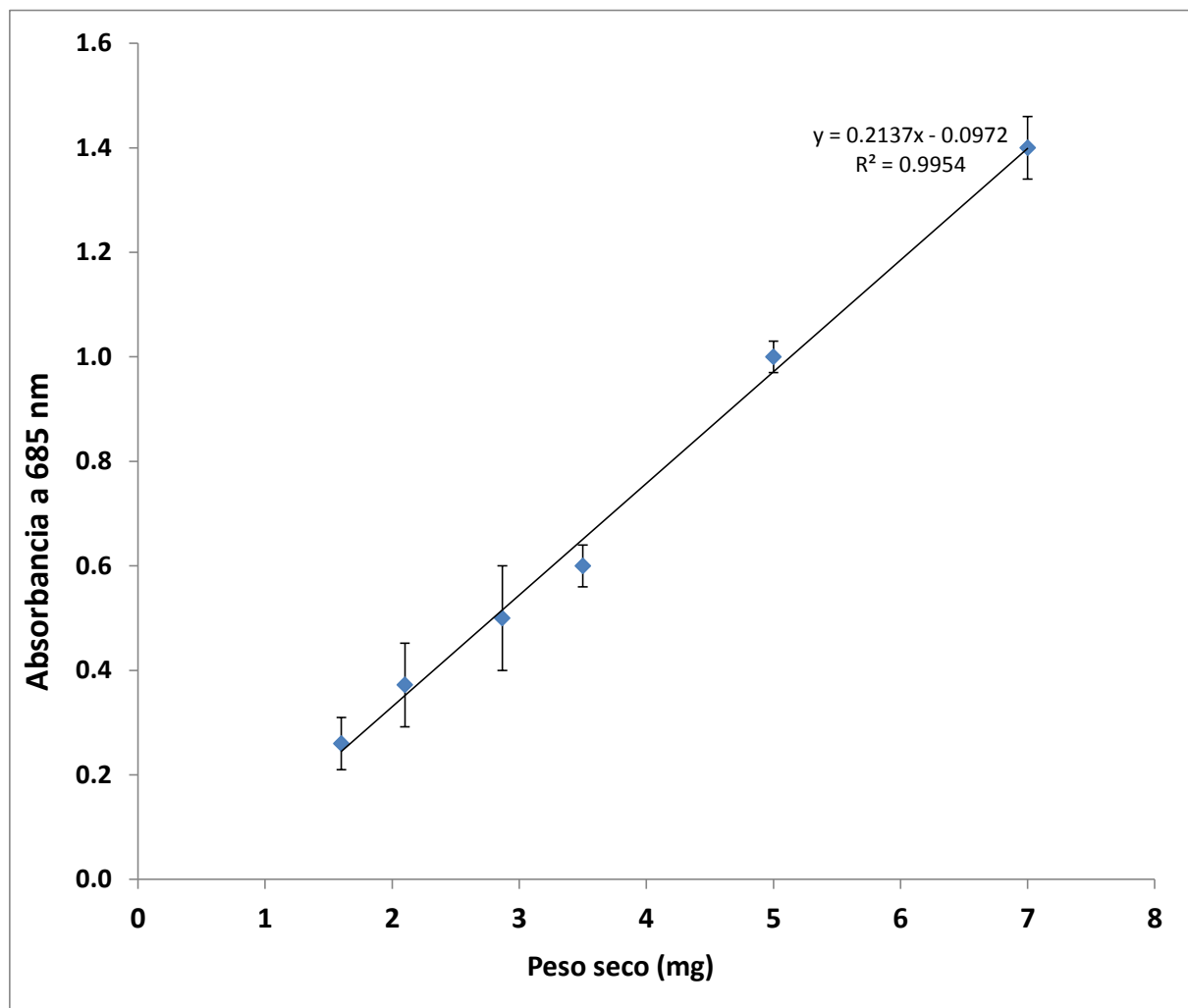


Figura 4.3 Relación entre la absorbancia medida a 685 nm con la cantidad en peso seco de la biomasa recuperada de 15 mL de medio de cultivo de *S. capricornutum*.

En la figura 4.3 se observa que para obtener aproximadamente 5 mg de biomasa seca de microalgas es necesario obtener una lectura de absorbancia de 1.00. Esta cantidad de biomasa tan pequeña se seleccionó para desarrollar la metodología de extracción de los compuestos en estudio porque más adelante se planearían ensayos de exposición a los HAPs en 15 mL de medio. En estudios previos (García de Llasera & Olmos-Espejel, 2011) ya se había logrado miniaturizar satisfactoriamente los métodos de EFS y DMFS fuera de línea para la extracción de HAPs de otros microorganismos como los protozoarios, utilizando muestras de 15 mL de medio de cultivo líquido y una cantidad de biomasa de 5 mg. Entonces,

en los bioensayos del presente trabajo se decidió utilizar cultivos que tuvieran un tiempo de desarrollo aproximado de 10 días, verificando que la absorbancia fuera cercana a la unidad.

4.1.3. Monitoreo del crecimiento de cultivos de *Colpoda cucullus*

Se adquirió una cepa pura *Colpoda cucullus* ATCC® 30916, con la cual se lograron mantener cultivos con células viables hasta por 5 días porque inicialmente se trabajó con una sepa de *C. cucullus* que no era pura y esto provocaba que los cultivos tuvieran tiempos de vida muy cortos, menores a 2 días

También se probaron diferentes medios de cultivo para optimizar el desarrollo de los protozoarios como son infusiones de alfalfa, lechuga, trigo y cebada, siendo esta última la que proporcionó los mejores resultados. Cada infusión fue inoculada con la bacteria *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048 24 h antes de sembrar al protozoario (Przybos et al. 2002).

La variación en el tiempo del número promedio de células por mL de cultivo se presenta en la figura 4.4.

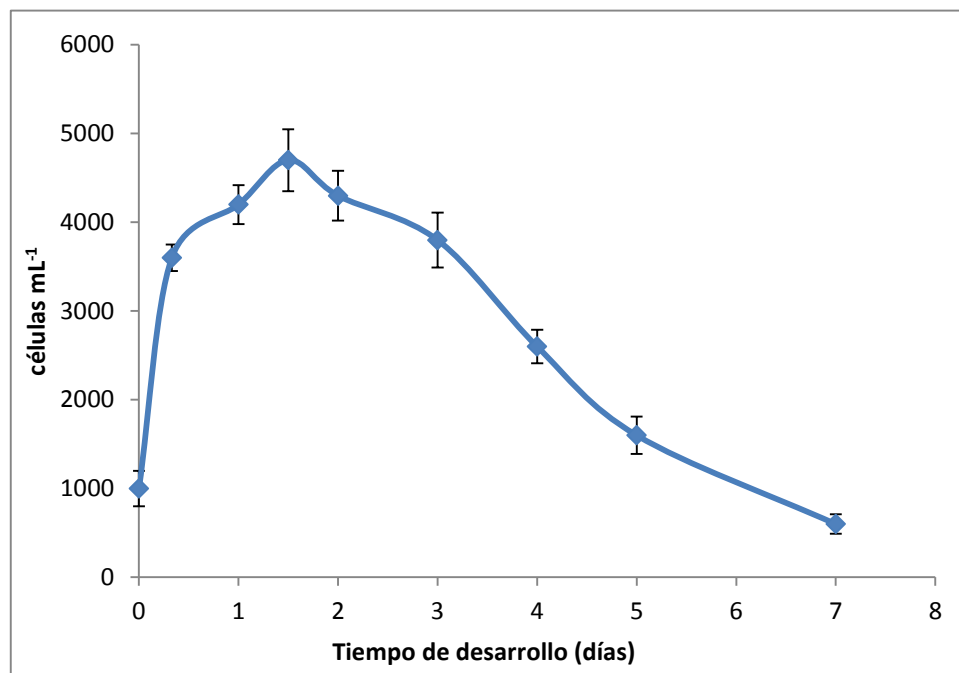


Figura 4.4 Variación del número de células del protozoario *C. cucullus* por mL de cultivo durante diferentes tiempos de desarrollo del cultivo.

En la figura 4.4 se puede observar que los protozoarios presentan un crecimiento más acelerado que las microalgas ya que alcanzan la cantidad máxima de células en un intervalo de tiempo entre 1 y 2 días

de desarrollo del cultivo. A pesar de esto, el número de células máximo obtenido para cada microorganismo resultó de orden diferente, más bajo. Mientras que los cultivos de microalgas logran alcanzar un número de células mayor a 5.6×10^6 células mL^{-1} , los protozoarios solo alcanzan valores promedio cercanos a 4.7×10^3 células mL^{-1} . Esto tuvo un gran efecto sobre la cantidad de biomasa obtenida en 15 mL de cultivo de protozoarios.

También se observa en la figura 4.4 que después del día 3 de desarrollo, el número de células comienza a decaer drásticamente. Este efecto se atribuye a la falta de alimento y cambios en la composición del medio debidos al propio metabolismo del protozoario. Aun cuando la materia orgánica del cultivo y las bacterias *Enterobacter aerogenes* agregadas sirvieron de alimento para los protozoarios al inicio del desarrollo y posteriormente se continuó agregando al cultivo periódicamente una mayor cantidad de bacterias, no se logró mantener el número de células de protozoarios estable.

4.1.4. Determinación de la biomasa recuperada de protozoarios

Se evaluó el volumen máximo de cultivo en donde se podían hacer crecer las células del protozoario y se determinó que en 90 mL se logran mantener células viables del organismo. Este volumen resultó ser límite ya que debido a que los protozoarios no tienen pared celular, son más susceptibles a cambios en las condiciones del medio de cultivo. Por lo tanto, al aumentar el volumen de cultivo a valores mayores a 90 mL, la misma presión hidrostática ejercida por el medio en la superficie celular provoca la ruptura de las células.

Con esto, se determinó la cantidad de biomasa que se podía recuperar cultivando a los protozoarios en 90 mL de cultivo y colectándolos en 15 mL a diferentes tiempos de desarrollo. Los resultados se presentan en la figura 4.5 en donde se observa que entre un tiempo de desarrollo de 1 a 3 días, se logra obtener una cantidad de biomasa aproximada de 2 mg. De esta forma se estableció utilizar esta cantidad de biomasa para desarrollar el método de extracción por DMFS y seguir analizando solo 15 mL del cultivo de protozoarios al igual que con las muestras de microalgas.

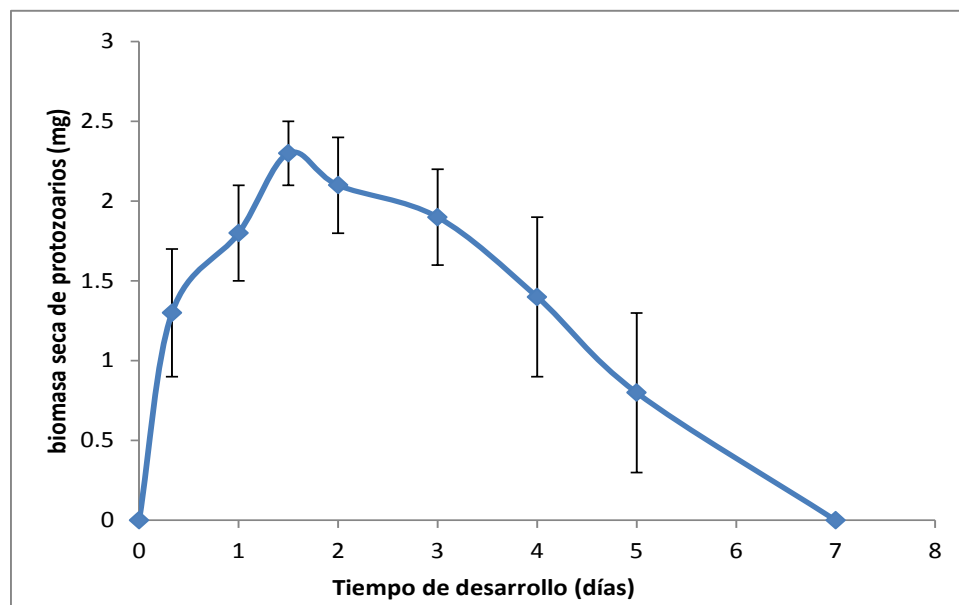


Figura 4.5 Cantidad de biomasa seca de protozoarios recuperada a partir de cultivos desarrollados en un volumen de 90 mL a diferentes tiempos de crecimiento.

4.2. Análisis de los HAPs y metabolitos por cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia (CLAR-DF)

4.2.1. Optimización de la separación cromatográfica

La optimización de la separación cromatográfica para el análisis de los compuestos en estudio se basó en los resultados de la variación del tiempo de retención (t_r) con la composición de la fase móvil que se presentan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1.

Tiempos de retención de los HAPs y metabolitos en estudio utilizando diferentes proporciones de metanol/agua en la fase móvil

Compuesto	Porcentaje de MeOH en mezcla MeOH/agua							
	100	95	90	85	80	70	65	60
	t_r (min)							
9,10-dihidrodiol BaP	ND	3.10	3.17	3.50	3.91	5.07	7.00	9.70
4,5-dihidrodiol BaP	ND	3.94	4.03	5.05	6.52	9.87	19.00	26.70
9-OH BaP	ND	6.47	7.95	10.11	20.65	ND	ND	ND
3-OH BaP	ND	7.17	9.14	12.09	25.70	ND	ND	ND
BaA	6.05	8.13	13.11	19.20	ND	ND	ND	ND
BbF	7.90	11.23	19.23	27.10	ND	ND	ND	ND
BkF	8.18	11.85	20.36	31.28	ND	ND	ND	ND
BaP	9.28	13.70	22.97	35.16	ND	ND	ND	ND

ND= No Determinado

Se obtuvieron los valores de $\log k'$ para los metabolitos en cada una de las fases móviles utilizadas. Los resultados se presentan en la figura 4.6. En la figura 4.6A se puede observar que los dos benzofluorantenos tienen curvas que corren paralelas y muy cercanas, por lo que presentan dificultades para separarse satisfactoriamente usando una fase móvil isocrática. Solo hasta que se utiliza una composición de 85% de metanol y 15% de agua es posible alcanzar un valor de resolución (R_s) adecuado entre los dos picos, >1.62 . En la figura 4.6B se aprecia que para los cuatro metabolitos, los valores de k' obtenidos con cada fase móvil utilizada son suficientes para permitir una adecuada separación de los analitos.

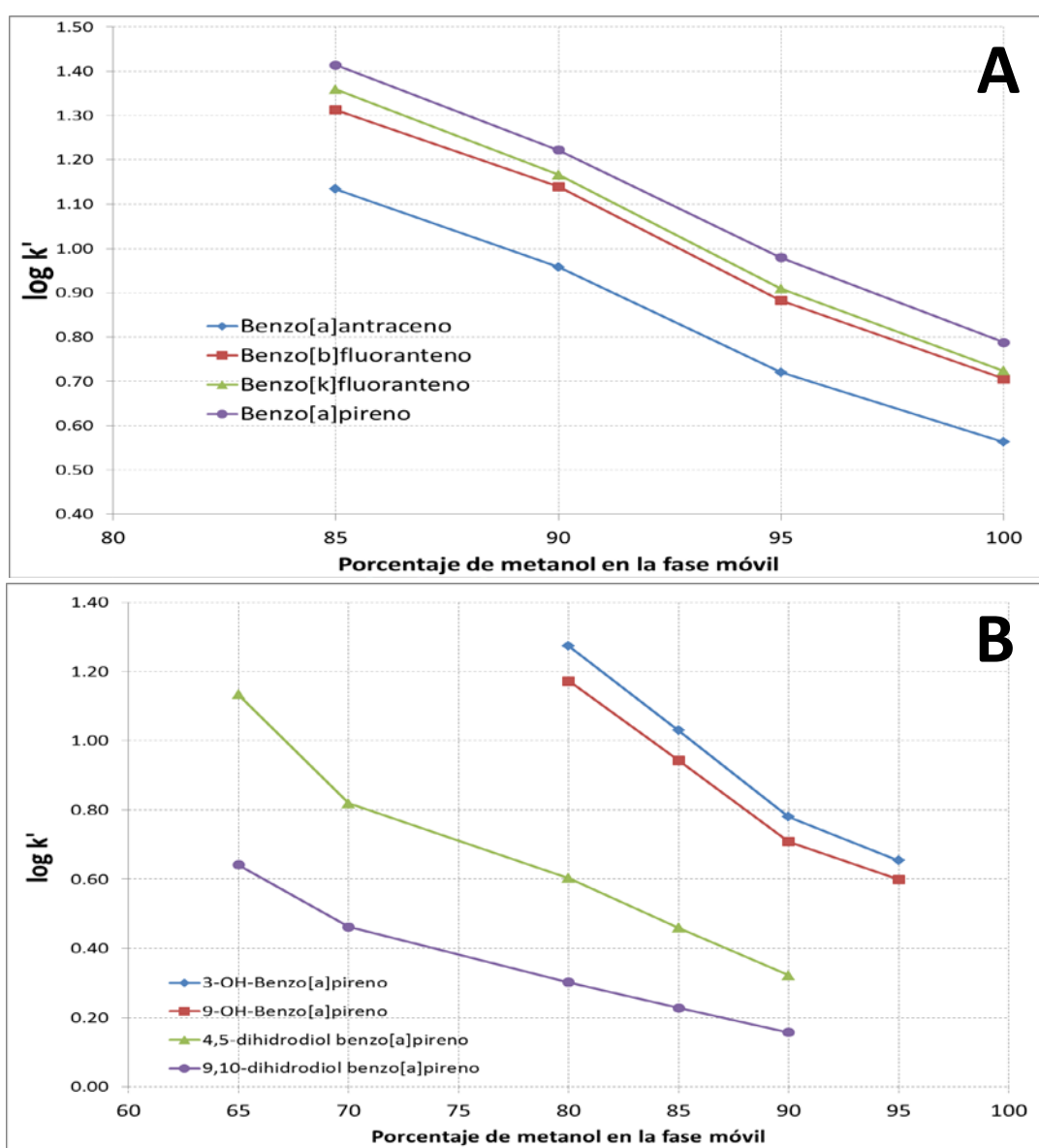


Figura 4.6 Variación del log del factor de capacidad (k') de (A) los HAPs y (B) metabolitos del BaPen estudio.

Se observa también que los valores de $\log k'$ obtenidos para los cuatro HAPs y los dos OH-BaP son cercanos cuando la composición de la fase móvil es 85%, mientras que los dihidrodiol presentan factores de retención con valores menores que el resto de los compuestos. Esto demuestra una amplia variabilidad en la polaridad de los analitos estudiados. En la figura 4.7 se muestra que una fase móvil con 85% de metanol fue capaz de separar satisfactoriamente a todos los analitos en una disolución estándar. Sin embargo, como se explica más adelante en la sección 4.3.4 de este trabajo, se observó que la presencia de interferentes provenientes de las muestras analizadas, impedía una correcta separación de los picos cromatográficos correspondientes a los dos dihidrodiol, que eluyen rápidamente, al principio del cromatograma.

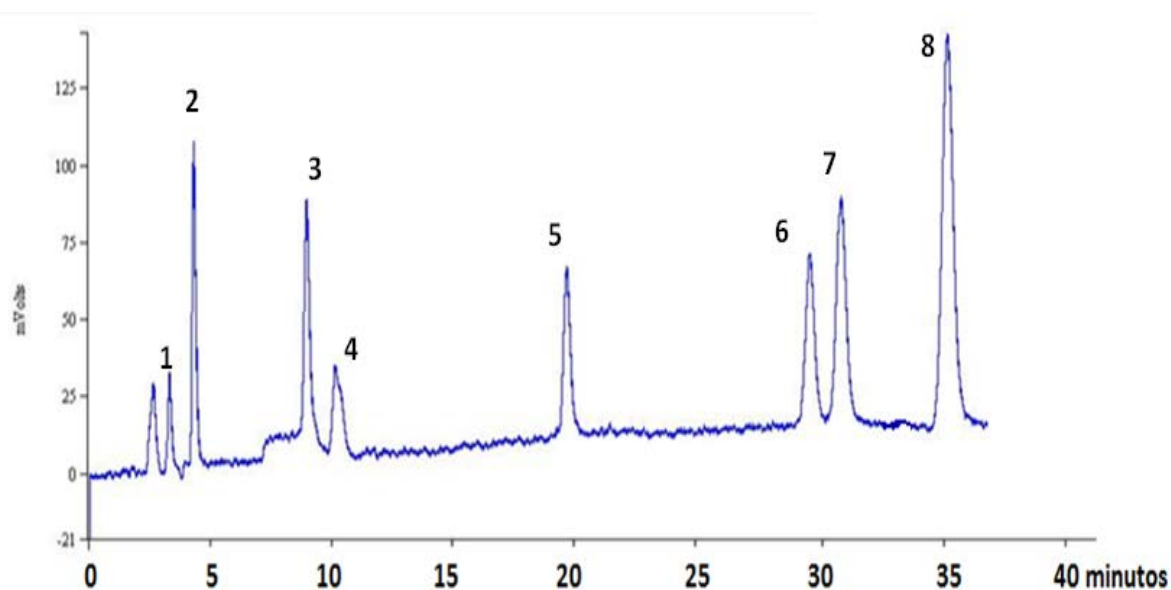


Figura 4.7 Cromatograma obtenido con una mezcla de HAPs y metabolitos del BaP todos a una concentración de 2 ng mL^{-1} , utilizando una fase móvil MeOH/Agua (85:15) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5. Detector de fluorescencia. 1= 9.10-benzo[a]pireno dihidrodiol; 2= 4.5-benzo[a]pireno dihidrodiol; 3= 9-hidróxi-benzo[a]pireno; 4= 3-hidróxi-benzo[a]pireno; 5= benzo[a]antraceno; 6= benzo[b]fluoranteno; 7= benzo[k]fluoranteno; 8=benzo[a]pireno

Por esta razón, los compuestos 3-OH BaP, 9-OH BaP, BaA, BbF, BkF y BaP, fueron separados utilizando una fase móvil de composición metanol/agua (85:15 v/v) mientras que los dos dihidrodiol se separaron aparte utilizando una fase móvil de composición metanol/agua (65:35 v/v). Ejemplos de las separaciones cromatográficas realizadas con estas condiciones se presentan en la figura 4.8.

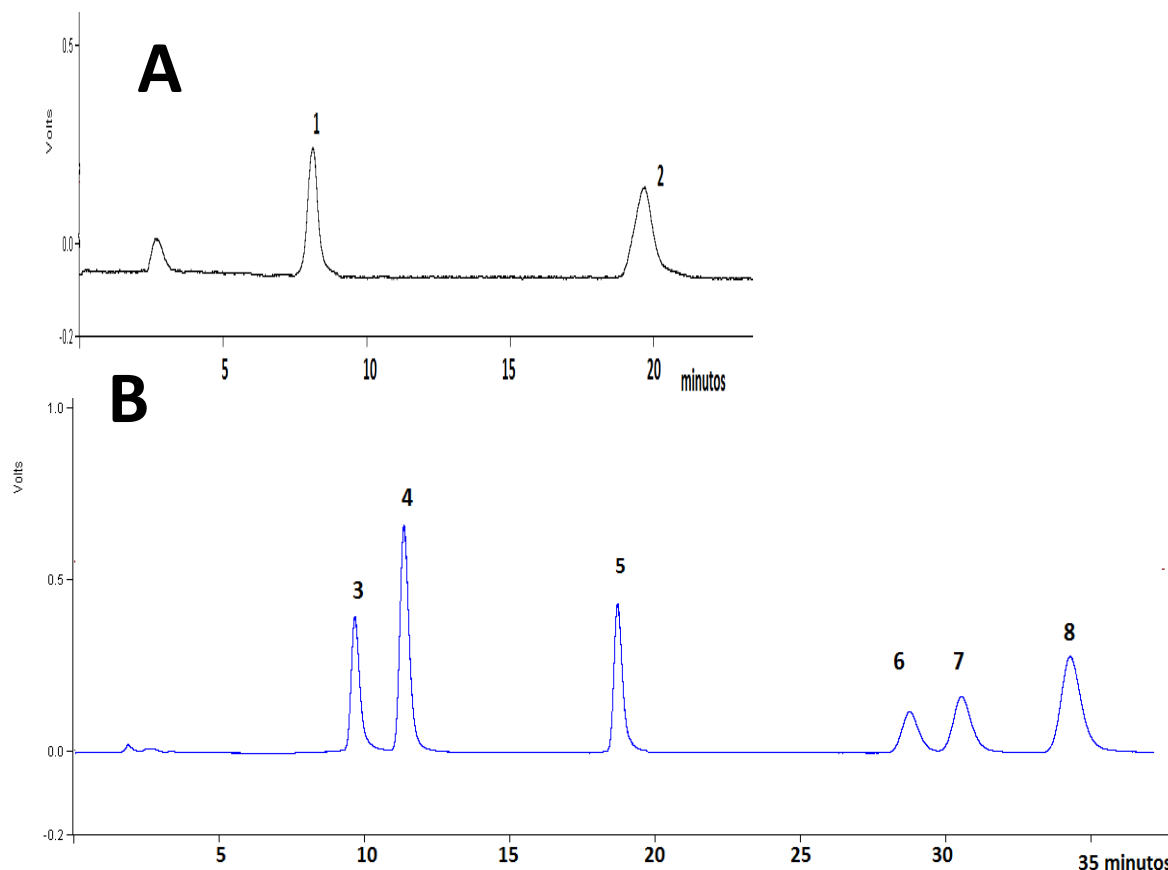


Figura 4. 8 (A) Cromatograma obtenido para una mezcla de los dos dihidrodioles del BaP utilizando una fase móvil MeOH/Agua (65:35) y (B) Cromatograma obtenido para una mezcla de los cuatro HAPs y los dos OH-BaP con una fase móvil MeOH/Agua (85:15). 1= 9.10-benzo[a]pireno dihidrodiol; 2= 4.5-benzo[a]pireno dihidrodiol; 3= 9-hidróxi-benzo[a]pireno; 4= 3-hidróxi-benzo[a]pireno; 5= benzo[a]antraceno; 6= benzo[b]fluoranteno; 7= benzo[k]fluoranteno; 8=benzo[a]pireno

4.2.2. Validación del sistema cromatográfico para los compuestos

En la tabla 4.2 se muestran los resultados obtenidos para la validación del sistema cromatográfico. El sistema presentó una buena linealidad con coeficientes de correlación (r^2) mayores a 0.993 para todos los analitos. La precisión del sistema también resultó buena con coeficientes de variación (C.V.) menores al 3.94%.

La presencia de los anillos aromáticos en la estructura de los HAPs permite alcanzar límites de detección y cuantificación del orden de los ng mL^{-1} para todos los compuestos utilizando el detector de fluorescencia. Alcanzar estos límites resulta importante debido a que en el análisis de HAPs en muestras ambientales presentan concentraciones cercanas a estos valores. Sin embargo, las agencias ambientales establecen concentraciones máximas permitidas entre 0.1 y 0.2 ng mL^{-1} para este tipo de contaminantes

y se requiere contar con metodologías sensibles que permitan cuantificar a los HAPs de forma exacta a estos niveles de concentración. La sensibilidad obtenida con el sistema cromatográfico no permite determinar con exactitud concentraciones menores a 0.4 ng mL^{-1} para los HAPs y menores a 1.23 ng mL^{-1} para los metabolitos del BaP estudiados. Sin embargo, como se puede ver en las secciones siguientes, al acoplar en línea a la EFS con el sistema cromatográfico se logró alcanzar la sensibilidad adecuada para analizar con exactitud muestras que se encuentran en estos valores de concentraciones máximas permitidas.

Tabla 4.2

Resultados de la validación del sistema cromatográfico para los 4 metabolitos.

Compuesto	Coeficiente de correlación (r^2)	L. D. T. ^a (ng mL^{-1})	L. D. E. ^b (ng mL^{-1})	L. C. ^a (ng mL^{-1})	Repetibilidad (C.V. %) ^d	
					1 ng mL^{-1}	10 ng mL^{-1}
9,10-dihidrodiol BaP	0.994	0.47	0.2	1.55	3.94	1.57
4,5-dihidrodiol BaP	0.998	0.37	0.2	1.23	3.79	1.80
9-OH-Benzo[a]pireno	0.993	0.38	0.1	1.63	1.90	1.50
3-OH-Benzo[a]pireno	0.996	0.46	0.1	1.52	3.58	2.11
BaA	0.994	0.124	0.1	0.413	2.75	1.80
BbF	0.997	0.196	0.2	0.653	2.89	1.97
BkF	0.996	0.127	0.2	0.423	3.44	2.08
BaP	0.995	0.119	0.1	0.396	3.87	1.99

^a Calculado en base a la desviación y la pendiente de la curva de calibración (García, 2002).

^b Medido como la concentración que proporciona una señal que es 3 veces mayor que el ruido de fondo.

^d 5 inyecciones de disoluciones estándar de dos concentraciones en diferentes días.

L.D.T.= Límite de Detección Teórico; L.D.E.= Límite de Detección Experimental; L.C.= Límite de cuantificación. C.V. = Coeficiente de Variación.

Intervalo de concentraciones de la curva de calibración: para los dihidrodiolios $1\text{-}15 \text{ ng mL}^{-1}$; para el resto de los compuestos $0.7\text{-}10 \text{ ng mL}^{-1}$.

4.3. Desarrollo del método de extracción de HAPs y metabolitos por EFS fuera de línea

4.3.1. Optimización de la extracción por EFS fuera de línea

Diferentes autores han reportado la dificultad que se tiene para obtener buenos recobros al extraer HAPs de muestras acuosas (Marcé, 2000; Brum, 2009). La mayoría coinciden en que debido a la baja solubilidad de los HAPs en agua, estos se adhieren a las paredes de los recipientes que contienen la muestra. En ocasiones los recobros suelen mejorar al adicionar un modificador orgánico para aumentar la solubilidad de los HAPs en la muestra y la cantidad de hidrocarburo que pasa a través del cartucho de EFS.

En trabajos previos se determinó que el isopropanol es una buena opción para mejorar los recobros de los HAPs por EFS (Buseti et al, 2006; García de Llasera & Olmos-Espejel, 2011). Sin embargo, su proporción en la muestra es crítica debido a que si es lo suficientemente alta, puede aumentar su fuerza eluyente provocando la fuga de los compuestos más polares, como son los dihidrodioles. Los recobros obtenidos en la extracción de los compuestos agregando diferentes porcentajes de isopropanol se presentan en la figura 4.9. En dicha figura se puede apreciar que el isopropanol mejora los rendimientos de extracción para cada metabolito. Para los compuestos OH-BaP y PAH se aprecia una tendencia a aumentar el recobro aumentando la proporción de isopropanol hasta 25%; mientras que para los dihidrodioles, un porcentaje de isopropanol de 20% en la muestra resulta ser el límite que proporciona los mejores rendimientos, debido a que al aumentar este porcentaje, se presenta fuga de estos compuestos y el recobro disminuye.

De esta forma para el desarrollo del método de EFS se utilizó un 20% de isopropanol para favorecer la recuperación de los metabolitos producidos en los ensayos de exposición a los HAPs aun cuando los HAPs presentan recobros comparativamente menores que los metabolitos.

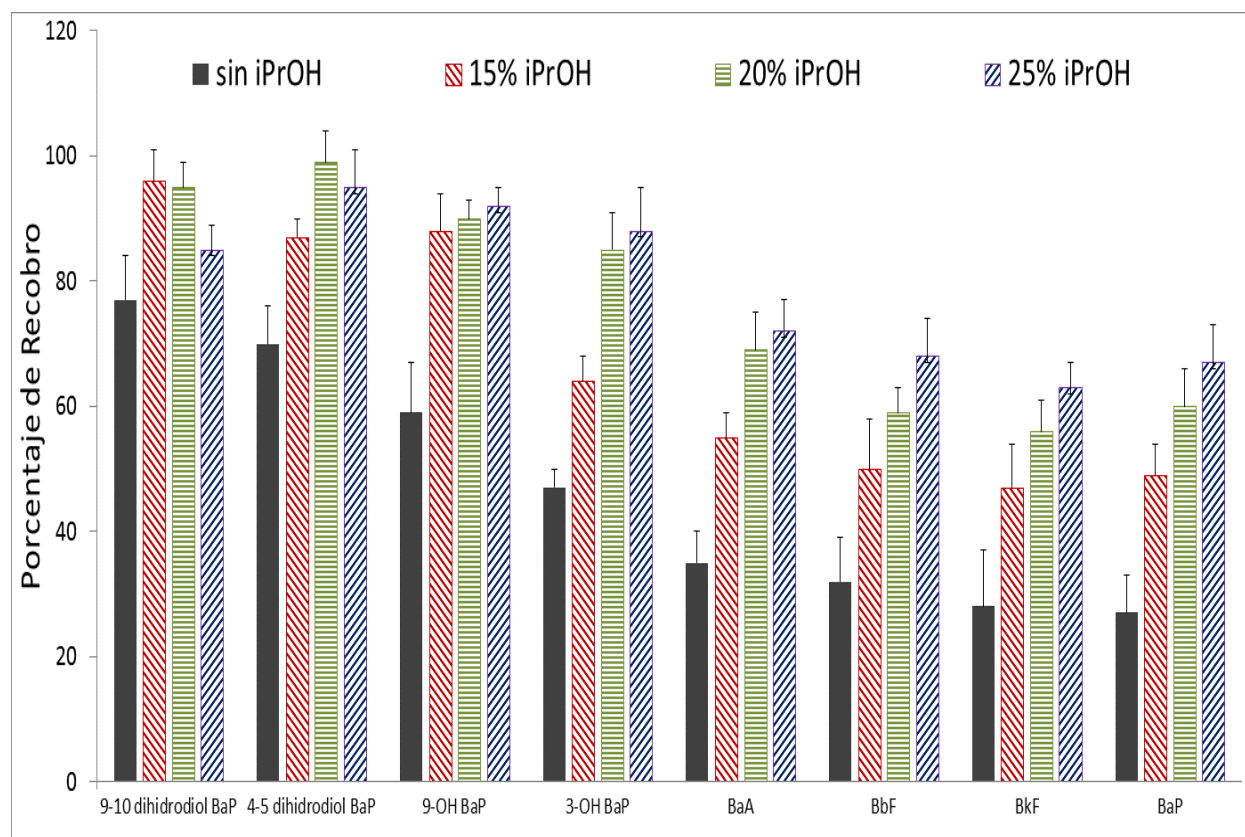


Figura 4.9 Efecto del porcentaje (v/v) de isopropanol (iPrOH) en los recobros por EFS usando un cartucho con 300 mg de fase C-18 PAH Chromabond y un volumen de 15 mL de agua fortificada con los analitos a una concentración de 2 ng mL^{-1} .

4.3.1.1. Implementación de una secuencia de limpieza del cartucho de EFS

Debido a que los cultivos de microorganismos son mezclas muy complejas, fue necesario establecer una secuencia de limpieza en el cartucho que permitiera eliminar selectivamente la mayor cantidad de interferentes antes de recuperar a los analitos. Para esto se probaron diferentes eluentes de fuerza débil que pudieran eliminar interferentes del cartucho, una vez que fue aplicada la muestra, sin que se desorbieran los compuestos de interés.

En la tabla 4.3 se puede observar que es posible aplicar al cartucho de EFS agua (10 mL), MeCN 10% (10 mL) y MeCN 20% (3 mL) sin provocar pérdidas de los metabolitos del BaP más polares. Con disolventes menos polares como MeCN al 30 y 40% se generan pérdidas de los dihidrodiolos, del orden de 3 y 15%.

Tabla 4.3

Evaluación de la fuga de los analitos del cartucho de EFS al aplicar diferentes disolventes de limpieza.

Compuesto	% de fuga global para cada disolución					% recobro Elución con 5 mL de MeCN 100%
	10 mL de agua	10 mL MeCN:Agua 10:90	3 mL MeCN:Agua 20:80	1 mL MeCN:Agua 30:70	1 mL MeCN:Agua 40:60	
9-10 dihidrodiol BaP	---*	---	1	3	15	75
4-5 dihidrodiol BaP	---	---	N. D.**	N. D.	8	90
9-OH BaP	---	---	N. D.	N. D.	N. D.	90
3-OH BaP	---	---	N. D.	N. D.	N. D.	85
BaA	---	---	N. D.	N. D.	N. D.	69
BbF	---	---	N. D.	N. D.	N. D.	59
BkF	---	---	N. D.	N. D.	N. D.	56
BaP	---	---	N. D.	N. D.	N. D.	60

*---=No analizado; **N. D. = No detectado

Finalmente se decidió utilizar la fracción de 1 mL de MeCN al 30% como eluente de limpieza porque además de mejorar la forma de los cromatogramas obtenidos al analizar los dihidrodioles en las muestras de cultivos de microorganismos, no genera pérdidas mayores a 3% para los compuestos.

4.3.1.2. Optimización de la elución de los analitos en dos fracciones diferentes E1 y E2

Debido a la diferencia de polaridades entre los dihidrodioles y el resto de los analitos, se decidió separar los analitos en dos fracciones diferentes. Esto ayudaría a mejorar los recobros en el proceso de preconcentración de las muestras en el sistema en línea.

De esta forma se obtuvieron los frentes de elución de los compuestos utilizando diferentes disoluciones eluentes de MeCN/agua. Los resultados se presentan en la figura 4.10.

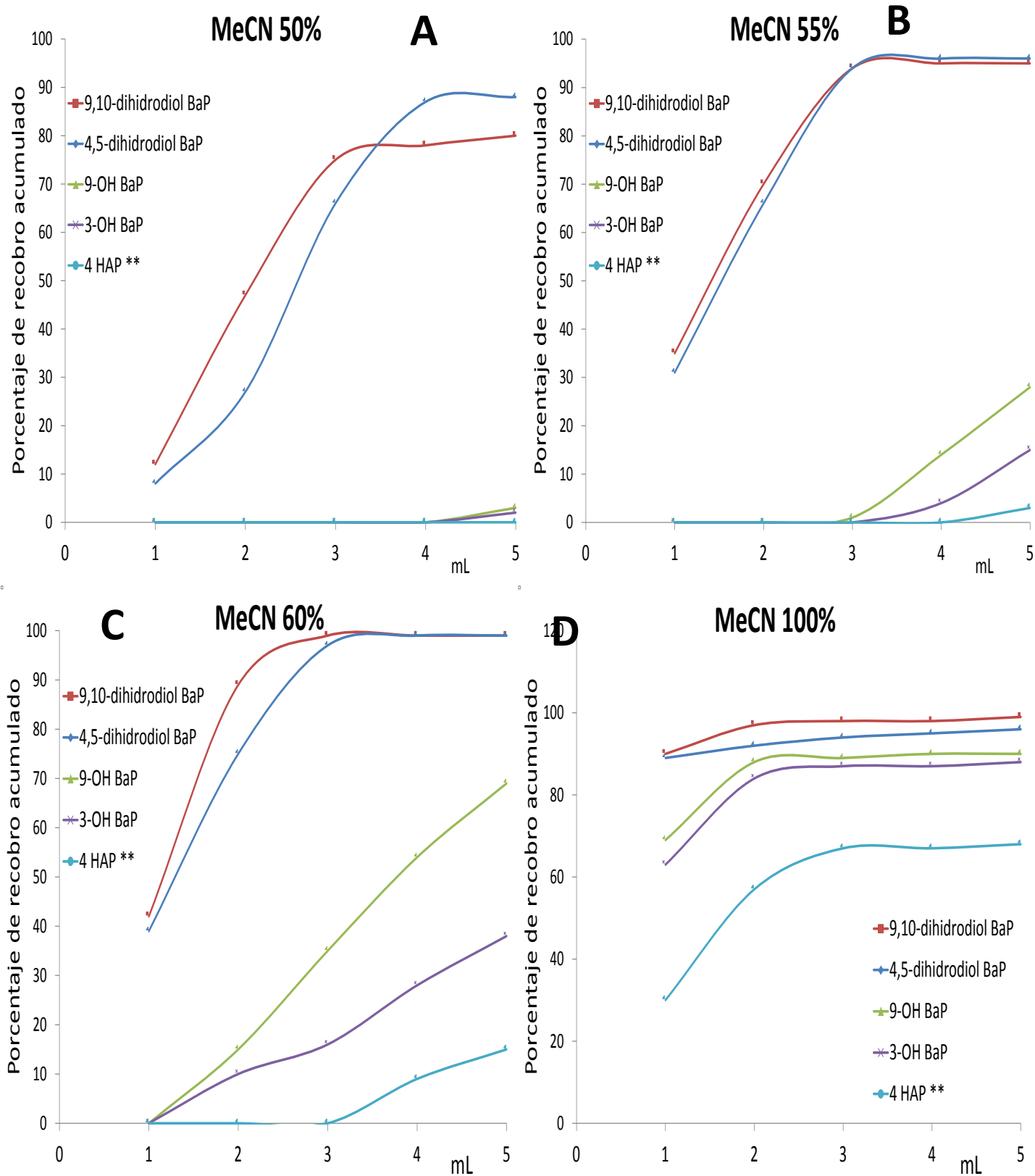


Figura 4.10 Frentes de elución de los analitos en el cartucho de EFS.

**Recobro promedio para los HAPs: BaA, BbF, BkF y BaP.

En la figura 4.10A se puede apreciar que con un volumen de 4 mL de MeCN al 50% se pueden recuperar del cartucho los dihidrodióles sin que eluyan el resto de los analitos. Los recobros totales que se obtuvieron para los dihidrodióles en este ensayo estuvieron entre 76 y 89%.

Cuando se utiliza una disolución de MeCN 55% (ver Fig 4.10.B) se logra disminuir a 3 mL el volumen para recuperar selectivamente a los dihidrodióles y se mejoran los recobros que resultaron entre 91 y 94%, aunque se empiezan a eluir los OH-BaP en un bajo porcentaje

Al utilizar una disolución de MeCN al 60%, como se muestra en la figura 4.10C, se alcanzaron los mejores rendimientos de extracción para los dihidrodióles con un volumen de 3 mL. Sin embargo, la extracción selectiva no se logró ya que en ese volumen de elución se recuperaron también entre 15 y 35 % de los OH-BaP. En la figura 4.10.D se observa que al utilizar 3 mL de MeCN al 100% se alcanzan los recobros máximos para cada analito.

Considerando lo anterior, se determinó que para recuperar a los analitos del cartucho de EFS se utilizarían 3 mL de MeCN al 55% para eluir los dihidrodióles en un primer extracto (abreviado como E1) y después con 3 mL de MeCN 100% recuperar a los OH-BaP y PAH en un segundo extracto (nombrado como E2). Se debe recordar que la recuperación de los compuestos en dos extractos diferentes se debió a que si se recuperaban todos juntos con el metanol puro, se presentan interferencias en los cromatogramas en los tiempos de retención de los dihidrodióles.

Finalmente, se probó por triplicado la secuencia completa de disolventes de limpieza de interferentes y de elución de los analitos. Los recobros se presentan en la tabla 4.4. Como se observa en esta tabla, se obtuvo una buena reproducibilidad en los recobros de los analitos con % de C. V. menores a 5, a excepción del 3-OH BaP (% C.V. <9). Se puede notar que los dihidrodióles son separados en el extracto E1 selectivamente del resto de los compuestos.

Estas condiciones permiten obtener recobros satisfactorios mayores al 62% aunque los recobros para los metabolitos del BaP disminuyen en comparación con los ensayos donde no se utiliza la secuencia de limpieza. Esta disminución podría deberse a la inestabilidad que presentan los metabolitos en disoluciones acuosas, como se señala en la sección de los antecedentes. Para estabilizar a los compuestos y por lo tanto mejorar estos recobros, podría haberse agregado a la muestra algunas

sustancias como antioxidantes, surfactantes, modificadores del pH. Sin embargo, como la muestra es un medio de cultivo donde ocurre el crecimiento de los microorganismos, la adición de cualquiera de estas sustancias inhibiría dicho desarrollo (Jongeneelen et al., 1985; Nyber, 1988; Gündel, 2000; Simon et al., 2000; Richardson, 2004).

Tabla 4.4

Recobros promedio al utilizar la secuencia de limpieza y elución completa para el método de EFS fuera de línea.

Compuesto	Limpieza*	Recuperación de los analitos	
		E1 (3 mL MeCN 55%)	E2 (3 mL MeCN 100%)
9,10- dihidrodiol BaP	NI	86	---
4,5- dihidrodiol BaP	NI	82	---
9-OH BaP	NI	---	69
3-OH BaP	NI	---	62
BaA	NI	---	73
Bbf	NI	---	70
BkF	NI	---	71
BaP	NI	---	67

*10 mL agua, 10 mL MeCN10%, 2.5 mL MeCN 20%, 1 mL MeCN 30%.

---=No determinado.

D.E.=Desviación estándar

4.4. Montaje del sistema EFS-CLAR en línea

Con el sistema EFS-CLAR en línea descrito en la sección 3.3.3 se optimizaron las condiciones de preconcentración de los extractos obtenidos con el método de EFS fuera de línea.

4.4.1. Optimización de la preconcentración y análisis en línea de los HAPs y metabolitos del BaP con disoluciones estándar a diferentes porcentajes de disolvente orgánico (extractos E1 y E2 simulados)

Debido a que los extractos E1 y E2 son demasiado fuertes como eluentes para preconcentrar a los analitos en el sistema en línea y provocaban su fuga; entonces, fueron preparadas mezclas acuosas con diferente porcentaje de MeCN y fortificadas con los analitos para simular la composición de la mezcla hidro-orgánica apropiada para los extractos E1 y E2. Cada mezcla fue analizada con el sistema en línea y los resultados se presentan en la figura 4.11.

Para el extracto E1 se observa que los porcentajes de recobro de los dihidrodiol aumentan al disminuir la proporción de MeCN en la muestra. Los porcentajes óptimos se alcanzaron con una proporción de MeCN al 10% que es lo suficientemente polar para permitir la retención de los analitos en la precolumna. Los recobros promedio estuvieron entre 92 y 102%.

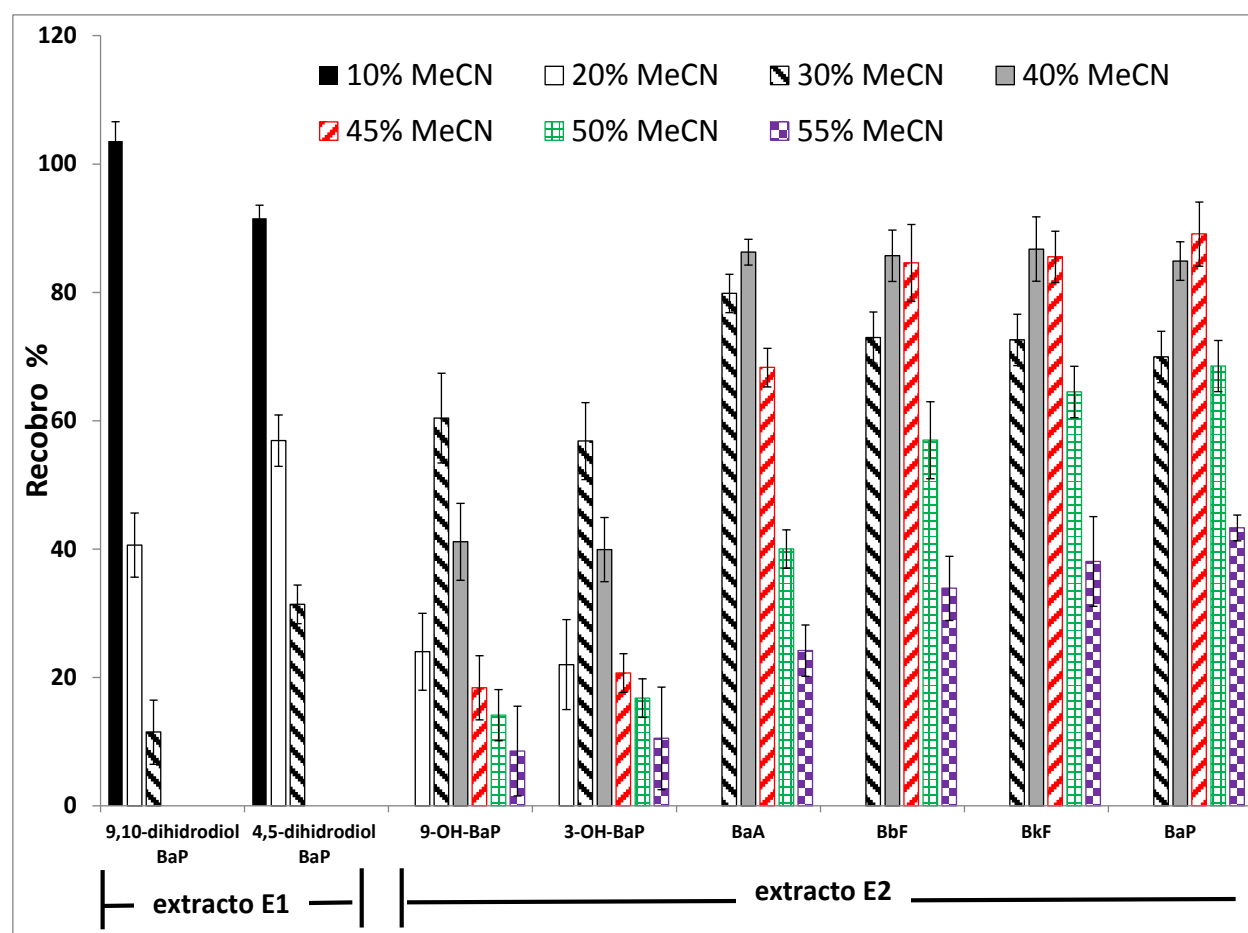


Figura 4.11 Optimización de la dilución de extractos simulados para la preconcentración por EFS-CLAR en línea. Efecto del porcentaje de MeCN en el recobro de los analitos al preconcentrar 20 mL (E1) u 8 mL (E2) de disoluciones acuosas a una concentración de 8 pg mL^{-1} and 27 pg mL^{-1} , respectivamente.

En la misma figura 4.11 se observa que para los OH-BaP en el extracto E2 simulado, los recobros máximos se alcanzan con una proporción de 30% de MeCN en la muestra. Mientras que para los HAPs en ese mismo extracto, los mejores resultados se obtienen cuando la muestra tiene 40% de MeCN.

Para los dos grupos de compuestos, OH-BaP y HAPs, se observa que si se aumenta o disminuye la proporción de MeCN con respecto a los porcentajes óptimos, los recobros disminuyen. Este efecto

puede explicarse de la siguiente forma. Cuando se tienen muestras con porcentajes de MeCN menores al óptimo, los metabolitos y los HAPs sufren un proceso de adsorción a las paredes del recipiente que los contiene. Esto hace que la cantidad de analitos que pasa a través de la precolumna disminuya. Por otro lado, cuando el porcentaje de MeCN es mayor al óptimo, se tiene la suficiente fuerza eluyente para que se presente la fuga de los analitos en la precolumna de concentración.

De esta forma, se estableció que los extractos E1 provenientes de la EFS fuera de línea deben diluirse con agua hasta alcanzar un contenido del 10% de MeCN. Los extractos E2 se deben llevar hasta un porcentaje de 30% de MeCN en el extracto diluido. Aunque los mejores recobros para los HAPs son utilizando 40% de MeCN en el extracto diluido, se decidió usar 30% de MeCN como compromiso para favorecer el análisis de los metabolitos del BaP porque suelen producirse a concentraciones mucho menores en comparación a la que se encuentran los HAPs en los ensayos de exposición.

En la tabla 4.5, se resumen los porcentajes de MeCN óptimos para la preconcentración de los extractos obtenidos por EFS, E1 y E2.

Tabla 4.5

Porcentajes de MeCN en los extractos obtenidos con el método de EFS-EFS/CLAR y diluciones que se deben hacer para su preconcentración en línea.

Método	Extracto	Compuestos	% MeCN inicial en el extracto	Volumen del extracto (mL)	Volumen de agua agregado (mL)	% MeCN del extracto diluido
EFS-EFS/CLAR	E1	Dihidrodióles	55	3	13.5	10
	E2	OH-BaP, PAHs	100	3	7	30

4.4.2. Validación del sistema de EFS-CLAR en línea con disoluciones estándar de los analitos

Con los porcentajes de agua y acetonitrilo optimizados para los dos extractos se realizó la validación del sistema en línea con disoluciones.

Se evaluó la linealidad, los límites de detección y cuantificación, reproducibilidad y el recobro global, medido como la pendiente de la curva de cantidad recuperada vs cantidad agregada. Los resultados de la validación se presentan en la tabla 4.6. Se obtuvo buena linealidad para todos los compuestos con coeficientes de correlación mayores a 0.994. La reproducibilidad fue buena con coeficientes de variación menores a 7.76

para todos los compuestos, los cuales son aceptables al nivel de concentraciones que se trabaja. Los hidróxidos del BaP son los compuestos que presentaron una mayor variación por lo cual se tuvo que trabajar en un intervalo de concentraciones mayor (0.02 a 0.2 ng mL⁻¹). Para los dihidrodioles se obtuvieron recobros mayores a 90%. Los dos hidróxidos tuvieron los recobros más bajos, entre 58 y 61%. Los HAP's presentaron recobros entre 68 y 80%.

Tabla 4.6
Resultados de la validación del sistema en línea EFS-CLAR

Compuesto	r ²	Ecuación de la recta ng recuperados vs ng agregados**	Repetibilidad (C.V. %)*	Intervalo de concentraciones de la curva (ng mL ⁻¹)	L. D. (ng mL ⁻¹)	L. C. (ng mL ⁻¹)
9,10-dihidrodiol BaP	0.9968	Y=0.9400x+0.0012	4.28	0.007 - 0.067	0.0010	0.0033
4,5-dihidrodiol BaP	0.9947	Y=0.9020x-0.0005	3.67	0.007 - 0.067	0.0006	0.0020
9-OH-BaP	0.9976	Y=0.6183x+0.0001	7.76	0.02 - 0.200	0.007	0.0233
3-OH-BaP	0.9963	Y=0.5804x+0.0003	7.57	0.02 - 0.200	0.019	0.063
BaA	0.9961	Y=0.8074x+0.0006	1.40	0.005 - 0.080	0.0007	0.0233
BbF	0.9970	Y=0.7357x+0.0001	2.96	0.005 - 0.080	0.0017	0.0056
BkF	0.9984	Y=0.7419x+0.0001	3.05	0.005 - 0.080	0.0012	0.0040
BaP	0.9944	Y=0.6854x+0.0017	2.22	0.005 - 0.080	0.0006	0.0020

* Medida con 5 ensayos en diferentes días a una concentración de 0.03 ng mL⁻¹ de cada compuesto.

**La pendiente multiplicada por 100 representa el recobro global obtenido.

De esta forma, todos los compuestos presentaron límites de detección excelentes aun cuando los compuestos 3-OH BaP y 9-OH BaP presentaron los límites de detección más altos. Si comparamos los límites de detección por inyección directa con los obtenidos en estos experimentos en línea, podemos observar que estos últimos son más bajos y la preconcentración en línea permite aumentar la sensibilidad del sistema entre 24 y 617 veces más que los límites obtenidos por inyección directa de las disoluciones. Estos datos comparativos se muestran en la tabla 4.7.

En la figura 4.12 se presenta un esquema general con las condiciones del método EFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea desarrollado para el análisis de HAPs y metabolitos del BaP en cultivos líquidos de microorganismos.

Tabla 4.7

Comparación entre los límites de detección teóricos (L. D.) obtenidos con los sistemas cromatográficos fuera de línea y en línea

Compuesto	L. D. sistema en línea (ng mL ⁻¹)	L. D. sistema fuera de línea (ng mL ⁻¹)	Proporción de los L.D. (fuera/en línea)
9-10 dihidrodiol BaP	0.0010	0.47	470
4-5 dihidrodiol BaP	0.0006	0.37	617
9-OH-Benzo[a]pireno	0.007	0.38	54
3-OH-Benzo[a]pireno	0.019	0.46	24
Benzo[a]antraceno	0.0007	0.124	177
Benzo[b]fluoranteno	0.0017	0.196	115
Benzo[k]fluoranteno	0.0012	0.127	106
Benzo[a]pireno	0.0006	0.119	198

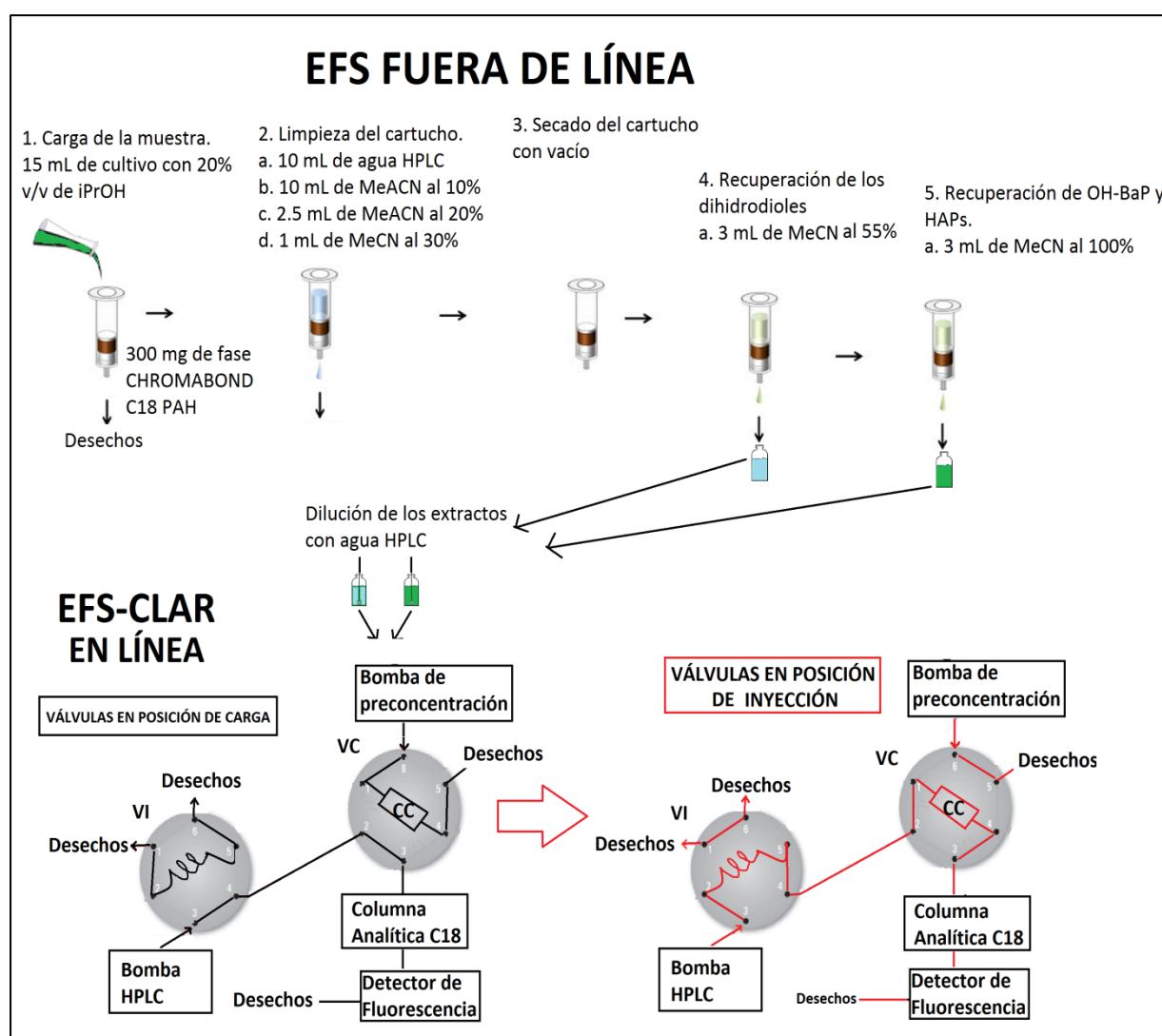


Figura 4.12 Esquema del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea desarrollado. VI=Válvula del inyector; VC = Válvula de concentración; CC = Columna de concentración rellena con fase C18.

4.5. Optimización y validación del método de extracción por EFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-FD en línea para los HAPs y metabolitos del BaP con muestras de cultivos

4.5.1. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de E1 y E2 obtenidos de muestras de cultivos de microalgas

Se utilizaron muestras de 15 mL de cultivos libres de microalgas fortificados a una concentración de 10 pg mL^{-1} de cada compuesto. Se realizó la EFS fuera de línea con las condiciones optimizadas y se recuperaron los analitos en los dos extractos E1 y E2. Cada uno fue preconcentrado y analizado en línea con las condiciones establecidas previamente descritas.

Para el extracto E1, se obtuvieron los cromatogramas mostrados en la figura 4.13 con dos diferentes composiciones de fase móvil.

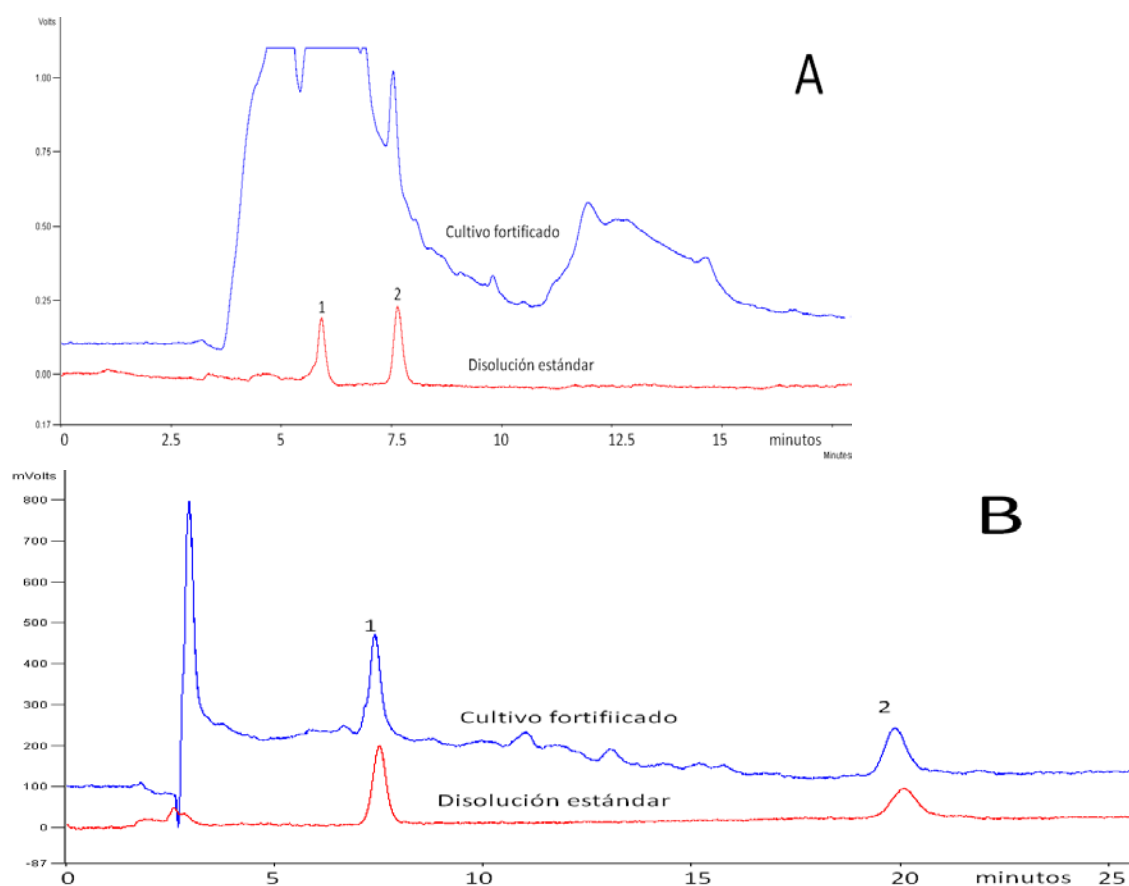


Figura 4.13 Cromatogramas obtenidos a partir del análisis en línea de extractos obtenidos de muestras de medio líquido proveniente de cultivo de *Selenastrum capricornutum* fortificados a 10 pg mL^{-1} . A) Separación con fase móvil MeOH/Agua (80:20); B) Separación con fase móvil MeOH/Agua (65:35). 1 = 9,10-dihidrodiol BaP; 2 = 4,5-dihidrodiol BaP.

En la figura 4.13A, se observa que para el extracto 1 se tienen dificultades con una fase móvil MeOH/Agua (80:20) en la separación cromatográfica debido a la presencia de interferentes de polaridad

parecida a los dos dihidrodiol. Cuando se aumentó el contenido de agua en la fase móvil para mejorar la separación de los picos cromatográficos se observó que la fase móvil MeOH/Agua (65:35) era la más apropiada como se muestra en la figura 4.13B.

Se realizó un seguimiento de la presencia de estos interferentes a lo largo del crecimiento del cultivo y se encontró que a partir de un tiempo de 4 semanas de desarrollo, comienzan a aumentar los interferentes en los cultivos, formados probablemente a partir de la actividad metabólica de los propios microorganismos. En particular se hace evidente la formación de interferentes más polares que los dihidrodiol. Esto se muestra en la figura 4.14.

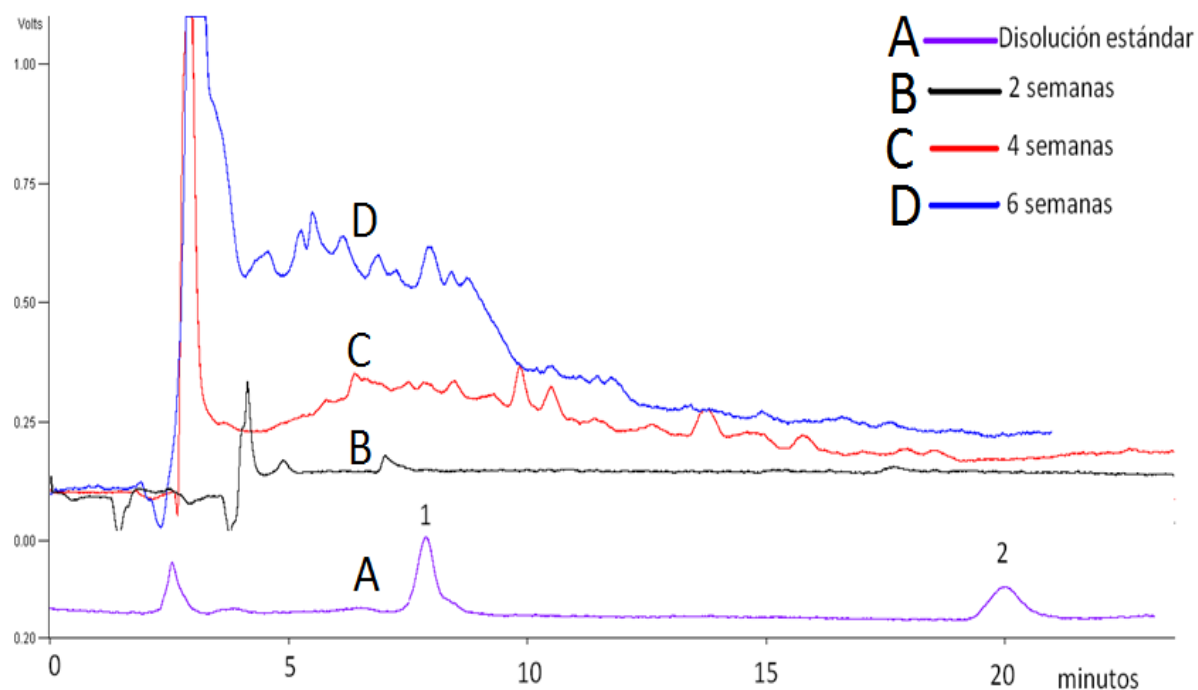


Figura 4.14 Cromatogramas obtenidos a partir del análisis en línea de extractos E1 obtenidos de muestras de cultivos de *Selenastrum capricornutum* a diferentes tiempos de crecimiento.
1 = 9,10-dihidrodiol BaP; 2 = 4,5-dihidrodiol BaP.

Aunque estos interferentes no afectan la integración de los picos correspondientes a los dihidrodiol, sí provocan un aumento en la intensidad de la línea base. Esto puede disminuir el intervalo de concentraciones que se pueden medir con exactitud sin saturar la señal del detector.

Con los resultados anteriores, se procuró trabajar en la validación del método y ensayos de exposición con muestras de cultivos líquidos de *Selenastrum capricornutum* que tuvieran entre 2 y 3

semanas de desarrollo obteniendo buenos resultados en la separación cromatográfica. En este período de tiempo, los cultivos llegan a tener una población de microorganismos que proporciona cantidades de muestra sólida entre 4.5 y 6 mg por cada 15 mL de cultivo, dichas cantidades resultaron suficientes para realizar los ensayos de optimización de las condiciones de extracción por DMFS.

Finalmente, para realizar el análisis en línea del extracto con menos interferencias, se optimizó una secuencia de limpieza para aplicar en la precolumna con 5 mL de mezclas de MeCN/agua buscando una mayor eliminación de interferentes polares sin afectar los recobros de los dihidrodiol. El volumen fue optimizado preconcentrando muestras de agua pura fortificadas con los dihidrodiol y aplicando después, en ensayos por separado, diferentes mezclas MeCN/agua. Los recobros para cada analito obtenidos al aplicar cada una de las mezclas se presentan en la figura 4.15. En dicha figura se puede observar que al aplicar 5 mL de MeCN al 10% no se presentaron pérdidas considerables de los analitos, respecto a los ensayos donde no se aplicó el disolvente de limpieza. De esta forma se decidió aplicar esta mezcla antes de realizar la elución en línea con la fase móvil y las condiciones finales proporcionan cromatogramas del tipo mostrados en la figura 4.16.

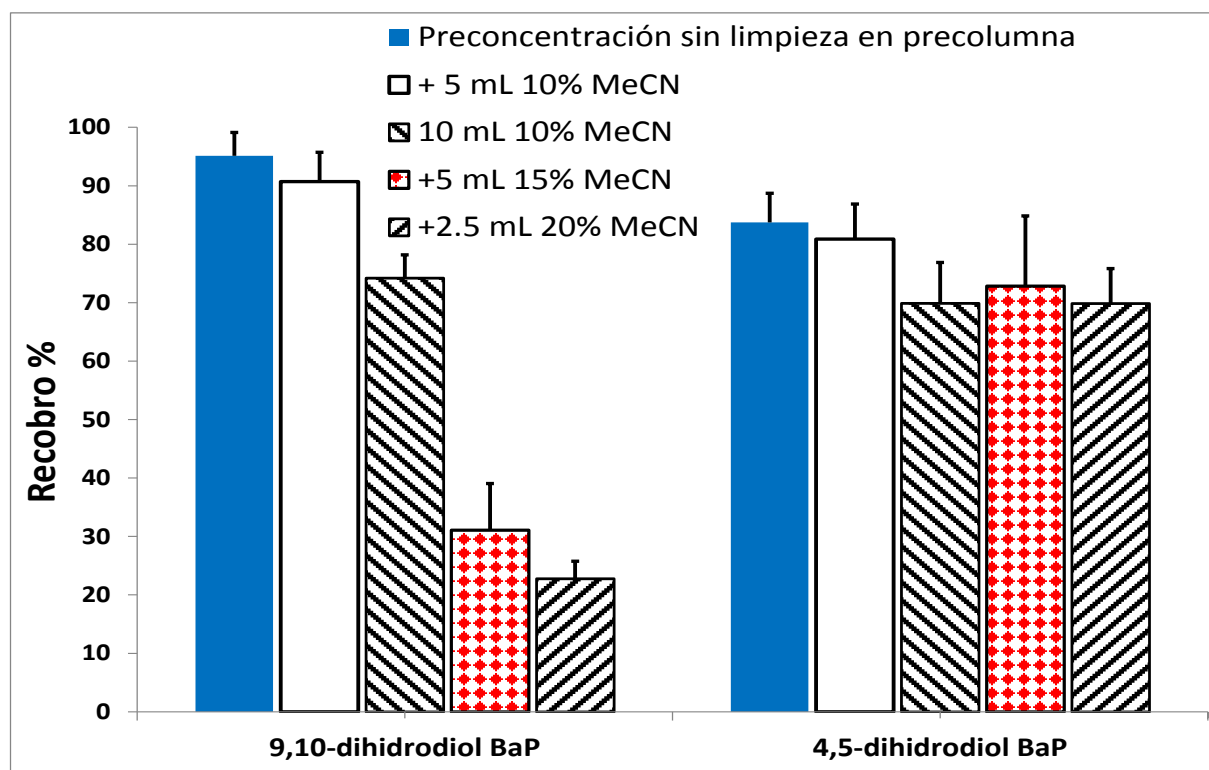


Figura 4.15 Porcentajes de recobro obtenidos al aplicar disolventes de limpieza en la precolumna previo al análisis en línea.

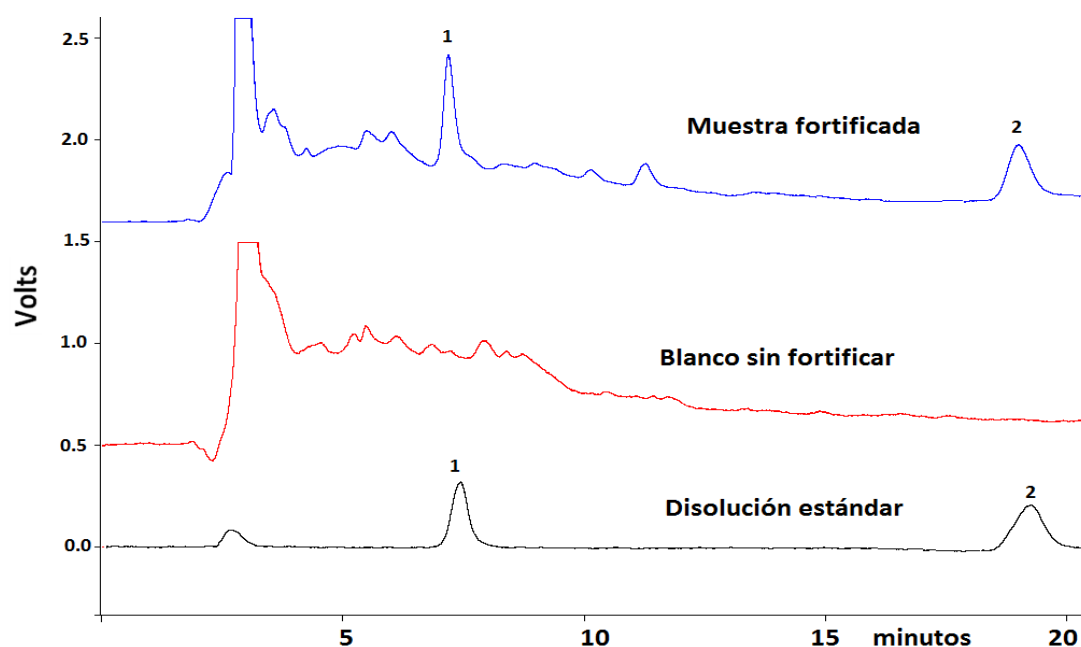


Figura 4.16 Cromatogramas obtenidos a partir del análisis en línea de extractos obtenidos de muestras de medio líquido proveniente de cultivos de *S. capricornutum*. Separación con fase móvil MeOH/Agua (65:35). 1 = 9,10-dihidrodiol BaP; 2 = 4,5-dihidrodiol BaP.

Para el extracto E2 se obtuvieron los cromatogramas mostrados en la figura 4.17.

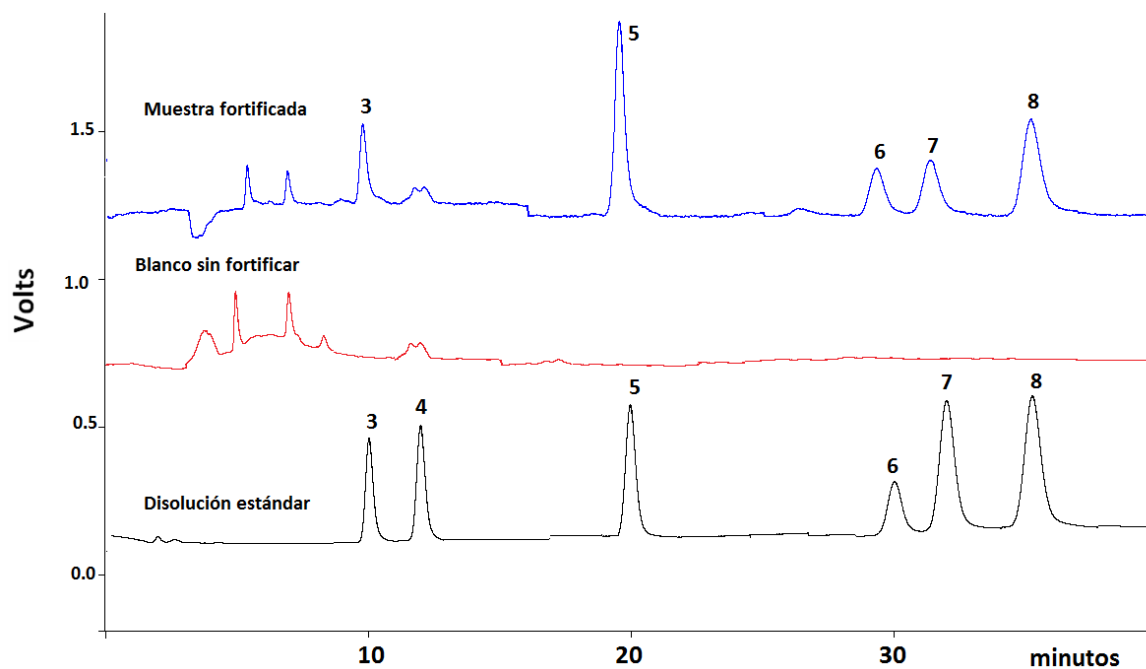


Figura 4.17. Cromatograma obtenido a partir del análisis en línea de extractos obtenidos de muestras de medio líquido de cultivos de *Selenastrum capricornutum*. Tiempo del cultivo = 4 semanas. 3 = 9-OH BaP; 4 = 3-OH BaP; 5 = BaA; 6 = BbF; 7 = BkF; 8 = BaP.

Cabe destacar que en la figura 4.17, resulta evidente la ausencia del pico cromatográfico del 3-OH BaP en la muestra de cultivo fortificado (pico No. 4). Como se menciona en los antecedentes, este metabolito presenta una elevada inestabilidad incluso en las disoluciones estándar (Whiton et al., 1995). Sin embargo, si se había logrado recuperar en los ensayos previos cuando la muestra fue agua pura. Esto demuestra que el medio de cultivo tiene algún componente que aumenta la inestabilidad de este metabolito. El resto de los analitos presentaron una buena separación cromatográfica y no se apreciaron interferentes que dificulten su correcta integración.

En el caso del extracto E2, los interferentes que presentan los cromatogramas no aumentan de intensidad al desarrollarse el cultivo por lo que no fue necesario aplicar un disolvente de limpieza previo al análisis en línea.

4.5.2. Optimización de los recobros del compuesto 3-OH BaP en los extractos de medio líquido de los cultivos de microalgas

En la bibliografía, se reporta el uso de diferentes ácidos y tensoactivos para mejorar los recobros del 3-OH BaP en estudios de muestras de orina por EFS, siendo el ácido ascórbico el reactivo que proporciona un mayor aumento en los recobros (Gündel & Angerer, 2000; Fan et al, 2006; Simon et al, 2000; Richardson et al., 2004; Rey-Salgueiro et al., 2009).

De esta forma, se probaron diferentes porcentajes de ácido ascórbico en muestras de 15 mL de cultivos líquidos fortificados con diferentes cantidades de cada analito. Se realizó la EFS y el análisis cromatográfico en línea con las condiciones establecidas. Los ensayos se realizaron por triplicado y se evaluaron los recobros obtenidos. Estos resultados se presentan en la figura 4.18.

En la figura 4.17 se puede observar que al agregar el ácido ascórbico a una concentración de 1% los recobros promedio del 3-OH BaP aumentan. Sin embargo, el ácido ascórbico tiene un efecto negativo en los recobros del resto los analitos.

También se observó que los resultados obtenidos al agregar 1% de ácido ascórbico no presentan una buena reproducibilidad ya que los coeficientes de variación obtenidos en estos experimentos estuvieron entre el 14 y 20%. Mientras que al realizar ensayos sin ácido ascórbico se obtuvieron coeficientes de variación entre 5 y 7%.

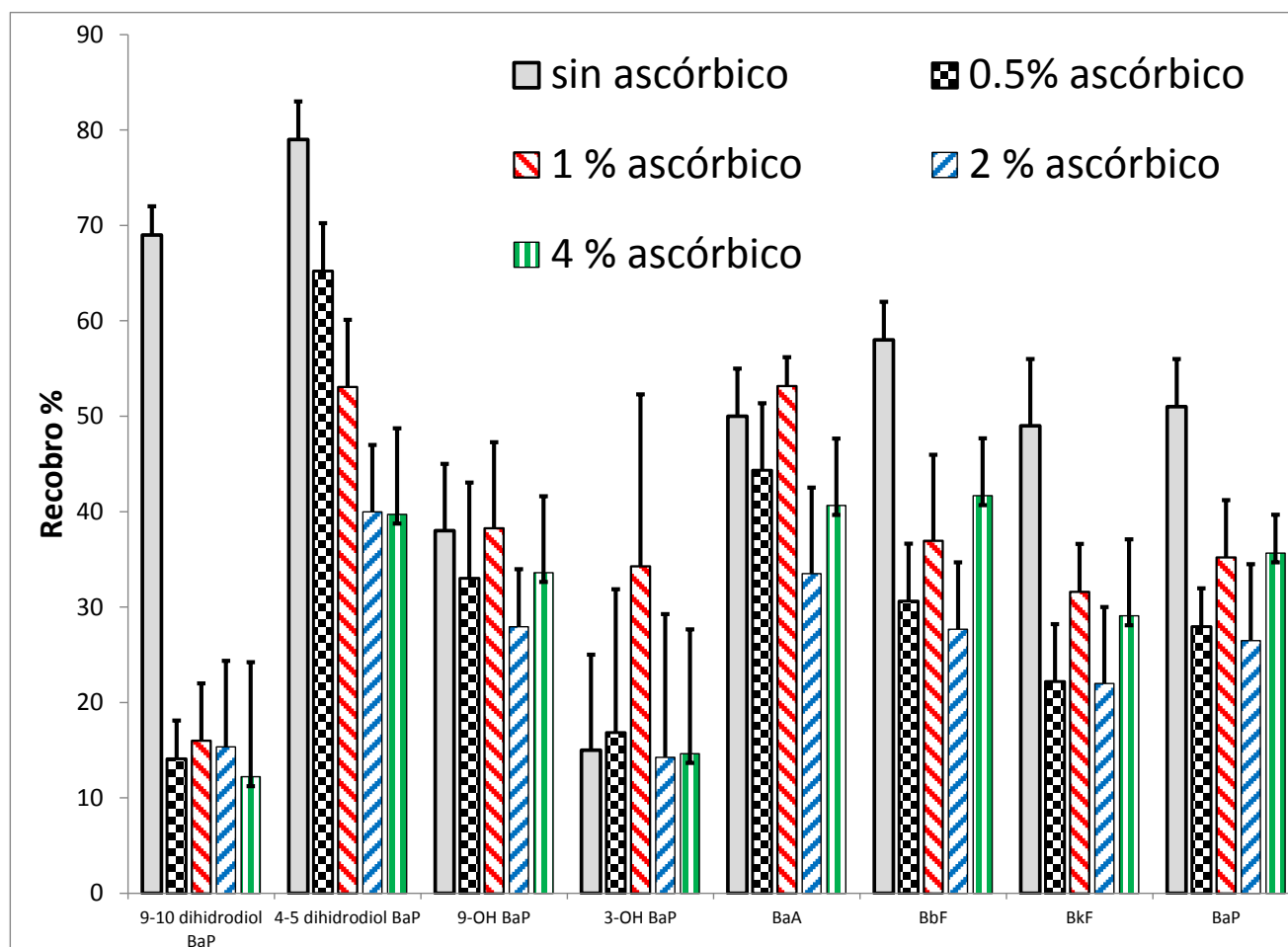


Figura 4.18 Porcentajes de recobro al aplicar el método de EFS-CLAR en línea desarrollado a muestras de cultivos de microalgas conteniendo diferentes porcentajes de ácido ascórbico.

De esta forma se consideró realizar la validación del método manteniendo los recobros bajos de este compuesto ya que si su inestabilidad es tan alta, lo más probable era que si era producido en los ensayos de exposición no se lograra identificar o cuantificar.

4.5.3. Validación del método de EFS fuera de línea/EFS-CLAR-FD en línea con muestras de cultivos de microalgas

En la tabla 4.8 se concentran los parámetros obtenidos de la validación del método de extracción por EFS y preconcentración en línea EF-CLAR. Como se mencionó anteriormente no fue posible determinar al compuesto 3-OH BaP con las condiciones óptimas del método en línea. De esta forma, los resultados para el resto de los compuestos se discuten a continuación.

Tabla 4.8

Resultados de la validación del método por EFS con preconcentración en línea EFS-CLAR utilizando muestras de cultivos de microalgas.

Compuesto ^a	9,10-dihidrodiol BaP	4,5-dihidrodiol BaP	9-OH BaP	BaA	BbF	BkF	BaP	
Recobro (%) (pendiente x 100)	74	65	42	49	41	45	38	
Linealidad (r^2) ^b	0.9913	0.9955	0.998	0.9967	0.9965	0.9978	0.9985	
Repetibilidad (% C.V.)	20 pg mL ⁻¹	5.59	5.93	4.32	4.14	7.36	6.68	5.47
	80 pg mL ⁻¹	3.75	3.99	2.89	2.04	5.54	4.03	3.08
L. D. ^c	(pg mL ⁻¹)	1.3	0.8	0.9	1	2.3	2.1	1
L. C. ^d	(pg mL ⁻¹)	4.3	2.7	3.0	3.3	7.7	7.0	3.3

a= El compuesto 3-OH BaP no mostró buenos parámetros de validación cuando se utilizó el método en línea con muestras de cultivos de microalgas.

b=El intervalo de concentraciones para los dihidrodioles fue de 5 a 120 pg mL⁻¹, para el resto de los compuestos fue de 10 a 120 pg mL⁻¹.

c= medido como la concentración de analito que produce una señal 3 veces mayor a la del ruido de fondo.

d= medido como la concentración de analito que produce una señal 10 veces mayor a la del ruido de fondo.

r^2 = Coeficiente de correlación; C.V. = Coeficiente de variación; L. D. = Límites de Detección; L. C. = Límites de Cuantificación; BaA =benzo[a]antraceno; BbF = benzo[b]fluoranteno; BkF = benzo[k]fluoranteno; BaP = benzo[a]pireno.

La exactitud del método, evaluada con la pendiente de la curva de cantidad recuperada vs cantidad agregada, resultó aceptable. Se obtuvieron recobros entre 38 y 75 %, los cuales se consideran adecuados a los niveles de concentración que se trabajan (pg mL⁻¹ = ppt) como lo señala la EURACHEM y la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, por sus siglas en inglés), que considera que un método es exacto si proporciona recobros entre 40 y 120% para analitos a niveles de ppb o menores (Taverniers, 2004, EURACHEM, 2012).

La linealidad del método resultó buena para todos los analitos obteniendo coeficientes de correlación mayores a 0.9913.

Las organizaciones antes mencionadas consideran buena reproducibilidad en los métodos cuando los % de C.V. son menores al 30% y los analitos están en el orden de concentración de ppb o menores. Con esto se observa que el método presenta una excelente reproducibilidad con % de C. V. menores a 7.36.

Los límites de detección del método estuvieron entre 0.08 y 2.3 pg mL^{-1} . Los límites mayores se obtienen para los HAPs que son los que tienen mayores pérdidas en los procesos de extracción y preconcentración. A pesar de esto, se sigue alcanzando una mayor sensibilidad en comparación con el análisis directo. Como se puede observar en la tabla 4.9, al comparar los límites de detección del método con la preconcentración en línea con los del sistema por inyección directa del extracto manejado fuera de línea, se observa que los primeros resultaron ser entre 106 y 617 veces menores.

Tabla 4.9

Comparación entre los límites de detección teóricos (L. D.) obtenidos con los sistemas cromatográficos fuera de línea y en línea

Compuesto	L. D. método EFS fuera de línea/EFS-CLAR en línea (ng mL^{-1})	L. D. sistema fuera de línea (ng mL^{-1})	Proporción de los L.D. (método/sistema)
9-10 dihidrodiol BaP	0.0013	0.47	361
4-5 dihidrodiol BaP	0.0008	0.37	617
9-OH-Benzo[a]pireno	0.0009	0.38	542
3-OH-Benzo[a]pireno	N. D.	0.46	---
Benzo[a]antraceno	0.0010	0.124	177
Benzo[b]fluoranteno	0.0023	0.196	115
Benzo[k]fluoranteno	0.0020	0.127	106
Benzo[a]pireno	0.0010	0.119	198

N. D. = No determinado.

Los límites de cuantificación resultan adecuados para medir con exactitud concentraciones desde 2.7 pg mL^{-1} . Estos límites permiten medir concentraciones muy por debajo de los límites para HAPs en agua establecidos por la USEPA y las CONAGUA en México, los cuales son 200 y 100 pg mL^{-1} , respectivamente (USEPA, 2012; CONAGUA, 2009).

Cuando los HAPs se encuentran en medios acuosos, su concentración tiende a valores cercanos a su solubilidad en condiciones de saturación. Aunque estas concentraciones son bajas, por ejemplo 3.6 ng mL^{-1} para el BaP, están por arriba de las normas de la EPA y la CONAGUA por lo que pueden resultar peligrosas para la salud.

En diversas publicaciones donde se hacen ensayos de exposición de cultivos de microorganismos a los HAPs, principalmente con BaP y/o HAPs de 4 anillos o más, se trabaja con concentraciones que sobrepasan por varios órdenes los valores de solubilidad de los compuestos en agua. Esto se debe a que sus metodologías analíticas no tienen la suficiente sensibilidad (Hong, 2008; Torres, 2008; Chen, 2010; Ke, 2010). Pocas son las referencias donde se logra identificar a los metabolitos producidos y aún menos lo son aquéllas que logran cuantificarlos. Estos datos son de utilidad para determinar las rutas metabólicas que llevan a cabo los diferentes organismos (Cerniglia, 1993; Hammel, 1995).

Con los límites de cuantificación del método desarrollado en este trabajo no sólo se logra identificar a los metabolitos del BaP, también se pueden cuantificar sus niveles en ensayos de exposición a concentraciones del contaminante que son semejantes a las naturales.

4.5.4. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de E1 y E2 obtenidos de muestras de cultivos de protozoarios

Las muestras de cultivos de protozoarios no presentaron dificultades en la separación de los analitos en los dos extractos, ya que los pocos interferentes que aparecen, lo hacen en tiempos de retención suficientemente alejados de los analitos de interés. Un ejemplo de los dos extractos se muestra en la figura 4.19. Las condiciones cromatográficas de análisis para cada extracto fueron las mismas a las condiciones óptimas utilizadas para las muestras de cultivo de microalgas.

En estos ensayos, sobresale el hecho de que en los extractos E2 provenientes de cultivos de protozoario, sí fue posible recuperar al compuesto 3-OH BaP. Sin embargo, los resultados en los análisis mostraron baja reproducibilidad para este analito. El resto de los compuestos presentó un buen comportamiento.

Con los resultados obtenidos, se planeó optimizar los recobros del compuesto 3-OH BaP. Esto se describe en la siguiente sección.

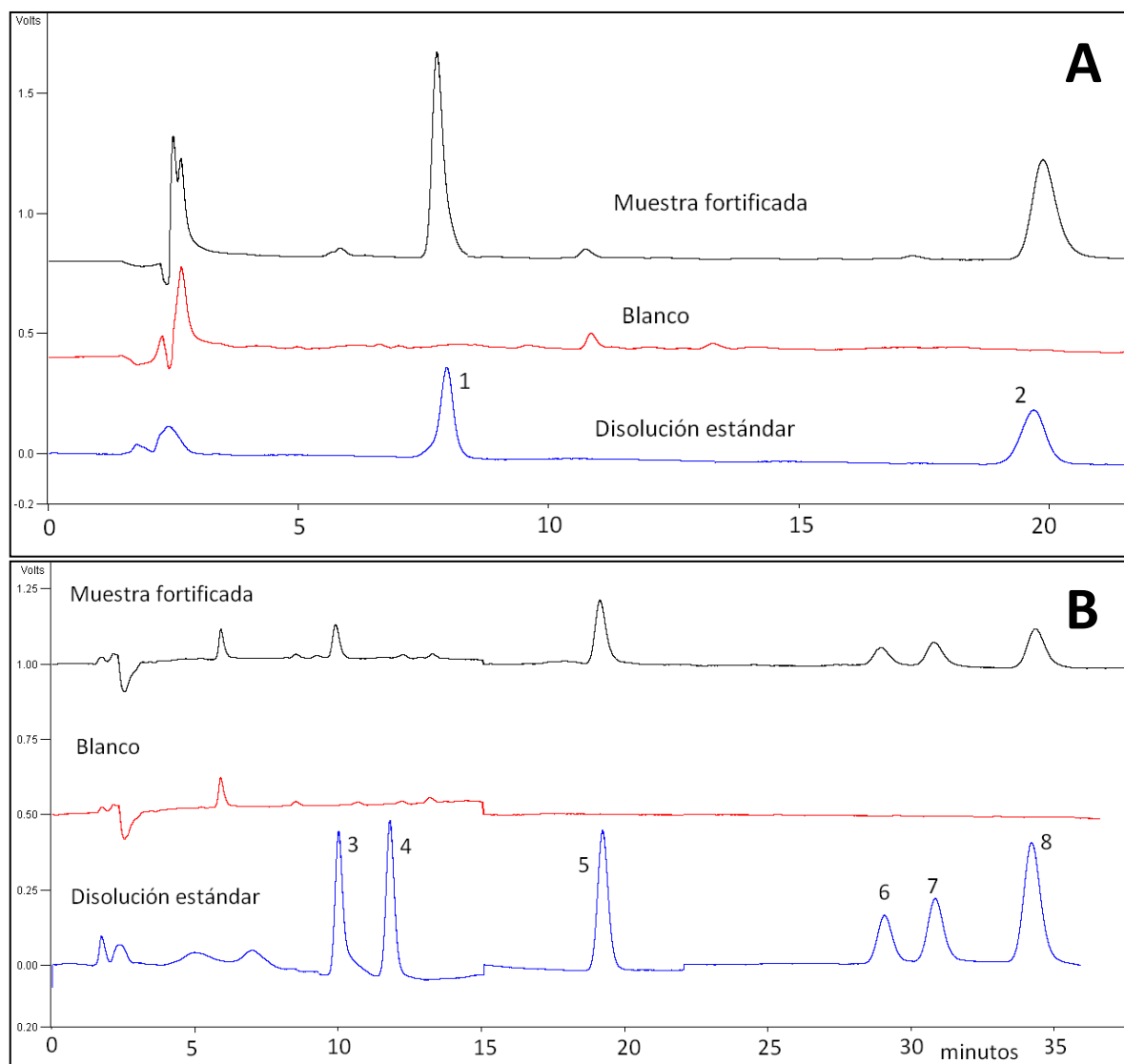


Figura 4.19 Cromatogramas obtenidos a partir del análisis en línea de extractos obtenidos de medio líquido proveniente de cultivos del protozoario *Colpoda cucullus*. (A) Extracto E1: Fase móvil MeOH:Agua (65:35). (B) Extracto E2: Fase móvil MeOH/Agua (85:15). 1 = 9-10-dihidrodiol BaP; 2 = 4-5- dihidrodiol BaP; 3 = 9-OH BaP; 4 = 3-OH BaP; 5 = BaA; 6 = BbF; 7 = BkF; 8 = BaP.

4.5.5. Validación del método de EFS fuera de línea/EFS-CLAR-FD en línea con muestras de con cultivos de *Colpoda cucullus* (protozoario)

En la tabla 4.10 se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de validación del método de extracción por EFS y preconcentración en línea EF-CLAR. De nueva cuenta, el compuesto 3-OH BaP no logró determinarse con el método en línea. A continuación se presentan los resultados para el resto de los analitos.

Se obtuvo buena linealidad con coeficientes de variación mayores a 0.9953. Con este tipo de muestra se alcanzaron recobros mayores al 43%. A excepción de los dos OH-BaP, los recobros de los HAPs y dihidrodioles en estos ensayos aumentaron con respecto a los realizados con las muestras de microalgas. Esto muestra un efecto de la complejidad de la matriz sobre los recobros, inclusive, estos recobros obtenidos con muestras de cultivos de protozoarios son semejantes a los de ensayos con agua pura. Una comparación de los recobros en las diferentes muestras utilizadas se presenta en la figura 4.20.

Tabla 4.10

Resultados de la validación del método por EFS con preconcentración en línea EFS-CLAR utilizando muestras de cultivos de protozoarios.

Compuesto ^a	9,10-dihidrodiol BaP	4,5-dihidrodiol BaP	9-OH BaP	BaA	BbF	BkF	BaP	
Recobro (%) (pendiente x 100)	88	90	43	69	64	56	60	
Linealidad (r^2) ^b	0.9953	0.9985	0.9962	0.9978	0.9975	0.9923	0.9957	
Repetibilidad (% C.V.)	20 pg mL ⁻¹	7.02	6.71	5.48	5.95	6.58	7.99	7.63
	80 pg mL ⁻¹	4.04	3.12	2.19	4.22	3.36	5.98	5.92
L. D. ^c	(pg mL ⁻¹)	1.00	0.6	0.7	0.8	2.1	1.9	0.95
L. C. ^d	(pg mL ⁻¹)	3.3	2.0	2.3	2.7	7.0	6.3	3.2

a= El compuesto 3-OH BaP no mostró buenos parámetros de validación cuando se utilizó el método en línea con muestras de cultivos de microalgas.

b= El intervalo de concentraciones para los dihidrodioles fue de 5 a 120 pg mL⁻¹, para el resto de los compuestos fue de 10 a 120 pg mL⁻¹.

c= medido como la concentración de analito que produce una señal 3 veces mayor a la del ruido de fondo.

d= medido como la concentración de analito que produce una señal 10 veces mayor a la del ruido de fondo.

r^2 = Coeficiente de correlación; C.V. = Coeficiente de variación; L. D. = Límites de Detección; L. C. = Límites de Cuantificación; s/n=relación intensidad de la señal/ruido de fondo.

BaA =benzo[a]antraceno; BbF = benzo[b]fluoranteno; BkF = benzo[k]fluoranteno; BaP = benzo[a]pireno.

La repetibilidad del método fue buena con coeficientes de variación menores a 7.99 %. Los límites de detección resultaron en general menores que para las muestras de cultivos de microalgas. Sus valores estuvieron entre 0.6 y 2.1 pg mL⁻¹, permitiendo de igual forma alcanzar una mayor sensibilidad comparada con el análisis fuera de línea de las muestras.

De igual forma, los límites de cuantificación estuvieron entre 2 y 7 pg mL^{-1} que al igual que en el caso de las microalgas, pueden ser adecuados para determinar la presencia y concentración de los metabolitos producidos en los ensayos de exposición a los HAPs.

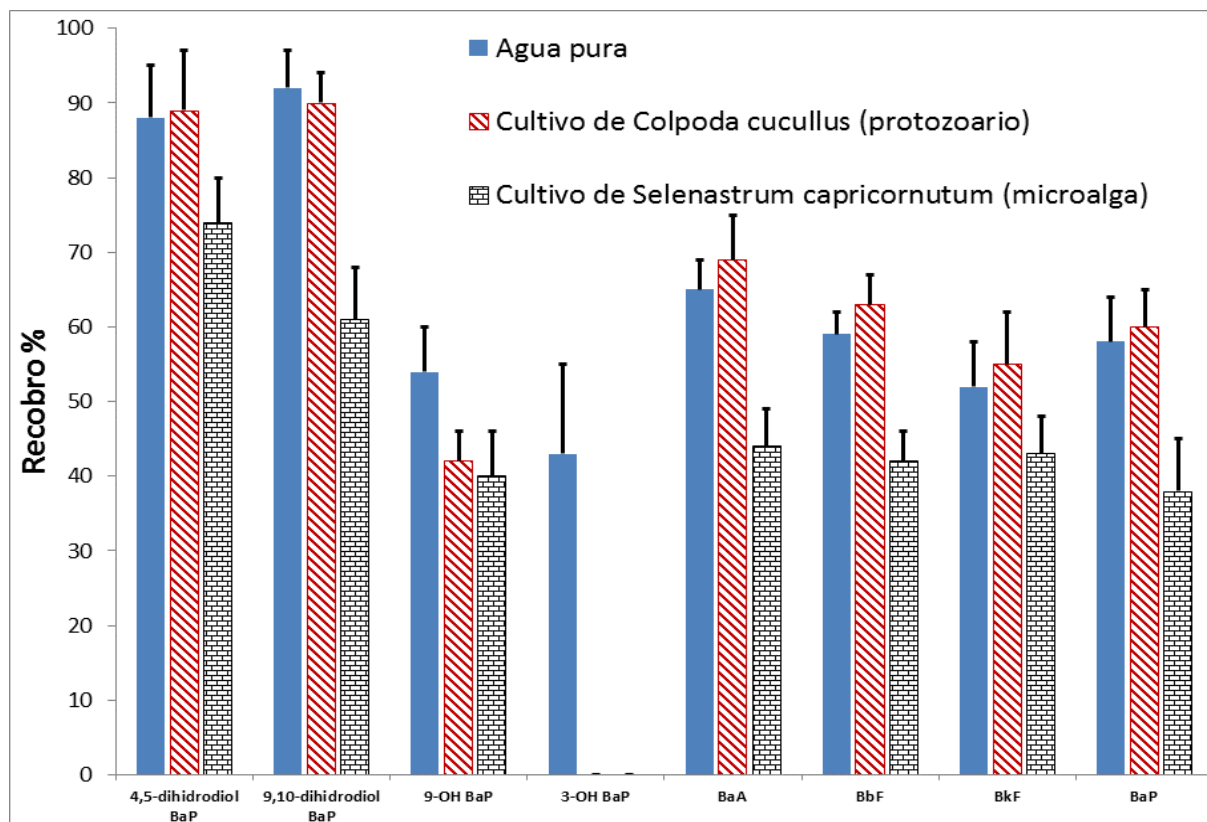


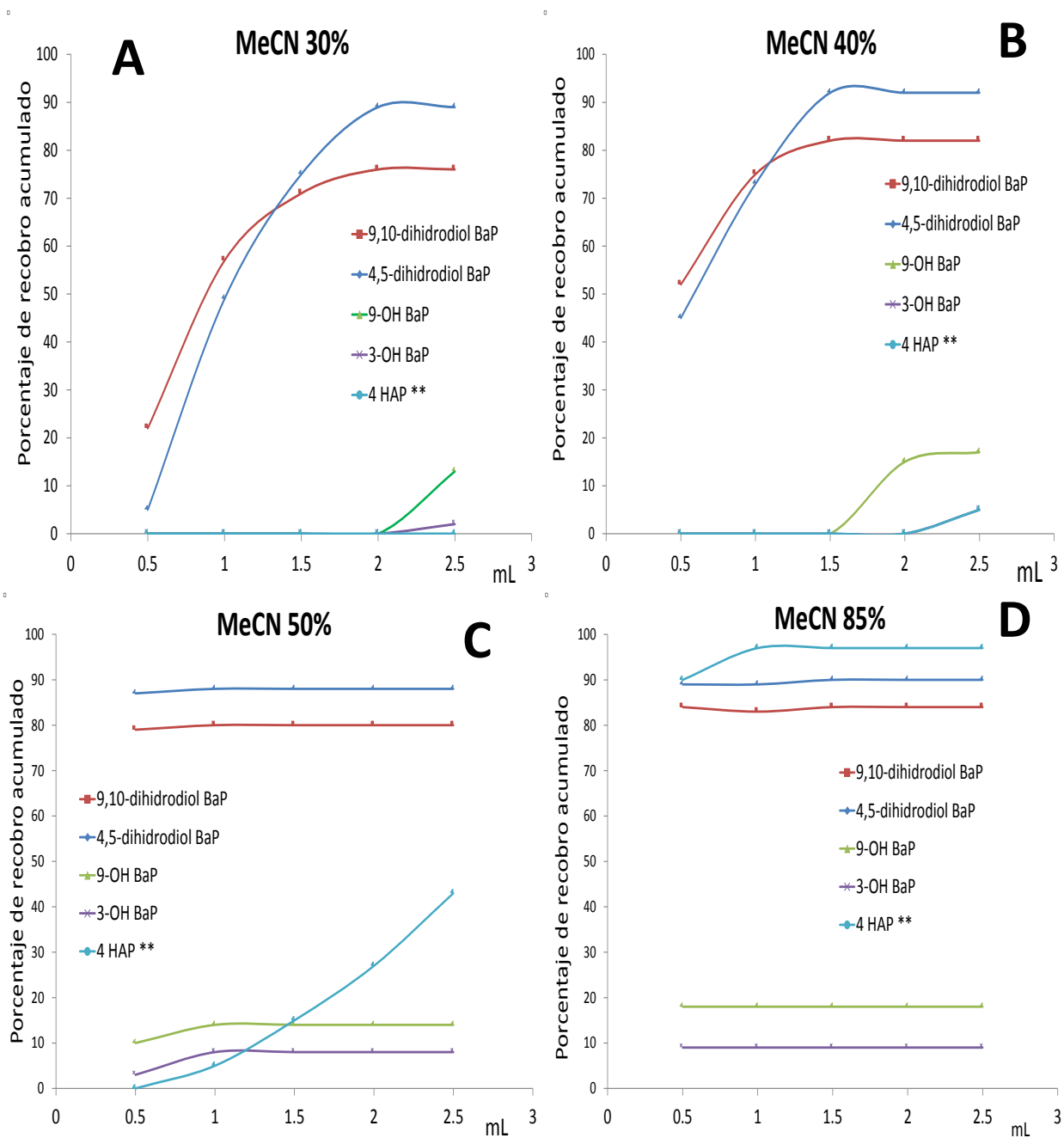
Figura 4.20 Comparación de los recobros globales obtenidos con el método de EFS fuera de línea/EFS-CLAR en línea aplicado a diferentes tipos de muestras. BaA =benzo[a]antraceno; BbF = benzo[b]fluoranteno; BkF = benzo[k]fluoranteno; BaP = benzo[a]pireno.

4.6. Desarrollo del método de extracción de HAPs y metabolitos por DMFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea

4.6.1. Ensayos de recobro preliminares de los analitos por DMFS fuera de línea sin muestra

Se siguió la misma estrategia usada en el método de EFS, para recuperar en un primer extracto a los dihidrodiolés y en el segundo a los OH-BaP y HAPs (ahora llamados D1 y D2). En estudios previos con protozoarios, se optimizó la relación peso biomasa/peso adsorbente como 5 mg/100 mg obteniendo buenos resultados (García de Llasera & Olmos-Espejel, 2011). Con base en esto se evaluaron los frentes de elución de los compuestos en estudio usando como eluentes diferentes mezclas MeCN/Agua de

diferente polaridad para determinar los volúmenes óptimos de elución selectiva de los compuestos. Los resultados de estos ensayos sin muestra se presentan en la figura 4.21 en donde se observa que cuando se utilizó MeCN al 30 y 40% fue posible separar selectivamente a los dihidrodioles del resto de los metabolitos. Se decidió utilizar MeCN al 40% con un volumen de 1.5 mL debido a que proporcionaba recobros más altos y reproducibles.



4.21 Frentes de elución de los analitos en el cartucho de DMFS sin muestra.

**Recobro promedio para los HAPs: BaA, BbF, BkF y BaP.

Con MeCN al 50% se obtienen buenos recobros, pero no se logra separar a los dihidrodioles de los OH-BaP. A su vez, con estos últimos se presentó un comportamiento diferente al del resto de los analitos, ya que sólo se pudo recuperar entre el 8 y 15% de la cantidad adicionada.

Se realizó un último ensayo con MeCN al 85% y se observó que 1 mL fue suficiente para eluir a todos los analitos. Sin embargo, de nueva cuenta los OH-BaP resultaron con recobros bajos.

Se hicieron pruebas con 100% de MeCN y también se obtuvieron buenos recobros para los HAPs. Sin embargo, como las algas contienen una alta proporción de pigmentos, se obtenían extractos demasiado coloridos, lo cual podría causar un aumento en la presencia de interferentes en los cromatogramas. Con MeCN al 85% se obtiene un extracto más claro que resulta adecuado para su análisis.

Con esto, se estableció que en los ensayos por DMFS fuera de línea, los dihidrodioles se recuperarían del cartucho con 1.5 mL de MeCN 40% (extracto nombrado como D1) y los OH-BaP y PAH se recuperarían con 1 mL de MeCN 85% (extracto denominado como D2).

4.6.2. Optimización de los recobros de los metabolitos OH-BaP

En la tabla 4.11 se presentan los recobros obtenidos con la adición de diferentes modificadores en el adsorbente; se puede observar que los surfactantes como el heptanosulfonato de sodio y el lauril sulfato de sodio mejoraron los recobros de los HAPs, pero no así los recobros de los metabolitos.

El ácido nítrico mejora los recobros de los compuestos 4,5-dihidrodiol BaP y los OH-BaP, cuando se usó a una concentración de 1 M, los recobros estuvieron entre 42 y 54%. Sin embargo, los recobros de los HAPs y el compuesto 9,10-dihidrodiol BaP disminuyen considerablemente.

El ácido sulfúrico no presentó efectos positivos en los recobros de los analitos.

Finalmente, el ácido ascórbico resultó ser la sustancia que proporcionó los mejores resultados. En la tabla 4.11 se observa que cuando se agregaron diferentes porcentajes de ácido ascórbico a la muestra, los recobros de los OH-BaP mejoraron hasta valores superiores al 50%. Las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos indican que son inestables en contacto con el aire, por lo cual el ácido ascórbico al ser un antioxidante, ayuda a prevenir la descomposición de estos metabolitos y se mejoran sus recobros. Por otra parte, los dihidrodioles disminuyeron sus recobros, mientras que de los HAPs, solo el BaA presenta una disminución considerable.

Tabla 4.11

Resultados de la adición de diferentes modificadores para la optimización del rendimiento de extracción por DMFS de los compuestos.

Compuesto	Recobro % (\pm D.E.) n = 3								
	Sin modificador	Modificador*							
		HSNa 1 M	LSNa 1 M	HNO ₃ 0.1 M	1 M	H ₂ SO ₄ 0.1 M	Ácido ascórbico (%p/v)		
						15%	20%	40%	
9,10- dihidrodiol BaP	77(\pm 4)	71(\pm 3)	73(\pm 3)	52(\pm 1)	ND	50(\pm 4)	56 (\pm 3)	52(\pm4)	42 (\pm 2)
4,5- dihidrodiol BaP	79 (\pm 2)	76(\pm 4)	79(\pm 2)	95(\pm 4)	90(\pm 2)	67(\pm 5)	66(\pm 3)	61(\pm3)	57 (\pm 2)
9-OH BaP	16(\pm 1)	16(\pm 4)	14(\pm 3)	33(\pm 3)	42(\pm 1)	18(\pm 4)	53 (\pm 6)	54(\pm5)	61 (\pm 4)
3-OH BaP	7(\pm 11)	7(\pm 9)	6(\pm 10)	26(\pm 9)	54(\pm 10)	15(\pm 8)	51(\pm 9)	55(\pm13)	53(\pm 11)
BaA	91(\pm 2)	90(\pm 1)	92(\pm 4)	85(\pm 2)	83(\pm 5)	80(\pm 2)	88 (\pm 3)	76(\pm4)	77(\pm 4)
Bbf	89(\pm 5)	91(\pm 2)	93(\pm 4)	83(\pm 3)	81(\pm 2)	80(\pm 3)	87 (\pm 2)	82(\pm4)	81(\pm 3)
BkF	87 (\pm 4)	88(\pm 4)	89(\pm 2)	85(\pm 4)	81(\pm 2)	83(\pm 4)	87 (\pm 2)	87(\pm4)	85(\pm 6)
BaP	90(\pm 4)	91(\pm 2)	93(\pm 3)	86(\pm 4)	83(\pm 5)	81(\pm 4)	88 (\pm 4)	86(\pm4)	83(\pm 6)

*Se agregaron 20 μ L de cada sustancia a la muestra.

D.E. = Desviación estándar; HSNa= Heptanosulfonato de sodio; LSNa= Lauril sulfato de sodio.

BaA =benzo[a]antraceno; BbF = benzo[b]fluoranteno; BkF = benzo[k]fluoranteno; BaP = benzo[a]pireno.

Con los resultados anteriores, se determinó agregar a las muestras de biomasa de microorganismos 20 μ L de una disolución al 20% (p/v) de ácido ascórbico antes de realizar la homogenización de la muestra con la fase sólida en el proceso de extracción por DMFS.

4.6.3. Implementación de una secuencia de limpieza en el cartucho de DMFS

Al igual que en el método por EFS fuera de línea se optimizó una secuencia de disolventes de limpieza para eliminar la mayor cantidad de interferentes del cartucho empacado antes de eluir a los analitos. Los resultados de estos ensayos se presentan en la tabla 4.12. Se observa que el agua pura y la mezcla de MeCN 10% con un volumen de 10 mL no tienen la fuerza eluyente necesaria para provocar la fuga de los analitos. Considerando lo anterior se probó un eluyente un poco más fuerte como el MeCN 20% que también se podía aplicar sin provocar pérdidas en los recobros finales; se observó que sólo al aplicar 6 mL de dicha disolución comienza a fugarse el compuesto 9,10-dihidrodiol BaP.

Tabla 4.12

Recobros obtenidos al aplicar diferentes disolventes de limpieza al cartucho de DMFS empacado con 100 mg de fase Chromabond C18-PAH fortificada a una concentración de 0.05 ng mg^{-1} .

Compuesto	10 mL de Agua HPLC	10 mL de MeCN 10%	Recobros (\pm C.V.%)						Elución con 1 mL MeCN 85%
			6 x 1 mL de MeCN 20%						
			1	2	3	4	5	6	
9,10- dihidrodiol BaP	NI	NI	---	---	---	---	---	7 (\pm 2)	70 (\pm 3)
4,5- dihidrodiol BaP	NI	NI	---	---	---	---	---	---	76(\pm 2)
9-OH BaP	NI	NI	---	---	---	---	---	---	52(\pm 9)
3-OH BaP	NI	NI	---	---	---	---	---	---	57(\pm 13)
BaA	NI	NI	---	---	---	---	---	---	94(\pm 4)
Bbf	NI	NI	---	---	---	---	---	---	88(\pm 3)
BkF	NI	NI	---	---	---	---	---	---	85(\pm 2)
BaP	NI	NI	---	---	---	---	---	---	86(\pm 4)

NI = No inyectado; --- No detectado.

C.V. = Coeficiente de variación; HSNa= Heptanosulfonato de sodio; LSNa= Lauril sulfato de sodio.

BaA =benzo[a]antraceno; BbF = benzo[b]fluoranteno; BkF = benzo[k]fluoranteno; BaP = benzo[a]pireno.

De esta forma, la secuencia de elución completa para el método de DMFS fuera de línea se estableció como 10 mL de agua, 10 mL de MeCN 10% y 5 mL de MeCN 20% como limpieza de interferentes; después 1.5 mL de MeCN 40% para eluir los dihidrodioles (extracto D1) y finalmente recuperar los OH-BaP y HAPs con 1 mL de MeCN 85 % (extracto D2).

4.6.4. Optimización de la elución de los analitos en la DMFS fuera de línea

Finalmente se evaluó la reproducibilidad en los recobros usando la secuencia de elución completa. Los resultados se presentan en la tabla 4.13. Se observa que para los dihidrodioles y los HAPs se obtuvieron buenos C.V., menores a 4%. Los compuestos presentaron una mayor variabilidad con C.V. entre 8 y 10% que se consideran aceptables para el nivel de concentraciones que se manejó ($2 \text{ ng mg}^{-1} = 2 \text{ ppm}$). Taverniers *et al.* (2004) reporta que los % de C.V. obtenidos al analizar muestras de concentraciones entre 1 y 10 ppm deben estar entre 7 y 11.3 %.

Tabla 4.13

Recobros obtenidos al aplicar la secuencia de disolventes de limpieza y elución optimizada al cartucho de DMFS empacado con 100 mg de fase Chromabond C18-PAH. n=5

Compuesto	Limpeza	Recobro % de los analitos (±C.V.%)	
	10 mL Agua 10 mL MeCN 10% 5 mL MeCN 20%	1.5 mL MeCN 55%	1 mL MeCN 85%
9,10- dihidrodiol BaP	NI	76 (±3)	---
4,5- dihidrodiol BaP	NI	71(±1)	---
9-OH BaP	NI	---	56(±8)
3-OH BaP	NI	---	53(±10)
BaA	NI	---	91(±3)
Bbf	NI	---	89(±2)
BkF	NI	---	87(±4)
BaP	NI	---	80(±3)

D.E. = Desviación estándar; BaA =benzo[a]antraceno; BbF = benzo[b]fluoranteno; BkF = benzo[k]fluoranteno; BaP = benzo[a]pireno.

4.6.5. Desarrollo y validación del método de extracción por DMFS fuera de línea y análisis por EFS/CLAR-FD en línea

Como en el método por EFS desarrollado, la composición de acetonitrilo en los extractos obtenidos por DMFS no permitió a los analitos ser preconcentrados directamente en el sistema EFS-CLAR en línea. De esa forma se describe a continuación como se efectuó la optimización de la preconcentración en línea de los analitos presentes en los extractos obtenidos por DMFS.

4.6.5.1. Optimización de la preconcentración y análisis en línea de los HAPs y metabolitos del BaP con disoluciones estándar a diferentes porcentajes de disolvente orgánico (extractos D1 y D2 simulados)

Se prepararon mezclas acuosas con diferente porcentaje de MeCN y fortificadas con los analitos. Se mantuvo un volumen constante de 6 mL para el extracto D1 diluido y de 2 mL para el extracto D2 diluido. Cada mezcla fue analizada con el sistema en línea y los recobros de los analitos se presentan en la figura 4.22.

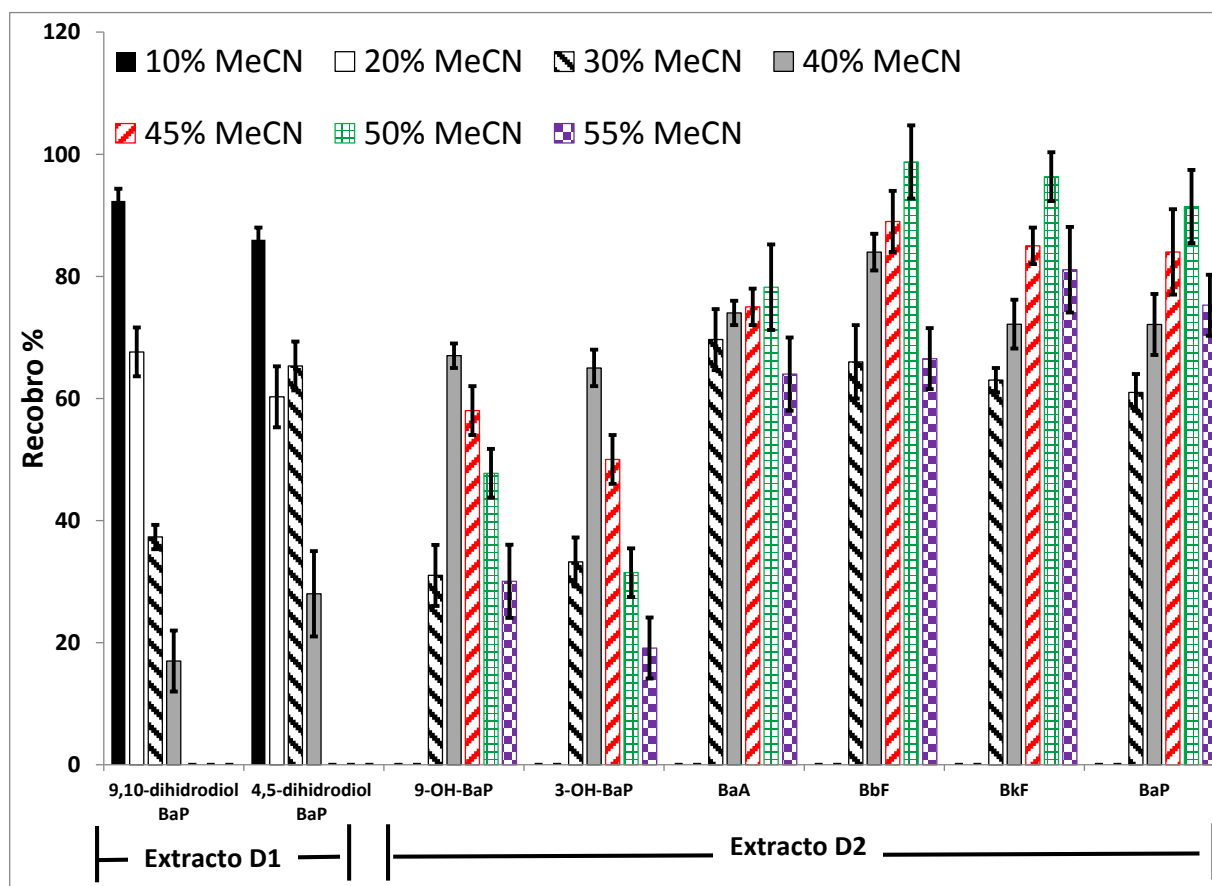


Figura 4.22 Optimización de la dilución de extractos simulados para la preconcentración por EFS-CLAR en línea de los extractos obtenidos por DMFS. Efecto del porcentaje de MeCN en el recobro de los analitos al preconcentrar 6 mL (D1) y 2 mL (D2) de disoluciones acuosas a una concentración de 45 pg mL^{-1} and 160 pg mL^{-1} , respectivamente.

Para el extracto D1 se obtuvieron mejores resultados al utilizar un porcentaje de MeCN 10% en el extracto diluido, proporcionando recobros entre el 85 y 92 %. Al aumentar el contenido de MeCN los recobros disminuyen debido a la fuga de los analitos de la precolumna.

Para el extracto D2 se observa también en la figura 4.22 que el porcentaje óptimo resultó MeCN 40% para los OH-BaP y MeCN 50% para los HAPs. Al igual que ocurre al preconcentrar los extractos obtenidos por EFS, al aumentar o disminuir los porcentajes de MeCN a valores diferentes a los anteriores, los recobros disminuyen para los dos grupos de compuestos, lo cual se atribuye al mismo proceso de adsorción de los analitos cuando el porcentaje de MeCN disminuye y a la fuga de los mismos cuando el porcentaje de MeCN aumenta.

Con lo anterior se determinó diluir los extractos D1 hasta un contenido de MeCN 10%, mientras que el extracto D2 hasta MeCN 40%, para promover los mayores recobros posibles de los analitos en los ensayos de exposición.

En la figura 4.23 se presenta un esquema general de las condiciones optimizadas para el método desarrollado de extracción por DMFS fuera de línea y análisis por EFS-CLAR en línea.

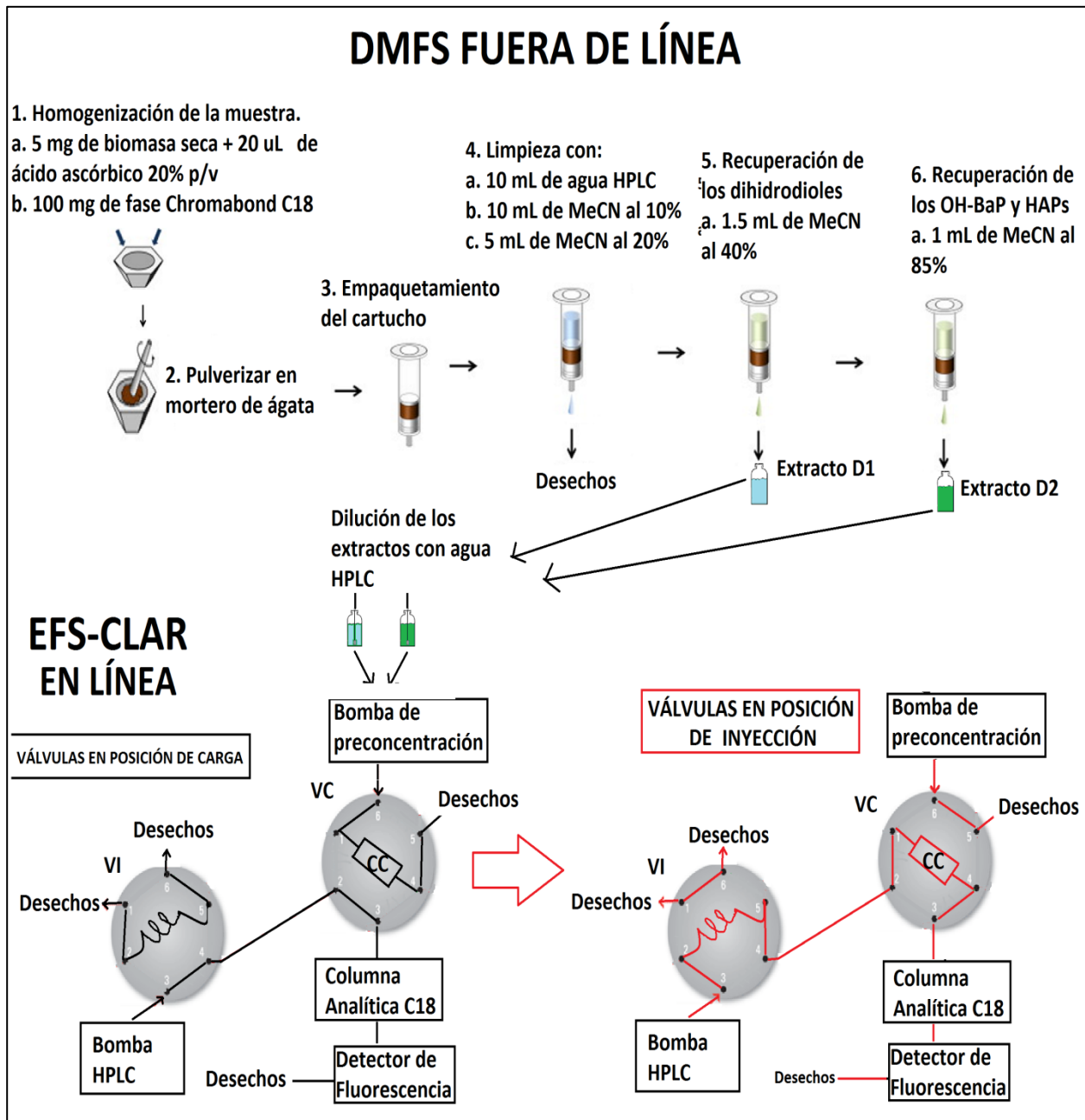


Figura 4.23 Esquema del método de extracción por DMFS y análisis por EFS-CLAR online desarrollado. VI=Válvula del inyector; VC = Válvula de concentración; CC = Columna de concentración rellena con fase C18.

4.6.5.2. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de D1 y D2 obtenidos de muestras de biomasa de microalgas

Con las condiciones establecidas de DMFS se obtuvieron extractos de muestras sólidas de microorganismos no expuestos a los HAPs. Estos extractos se preconcentraron y analizaron en el sistema cromatográfico en línea.

En la figura 4.24 se presentan los cromatogramas obtenidos con la preconcentración del extracto D1. De igual forma que para los ensayos por EFS, se realizó la separación cromatográfica de los dihidrodiolés utilizando una fase móvil metanol/agua (65:35) obteniendo resultados satisfactorios.

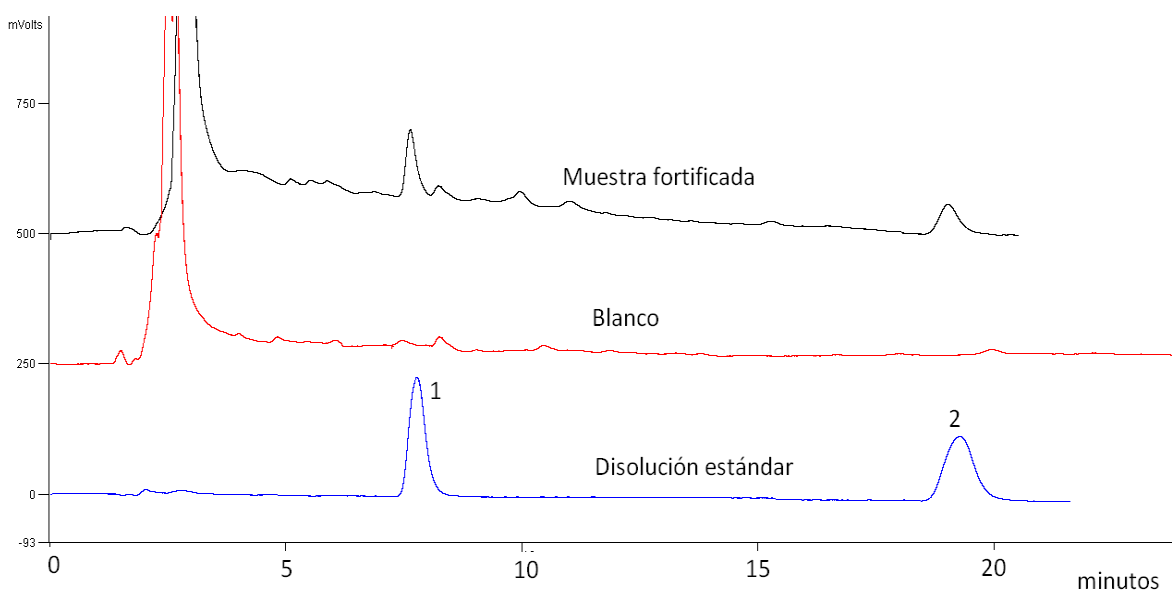


Figura 4.24. Cromatogramas obtenidos con los análisis en línea de extractos D1 provenientes de biomasa de *S. capricornutum* fortificada a una concentración de 32 pg mg^{-1} . Disolución estándar 8 ng mL^{-1} . 1=9,10-dihidrodiol BaP; 2=4,5-dihidrodiol BaP

Se aprecia en la figura 4.24 que los cromatogramas de los extractos D1 provenientes de muestras de *Selenastrum capricornutum* tuvieron menos interferentes en comparación con los obtenidos por la técnica de EFS. De esta forma, no resultó necesario aplicar disolventes de limpieza a la precolumna antes de realizar el análisis en línea.

En la figura 4.25 se presentan los cromatogramas obtenidos con la preconcentración del extracto D2.

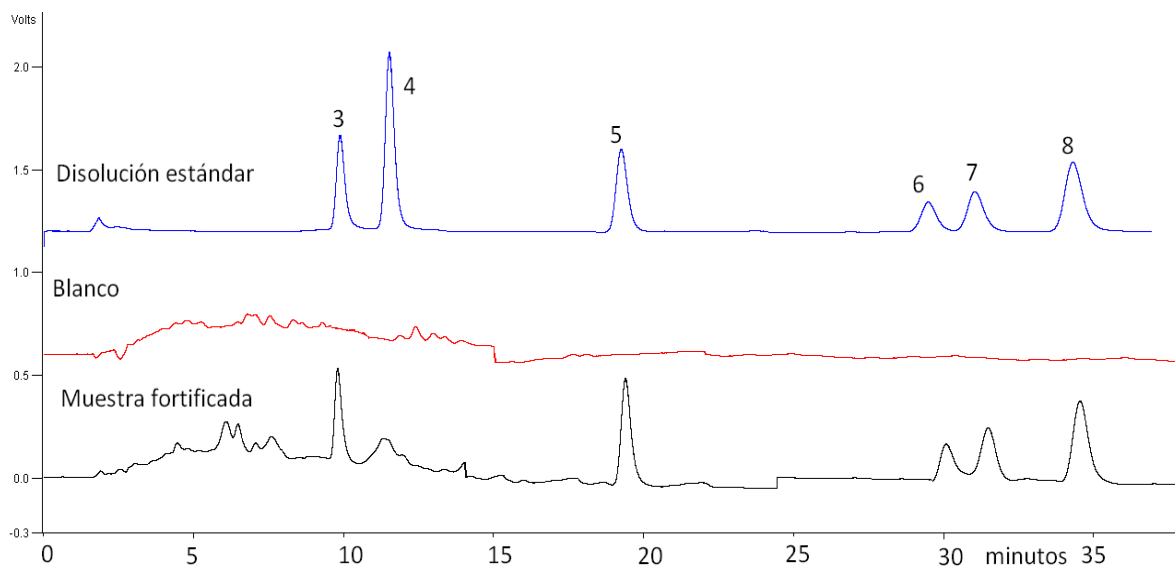


Figura 4.25 Cromatogramas obtenidos con el análisis en línea de extractos D2 provenientes de biomasa de *S. capricornutum* fortificada a una concentración de 32 pg mg^{-1} . Disolución estándar 8 ng mL^{-1} . 3= 9-hidróxi-benzo[a]pireno; 4= 3-hidróxi-benzo[a]pireno; 5= benzo[a]antraceno; 6= benzo[b]fluoranteno; 7= benzo[k]fluoranteno; 8=benzo[a]pireno

Se puede observar en el cromatograma del extracto D2 existe una mayor presencia de interferentes, lo cual hace que la línea base tenga una mayor variación. A pesar de esto, los HAPs y metabolitos se separaron correctamente, a excepción del compuesto 3-OH BaP que eluyó junto a un interferente presente en la muestra. La aparición de este interferente resultó reproducible al realizar réplicas de los ensayos, por lo cual se consideró que las condiciones cromatográficas utilizadas permiten llevar a cabo la validación correcta del método.

4.6.5.3. Validación del método de extracción por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea con muestras de biomasa de microalgas

En la tabla 4.14 se presentan los parámetros obtenidos a partir de la curva de cantidad recuperada en función de la cantidad agregada para cada uno de los compuestos, junto con los límites de detección y cuantificación del método. Se aprecia que de nueva cuenta no fue posible validar el método para el compuesto 3-OH BaP en el intervalo de concentraciones que se manejó. A pesar de agregar el ácido ascórbico a las muestras de biomasa seca, el compuesto presentó recobros menores al 7 % y % de C.V. mayores a 15. De esta forma solo se discuten los resultados para el resto de los analitos.

El método presentó buena linealidad en el intervalo de concentraciones utilizado para todos los compuestos.

Tabla 4.14

Resultados de la validación del método por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea utilizando muestras de biomasa de microalgas.

Compuesto ^a	9,10-dihydrodiol BaP	4,5-dihydrodiol BaP	9-OH BaP	BaA	BbF	BkF	BaP	
Recobro (%) (pendiente x 100)	66	55	40	57	53	62	51	
Linealidad (r^2) ^b	0.9985	0.9920	0.9982	0.9985	0.9941	0.9912	0.9950	
Repetibilidad (% C.V.)	18 pg mg ⁻¹	4.13	4.73	2.9	2.06	3.22	2.8	3.31
	120 pg mg ⁻¹	2.77	3.09	2.35	1.87	2.65	2.06	2.97
L. D. ^c	(pg mg ⁻¹)	3.3	2	2.4	3.2	6.5	5.7	2
L. C. ^d	(pg mg ⁻¹)	9.9	6.2	7.2	9.6	18.7	17.3	6.1

a = El compuesto 3-OH BaP no mostró buenos parámetros de validación cuando se utilizó el método en línea con muestras de biomasa de microalgas.

b = El intervalo de concentraciones para todos los compuestos fue de 20 a 200 pg mg⁻¹.

c = medido como la concentración de analito que produce una señal 3 veces mayor a la del ruido de fondo.

d = medido como la concentración de analito que produce una señal 10 veces mayor a la del ruido de fondo.

r^2 = Coeficiente de correlación; C.V. = Coeficiente de variación; L. D. = Límites de Detección; L. C. = Límites de Cuantificación; s/n=relación intensidad de la señal/ruido de fondo.

BaA =benzo[a]antraceno; BbF = benzo[b]fluoranteno; BkF = benzo[k]fluoranteno; BaP = benzo[a]pireno.

La exactitud fue buena con recobros mayores al 51%, a excepción del 9-OH BaP que obtuvo un valor de 40%. El método presentó buena reproducibilidad con C. V. menores a 4.73% en los dos niveles de fortificación probados.

Los límites de detección estuvieron en el orden de los ppb con valores entre 2 y 6.5 pg mg⁻¹. Los límites de cuantificación estuvieron entre 6.1 y 18.7 pg mg⁻¹. Estos L. C. resultaron suficiente para medir las cantidades pequeñas de los metabolitos producidos y los HAPs en los ensayos de exposición realizados.

4.6.5.4. Evaluación de la presencia de interferentes en los extractos de D1 y D2 obtenidos de muestras de biomasa de protozoarios

En la figura 4.26 se presentan los cromatogramas obtenidos con la preconcentración del extracto D1. Este extracto presentó cantidades de interferentes similares a las obtenidas con muestras de microalgas. De nueva cuenta no fue necesario implementar una secuencia de disolventes de limpieza en la precolumna.

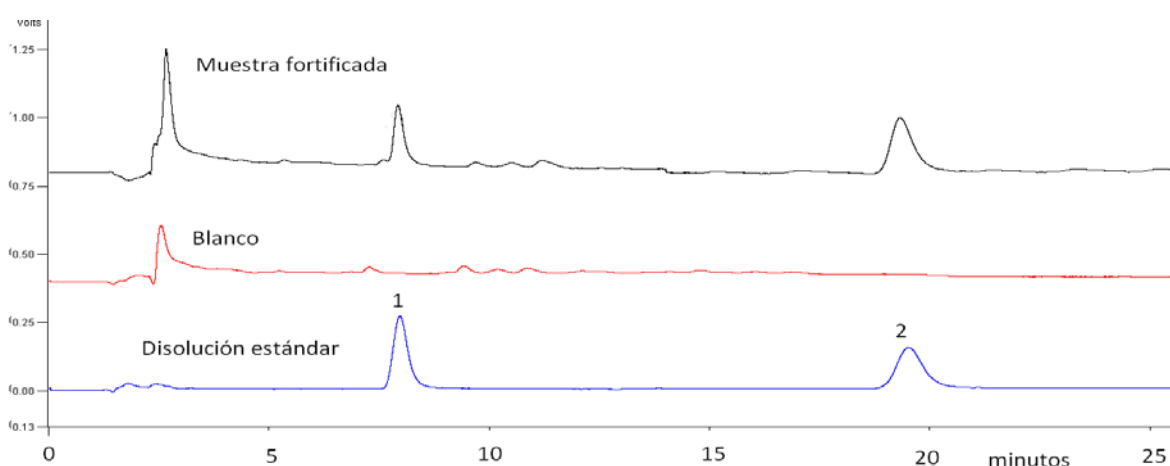


Figura 4.26 Cromatogramas obtenidos con muestras extractos D1 provenientes de biomasa de *C. cucullus* fortificada a una concentración de 90 pg mg^{-1} . Disolución estándar 8 ng mL^{-1} .

En la figura 4.27 se presentan los cromatogramas obtenidos con la preconcentración del extracto D2. En este caso todos los analitos se pueden integrar de forma adecuada y la presencia de interferentes resultó similar a las muestras de microalgas.

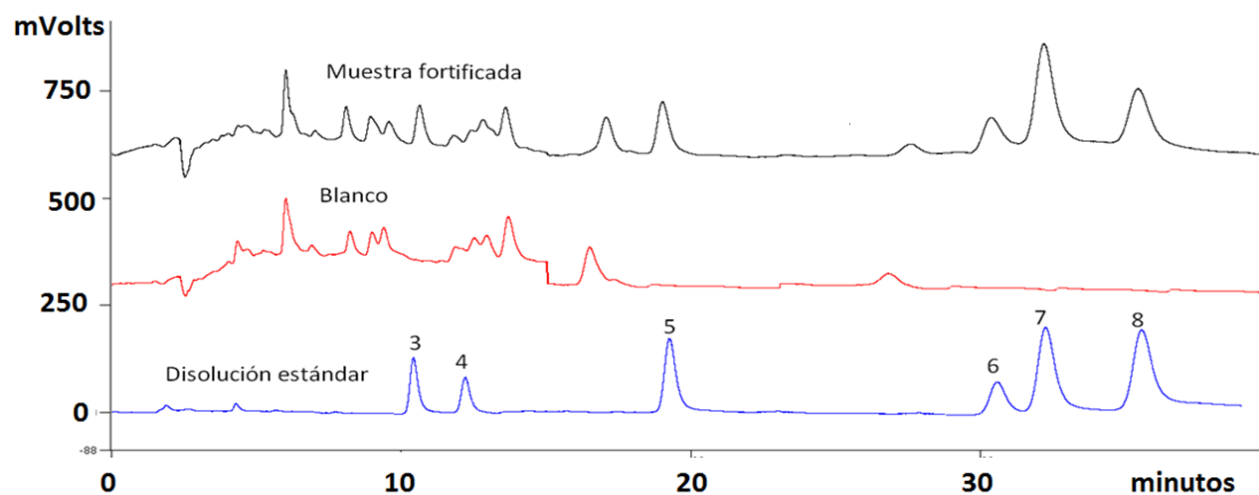


Figura 4.27 Cromatogramas obtenidos con muestras extractos D2 provenientes de biomasa de *C. cucullus* fortificada a una concentración de 90 pg mg^{-1} . Disolución estándar 8 ng mL^{-1} . 3= 9-hidróxi-benzo[a]pireno; 4= 3-hidróxi-benzo[a]pireno; 5= benzo[a]antraceno; 6= benzo[b]fluoranteno; 7= benzo[k]fluoranteno; 8=benzo[a]pireno

4.6.5.5. Validación del método de extracción por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea con muestras de biomasa de protozoarios

En la tabla 4.15 se presentan los resultados obtenidos con los ensayos de validación del método utilizando 2 mg de biomasa seca de protozoarios.

Tabla 4.15

Resultados de la validación del método por DMFS fuera de línea con análisis por EFS-CLAR en línea utilizando muestras de biomasa de protozoarios.

Compuesto ^a	9,10-dihidrodiol BaP	4,5-dihidrodiol BaP	9-OH BaP	BaA	BbF	BkF	BaP	
Recobro (%) (pendiente x 100)	70	65	43	59	55	64	60	
Linealidad (r^2) ^b	0.9932	0.9973	0.9951	0.9976	0.9911	0.9982	0.9965	
Repetibilidad (% C.V.)	60 pg mg ⁻¹	3.90	4.14	3.73	3.07	3.02	4.89	3.51
	120 pg mg ⁻¹	2.03	3.99	2.47	2.07	2.15	2.96	2.99
L. D. ^c	(pg mg ⁻¹)	8.1	5.7	7.4	8.6	16.2	14.5	5.8
L. C. ^d	(pg mg ⁻¹)	27.0	19.0	24.7	32.0	54.0	48.3	19.3

a = El compuesto 3-OH BaP no mostró buenos parámetros de validación cuando se utilizó el método en línea con muestras de biomasa de microalgas.

b = El intervalo de concentraciones para todos los compuestos fue de 50 a 400 pg mg⁻¹.

c = medido como la concentración de analito que produce una señal 3 veces mayor a la del ruido de fondo.

d = medido como la concentración de analito que produce una señal 10 veces mayor a la del ruido de fondo.

r^2 = Coeficiente de correlación; C.V. = Coeficiente de variación; L. D. = Límites de Detección; L. C. = Límites de Cuantificación; s/n=relación intensidad de la señal/ruido de fondo.

BaA =benzo[a]antraceno; BbF = benzo[b]fluoranteno; BkF = benzo[k]fluoranteno; BaP = benzo[a]pireno.

Al igual que con las muestras de biomasa de microalgas, el compuesto 3-OH BaP no pudo ser determinado con buena exactitud y reproducibilidad. Para el resto de los compuestos el método presentó buena linealidad con coeficientes de regresión (r^2) mayores a 0.9911.

La exactitud fue buena con valores de recobro entre 43 y 70 %. De nueva cuenta el compuesto 9-OH BaP fue el compuesto que presentó los valores más pequeños.

La reproducibilidad del método fue aceptable con C. V. menores a 4.89 % en los dos niveles de concentración utilizados. Esto demuestra que el método resulta adecuado para medir a los analitos a pesar de usar cantidades de muestras pequeñas del orden de los mg.

Se obtuvieron valores de L. D. entre 5.7 y 16.2 pg mg^{-1} . Mientras que los L. C. estuvieron entre 19 y 54 pg mg^{-1} . En ambos casos los resultados fueron mayores a los obtenidos con muestras de microalgas debido a que se utiliza una cantidad de muestra menor. A pesar de esto, los límites siguen estando en el orden de los pg mg^{-1} .

Una vez que se contó con los métodos validados, éstos fueron aplicados en ensayos de exposición a los HAPs.

4.7. Aplicación de las metodologías desarrolladas en ensayos de exposición a los HAPs

4.7.1. Toxicidad del BaP sobre las microalgas

En este trabajo se realizaron ensayos de exposición a 3 diferentes concentraciones de BaP, 0.5, 5 y 50 ng mL^{-1} . Se evaluó el efecto tóxico que el BaP podría tener en los cultivos monitoreando el número de células con la medición de la absorbancia a 685 nm de los cultivos después de 48 h de haber agregado al contaminante. Los resultados se muestran en la figura 4.28. Se realizó un análisis estadístico ANOVA y se encontró que no existieron diferencias significativas en el crecimiento de los microorganismos al ser expuestos a estas concentraciones de BaP.

4.7.2. Exposición de cultivos de microalgas a una concentración de 5 ng mL^{-1} de BaP

Los ensayos de exposición se iniciaron con una concentración de BaP cercana al valor de su solubilidad en agua (3.6 ng mL^{-1}). En la figura 4.29 se presentan los resultados de la cantidad de BaP recuperada en cada uno de los tiempos de exposición. Se observó un metabolismo rápido de las microalgas hacia el BaP ya que desde los 45 min de exposición se pudo observar una disminución de las cantidades de BaP recuperadas en los cultivos expuestos respecto al cultivo control sin microorganismos.

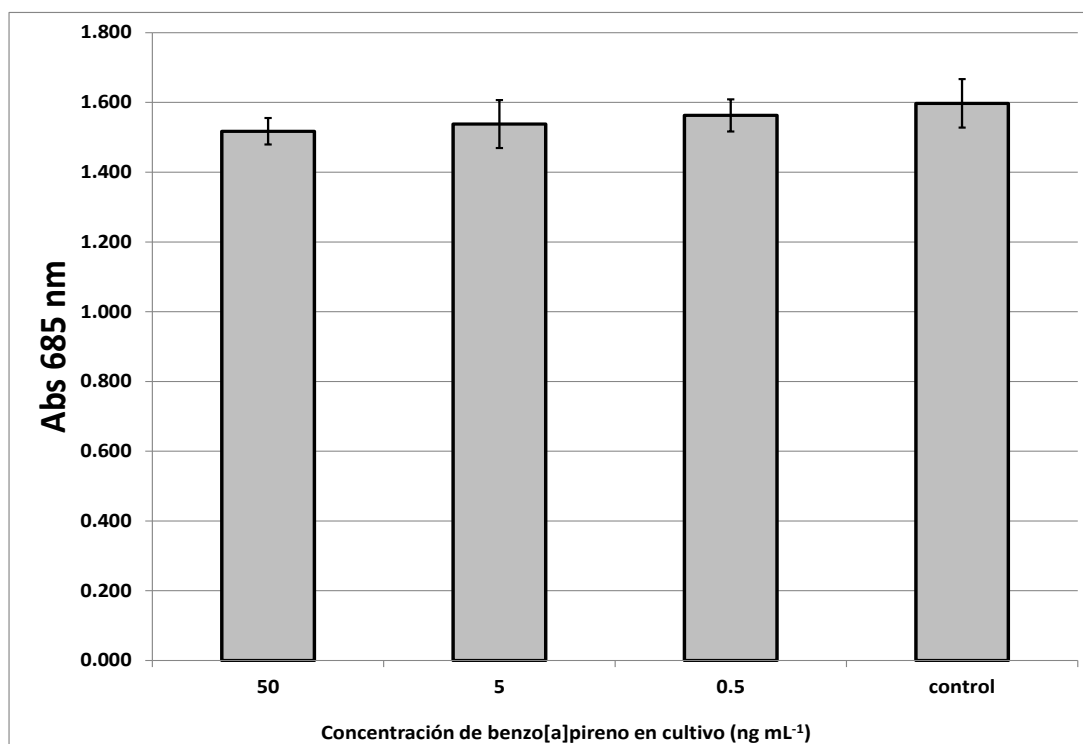


Figura 4.28 Evaluación de la toxicidad del BaP en cultivos de microalgas iluminadas con luz amarilla. Los cultivos fueron expuestos a cada concentración del contaminante por 24 h.

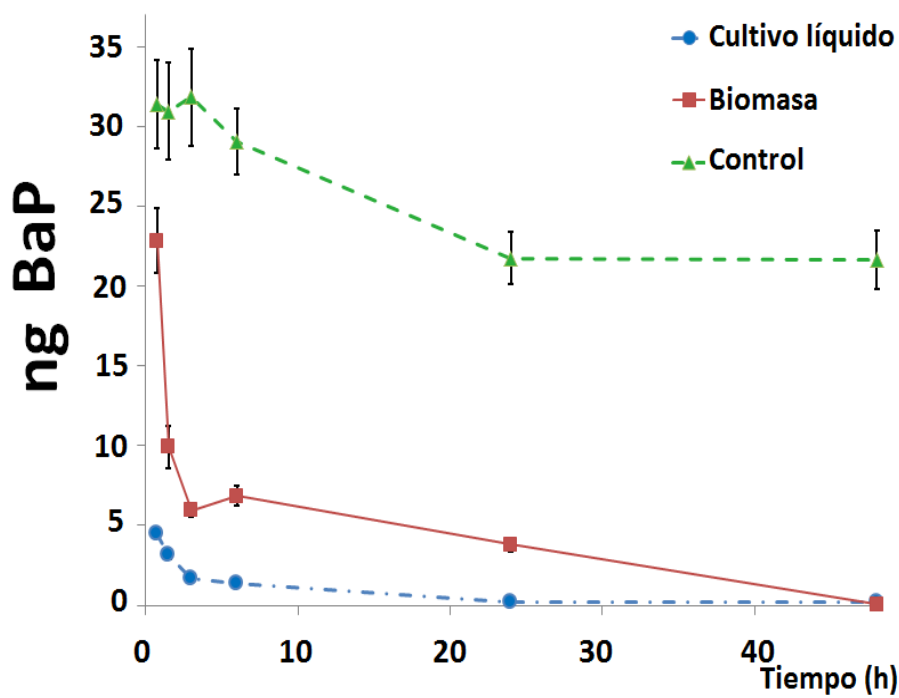


Figura 4.29 Cantidades de BaP recuperadas en el ensayo de exposición de cultivos de microalgas a una concentración de 5 ng mL⁻¹ de BaP.

En la figura 4.29 se observa que la cantidad recuperada inicialmente (32 ng) en el control sin microorganismos es menor que la cantidad de BaP agregada ($75 \text{ ng} = 15 \text{ mL} \times 5 \text{ ng mL}^{-1}$). Esto proporciona un rendimiento de extracción del 42 % que concuerda con los valores obtenidos para este compuesto en la validación del método por EFS. Las cantidades en el control van disminuyendo al aumentar el tiempo de exposición hasta alcanzar un equilibrio a las 24 h. No se presentaron señales de productos de degradación en los cromatogramas obtenidos al analizar estas muestras que indiquen una posible pérdida del BaP por foto-oxidación. Debido a esto, la disminución de la cantidad de BaP en estas muestras control puede atribuirse a la tendencia que tienen los HAPs más pesados para adherirse a las paredes del recipiente que los contiene cuando se encuentran en disoluciones acuosas.

En la figura 4.29 se puede observar también que inicialmente el BaP se acumuló en la biomasa del cultivo y las cantidades recuperadas en el medio líquido resultan menores. Después el BaP comenzó a disminuir en cada una de las fracciones del cultivo. Si se suman las cantidades de BaP recuperadas en la biomasa y el medio de cultivo líquido se observa que en cada tiempo de exposición son menores a las recuperadas en el control sin microorganismos, lo cual es prueba de que el microorganismo *S. capricornutum* es capaz de degradar al BaP.

Los resultados mostraron que durante las primeras 3 h de exposición se obtiene una mayor velocidad de degradación respecto a los siguientes tiempos monitoreados. En la bibliografía se reporta que la aparición de metabolitos puede alterar el metabolismo de los HAPs progenitores (Kazunga & Aitken, 2000) e incluso el mecanismo de metabolismo llevado a cabo por las microalgas puede ser dependiente de la concentración del contaminante. Sin embargo, mayores estudios deben realizarse para determinar esta última hipótesis.

Hasta un tiempo de exposición de 6 h, en el medio de cultivo solo se recuperaron 1.8 ng de BaP, lo cual nos proporciona una concentración de 0.12 ng mL^{-1} en los 15 mL de cultivo. Esta concentración está por debajo del límite establecido por la USEPA (0.2 ng mL^{-1}) y es cercano al límite establecido por la CONAGUA en México (0.1 ng mL^{-1}). Con esto se demuestra la capacidad que podría tener este microorganismo para disminuir la contaminación por BaP en los cuerpos de agua naturales.

A un tiempo de 48 h, la cantidad de BaP remanente en el medio de cultivo fue de 0.18 ng, mientras que en la biomasa se obtuvieron 0.07 ng. Esto proporciona una cantidad de BaP total remanente en el cultivo de 0.25 ng. Si se compara esta cantidad total remanente con la cantidad recuperada de BaP

inicialmente en el control (32 ng = 100 % BaP) se obtiene un porcentaje BaP remanente del 0.8%. Lo cual nos indica que la microalga fue capaz de degradar en 48 h el 99.2% del BaP recuperado.

Las cantidades de BaP pudieron medirse sin dificultad realizando inyecciones directas de los extractos obtenidos a tiempos de exposición menores a las 24 h. Ejemplos de estos cromatogramas se presentan en la figura 4.30.

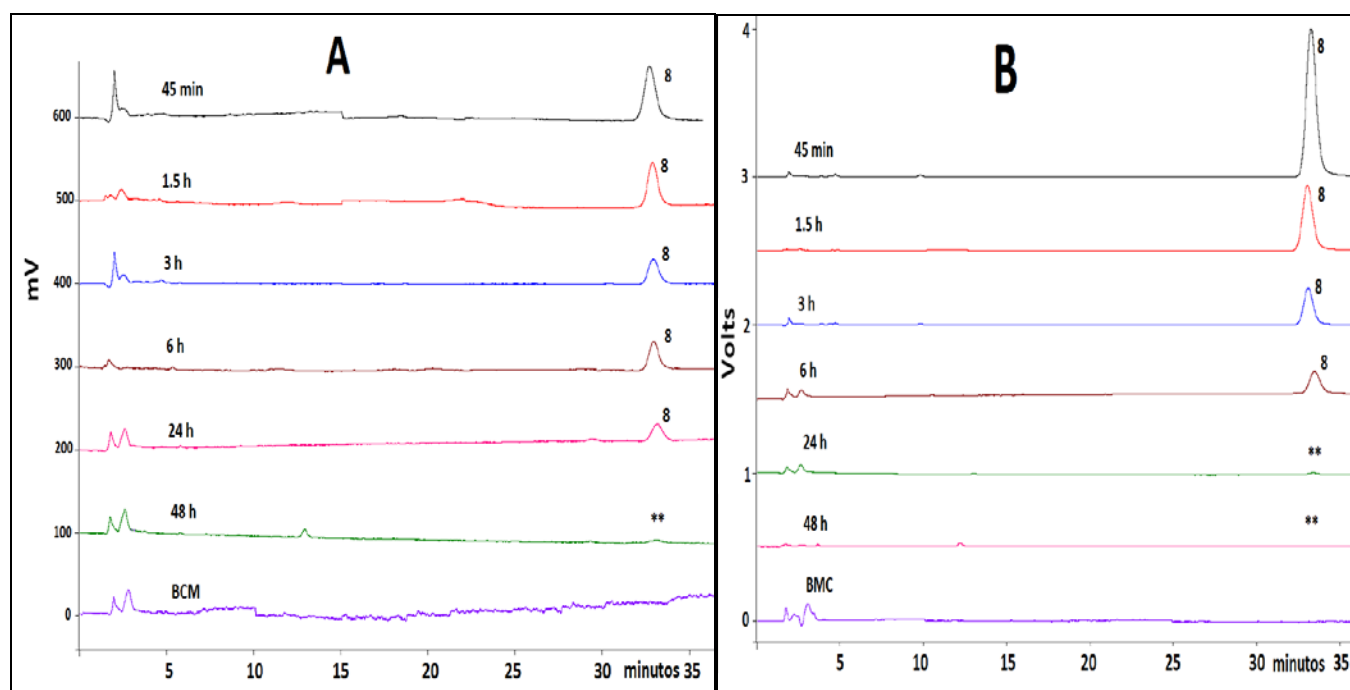


Figura 4.30 Desaparición del BaP en los cultivos de microalgas a diferentes tiempos de exposición. (A) Inyección directa del extracto E2 al sistema CLAR-FD y (B) Inyección directa del extracto D2. 8= BaP; ** = Cuantificado con el método en línea desarrollado; BMC = Blanco del medio de cultivo sin BaP. Condiciones de análisis: fase móvil MeOH/Agua (85:15) y flujo de 1 mL min⁻¹. Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

Al utilizar los métodos de análisis en línea desarrollados para el análisis de los extractos E1 y D1, se lograron identificar y cuantificar algunos de los metabolitos formados por la exposición al BaP. Ejemplos de los cromatogramas obtenidos para los extractos E1 y D1 se presentan en la figura 4.31.

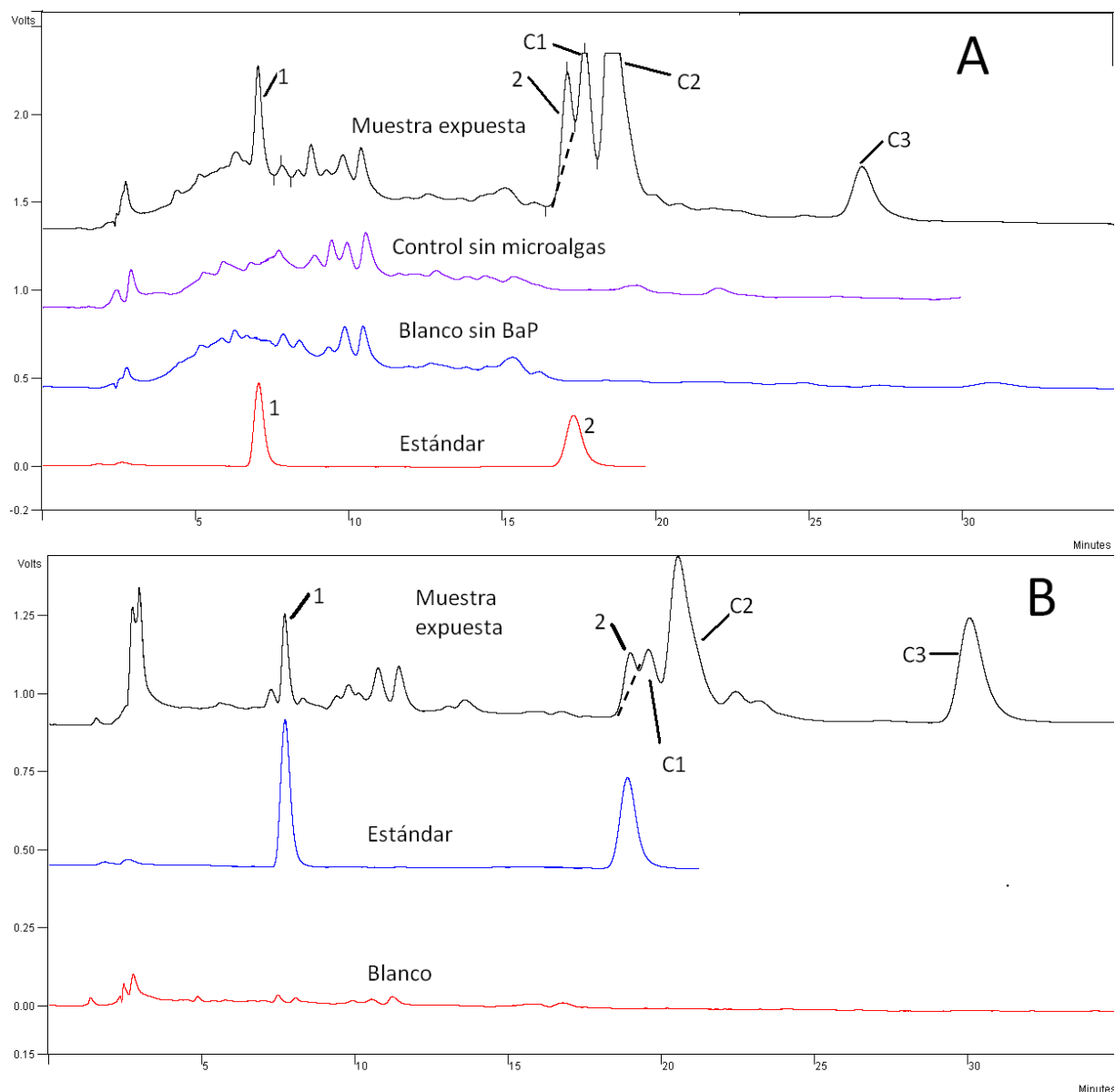


Figura 4.31 Cromatogramas obtenidos al analizar con el método desarrollado los extractos E1 (A) y D1 (B) provenientes de muestras expuestas a 5 ng mL^{-1} de BaP durante 3 h. 1=9,10-dihidrodiol BaP; 2=9,10-dihidrodiol BaP. C1-C3 = Compuestos no identificados. Condiciones de análisis: fase móvil MeOH/Agua (65:35) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

En la figura 4.31 se observa la presencia de picos cromatográficos en la muestra expuesta al BaP que coinciden con los tiempos de retención de los compuestos 9,10-dihidrodiol BaP y 4,5-dihidrodiol BaP. En particular el pico correspondiente al 4,5-dihidrodiol BaP aparece junto a otros compuestos con tiempos de retención cercanos. Por lo cual se tuvo que integrar el pico como se muestra en la misma figura 4.31 (línea punteada). La integración del pico correspondiente al primer dihidrodiol no presentó dificultades y las cantidades calculadas para cada uno de los dihidrodiol se muestran en la figura 4.32.

Al ser los dihidrodioles de mayor polaridad que el BaP, en la figura 4.31 se observa que en todos los tiempos, la cantidad recuperada de los dihidrodioles es mayor en el medio líquido que en la biomasa. También se observó que el compuesto 9,10-dihidrodiol BaP se forma a un ritmo más lento en comparación al compuesto 4,5-dihidrodiol BaP. Sin embargo, las cantidades del segundo comenzaron a disminuir después de un tiempo de exposición de 3 h. Mientras que el 9,10-dihidrodiol BaP parece continuar formándose.

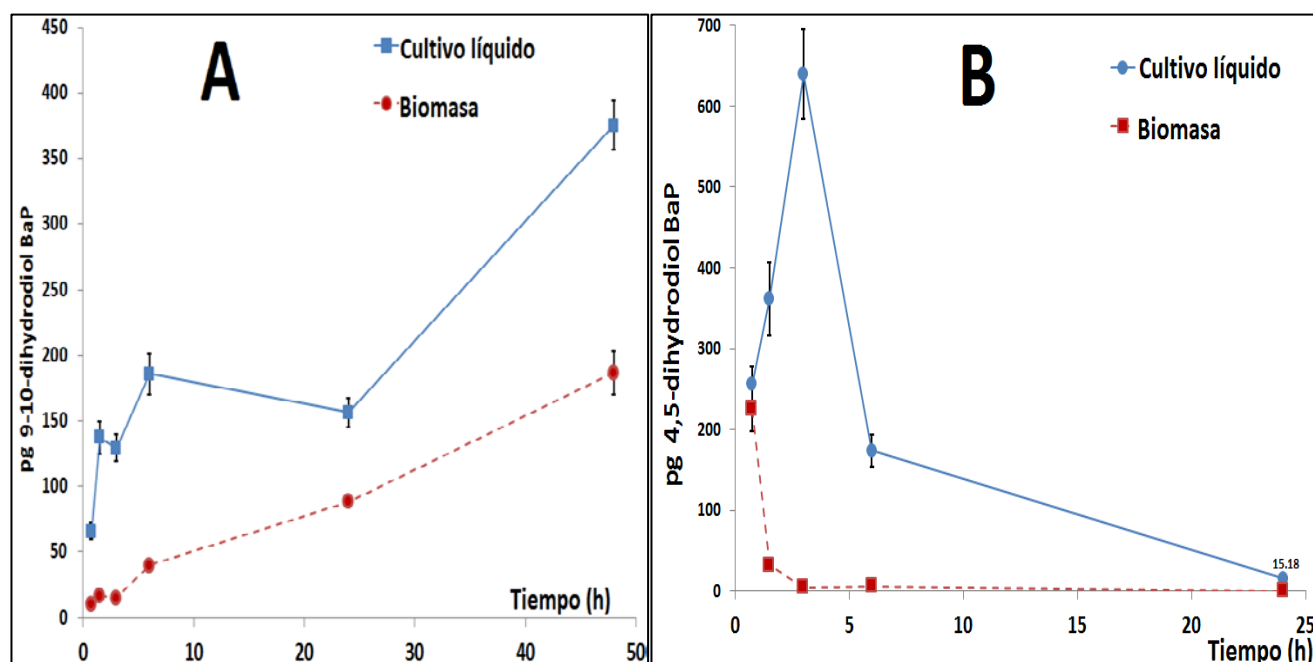


Figura 4.32 Cantidades de (A) 9,10-dihidrodiol BaP y (B) 4,5-dihidrodiol BaP recuperadas en los ensayos de exposición de cultivos de microalgas al BaP a una concentración de 5 ng mL^{-1} .

La cantidad máxima producida de estos metabolitos fue 640 pg (para el 4, 5-dihidrodiol BaP), los cuales dan una concentración en los 15 mL de cultivo de $43 \text{ pg mL}^{-1} = 0.043 \text{ ng mL}^{-1}$, la cual es menor a los límites de cuantificación del sistema cromatográfico obtenidos para estos compuestos (1.23 a 1.55 ng mL^{-1}) cuando se llevan a cabo análisis con inyección directa de los extractos, con lo cual se resalta la utilidad de la preconcentración del extracto en línea para poder medir las cantidades tan pequeñas de los metabolitos formados cuando los cultivos se exponen a concentraciones del contaminante similares a las encontradas naturalmente.

En la figura 4.33 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar con el método desarrollado los extractos E1 y D1 de las diferentes muestras expuestas al BaP.

En la figura 4.34 se presentan las cantidades recuperadas para el compuesto 9-OH BaP.

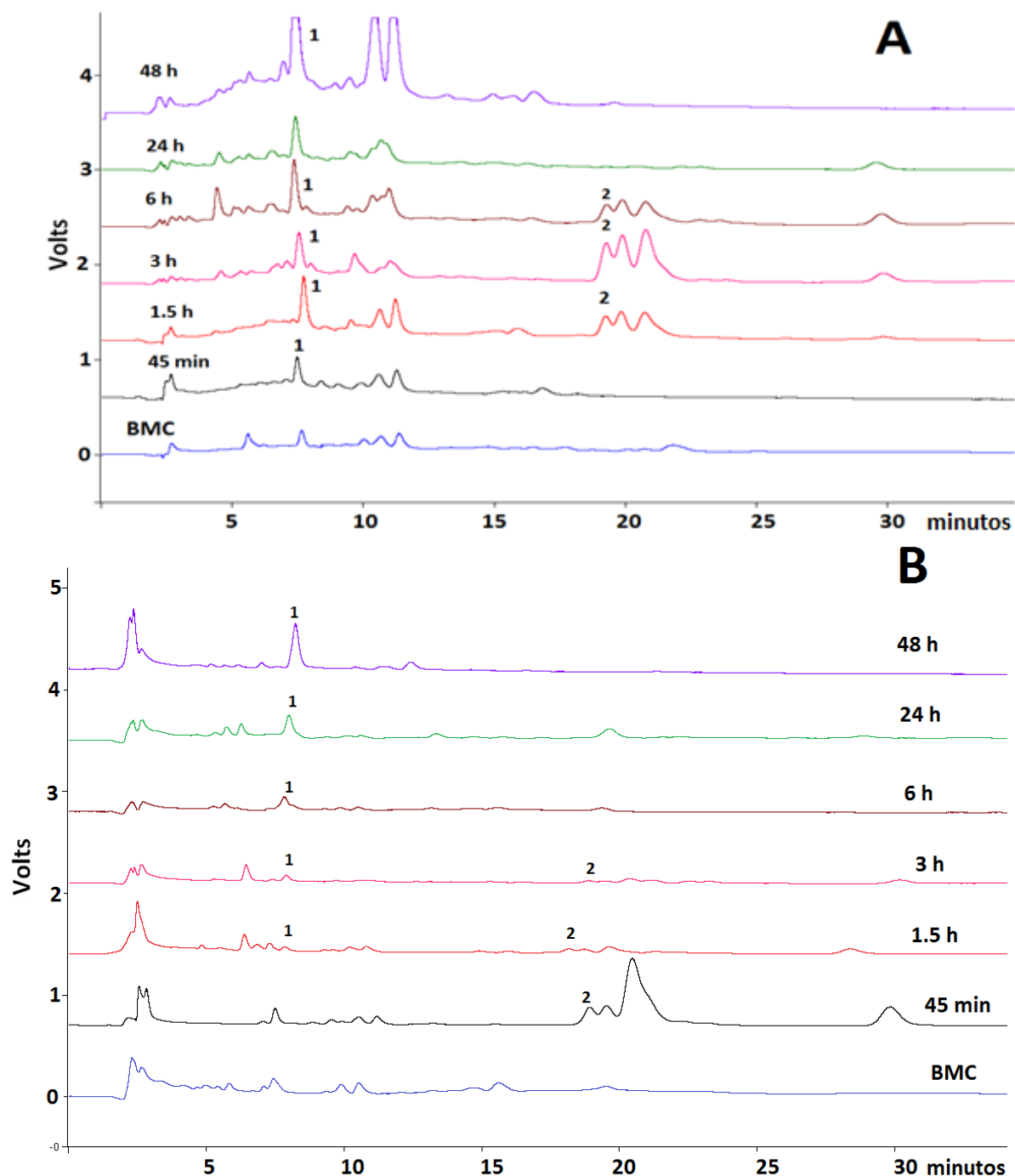


Figura 4.33 Cromatogramas obtenidos al analizar con los métodos desarrollados los extractos (A) E1 y (B) D1 provenientes de cultivos expuestos a una concentración de 5 ng mL^{-1} de BaP. Condiciones de análisis: fase móvil MeOH/Agua (85:15) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

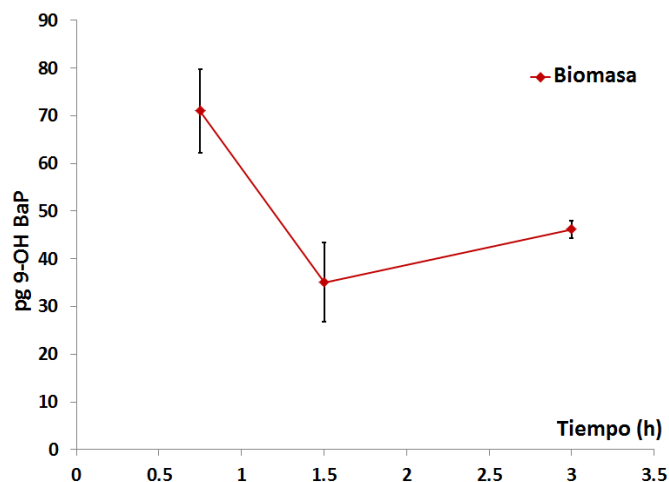


Figura 4.34 Cantidades de 9-OH BaP recuperadas de cultivos de microalgas expuestos a una concentración de 5 ng mL^{-1} de BaP.

En la figura 4.34 se observa que el compuesto 9-OH BaP solo pudo ser cuantificado en la biomasa del cultivo. En tiempos de exposición mayores a las 3 h, no se detectó la presencia de este metabolito. Las cantidades recuperadas fueron menores a las cantidades de los dihidrodioles con lo cual se puede apreciar que la producción de estos últimos se favorece respecto a los OH-BaP. En la figura 4.35 se presenta un ejemplo de los cromatogramas obtenidos para los extractos D2 (biomasa).

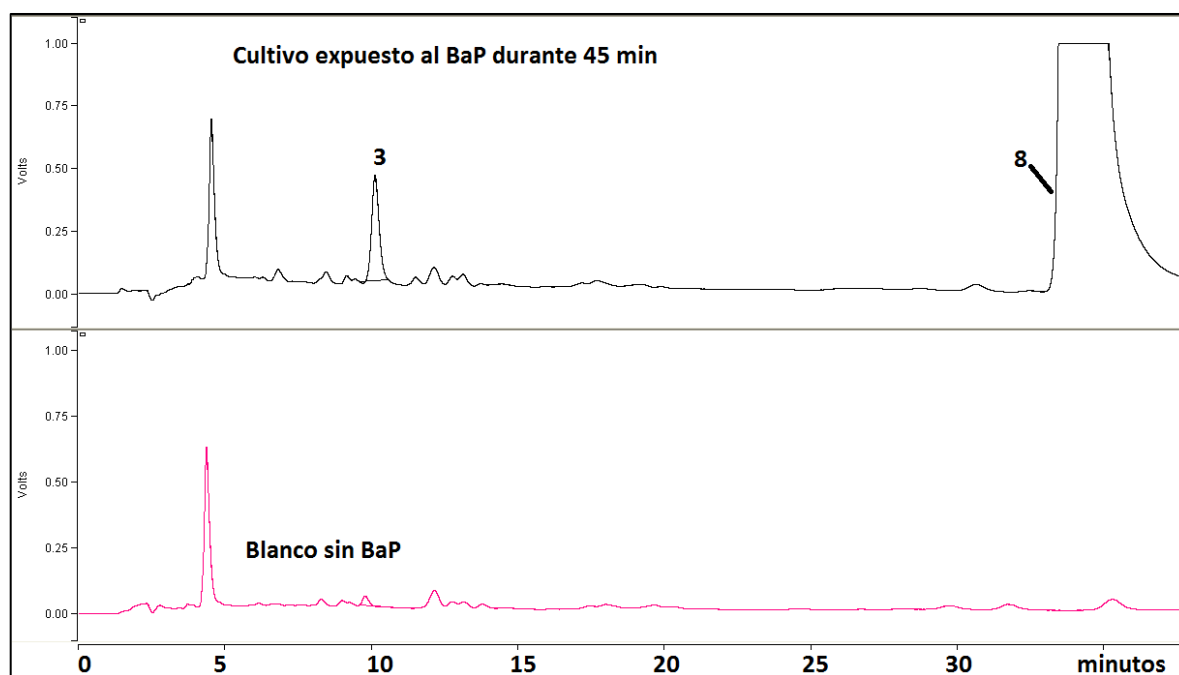


Figura 4.35 Cromatogramas obtenidos al analizar extractos D2 provenientes de la biomasa de un cultivo de microalgas expuestos a una concentración de 5 ng mL^{-1} de BaP. 3= 9-OH BaP; 8= BaP. Condiciones de análisis: fase móvil MeOH/Agua (85:15) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

4.7.3. Exposición de cultivos de microalgas a una concentración de 50 ng mL⁻¹ de BaP

Con el fin de evaluar el desempeño de la microalga al estar presente una concentración mayor de BaP, se realizó este segundo ensayo utilizando los mismos tiempos de exposición.

En la figura 4.36 se muestran las cantidades recuperadas para el BaP durante los tiempos monitoreados.

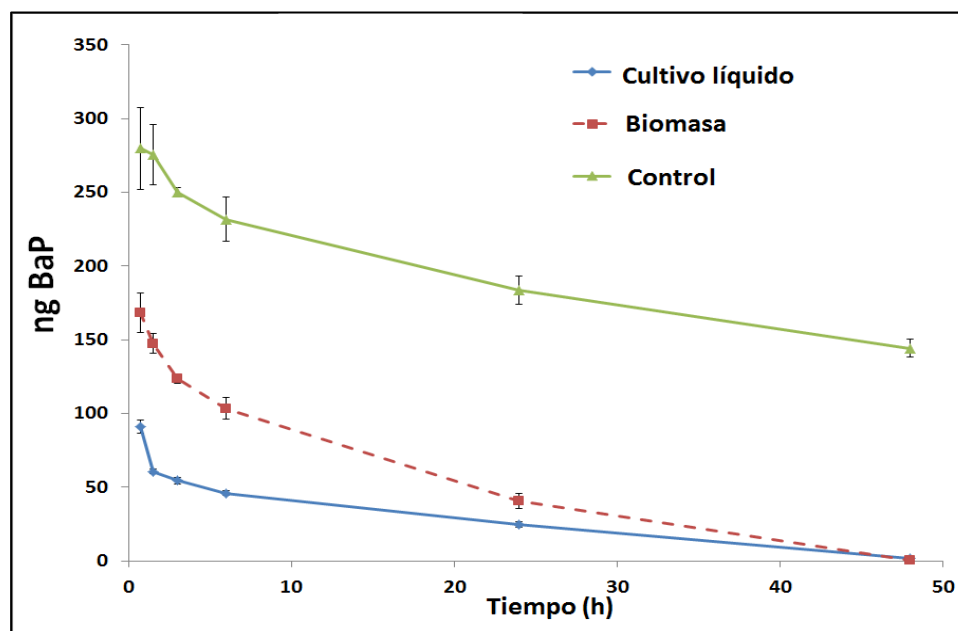


Figura 4.36 Cantidades recuperadas de BaP a partir de muestras de cultivo de microalgas expuestas a una concentración de 50 ng mL⁻¹.

En la figura 4.36 se observa que el BaP presentó un comportamiento similar al del experimento anterior. En el cultivo control sin microorganismos, la cantidad de BaP recuperada es menor a la agregada, < 280 ng y 750 ng, respectivamente. Los niveles de BaP disminuyeron de nueva cuenta al aumentar el tiempo. En estas muestras tampoco hubo evidencia de foto-oxidación del compuesto.

En estos experimentos, la concentración del BaP en el medio líquido disminuyó hasta valores menores a los límites máximos aceptados por la USEPA (200 pg mL⁻¹) al llegar a un tiempo de exposición de 48 h (120 pg mL⁻¹). Aunque los cultivos fueron expuestos a una concentración diez veces mayor que en el ensayo previo, el microorganismo fue capaz de reducir los niveles de contaminante en un período de tiempo relativamente corto (2 días).

En la figura 4.37 se presentan las cantidades recuperadas del compuesto 3-OH BaP.

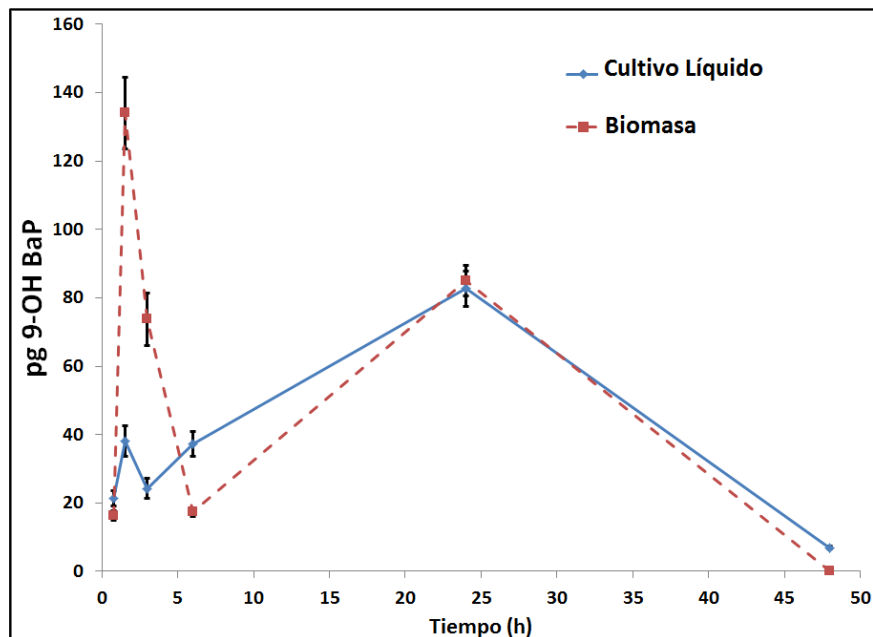


Figura 4.37 Cantidades recuperadas de 9-OHBaP a partir de muestras de cultivo de microalgas expuestas a una concentración de 50 ng mL^{-1} de BaP.

En este ensayo se logró recuperar al compuesto 9-OH BaP en la biomasa y cultivo líquido con cantidades máximas recuperadas entre 80 y 136 pg, respectivamente. Comparando estas cantidades con las recuperadas de los dihidrodioles se observa de nueva cuenta que la producción de estos últimos es favorecida ($>6000 \text{ pg}$ para los dihidrodioles respecto a 136 pg del 9-OH BaP). Al igual que en el primer ensayo, su producción no mostró un patrón constante.

En la figura 4.38 se presentan los resultados obtenidos para los dihidrodioles del BaP. En la figura 4.38A se observa que el compuesto 9,10-dihidrodiol BaP presentó una mayor distribución en el medio líquido con respecto a la biomasa. En ambas matrices se logró cuantificar durante todos los tiempos monitoreados. La cantidad máxima recuperada en el medio de cultivo fue de $2,650 \text{ pg}$ a las 6 h de exposición. Después de este tiempo, la cantidad de 9,10-dihidrodiol BaP comienza a disminuir. En la figura 4.38B se presentan los resultados de las cantidades recuperadas del metabolito 4,5 dihidrodiol BaP y se observó que este fue distribuido en las mismas cantidades entre la biomasa y el medio líquido hasta las primeras 3 h de exposición. Después de este tiempo, las cantidades comenzaron a disminuir y al igual que el otro dihidrodiol, lo hizo a una mayor velocidad en la biomasa recuperada que en el medio líquido. Las cantidades máximas recuperadas en el medio líquido fueron cercanas a los $4,750 \text{ pg}$. Al igual

que en el ensayo anterior, este metabolito solo se detectó hasta llegar a un tiempo de exposición de 24 h cuando su concentración llegó por debajo de los límites de detección de los métodos desarrollados.

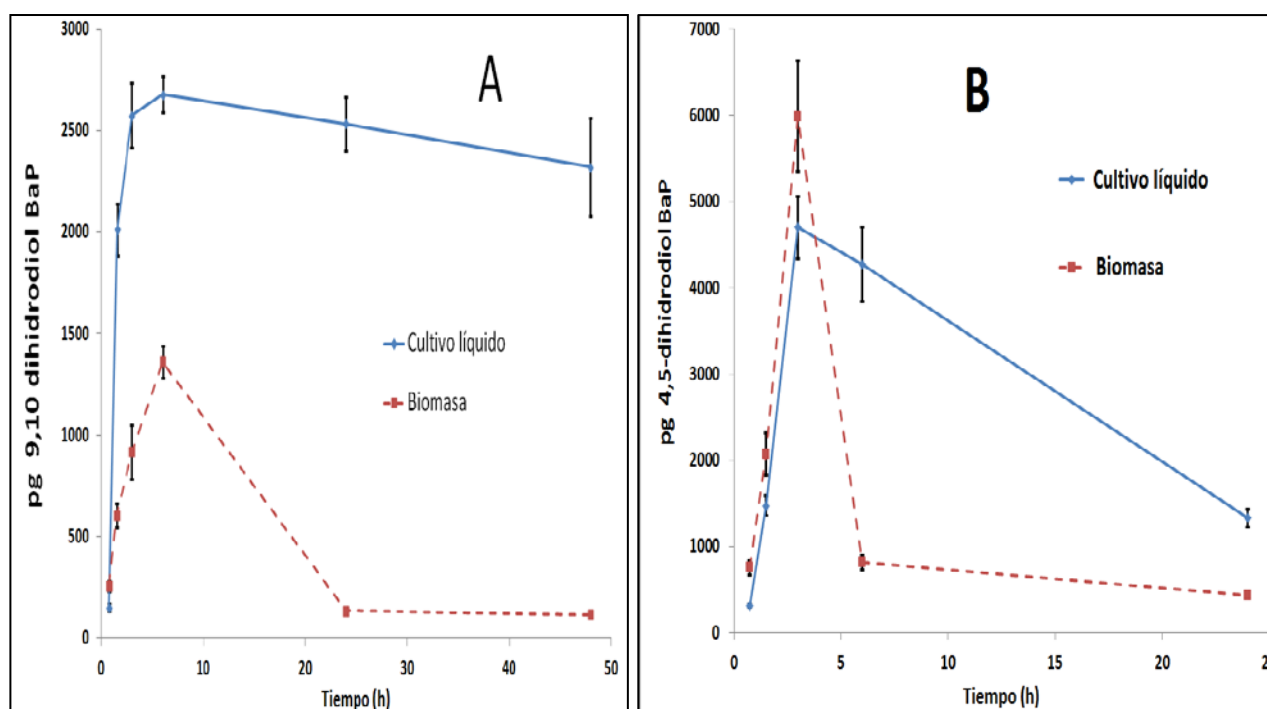


Figura 4.38 Cantidades recuperadas de dihidrodiol BaP a partir de muestras de cultivo de microalgas expuestas a una concentración de 50 ng mL^{-1} de BaP.

Cuando la concentración de BaP en este ensayo de exposición se incrementó en un orden de 10 (de 5 a 50 ng mL^{-1}), las cantidades máximas recuperadas de los dihidrodiol aumentaron en el mismo orden ($\sim 600 \text{ pg}$ y $\sim 6000 \text{ pg}$). Mientras que las cantidades máximas recuperadas del 9-OH BaP solo aumentaron al doble (70 ng y 136 ng).

En los dos ensayos realizados, se puede calcular la tasa de degradación del BaP si se obtienen las pendientes de las curvas de ng totales de BaP degradados en función de los tiempos de exposición. Se hicieron estos cálculos para los datos obtenidos hasta las primeras 3 h de exposición que fue el período de tiempo donde se obtuvo la mayor actividad metabólica en los ensayos realizados a las dos diferentes concentraciones de BaP utilizadas. Se encontró que los cultivos expuestos a una concentración de 5 ng mL^{-1} de BaP presentaron tasas de degradación menores respecto a los cultivos expuestos a 50 ng mL^{-1} ($8.02 \text{ ng BaP degradados h}^{-1}$ contra $33.94 \text{ ng BaP degradados h}^{-1}$). Con estos resultados se puede observar que la actividad metabólica de la microalga *S. capricornutum* es dependiente de la

concentración del contaminante ya que la actividad aumentó cerca de 4 veces al incrementar 10 veces la concentración de BaP.

Estos resultados muestran que la actividad metabólica del alga es mayor a tiempos cortos de exposición y puede ser el motivo por el que algunos autores no han logrado detectar este tipo de metabolitos producidos. Por ejemplo, Ke et al. (2010) realizaron un trabajo de exposición de cultivos de microalgas al BaP y diferentes metales para evaluar el efecto que estos tenían sobre la degradación del este hidrocarburo aromático policíclico. En la publicación se menciona que los tiempos de exposición monitoreados estuvieron entre 1 y 14 días. En este mismo trabajo se menciona que no fue posible determinar los metabolitos formados y que incluso se necesitó utilizar concentraciones mayores a 100 ng mL⁻¹ para poder seguir la degradación del BaP.

La bibliografía reporta que los compuestos cercanos al pico del 4,5-dihidrodiol BaP son también dihidrodioles formados (11,12-dihidrodiol BaP y 7,8-dihidrodiol BaP). Al no contar con otros estándares disponibles para identificarlos, se logró determinar el espectro de masas de estos compuestos utilizando un sistema CLAR-EM(Q-TOF) para confirmar su naturaleza. Los resultados se presentan a continuación.

4.7.4. Obtención de los espectros de masas de los metabolitos por CLAR-EM(Q-TOF)

El sistema CLAR-EM utilizado contó con una fuente de ionización de tipo ESI (“electrospray ionization”), el cual no es regularmente utilizado para la determinación de compuestos no polares como los HAPs. Sin embargo, al ser los dihidrodioles y los OH-BaP compuestos de mayor polaridad, se logró obtener el espectro de masas de una disolución de los dihidrodioles con una concentración alta, de 5 ppm. Los resultados se presentan en la figura 4.39.

Se observó que la fragmentación de los compuestos fue escasa debido a la estabilidad de los anillos aromáticos. Sin embargo, se logró obtener un fragmento común para los dihidrodioles con valor de m/z de 269. Este valor correspondería al fragmento producido por la pérdida de un grupo OH (PM=17), ya que el peso molecular de los dihidrodioles es 286. Por otra parte, los compuestos OH-BaP formaron fragmentos con una relación m/z de 214 y 230.

De esta forma se realizó el análisis de los extractos E1 obtenidos a las 3 h de exposición ya que fue el tiempo de exposición donde se obtuvo una mayor formación de los dihidrodioles. Sin embargo, las concentraciones resultaron ser muy bajas para producir una señal en el detector de masas.

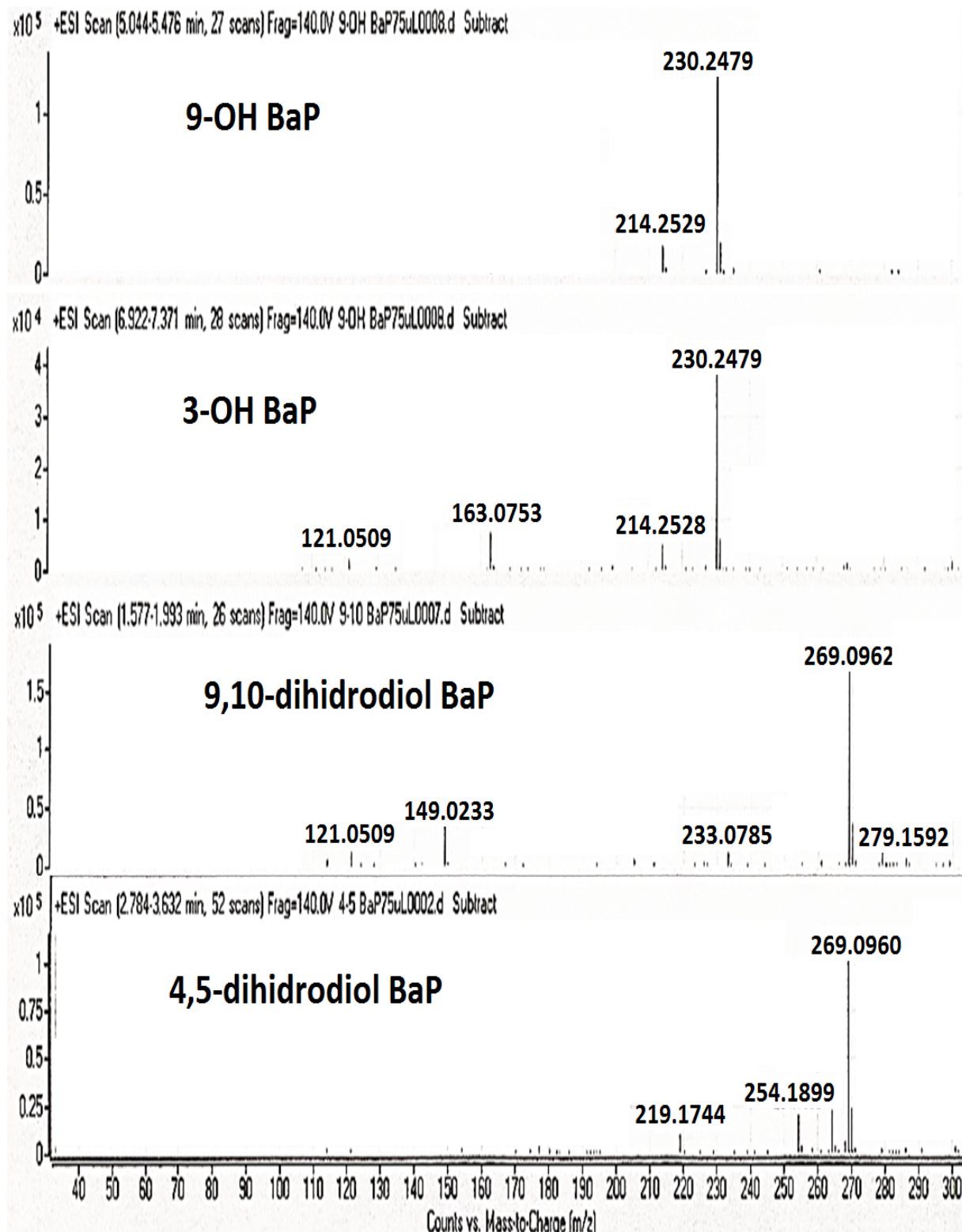


Figura 4.39 Espectros de masas obtenidos para los metabolitos del BaP a una concentración de 2 ppm utilizando el sistema CLAR-EM(Q-TOF).

Por otra parte, se observó que la microalga tolera concentraciones mayores de BaP y al aumentar la concentración de exposición a 240 ng mL^{-1} las cantidades de metabolitos formadas eran también mayores. Los cromatogramas de los extractos E1 provenientes de exposiciones a diferentes concentraciones de BaP se presentan en la figura 4.40

El extracto proveniente de la exposición a 240 ng mL^{-1} se inyectó al sistema CLAR-EM(Q-TOF), se obtuvieron los cromatogramas y espectros de masas presentados en la figura 4.41.

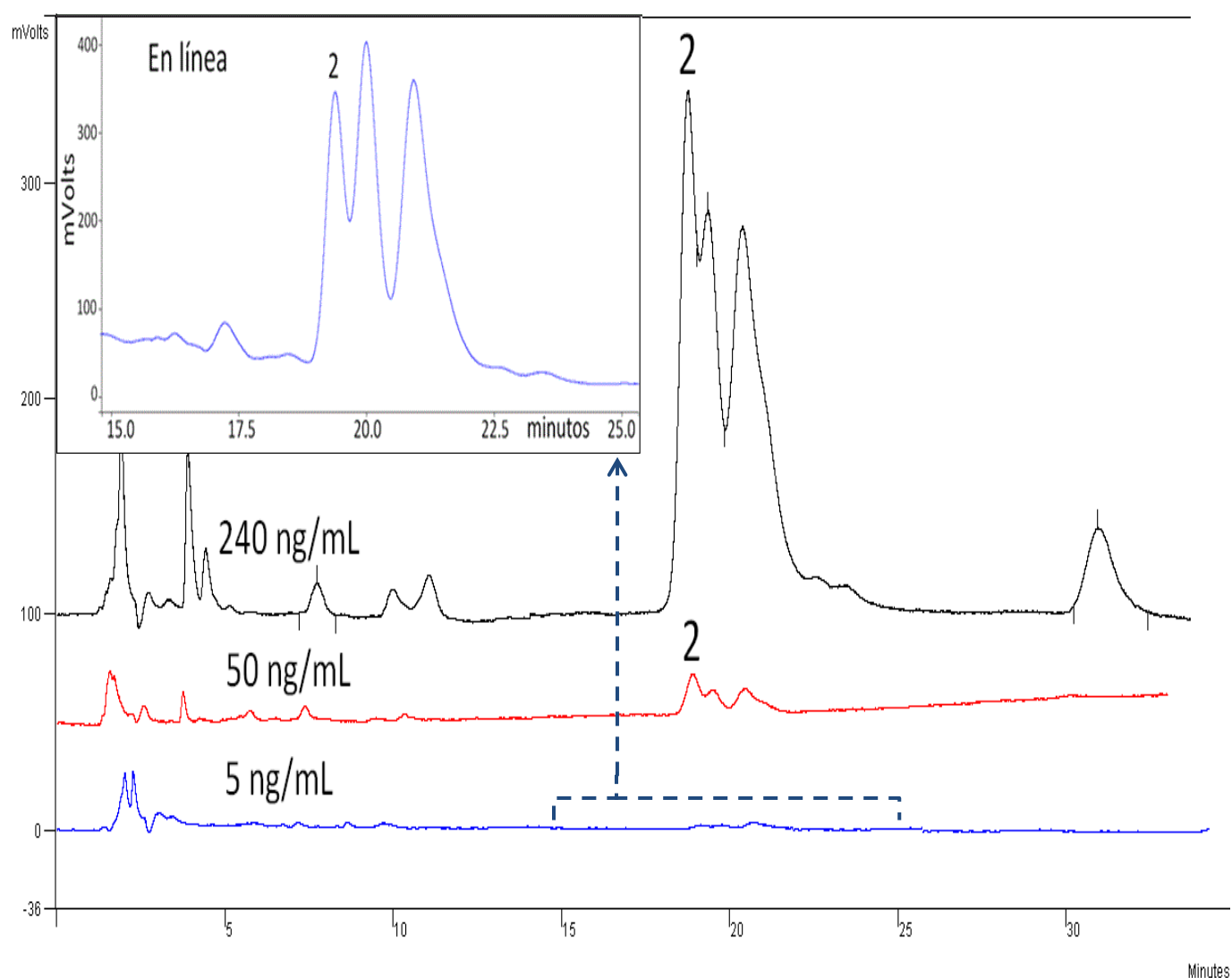


Figura 4.40 Comparación entre los cromatogramas obtenidos por inyección directa de extractos E1 de muestras de cultivos expuestos durante 1.5 h a diferentes concentraciones de BaP. 2 = 4,5-dihidrodiol BaP. Condiciones de análisis: fase móvil MeOH/Agua (65:35) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

En la figura 4.41 se puede observar que al monitorear el fragmento de $m/z = 269$, característico para los estándares de dihidrodioles, se obtuvo un cromatograma similar al que arroja el sistema CLAR-DF. Se observa el pico “a” que corresponde con el tiempo de retención del estándar 9,10-dihidrodiol BaP (2.45 min), después aparece un triplete de picos donde el marcado como “b” corresponde en tiempo con el estándar del 4,5-dihidrodiol BaP (4.3 min). Los compuestos “c” y “d” presentaron el mismo fragmento de $m/z = 269$ por lo que se puede deducir que son también dihidrodioles. Según lo reportado por Warshawsky et al. (1988) el compuesto “c” correspondería al 11,12-dihidrodiol BaP mientras que el compuesto “d” corresponde al 7,8-dihidrodiol BaP.

De la misma forma se intentó realizar la confirmación del pico producido en los extractos E2 y D2 que corresponde en tiempo de retención con el compuesto 9-OH BaP. Sin embargo, la concentración a la que se formaron resultó insuficiente para poderse medir en el sistema CLAR-EM(Q-TOF).

De esta forma se demostró la utilidad de las metodologías desarrolladas para identificar y cuantificar algunos de los metabolitos producidos por la exposición de cultivos de microalgas al BaP.

Debido a que la microalga podría formar este tipo de metabolitos a partir del resto de los HAPs, se realizaron ensayos de exposición a cada contaminante por separado para evaluar la degradación y al mismo tiempo la aparición de algunos de sus metabolitos. Estos resultados se discuten en la siguiente sección.

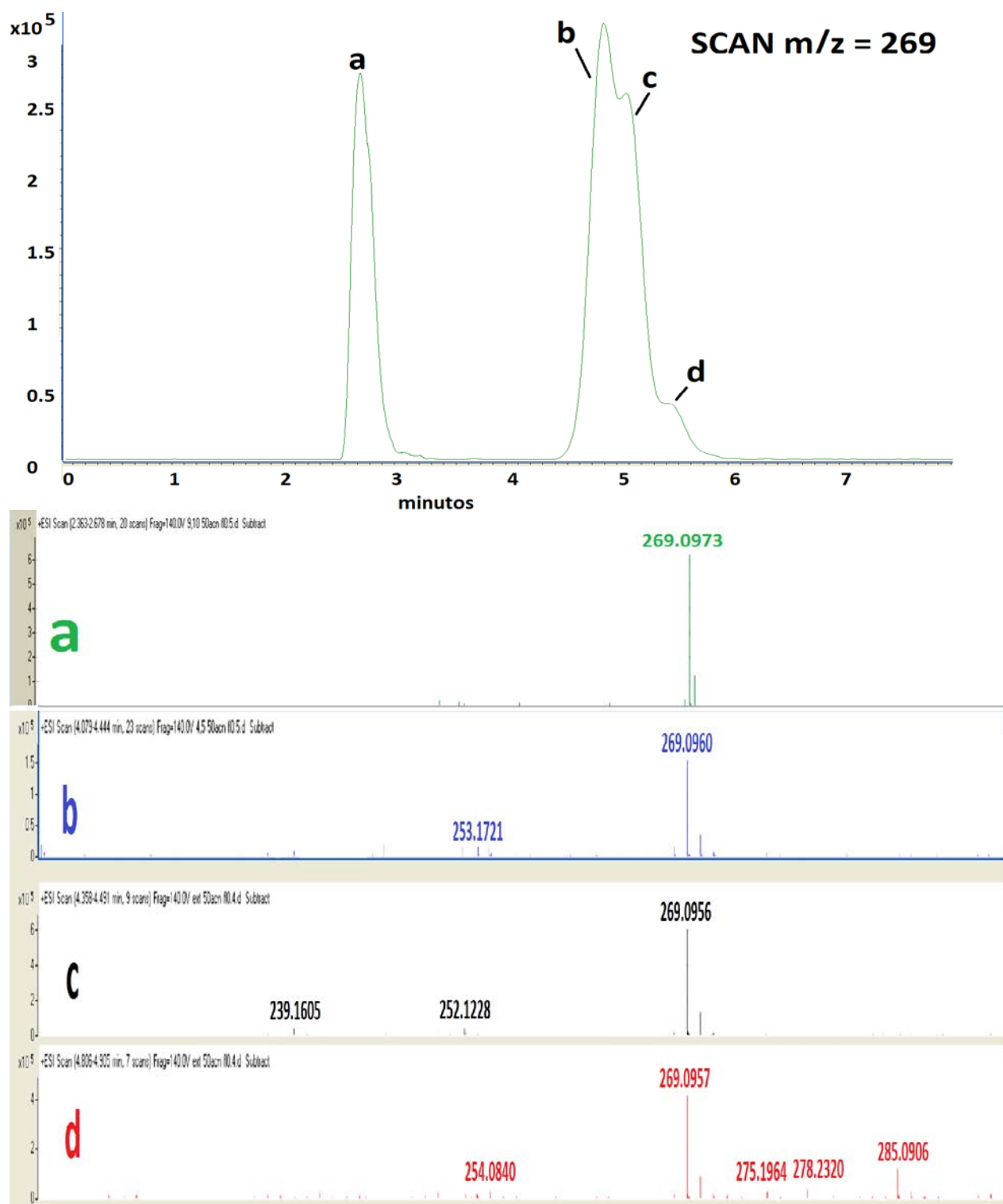


Figura 4.41 Cromatograma y espectros de masas obtenidos a partir de la inyección de una muestra de extracto E1 en el sistema CLAR-EM.

4.7.5. Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a cada uno de los HAPs

Estos ensayos se realizaron por triplicado a una misma concentración de los HAPs para evaluar si existía diferencia entre la velocidad de degradación que la microalga realiza sobre cada uno de los HAPs estudiados. Se eligió la concentración de 0.5 ng mL^{-1} debido a que es cercana al valor de solubilidad a la saturación en agua del HAPs menos soluble, en este caso el BkF que tiene un valor de 0.76 ng mL^{-1} (ATSDR, 1995). Se eligió un tiempo de exposición de 3 h, ya que en los resultados previos es el tiempo en el que se alcanzaron la mayor cantidad de metabolitos formados.

Las concentraciones de los HAPs fueron monitoreadas con las metodologías desarrolladas en línea y en la tabla 4.16 se presentan las cantidades obtenidas en los componentes del cultivo expuesto (biomasa y medio líquido) y en el cultivo control sin microorganismos.

Tabla 4.16

Cantidades promedio (n=3) recuperadas de los HAPs en los ensayos de exposición con cultivos de microalgas.

Compuesto	Medio líquido ng (C.V. %)	Biomasa ng (C. V. %)	Control ng (C. V. %)
Benzo[a]antraceno	0.04 (3.1)	0.26 (3.5)	4.19 (5.0)
Benzo[b]fluoranteno	0.22 (4.3)	0.95 (2.9)	3.86 (4.5)
Benzo[k]fluoranteno	0.16 (4.9)	1.37 (3.5)	3.59 (6.3)
Benzo[a]pireno	0.22 (6.3)	1.97 (7.9)	2.78 (6.5)

En la tabla 4.16 se observa que de los 4 HAPs estudiados se distribuyen con cantidades mayores en la biomasa que en el medio de cultivo líquido.

Si consideramos como 100% las cantidades recuperadas en el cultivo control sin microorganismos, se puede calcular el porcentaje degradado por las microalgas con las siguientes relaciones:

$$\% \text{ residual} = \frac{\text{Cantidad en control} - (\text{Cantidad en biomasa} + \text{Cantidad en medio líquido})}{\text{Cantidad en control}} \times 100$$

$$\% \text{ degradado} = 100 - \% \text{ residual}$$

De esta forma se calcularon los porcentajes degradados para cada HAPs y los resultados se muestran en la figura 4.42.

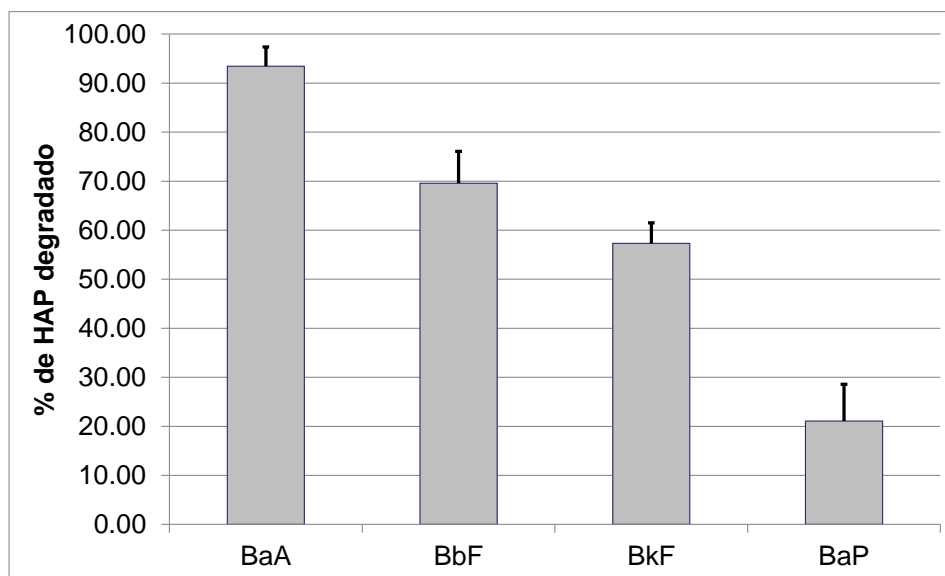


Figura 4.42 Porcentajes degradados de los HAPs al exponer diferentes cultivos de *S. capricornutum* a una concentración individual de cada HAPs de 0.5 ng mL^{-1} durante 3 h.

En la figura 4.42 se observa que el BaA resultó ser el compuesto que presentó una mayor degradación, mientras que el BaP fue el que presentó la degradación menor. Esto coincide con lo reportado en la literatura donde se señala que los HAPs de menor peso molecular se degradan más rápido (Gramss et al., 1999; Kazunga & Aitken, 2000; Ke et al., 2010).

Al analizar los extractos obtenidos para el BaA, se observó la formación de dos compuestos que aparecen en los extractos E1 y D1, por lo cual se podría tratar de dihidrodioles del BaA. Se adquirió un estándar del compuesto 8,9-dihidrodiol BaA y se comparó con las muestras de extractos obtenidas. Los resultados se muestran en la figura 4.43.

En la figura 4.43 correspondiente a los extractos E1, se observa que el pico cromatográfico que aparece aproximadamente a los 13.5 min corresponde con el pico del estándar del compuesto 8,9-dihidrodiol BaP. También apareció otro compuesto con un tiempo de retención menor (11.5 min) el cual por el perfil de elución que demostraron los metabolitos, podría ser otro dihidrodiol del BaA.

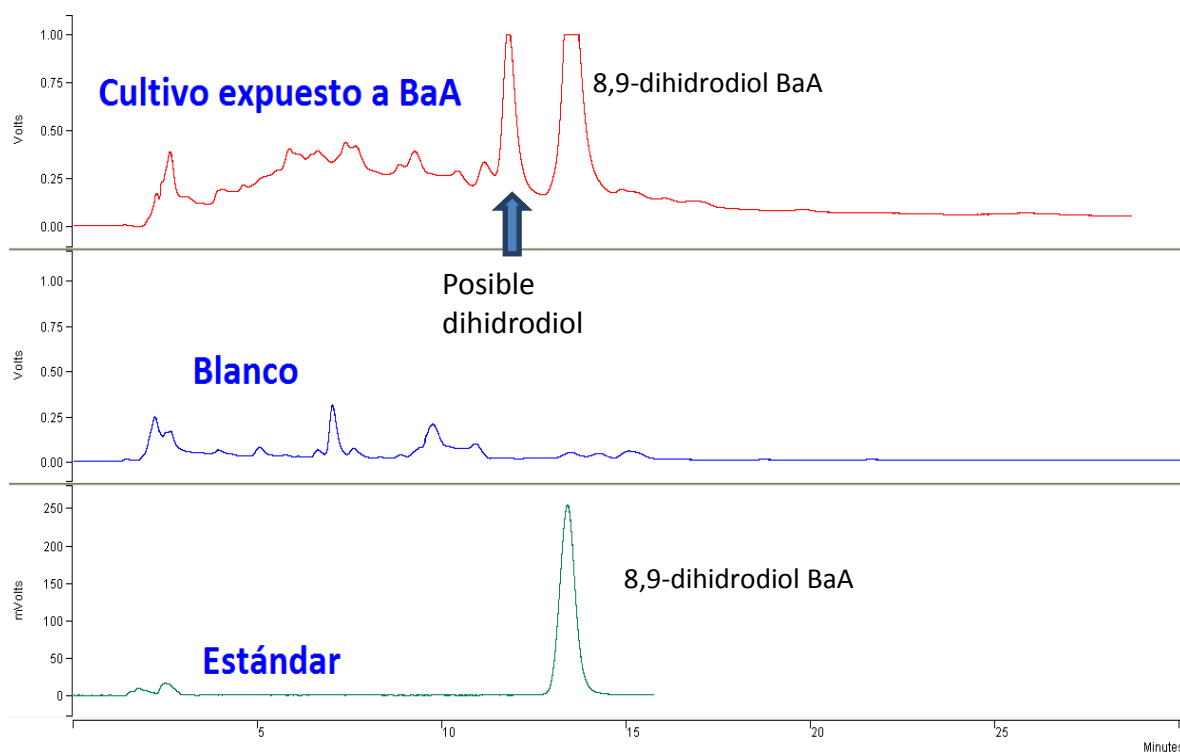


Figura 4.43 Cromatogramas de extractos E1 obtenidos durante la exposición de cultivos de *S. capricornutum* a una concentración de 0.5 ng mL^{-1} de BaA. Condiciones de análisis: utilizando una fase móvil MeOH/Agua (65:35) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

En los extractos D1 de las muestras expuestas a los compuestos BkF y BbF también se logró identificar la presencia de picos cromatográficos que se forman por el metabolismo de los contaminantes. Los resultados se presentan en la figura 4.44. Se compararon los cromatogramas con inyecciones de estándares de los compuestos 11,12-dihidrodiol BbF ($t_r=11.5 \text{ min}$) y 8,9-dihidrodiol BkF ($t_r=8.6 \text{ min}$). Sin embargo, ninguno de los compuestos presentó tiempos de retención cercanos a los de los picos encontrados en los ensayos de exposición.

Con estos resultados se resalta la utilidad que los métodos desarrollados pueden tener en la realización de ensayos de exposición a los contaminantes, no solo para medir la degradación del compuesto progenitor, sino también la identificación y cuantificación de los metabolitos producidos.

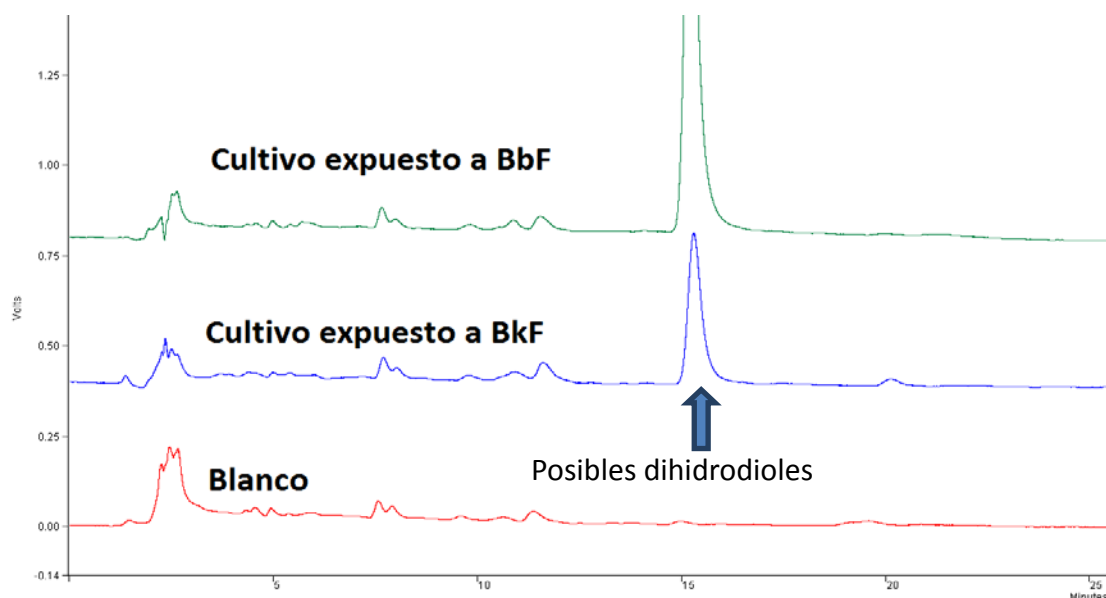


Figura 4.44 Cromatogramas de extractos D1 obtenidos durante la exposición de cultivos de *S. capricornutum* a una concentración de 0.5 ng mL^{-1} de BkF y BbF. Condiciones de análisis : fase móvil MeOH/Agua (65:35) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

4.7.6. Toxicidad del BaP sobre las células de protozooario

Se evaluó la toxicidad del BaP sobre el microorganismo contando el número de células presentes en un cultivo control sin BaP y en otro al que se le agregó una concentración de 5 ng mL^{-1} . Los resultados obtenidos en este ensayo se presentan en la figura 4.45.

Los resultados mostraron que el protozooario *C. cucullus* es capaz de resistir la presencia del BaP en el medio de cultivo ya que el número de células se mantuvo similar al del control sin contaminante.

4.7.7. Exposición de cultivos de protozoarios a una concentración de BaP de 5 ng mL^{-1}

De esta forma, el cultivo se dejó crecer un día y se agregó el contaminante, midiendo las cantidades de BaP recuperadas en 3 diferentes tiempos de exposición como fueron: 3, 24 y 48 h. A diferencia de las microalgas, el contaminante no se agrega cuando el cultivo está en la fase de crecimiento debido a que la cantidad de biomasa recuperada resultaba insuficiente para los análisis. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4.46.

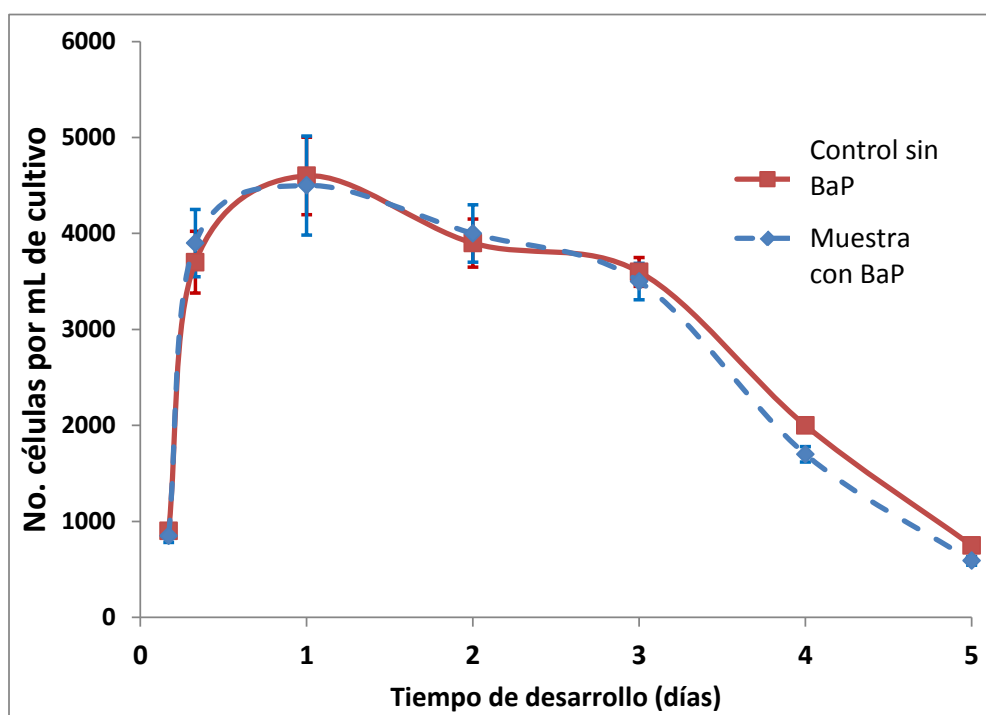


Figura 4.45 Variación del número de células de protozoarios por mL de cultivo en muestras con BaP (5 ng mL^{-1}) y sin contaminante.

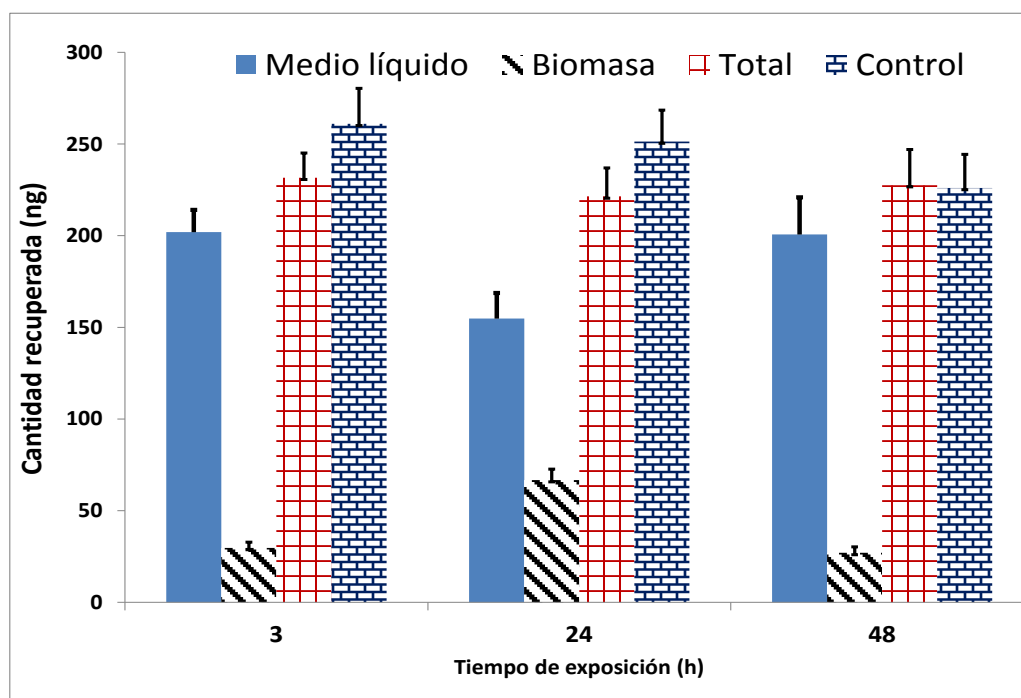


Figura 4.46 Cantidades de BaP recuperadas en la biomasa y medio líquido de los cultivos expuestos a una concentración de 0.5 ng mL^{-1} . Total=cantidad en medio líquido+cantidad en biomasa.

En la figura 4.46 se observa que se recuperó una mayor cantidad de BaP en el medio de cultivo que en los protozoarios a los diferentes tiempos monitoreados. Se observa también que la cantidad de BaP disminuye de un tiempo de 3 h a 24 h en el medio líquido; después, a las 48 h de exposición, esta cantidad vuelve a aumentar. En la biomasa se observa un efecto contrario, la cantidad aumenta de las 3h a las 24 h para después disminuir a las 48 h. Esto se atribuye a que en tiempos menores a 24 h el BaP se bioacumula en la células de *C. cucullus*. Después, el BaP puede ser liberado al medio debido a la muerte de las células ya que a los 3 días de desarrollo del cultivo (48 h de exposición al BaP) el número de células comienza a decaer.

Analizando la misma figura 4.46 se puede observar que la cantidad total de BaP recuperada (medio líquido + biomasa) en cada ensayo resulta semejante en cada uno de los tiempos monitoreados. Esto sugiere que el microorganismo no es capaz de metabolizar al BaP, lo cual se verificó con el análisis de los extractos E1 y D1 en busca de la formación de dihidrodioles. En estos análisis no se observó la presencia de picos cromatográficos que indicaran la producción de algún metabolito, por ejemplo los dihidrodioles. Ejemplos de estas muestras analizadas se presentan en la figura 4.47.

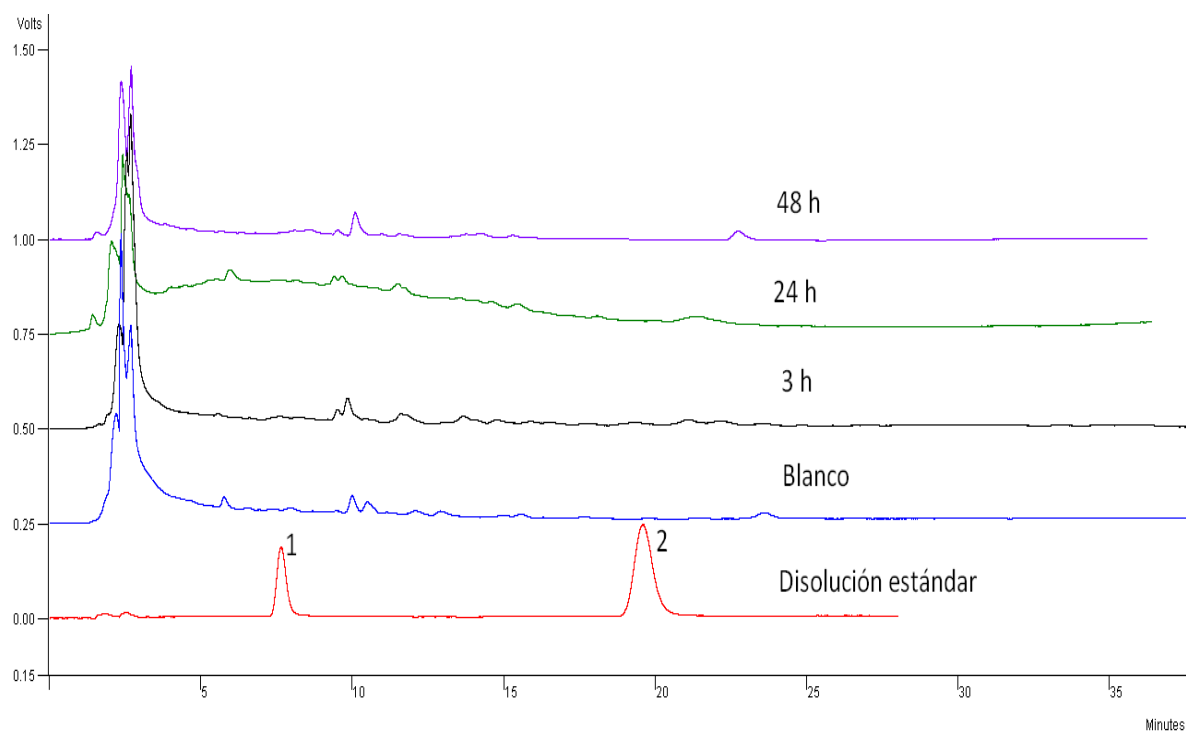


Figura 4.47 Cromatogramas de extractos D1 obtenidos durante la exposición de cultivos de *C. cucullus* a una concentración de 5 ng mL^{-1} de BaP. 1= 9,10-dihidrodiol BaP; 2= 4,5-dihidrodiol BaP. Condiciones: fase móvil MeOH/Agua (65:35) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

De la misma forma, al analizar los extractos E2 y D2 en la búsqueda de la producción de OH-BaP tampoco se logró identificar una señal que proporcionara indicios de metabolismo del BaP. Ejemplos de cromatogramas obtenidos en el análisis de estas muestras se presentan en la figura 4.48.

Los resultados obtenidos sugieren que el protozario *C. cucullus* es capaz de resistir la contaminación por BaP mediante la bioacumulación de éste en sus células.

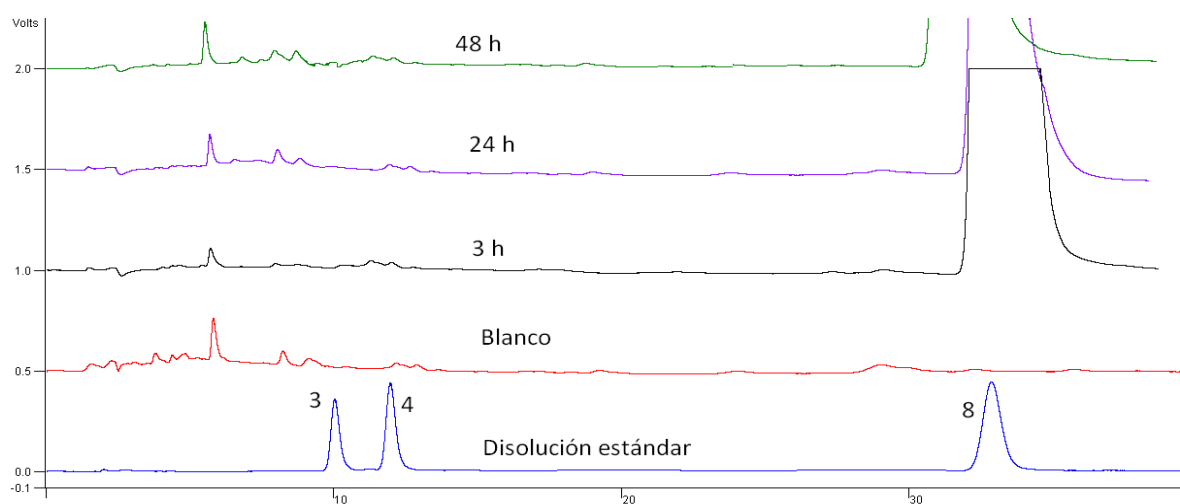


Figura 4.48 Cromatogramas de extractos E2 obtenidos durante la exposición de cultivos de *C. cucullus* a una concentración de 5 ng mL^{-1} de BaP. 3= 9-OH BaP; 4= 3-OH BaP; 8= BaP. Condiciones: fase móvil MeOH/Agua (85:15) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

4.7.8. Ensayos de exposición de cultivos de protozoarios a cada uno de los HAPs

Al igual que en el ensayo con las microalgas, los diferentes HAPs fueron agregados por separado a los cultivos de protozoarios y se evaluó un tiempo de exposición de 24 h, que resultó ser el tiempo al cuál el BaP alcanzó su máxima acumulación en la biomasa en el ensayo descrito en la sección anterior. Los resultados de las cantidades recuperadas promedio se presentan en la figura 4.49. En dicha figura, se puede observar que el balance total (biomasa + medio líquido) es cercano al total recuperado en el cultivo control para cada HAPs. De nueva cuenta esto confirma que el organismo *C. cucullus* no es capaz de metabolizar a ninguno de los HAPs utilizados en este estudio.

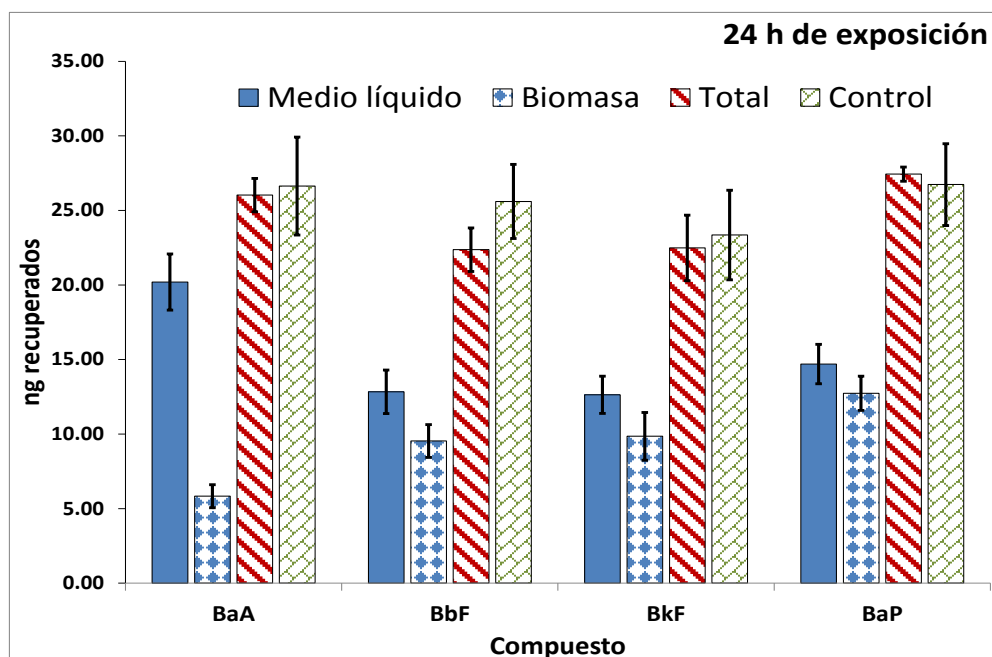


Figura 4.49 Cantidades de HAPs recuperadas en la biomasa y medio líquido de los cultivos expuestos durante 3 h a una concentración de 0.5 ng mL^{-1} . Total=cantidad en medio líquido+cantidad en biomasa.

En todos los ensayos, los HAPs permanecieron en mayores cantidades en el medio líquido que en la biomasa. El BaA fue el que presentó una menor acumulación en la biomasa de protozoarios. Esto se atribuye a su mayor polaridad respecto a los demás compuestos ya que el BaP (que es el HAPs utilizado menos polar) resultó ser el que más se acumuló en mayores cantidades en la biomasa.

En las figuras 4.50 y 4.51 se presentan los cromatogramas obtenidos del análisis de muestras de extractos E1 y D2, respectivamente, en búsqueda de la aparición de posibles metabolitos. No se observaron señales que indiquen formación de metabolitos a partir de los HAPs.

Aunque el microorganismo *C. cucullus* no es capaz de metabolizar a los HAPs, su resistencia a ciertas concentraciones de estos contaminantes y la bioacumulación que presentaron podrían utilizarse para evaluar la presencia de estos contaminantes en diferentes matrices ambientales.

Con los resultados obtenidos se puede apreciar que las metodologías desarrolladas permiten evaluar la capacidad biorremediadora del alga *S. capricornutum* y la tolerancia a ciertos niveles de HAPs por parte del microorganismo *C. cucullus*, por lo cual podrían ser empleadas en diferentes estudios de toxicidad y/o monitoreo ambiental de los HAPs.

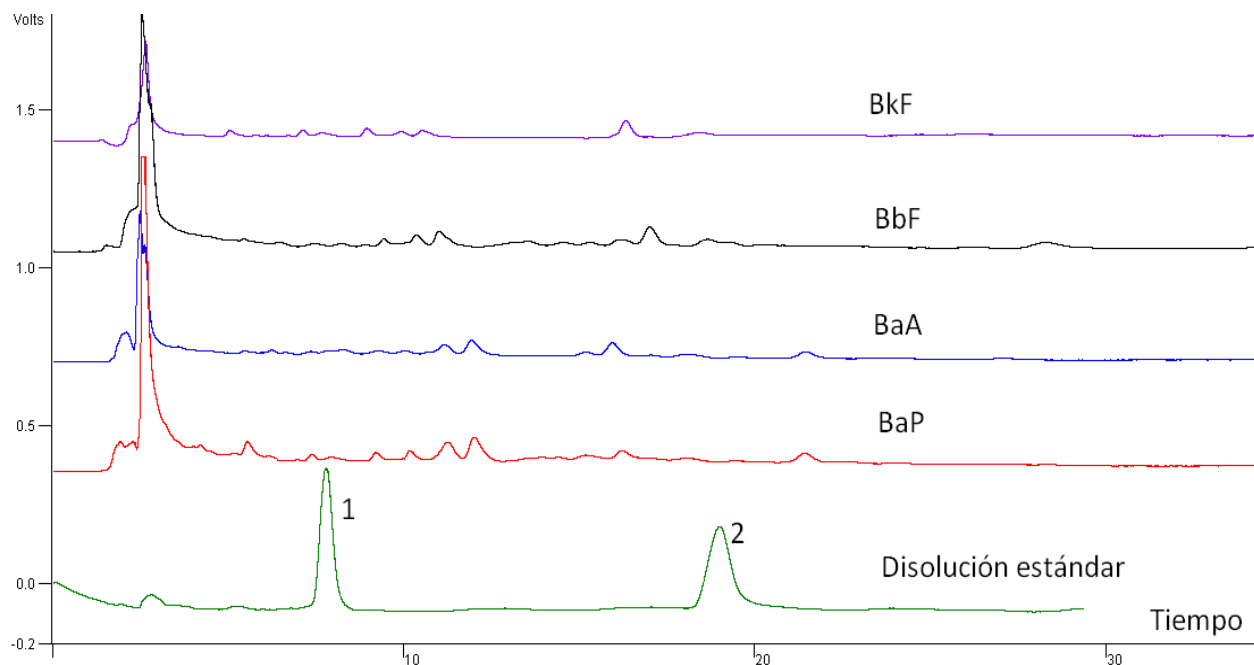


Figura 4.50 Cromatogramas de extractos E1 analizados con el método desarrollado. Los cultivos se obtuvieron de la exposición de cultivos de *C. cucullus* a una concentración de 0.5 ng mL^{-1} de cada HAP durante 3 h. 1= 9,10-dihidrodiol BaP; 2= 4,5-dihidrodiol BaP. Condiciones utilizando una fase móvil MeOH/Agua (65:35) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

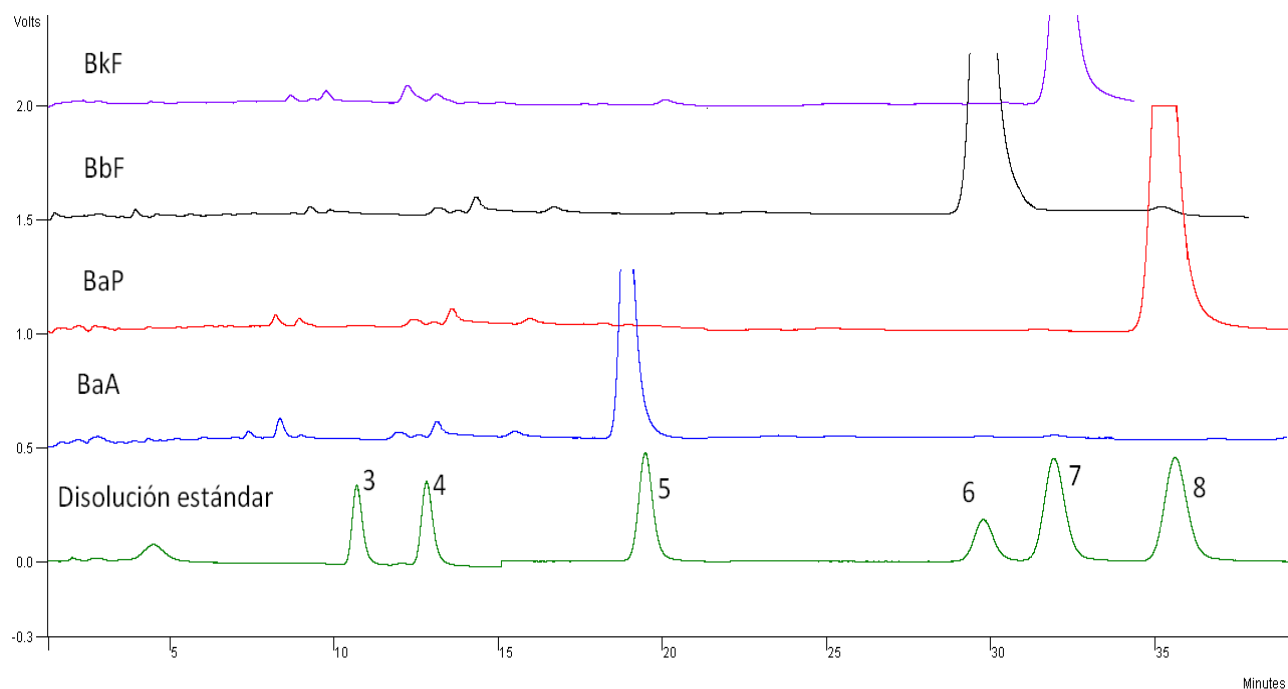


Figura 4.51 Cromatogramas de extractos D2 analizados con el método desarrollado. Los cultivos se obtuvieron de la exposición de cultivos de *C. cucullus* a una concentración de 0.5 ng mL^{-1} de cada HAP durante 3 h. 3= 9-OH BaP; 4= 3-OH-BaP; 5= BaA; 6= BbF; 7= BkF; 8= BaP. Condiciones: fase móvil MeOH/Agua (85:15) y flujo de 1 mL min^{-1} . Columna HICHROM SPHERISORB ODS-5.

5. CONCLUSIONES

Los métodos analíticos desarrollados permiten cuantificar a los analitos estudiados en dos matrices biológicas de diferente naturaleza como son protozoarios y microalgas y sus respectivos medios de cultivo líquidos. Se presentaron buenos parámetros de validación como son los coeficientes de regresión ($r^2 > 0.9911$), precisión (C. V. % < 7.99), recobros aceptables (38 a 90 % para EFS y 40 a 70 % para DMFS), robustez y límites de cuantificación muy bajos que permiten determinar fácilmente en los medios de cultivo a los HAPs y metabolitos del BaP estudiados en concentraciones que son menores a los valores máximos permitidos por la CONAGUA, $< 100 \text{ pg mL}^{-1}$. Gracias a la preconcentración en línea, los límites de detección del método de DMFS también fueron excelentes, del orden de las pg mg^{-1} (ppb) en la biomasa de las dos matrices estudiadas.

Los protocolos de extracción y análisis resultaron ser más simples que aquellos comúnmente aplicados a la determinación de los HAPs en este tipo de muestras (menor consumo de muestras, disolventes y tiempos).

Las metodologías desarrolladas representan herramientas útiles en la realización de ensayos de exposición a los HAP's de cultivos de microalgas y protozoarios utilizando concentraciones de exposición que son del orden en el que se encuentran estos tipos de contaminantes en el ambiente.

De los ensayos de exposición del BaP a cultivos de microalgas se puede concluir que:

- Las microalgas son capaces de disminuir las concentraciones de BaP del medio líquido mediante procesos de metabolismo y bioadsorción. Los cultivos expuestos a una concentración de 5 ng mL^{-1} presentaron desaparición de los compuestos que permitieron alcanzar valores de concentración menores al límite permitido por la CONAGUA en un tiempo de exposición de 6 h, mientras que los cultivos expuestos a una concentración de 50 ng mL^{-1} de BaP lograron hacerlo a las 48 h de exposición.
- La mayor actividad metabólica del microorganismo ocurre entre las primeras 3 y 6 h de exposición.
- Los dihidrodioles son los metabolitos que se forman mayoritariamente. Sin embargo, además de estos últimos y el 9-OH BaP se encontraron otras señales en los cromatogramas que sugieren la formación de otros metabolitos.

Con los ensayos de exposición individuales de los cuatro HAPs a cultivos de microalgas se puede concluir que:

- El orden creciente del porcentaje degradado por las microalgas para cada compuesto fue: BaP < BkF < BbF < BaA.
- El microorganismo es capaz de formar metabolitos (probablemente dihidrodioles) a partir de todos los HAP estudiados.

Con los ensayos de exposición individuales de los cuatro HAPs a cultivos de protozoarios se puede concluir que:

- El microorganismo es capaz de resistir las concentraciones de HAPs y continuar su crecimiento en el medio de cultivo expuesto.
- El principal mecanismo por el cual el protozoario resiste a este tipo de contaminantes parece ser la bioacumulación de los HAP's debido a que no se identificaron señales cromatográficas que indiquen la formación de metabolitos por acción del protozoario.

Perspectivas del trabajo.

- Los métodos pueden ser aplicados para la identificación de los diferentes metabolitos formados por la exposición a los HAPs diferentes del BaP.
- Se espera que las metodologías puedan ser usadas en ensayos de exposición a los HAPs, usando cultivos de otros tipos de protozoarios y microalgas endémicos para evaluar su potencial uso como organismos remediadores de la contaminación por este tipo de hidrocarburos.

BIBLIOGRAFÍA

- Agudo, A.** 2010. *Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Acercamiento a su problemática como riesgo laboral.* UGT Comisión Ejecutiva Confederal. España.
- Anitescu, G., Tavlarides, L. L.** 2012. *Supercritical extraction of contaminants from soils and sediments.* Journal of Supercritical Fluids 38, 167–180.
- Arensberg, P., Hemmingsen, V. H., Nyholm, N.** 1995. *Miniscale algal toxicity test.* Chemosphere, 30:2, 103-2, 115.
- ATSDR, US Department of Health Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** 1995. *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs),* US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- Barker, S.** 2007. *Matrix solid phase dispersion (MSPD). Review.* Journal of Biochemical and Biophysical Methods 70, 151–162.
- Barranco, A., Alonso-Salces, R. M., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., Sarobe, M.** 2003. *Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils.* Journal of Chromatography A 988(1) 33-40.
- Bending, G., Rodríguez-Cruz, S., Lincoln, S.** 2007. *Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories.* Chemosphere 69, 82–88.
- Borde, X., Guieysse, B., Delgado, O., Muñoz, R., Hatti-Kaul, R., Nugier-Chauvin, C., Patin, H., Mattiasson, B.** 2003. *Synergistic Relationships in Algal–Bacterial Microcosms for the Treatment of Aromatic Pollutants.* Bioresource Technology 86, no. 3, 293-300.
- Bouzige, M., Pichon, V., Hennion, M.C.** 1998. *On-line coupling of immunosorbent and liquid chromatographic analysis for the selective extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples at the ng l⁻¹ level.* Journal of Chromatography A, 823, 197–210.
- Braus, H., Middleton, F.M., Walton, G.** 1951. *Organic Chemical Compounds in Raw and Filtered Surface Waters.* Analytical Chemistry 23, 1160.
- Brum, D., Casella, R., Pereira Netto, A.** 2008. *Multivariate optimization of a liquid–liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection.* Talanta 74, 1392–1399.
- Busetti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., Traverso, P.** 2006. *Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant.* Journal of Chromatography A 1102, 104–115.

- Cameán A., Moreno I.M., Ruiz M.J., Picó Y. 2004. *Determination of microcystins in natural blooms and cyanobacterial strain cultures by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 380:537–544.
- Campbell, C., Warren, A., Cameron, C., Hope, S. 1997. *Direct toxicity assessment of two soils amended with sewage sludge contaminated with heavy metals using a protozoan (*Colpoda steinii*) bioassay*. Chemosphere, Vol. 34, No. 3, 501-514.
- Campo, L., Rossella, F., Fustinoni, S. 2008. *Development of a Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method to Quantify Several Urinary Monohydroxy Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Occupationally Exposed Subjects*. Journal of Chromatography B 875, 2, 531-40.
- Campíns-Falcó, P., Verdú-Andrés, J., Sevillano-Cabeza, A., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R. 2008. *New Micromethod Combining Miniaturized Matrix Solid-Phase Dispersion and in-Tube in-Valve Solid-Phase Microextraction for Estimating Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Bivalves*. Journal of Chromatography A 1211, 13-21.
- Capriotti, A., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbio, R., Samperi, R., Laganà, A. 2010. *Recent Developments in Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction*. Journal of Chromatography A 1217, 16, 2521-32.
- Castro-Ortiz, P., Luna-Pabello, V., Villalobos-Pietrini, R. 2007. *Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 23 (1) 35-45.
- Cerniglia, C. 1993. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Biotechnology, 4:331-338.
- Chen, B., Wang, Y., Hu, H. 2010. *Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi*. Journal of Hazardous Materials 179,845–851.
- Clark, A.P. 1993. *Handbook of Analytical and Spectral Data for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Benzo[a]pyrene and its Metabolites*, Midwest Research Institute, Kansas City, MO, pp. 1–296.
- CONAGUA, Comisión Nacional del Agua. 2009. *Ley Federal de Derechos Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales*. Editor: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, pp. 22.
- Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., Schroeder, H. 2012. *Late effects of a perinatal exposure to a 16 PAH mixture: Increase of anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats*. Toxicology Letters 211, 105– 113.
- Da Silva, M., Esposito, E., Moody, J., Canhos, V., Cerniglia, C. 2004. *Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cylothyrium* sp.* Chemosphere 57, 943–952.
- Díaz, S., Martín-González, A., Gutiérrez, J. 2006. *Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa*. Environment International 32: 711–717.
- Ekelund, F., Ronn, R., Christensen, S. 1994. *The effect of three different pesticides on soil protozoan activity*. Pesticide Science 42, 71–78.

- Environment Canada.** 1992. *Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater alga Selenastrum capricornutum*. Environmental Protection Series EPS 1/RM/24.
- EOL, Enciclopedia of life.** 2012. *Description of Colpoda cucullus*. Disponible en: <http://eol.org/pages/490939/overview>, Consultada en noviembre.
- EURACHEM.** 2012. *EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 3a Edición. Editores Ellison, S. R., Williams, A.
- Fan, R., Dong, Y., Zhang, W., Wang, Y., Yu, Z., Sheng, G., Fu, J.** 2006. *Fast Simultaneous Determination of Urinary 1-Hydroxypyrene and 3-Hydroxybenzo[a]Pyrene by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry*. *Journal of Chromatography B* 836, no. 1–2, 92-97.
- Fernández-González, V.,** Concha-Graña, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D. 2010. *A matrix solid-phase dispersion–gel permeation chromatography–programmed temperature vaporisation–GC-MS procedure for the analysis of polycyclic aromatic*. *Journal of Separation Science*, 33, 3741-3750.
- Flowers-Geary, L., Blecinski, W., Harvey, R., Penning, T.** 1996. *Cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones produced by dihydrodiol dehydrogenase*. *Chemico-Biological Interactions* 99, 55-72.
- Foissner, W.** 1997. *Protozoa as bioindicators in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides, and biodiversity*. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 62, 93–103.
- García, A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., Alcántara, A., Chárvel, A., Mota, R., Garzón, A.** 2002. *Métodos Analíticos, Guía de Validación*. Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.
- García de Llasera, M. P., Olmos-Espejel, J.J.** 2011. *Methodology for quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in protozoa cultures*. *Journal of the Mexican Chemical Society* 55(2) 115-121.
- Gentry, T., Wolf, D.** 2003. *Pyrene and Phenanthrene Influence on Soil Microbial Populations*. *Bioremediation Journal* 7, issue 1, 53–68.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A.** 2006. *Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms*. *Environmental Pollution* 144, 266-271.
- Gourlay, C., Mouchel, J., Tusseau-Vuillemin, M., Garric, J.** 2005. *Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in Daphnia magna*. *Science of the Total Environment* 346, 220– 230.
- Gramss, G., Kirsche, B., Voigt, K.D., Günther, T., Fritsche, W.** 1999. *Conversion Rates of Five Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Liquid Cultures of Fifty-Eight Fungi and the Concomitant Production of Oxidative Enzymes*. *Mycological Research* 103, no. 8, 1009-18.
- Gündel, J., Angerer, J.** 2000. *High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenzo[a]anthracene in*

the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers. *Journal of Chromatography B*, 738, 47–55.

- Gutierrez, J., Martin-Gonzales, A., Diaz, S., Ortega, R.** 2003. *Ciliates as potential source of cellular and molecular biomarkers/biosensors for heavy metal pollution*. *European Journal of Protistology* 39, 461–467.
- Hammel, K.** 1995. *Mechanisms for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Ligninolytic Fungi*. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 103, supl. 5, 41-43.
- Hennion, M.** 1998. *Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples. Tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters*. *Journal of Chromatography A*, 823, 147–161
- Hennion, M.** 1999. *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. Review*. *Journal of Chromatography A*, 856, 3–54.
- Hong, Y., Yuan, D., Lin, Q., Yang, T.** 2008. *Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem*. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1400–1405.
- Hussain, M., Amanchi, N., Solanki, V., Bhagavathi, M.** 2008. *Low cost microbioassay test for assessing cytopathological and physiological responses of ciliate model Paramecium caudatum to carbofuran pesticide*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 9, 66–70.
- Hyötyläinen, T.** 2007. *Principles, Developments and Applications of on-Line Coupling of Extraction with Chromatography*. *Journal of Chromatography A* 1153, 14-28.
- ISO, International Standards Organization.** 1989. *Water quality fresh water algal growth inhibition test with Scenedesmus subcapitatus and Selenastrum capricornutum*. ISO 8692.
- Jongeneelen, F. J., Kijdekkers, Ch.M., Bos, R. P., Theuws, J. L. G., Henderson, P. Th.** 1985. *Excretion of 3-Hydroxy-Benzo(a)pyrene and Mutagenicity in Rat Urine after Exposure to Benzo(a)pyrene*. *Journal Of Applied Toxicology*, Vol. 5, No. 5, 277-282.
- Juhasz, A., Naidu, R.** 2000. *Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 45, 57-88.
- Kazunga, C., Aitken, M.** 2000. *Products From Incomplete Metabolism of Pyrene by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5):1917.
- Ke, L., Luo, L., Wang, P., Luan, T., Tam N.** 2010. *Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology* 101, 6950–6961.
- Kidder, G. W. and Claff, C. L.** 1938. *Cytological investigations of Colpoda cucullus*. *Biological Bulletin*, 74, 178–197.

- Kirso, U., Irha, N.** 1998. *Role of Algae in Fate of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. *Ecotoxicology And Environmental Safety* 41, 83-89. Environmental research, section B.
- Kristenson, M. Ramos, L., Brinkman, U.** 2006. *Recent advances in matrix solid-phase dispersion*. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 25, No. 2. 96-111.
- Kristenson, M. Haverkate, E., Slooten, C., Ramos, L., Vreuls, R., Brinkman, U.** 2001. *Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic–mass spectrometric analysis*. *Journal of Chromatography A*, 917, issues 1-2, 11. 277-286.
- Lavery, P.** 2012. *What are polycyclic aromatic hydrocarbons?*. Online Combustion Handbook. International Flame Research Foundation. 2002. <http://www.handbook.ifrf.net>. Consultado en Noviembre.
- Lei, A.P., Hu, Z., Wong, Y., Tam, N.** 2007. *Removal of Fluoranthene and Pyrene by Different Microalgal Species*. *Bioresource Technology* 98, 2, 273-80.
- Lindquist, B., Warshawsky, D.** 1985. *Identification of the 11,12-dihydro-11,12-dihydroxybenzo(a)pyrene as a major metabolite produced by the green alga, *Selenastrum capricornutum**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 130, 1, 71-75.
- Liška, I.** 2000. *Fifty Years of Solid-Phase Extraction in Water Analysis – Historical Development and Overview*. *Journal of Chromatography A* 885, 3-16
- Louter, A. J. H., van Beekvelt, C. A., Cid Montanes, P., Slobodnik, J., Vreuls, J. J., Brinkman, U. A. Th.** 1996. *Analysis of Microcontaminants in Aqueous Samples by Fully Automated on-Line Solid-Phase Extraction–Gas Chromatography–Mass Selective Detection*. *Journal of Chromatography A* 725, 67-83.
- Louter, A. J. H., Vreuls, J. J., Brinkman, U. A. Th.** 1999. *On-Line Combination of Aqueous-Sample Preparation and Capillary Gas Chromatography*. *Journal of Chromatography A* 842, 391-426.
- Loveland, P. M., Reddy, A. P., Pereira, C. B., Field, J. A., Bailey, G. S.** 2001. *Application of Matrix Solid-Phase Dispersion in the Determination of Dibenzo[a,l]pyrene Content of Experimental Animal Diets Used in a Large-Scale Tumor Study*. *Journal of Chromatography A* 932, 33-41.
- Luan, T., Sidney, Jin, J., Chan, M.N., Wong, Y.S., Tam, N.** 2006. *Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles*. *Process Biochemistry* 41, 1560–1565.
- Luan, T., Fang, S., Zhong, Y., Lin, L., Chan, S., Lan, C., Tam N.** 2007. *Determination of Hydroxy Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fully Automated Solid-Phase Microextraction Derivatization and Gas Chromatography–Mass Spectrometry*. *Journal of Chromatography A* 1173, 37-43.
- Ma, J., Xiao, R., Li, J., Yu, J., Zhang, Y., Chen, L.** 2010. *Determination of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Water Samples by Solid-Phase Extraction Using Multi-Walled Carbon Nanotubes as Adsorbent Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry*. *Journal of Chromatography A* 1217, 34, 5462-69.

- Maeda, H., Akematsu, T., Fukui, R., Matsuoka, T.** 2005. *Studies on the resting cyst of ciliated protozoan Colpoda cucullus: resistance to temperature and additional inducing factors for en-or excystment.* Journal of Protozoology Research, 15, 7-13.
- Marce, R., Borrul, F.** 2000. *Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. Review.* Journal of Chromatography A, 885, 273–290.
- Martín-González, A. Díaz, S., Borniquel, S., Gallego, A., Gutiérrez, J.** 2006. *Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants.* Research in Microbiology, volume 157, issue 2, pp. 108-118.
- Martínez-Jerónimo, F. F.** 2008. *Ensayos de toxicidad crónica con microalgas clorofíceas,* en Ensayos Toxicológicos Para la evaluación de Sustancias Químicas en Agua y Suelo. La experiencia en México. Ramírez-Romero, P. & Mendoza-Cantú, A. (compiladoras). Ed. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México, pp. 89.
- Mastandrea, C.; Chichizola, C.; Ludueña, B.; Sánchez, H.; Álvarez, H.; Gutiérrez, A.** 2005. *Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos.* Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 39, 1, 27-36.
- Matamoras, V.; Calderón-Preciado, D.; Domínguez, C.; Bayona, M. J.** 2012. *Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review.* Analytica Chimica Acta 722, 8– 20.
- Moody, J. D., Freeman, J. P., Fu, P., Cerniglia, C.** 2004. *Degradation of Benzo[a]pyrene by Mycobacterium vanbaalenii PYR-1.* Applied And Environmental Microbiology, 70, 1, 340–345.
- Mueller, J. A., Mueller, W. P.** 1970. *Colpoda cucullus: A Terrestrial Aquatic.* American Midland Naturalist, Vol. 84, No. 1, 1-12.
- Muñoz, R., Guieysse, B.** 2006. *Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review.* Water Research 40, 2799 – 2815.
- Nielen, M. W. F., Van Soest, R. E. J., Van Ingen, H. E., Farjam, A., Frei, R. W., Brinkman, U. A. Th.** 1987. *Selective on-Line Trace Enrichment for the Determination of Ethynyl Steroids in Urine by Liquid Chromatography with Precolumn Technology.* Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 417, 159-67.
- NOM-138-SEMARNAT, NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.** 2003. *Límites máximos permisibles de Hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y Remediación.* México.
- Nyberg, H.** 1988. *Growth of Selenastrum capricornutum in the Presence of Synthetic Surfactants.* Water Research 22, 2, 217-23.
- Okay, O., Donkin, P., Peters, L. D., Livingstone, D. R.** 2000. *The role of algae (Isochrysis galbana) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel Mytilus edulis.* Environmental Pollution 110, 103-113.

- Pensado, L., Casais, M., Mejuto, M., Cela, R. 2005. *Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples*. Journal of Chromatography A 1077, 103–109.
- Pica-Granados, Y., Ronco, A., Díaz-Báez, M. C. 2008. *Ensayo de toxicidad crónica con el alga Selenastrum capricornutum (Pseudokirchneriella subcapitata) por el método de enumeración celular basado en el uso del hemocitómetro de Neubauer*, en Ensayos Toxicológicos Para la evaluación de Sustancias Químicas en Agua y Suelo. La experiencia en México. Ramírez-Romero, P. & Mendoza-Cantú, A. (compiladoras). Ed. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México, pp. 69.
- Pena, M., Casais, M., Mejuto, M., Cela, R. 2007. *Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction*. Journal of Chromatography A, 1165, 32–38.
- Pena, M., Casais, M., Mejuto, C., Cela, R. 2008. *Development of a Matrix Solid-Phase Dispersion Method for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sewage Sludge Samples*. Analytica Chimica Acta 626, 2, 155-65.
- Przybo, E., Nevo, E., Pavlièek, T. 2002. *Distribution of Species of the Paramecium aurelia Complex in Israel*. Acta Protozoologica, 41, 293 – 295.
- Rey-Salgueiro, L., Martínez-Carballo, E., García-Falcón, M., González-Barreiro, C., Simal-Gándara, J. 2009. *Occurrence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Hydroxylated Metabolites in Infant Foods*. Food Chemistry 115, 3, 814-19.
- Richardson, D. M., Gubbins, M., Davies, I. M., Moffat, C. F., Pollard, P. 2004. *Effects of Feeding Status on Biliary Pah Metabolite and Biliverdin Concentrations in Plaice (Pleuronectes Platessa)*. Environmental Toxicology and Pharmacology 17, no. 2, 79-85.
- Richter, H. Howard, J.B. 2000. *Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth to soot—a review of chemical reaction pathways*. Progress in Energy and Combustion Science 26, 565–608.
- Sánchez, N., Callejas, A., Millera, A., Bilbao, R., Alzueta, M. 2012. *Formation of PAH and soot during acetylene pyrolysis at different gas residence times and reaction temperatures*. Energy 43, 30-36.
- Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J. 2007. *Analysis of 27 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Matrix Solid-Phase Dispersion and Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry in Sewage Sludge from the Spanish Area of Madrid*. Journal of Chromatography A 1148, 2, 219-27.
- Schoeny, R., Cody, T., Warshawsky, D., Radike, M. 1988. *Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species*. Mutation Research, 197, 289-302.
- Simon, P., Lafontaine, M., Delsaut, P., Morele, Y., Nicot, T. 2000. *Trace Determination of Urinary 3-Hydroxybenzo[a]Pyrene by Automated Column-Switching High-Performance Liquid*

Chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 748, no. 2, 337-48.

- Slobodník, J., Hogenboom, A. C., Louter, A. J. H., Brinkman, U. A. Th.** 1996. *Integrated System for on-Line Gas and Liquid Chromatography with a Single Mass Spectrometric Detector for the Automated Analysis of Environmental Samples*. Journal of Chromatography A 730, 353-71.
- Slobodník, J., Ramalho, S., van Baar, B., Louter, A. J. H., Brinkman, U. A. Th.** 2000. *Determination of microcontaminants in sediments by on-line solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry*. Chemosphere 41, 1469-1478.
- Semple, K., Cain, R., Schmidt, S.** 1999. *Biodegradation of aromatic compounds by microalgae*. FEMS Microbiology Letters 170, 291-300.
- Sigma-Aldrich Corporation, US.** *Bulletin 910. Guide to Solid Phase Extraction*. Consultado en Noviembre 2012. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- Song, X., Li, J., Xu, S., Ying, R., Ma, J., Liao, C., Liu, D., Yu, J., Chen, L.** 2012. *Determination of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seawater Using Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Talanta 99, 75-82.
- Stellman, J.M., McCan, M.** 1998. *Hidrocarburos poliaromáticos*. En: *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*. 3ª edición. Madrid: Organización Internacional del Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales - Subdirección General de Publicaciones. pp. 310-9.
- Sun, H., Ge, X., Lv, Y., Wang, A.** Review. *Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed*. Journal of Chromatography A, 1237, 1– 23.
- Tam, T., Chong, A.M.Y., Wong, Y.S.** 2000. *Removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells*. Marine Pollution Bulletin 45, 362–371.
- Taverniers, I. De Loose, M., Van Bockstaele, E.** 2004. *Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 8, 535-552.
- Tondeur, Y., Hart, J.** 2009. *Ultratrace extraction of persistent organic pollutants*. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 10.
- Torres, M. A., Barros, M., Campos, S., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, T., Colepicolo, P.** 2008. *Biochemical Biomarkers in Algae and Marine Pollution: A Review*. Ecotoxicology and Environmental Safety 71, no. 1, 1-15.
- Trielli, F., Chessa, M., Amaroli, A., Ognibene, M., Delmonte Corrado, M.** 2006. *Effects of organophosphate compounds on a soil protist, Colpoda inflata (Ciliophora, Colpodidae)*, Chemosphere 65, 1731–1737.

- Trielli, F., Amaroli, A., Sifredi, F., Marchi, B., Falugi, C., Delmonte Corrado, M.** 2007. *Effects of xenobiotic compounds on the cell activities of Euplotes crassus, a single-cell eukaryotic test organism for the study of the pollution of marine sediments.* Aquatic Toxicology 83, 272–283.
- USEPA. US Environmental Protection Agency.** 1992. *Short-term methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms.* EPA-600/4-91-022. 3rd edition.
- USEPA. US Environmental Protection Agency.** 2012. Basic Information about Benzo(a)pyrene in Drinking Water. Disponible en: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/benzo-a-pyrene.cfm>. Consultado en noviembre 2012.
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, B., Schneider, J.** 1995. *Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light.* Chemo-Biological Interactions 97, 131-148.
- Warshawsky, D., LaDow, K., Schneider, J.** 2007. *Enhanced degradation of benzo[a]pyrene by Mycobacterium sp. in conjunction with green alga.* Chemosphere 69, 500–506.
- Whiton, R. S., Witherspoon, Buckley, T.** 1995. *Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites in Human Urine.* Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 665, no. 2, 390-94.

ANEXO I

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO BRISTOL

Para 1 L de cultivo:

1. Colocar aproximadamente 900 mL de agua destilada en un frasco de vidrio o matraz con capacidad de 1 L.
2. Agregar en el orden mostrado en la siguiente tabla, 10 mL de cada uno de los ingredientes, agitando vigorosamente la mezcla:

#	Ingrediente	Concentración de la disolución "stock"	Volumen de disolución "stock" por L de cultivo	Concentración final en 1 L de cultivo
1	NaNO ₃	10 g/400mL dH ₂ O	10 mL	2.94 mM
2	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 g/400mL dH ₂ O	10 mL	0.17 mM
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g/400mL dH ₂ O	10 mL	0.3 mM
4	Na ₂ HPO ₄	3 g/400mL dH ₂ O	10 mL	0.43 mM
5	KH ₂ PO ₄	7 g/400mL dH ₂ O	10 mL	1.29 mM
6	NaCl	1 g/400mL dH ₂ O	10 mL	0.43 mM

dH₂O=agua destilada

3. Agregar 1 g de proteosa peptona ^{a,b}.
 4. Llevar la disolución a 1 L con agua destilada
 5. Tapar el recipiente con algodón y esterilizar en autoclave.
 6. Dejar enfriar el medio de cultivo y mantener en refrigeración hasta su uso.
- a. La proteosa peptona se agrega de preferencia cuando el cultivo está por esterilizarse, ya que favorece el desarrollo de bacterias y el cultivo suele tornarse turbio.
- b. Para el medio sólido, se agrega 1.5 % p/v de agar bacteriológico.

ANEXO II

PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN DE CEBADA

Para 1 L de infusión:

1. Colocar entre 15 y 20 granos de cebada en 1 L de agua potable.
2. Calentar a fuego moderado hasta ebullición. Mantener la ebullición por 5 min y retirar el recipiente del fuego.
3. Permitir que la infusión se enfríe a temperatura ambiente.
4. Filtrar la infusión utilizando un filtro Whatman del No. 40.
5. Agregar a la infusión 1 mL de un cultivo de la bacteria *Enterobacter aerógenes* e incubar a 28 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo, la infusión está lista para ser inoculada con el protozooario *C. cucullus*.
6. La infusión no utilizada se puede mantener en refrigeración durante 1 semana.

PREPARACIÓN DEL CULTIVO DE *Enterobacter aerógenes*

Para 250 mL de cultivo:

1. Colocar aproximadamente 200 mL de agua destilada en un frasco de vidrio o matraz con capacidad de 500 mL.
 2. Agregar 1 g de extracto de levadura^a.
 3. Llevar la disolución a 250 mL con agua destilada
 4. Tapar el recipiente con algodón y esterilizar en autoclave.
 5. Dejar enfriar el medio de cultivo y mantener en refrigeración hasta su uso.
- a. Para el medio sólido, se agrega 1.5 % p/v de agar bacteriológico.

ANEXO III

EJEMPLO DEL CÁLCULO DE LA LINEALIDAD DEL SISTEMA, LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN EN BASE A LA CURVA DE CALIBRACIÓN Y A LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REGRESIÓN.

Datos de la curva de calibración del sistema, para el benzo[a]pireno.

Benzo[a]antraceno						
	CONCENTRACION (x)	AREA (y)		x^2	y^2	xy
	ng/mL					
	0.20	354049		0.04	1.2535E+11	70809.86
	0.20	378945		0.04	1.436E+11	75789
	0.20	345672		0.04	1.1949E+11	69134.4
	0.40	885123		0.16	7.8344E+11	354049.3
	0.40	904568		0.16	8.1824E+11	361827.2
	0.40	845672		0.16	7.1516E+11	338268.8
	0.80	1770247		0.64	3.1338E+12	1416197.2
	0.80	1704576		0.64	2.9056E+12	1363660.8
	0.80	1694856		0.64	2.8725E+12	1355884.8
	1.20	2924296		1.44	8.5515E+12	3509154.96
	1.20	2924595		1.44	8.5533E+12	3509514.24
	1.20	2982975		1.44	8.8981E+12	3579569.76
	1.60	3700370		2.56	1.3693E+13	5920591.6
	1.60	3700372		2.56	1.3693E+13	5920595.04
	1.60	3700529		2.56	1.3694E+13	5920847.04

ΣX	12.60
ΣY	28816844.90
ΣX^2	14.52
ΣY^2	78699483781097.10
ΣXY	33765894.00
N	15.00

Pendiente.

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

$$m = \frac{15(33765894.00) - (12.60)(28816844.90)}{15(14.52) - (12.60)^2} = 2428796.82$$

Ordenada al origen.

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

$$b = \frac{28816844.90 - 2428796.82(12.60)}{15} = -119066.34$$

Coefficiente de correlación.

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

$$r^2 = \frac{[15(33765894.00) - (12.600)(28816844.90)]^2}{[15(14.52) - (12.60)^2] - [15(78699483781097.10) - (28816844.90)^2]} = 0.9949$$

Desviación estándar de regresión.

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

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{78699483781097.10 - 2428796.82(33765894.00) - (-119066.34)(28816844.90)}{15 - 2}} = 96118.49$$

Límite de Detección.

$$L. D. = \frac{3.3 * S_{y/x}}{m} = \frac{3.3 * 96118.49}{2428796.82} = 0.131 \text{ ng mL}^{-1}$$

Límite de Cuantificación.

$$L. D. = \frac{10 * S_{y/x}}{m} = \frac{10 * 96118.49}{2428796.82} = 0.396 \text{ ng mL}^{-1}$$



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography[☆]

José J. Olmos-Espejel, Martha P. García de Llasera*, Marisol Velasco-Cruz

Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 May 2012

Received in revised form 10 August 2012

Accepted 4 September 2012

Available online 16 September 2012

Keywords:

Matrix solid-phase dispersion

Solid-phase extraction

On-line methods

HPLC

PAH

Microalgae cultures

ABSTRACT

This paper describes the development and validation of an analytical methodology to determine the presence of four PAHs: benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene and benzo[a]pyrene in cultures of the green microalgae *Selenastrum capricornutum*. The metabolites of benzo[a]pyrene (BaP), 4,5-dihydrodiol benzo[a]pyrene, 9,10-dihydrodiol benzo[a]pyrene, 3-hydroxy benzo[a]pyrene and 9-hydroxy benzo[a]pyrene were also included. The methodology consisted of three parts: (1) separation of liquid media from biomass samples by centrifugation of pure cultures, (2) off-line extraction of analytes from biomass by a miniaturized matrix solid phase dispersion (MSPD) method and from liquid media by a solid phase extraction (SPE) method and (3) on-line SPE preconcentration and analysis of the MSPD and SPE extracts, separately, by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD). The off-line/on-line (MSPD/SPE-HPLC-FD) method was validated over a concentration range of 20–200 pg mg⁻¹ obtaining good linearity ($r^2 > 0.9912$) and precision values measured as relative standard deviation (RSD) < 5%, recovery values were in the range of (40–66%) and the limits of detection (LODs) ranged from 2 to 6.5 pg mg⁻¹. The off-line/on-line (SPE/SPE-HPLC-FD) method was validated over a concentration range of 5–120 pg mL⁻¹; $r^2 > 0.9913$ and RSD < 7.36%, recovery values were in the range of 38–74% and LODs ranged from 0.8 to 2.3 pg mL⁻¹. This methodology was applied to samples from cultures exposed to BaP at 5 ng mL⁻¹ with different exposure times (0.75, 1.5, 3, 6, 24 and 48 h). The analytical methodology was suitable for measuring the very low amounts of residual BaP and metabolites produced in bioassays. Results showed that some of the metabolites favored by the microalgae are the dihydrodiols. The microalgae cultures were able to decrease the BaP level in the liquid medium below the United States Environmental Protection Agency (USEPA) limit (<0.2 ng mL⁻¹).

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are compounds consisting of two or more fused aromatic rings. They are formed by the incomplete combustion of organic materials from anthropogenic (smoke, automobile and industrial emissions, petroleum refineries, etc.) and natural activities (forest fires, active volcanoes activities, etc.). PAHs are persistent, widely distributed in the environment and toxic, even at low concentrations. Compounds having more

than four rings can be carcinogenic and/or teratogenic. For these reasons, this group of contaminants is monitored continuously by the environmental agencies such as the USEPA and European Environment Agency [1,2].

PAHs can be removed from polluted environmental samples by several processes including adsorption, volatilization, photolysis, chemical degradation and microbial degradation; the last is the most important. Many publications have reported that a wide variety of bacteria and fungi are capable of degrading PAHs such as anthracene, phenanthrene and benzo[a]pyrene to polar metabolites [2–6]. Several microalgae species also have been reported to degrade certain PAHs such as naphthalene, fluoranthene and pyrene [2]. However, references describing PAHs degradation by microalgae are less numerous than those describing degradation by bacteria or fungi. The green microalgae *Selenastrum capricornutum* is commonly used in such assays due to its ability to survive in both eutrophic and oligotrophic environments and grow easily and

[☆] Presented at the 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Anaheim, CA, USA, 16–21 June 2012.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223899 44051;

fax: +52 55 56223899 44051.

E-mail addresses: pgcllas@unam.mx, pgcllas@servidor.unam.mx (M.P. García de Llasera).

rapidly even at contaminated sites [7–13]. There are some reports of biodegradation of heavy PAHs by green microalgae; most of these have been focused on the behavior of benzo[a]pyrene (BaP), the most common marker of carcinogenicity, although BaP is not the only carcinogenic PAH. Although most studies have monitored only the disappearance of PAHs from the culture medium or biomass, a few studies also have shown that some microalgae are capable of metabolizing BaP to compounds with high polarity such as dihydrodiols, hydroxides and quinones [8,14,15]. The analysis and identification of these metabolites is difficult due to their instability to light, temperature, pH and air [16], as well as their low levels of production in exposed cultures. Their concentrations are usually below the detection limits of the classical analytical methodologies that are commonly used to perform this type of bioassay. For this reason, it is necessary to develop rapid and sensitive methods to determine the very low levels of the PAH-metabolites that are formed in environmental or microbiological culture samples and that are potentially more toxic and carcinogenic than the parents PAHs [17,18]. A better understanding of the biodegradation process is also needed.

The main problem for the extraction of trace levels of organic contaminants from complex samples, such as the cultures of microorganisms, is the limited amount of sample available. As mentioned above, the most common extraction technique utilized in biodegradation assays is the classic liquid–liquid extraction (LLE), which often consumes large amounts of samples and reagents and presents various other inconveniences as well such as many extractions and clean-up steps and the generation of considerable amounts of wastes. Alternative sorbent-based extraction techniques, such as solid phase extraction (SPE) for the treatment of liquid samples or matrix solid phase dispersion (MSPD) for the treatment of solid samples, can provide better results than traditional LLE. SPE allows high concentration factors because it uses a small volume of samples and it is extremely versatile in that it can be applied to a wide range of samples and compounds [19,20]. On the other hand, MSPD is a sample preparation strategy that is widely applied to solid, semisolid or viscous samples because it uses very small amounts of sample and consequently this technique is well-suited for miniaturization. Some works report the application of MSPD to less than 50 mg of sample and 100 mg of sorbent. In both, SPE and MSPD extraction, the most commonly used sorbent is silica C-18 [21–25].

Even though SPE and MSPD are able to achieve high concentration factors and provide low detection limits to the whole methodology, for example 1000, when 1 L of water sample is pre-concentrated to 1 mL by SPE, sometimes even lower detection limits are required for the accurate measurement of small concentrations of trace contaminants in the order of ppb or ppt, as is the case of PAH metabolites. To accomplish this, the extract can be pre-concentrated before its introduction into the analytical system. On-line methodologies are very useful when the sample amount is limited, the analytes are labile or a very high sensitivity is necessary. The use of on-line SPE has made possible the development of faster and more sensitive methods by reducing sample preparation times and increasing sample throughput. Conditioning, washing and elution steps can be performed automatically, and most of systems also allow the treatment of one sample while another is being analyzed [26–29].

The aim of this work was to develop and validate a new and very sensitive methodology for the extraction of PAHs and metabolites from *S. capricornutum* liquid culture components (liquid-media and biomass), using SPE and MSPD, respectively. Extraction was followed by on-line preconcentration and HPLC analysis of the extracts using the high sensitivity provided by fluorescence detection. While the instrumental limits of detection of the studied compounds ranged from 120 to 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, this off-line/on-line

methodology made it possible to achieve detection limits on the range of 2.0–6.5 pg mg^{-1} for biomass and 0.8–2.3 pg mL^{-1} for liquid media, allowing monitoring of the changing concentrations of analytes over time, for both PAHs and the metabolites produced in exposure assays. The level of BaP selected for the exposure test (5 ng mL^{-1}) was close to its solubility in water, 2.3 ng mL^{-1} [30], a concentration representative of that found in the contaminated environmental waters. This is a novel application because a very low concentration of PAHs and metabolites can be analyzed from a small sample amount, in an average time of 45 min. Therefore, the developed methodologies allow a better study of the degradation kinetics of PAHs in microalgae cultures than those commonly used in laboratory biodegradation assays. Previous works applied several liquid–liquid extraction steps, decolorize and evaporate the extracts. These procedures can easily be done by the use of SPE or MSPD. Likewise, some works used in bioassays more than a hundred-fold greater concentrations (100–1200 ng mL^{-1}) than the saturated solubility values, possibly because their methods did not have adequate limits of detection [12,14,31].

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

The PAHs standards (benzo[a]anthracene (BaA), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF) and benzo[a]pyrene (BaP)) were purchased from Chem Service (West Chester, PA, USA) with a certified purity >99%. BaP metabolite standards (3-hydroxy benzo[a]pyrene (3-OH BaP), 9-hydroxy benzo[a]pyrene (9-OH BaP), 4,5-dihydrodiol benzo[a]pyrene and 9,10-dihydrodiol benzo[a]pyrene) were acquired from the NCI Chemical Carcinogen Reference Standards Repository (Kansas, MO, USA). Individual standard solutions were prepared by appropriate dilution of the standards in acetonitrile at 1.0 mg L^{-1} . A stock solution of a mixture of eight analytes at 500 ng mL^{-1} was prepared in acetonitrile and stored in the dark at 4 °C. Water (18.2 $\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ resistivity) was obtained from a Millipore Simplicity UV (Bedford, MA, USA) deionizer. Silica CHROMABOND C18-PAH (particle diameter 45 μm) from MACHEREY-NAGEL (Bethlehem, PA, USA) was used as a sorbent to perform SPE and MSPD. Nucleosil C18 (particle diameter 10 μm) was purchased from Phenomenex (San Francisco, CA, USA) and was used to pack the SPE precolumn of the on-line concentration system. HPLC-grade solvents such as methanol, acetonitrile, isopropanol and the following reagents were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA): ascorbic acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), sodium nitrate (NaNO_3), calcium chloride dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), magnesium sulphate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4), monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4), nitric acid (HNO_3), sulfuric acid (H_2SO_4), sodium lauryl sulfate (SDS), sodium heptane sulfate and sodium chloride (NaCl). All substances were reactive grade. The culture medium ingredient peptone proteose was acquired from MCD LAB (Tlalnepantla, MEX, México). All the glassware was cleaned before each experiment with an aqueous solution of HNO_3 3% (v/v) overnight. Afterwards it was rinsed with distilled water and finally with 1 mL of 100% ACN.

2.2. Algal cultures

A culture of the microalgae *S. capricornutum* was obtained from The Culture Collection of Algae (UTEX) at The University of Texas (Austin, TX, USA). The stock culture was maintained in 150 mL Bristol's medium supplemented with 1 g L^{-1} of proteose peptone in a 250 mL Erlenmeyer flask under axenic conditions at room temperature. A 16/8 h light/dark photoperiod was generated by T5 14 W cool-white fluorescent lamps. The cultures were aerated by

orbital agitation at 100 rpm using a THERMO SCIENTIFIC Model 2346 (Dubuque, IA, USA) shaker. Under these conditions, the algal cells reached the mid-exponential growth phase (7–10 days) with a cell number of $(2-6) \times 10^6$ cells mL⁻¹. The cell number was counted using a Neubauer haemocytometer with improved rulings (Boeco, Germany). Microalgae were harvested after 7–10 days (in mid-growth phase) and isolated from 15 mL of liquid culture medium by centrifugation for 20 min at 3900 rpm, using a SIGMA 2–5 centrifuge Laborzentrifugen (Osterode am Harz, Germany). The pellet of cells thus obtained was then air-dried and used for the MSPD procedure, while the supernatant (i.e., the liquid culture medium) was treated by the SPE method. Reserve cultures were maintained for longer periods on solid culture medium (Bristol's medium + 1 g L⁻¹ of proteose peptone + 1.5% of agar).

2.3. Apparatus

The selected PAHs and metabolites were analyzed on a Varian model 210 liquid chromatograph, coupled to a model 363 fluorescence detector (FD) (Palo Alto, CA, USA) using LC Workstation Multi-instrument Version 6.20 software. This HPLC system was equipped with a manual injection port and switching valve Rheodyne 7725i with a 20 μ L loop. A 5 μ m HICHROM SPHERISORB stainless steel analytical column (150 mm \times 4.6 mm I.D.) connected to a guard column (20 mm \times 2 mm I.D., packed with the same stationary phase) was used. Both columns were obtained from Varian. Samples were preconcentrated on a 20 mm \times 2 mm I.D. pre-column packed with nucleosil C18 (10 μ m) Phenomenex (CA, USA) stationary phase using an Eldex Duros Series 1000-C pump (Napa, CA, USA). The direction of the mobile phase flow was controlled by a Rheodyne model 7000 six-port switching valve (Berkeley, CA, USA).

2.4. Chromatographic conditions

Analytical separation was performed by the use of two isocratic elution modes at a flow rate of 1 mL min⁻¹ as follows: mode 1, mobile phase 65% methanol and 35% water (separation of

4,5-dihydrodiol benzo[a]pyrene and 9,10-dihydrodiol benzo[a]pyrene) and mode 2, mobile phase 85% methanol and 15% water (separation of 3-OH BaP, 9-OH BaP, BaA, BbF, BkF and BaP). The detection wavelengths selected for each compound were as follows: benzo[a]anthracene, λ_{ex} = 284 nm, λ_{em} = 410 nm; for the rest of the compounds, λ_{ex} = 263 nm, λ_{em} = 430 nm.

2.5. PAHs extraction

Due to considerable differences in polarity between the dihydrodiol metabolites and the other compounds, the analytes were recovered in two different SPE and MSPD extracts. Thus, the first extract contained the dihydrodiols-BaP and the second extract contained the hydroxy-BaP together with the PAHs. MSPD and SPE off-line protocols are described below.

2.5.1. Off-line MSPD method

Five milligrams of dried biomass was mixed with 20 μ L of 20% ascorbic acid solution and allowed to dry. Next, the entire sample was blended in an agate mortar with 100 mg of C18-PAH silica (pre-conditioned with 2 mL acetonitrile and dried with vacuum) until a homogeneous mixture was obtained. The mixture was placed into a 1 mL polypropylene cartridge with a polyethylene frit in the bottom, compressed and covered with another polyethylene frit. The following solvent sequence was used to remove interferences from the cartridge: 10 mL of deionized water, 10 mL of a 10:90 (v/v) acetonitrile–water mixture and 5 mL of a 20:80 (v/v) acetonitrile–water mixture. Finally, analytes were eluted from the cartridge in two different extracts identified as D1 (1.5 mL of 40:60 (v/v) acetonitrile–water mixture) and D2 (1 mL of 85:15 (v/v) acetonitrile–water mixture). The entire extracts obtained in the off-line mode were diluted with water for subsequent preconcentration and analysis by the on-line SPE–HPLC–FD system (see Fig. 1).

2.5.2. Off-line SPE method

Extraction of the analytes from the liquid medium was performed by a simple SPE method, using a cartridge packed with

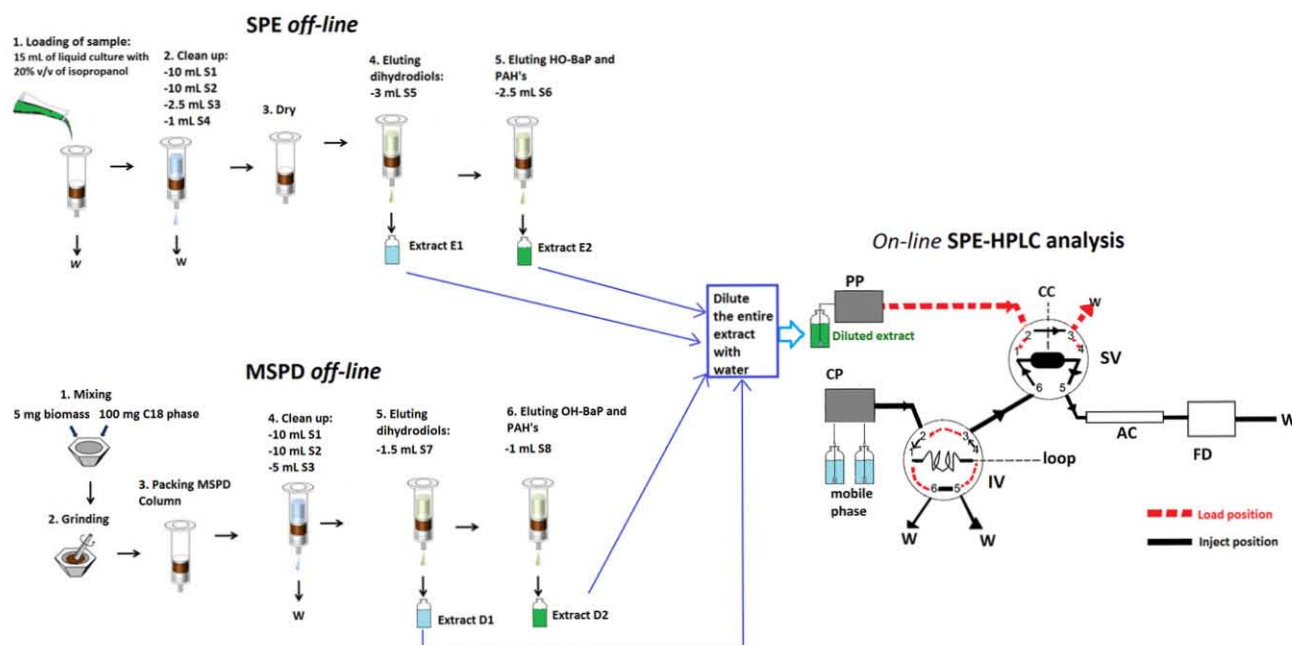


Fig. 1. The methodology scheme including the off-line extraction methods and on-line SPE-HPLC. S1 = water; S2 = ACN/water (10:90, v/v); S3 = ACN/water (20:80, v/v); S4 = ACN/water (30:70, v/v); S5 = ACN/water (55:45, v/v); S6 = ACN 100%; S7 = ACN/water (40:60, v/v); S8 = ACN/water (85:15, v/v); PP = preconcentration pump; CP = HPLC pump; CC = concentration column; IV = injector valve; SV = switching valve; AC = analytical column; FD = fluorescence detector; W = waste. E1 and E2 are extracts from SPE. D1 and D2 are extracts from MSPD.

Table 1
Method optimization (on-line preconcentration). Acetonitrile percentages (% ACN) of the extracts.

Method	Extract	Compounds	Initial % ACN in extract	Extract volume (mL)	Volume of water added (mL)	Final % ACN of diluted extract
MSPD	D1	Dihydrodiols	40	1.5	4.5	10
	D2	OH-BaP, PAHs	85	1	1.1	40
SPE	E1	Dihydrodiols	55	3	13.5	10
	E2	OH-BaP, PAHs	100	2.5	5.8	30

E1 and E2 are extracts from off-line SPE; D1 and D2 are extracts from off-line MSPD.

Table 2
Operation conditions of the on-line SPE-HPLC system.

Operation	Pump active	Valve position		Solvents applied to extract	
		IV	SV	E1 or D1	E2 or D2
Precolumn conditioning	PP	L	L	–5 mL ACN 100%	–5 mL ACN–water (10:90, v/v)
Sample loading	PP	L	L		Flow 2 mL min ^{–1}
On-line clean-up	PP	L	L		–5 mL ACN–water (10:90, v/v)
Analytes separation	CP	I	I	Mobile phase MeOH–water (65:35, v/v) Flow 1 mL min ^{–1}	Mobile phase MeOH–water (85:15, v/v) Flow 1 mL min ^{–1}
Precolumn reconditioning	PP	L	L	–5 mL ACN 100%	–5 mL ACN–water (10:90, v/v)
Direct injection of standard	CP	I	L	Mobile phase MeOH–water (65:35, v/v) Flow 1 mL min ^{–1}	Mobile phase MeOH–water (85:15, v/v) Flow 1 mL min ^{–1}

PP = preconcentration pump; CP = pump of the HPLC system; IV = injector valve; SV = switching valve. I = inject; L = load. E = extract obtained from SPE step and diluted; D = extract obtained from MSPD step and diluted.

300 mg of Chromabond C18-PAH and previously conditioned with 4 mL of acetonitrile and 8 mL of water. First, 15 mL of sample mixed with 3.75 mL of isopropanol, to obtain a 20% solution, was passed through the cartridge. Afterwards, a sequence of solvents was passed through the cartridge to clean the sample: 10 mL of water, 10 mL of 10:90 (v/v) acetonitrile–water mixture, 2.5 mL of 20:80 (v/v) acetonitrile–water mixture and 1 mL of 30:70 (v/v) acetonitrile–water mixture. Finally, as in the MSPD method, the analytes were eluted from the cartridge in two different extracts designated as E1 (3 mL of 55:45 (v/v) acetonitrile–water mixture) and E2 (2.5 mL of acetonitrile). The entire extracts obtained in the off-line mode, were diluted with water, preconcentrated on-line and analyzed as in the MSPD method (see Fig. 1).

2.6. On-line SPE preconcentration and HPLC-FD analysis of MSPD and SPE extracts

A schematic diagram of the entire off-line/on-line methodology for determination of the analytes with SPE or MSPD and HPLC-FD is shown in Fig. 1. The on-line system consisted of a concentration

precolumn coupled to HPLC-FD. The entire extracts obtained from off-line SPE or MSPD were diluted to the acetonitrile percentages indicated in Table 1. Then, the diluted extracts were loaded onto the concentration column (CC) which was packed with a C18 phase and connected to the switching valve (SV). This operation was performed using the preconcentration pump (PP). Table 2 describes the operating conditions used for the on-line system.

2.7. Method validation

2.7.1. Off line/on-line method (MSPD/SPE–HPLC-FD)

The linearity and precision of the MSPD/SPE–HPLC-FD method were evaluated by analyzing dry biomass samples spiked at five concentration levels (20, 60, 80, 120, 200 pg mg^{–1}). For each concentration, three replicates were made and the RSD was calculated. Precision was evaluated in terms of reproducibility by analyzing five extracts, on different days, prepared from samples spiked at two different concentration levels (20 and 120 pg mg^{–1}). The accuracy was evaluated by plotting the recovered amount of each analyte vs. the amount initially added to the spiked samples; the

Table 3
Optimization of the off-line MSPD elution sequence.

Compound	Recovery in fraction%									Global recovery % (±RSD) n = 3
	Clean-up			Analyte elution						
	S1	S3	S4				S5			
	S2	1–5	1	2	3	4	1	2	3	
9,10-Dihydrodiol BaP	NI	–	32	44	–	–	–	–	–	76 (±3)
4,5-Dihydrodiol BaP	NI	–	29	36	6	–	–	–	–	71 (±1)
9-OH BaP	NI	–	–	–	–	–	16	–	–	16 (±8)
3-OH BaP	NI	–	–	–	–	–	7	–	–	7 (±10)
BaA	NI	–	–	–	–	–	91	–	–	91 (±3)
BbF	NI	–	–	–	–	–	89	–	–	89 (±2)
BkF	NI	–	–	–	–	–	87	–	–	87 (±4)
BaP	NI	–	–	–	–	–	70	10	–	80 (±3)

S1 = 10 mL water HPLC; S2 = 10 mL ACN/water (10:90, v/v); S3 = 5 × 1 mL ACN/water (20:80, v/v); S4 = 4 × 0.5 mL ACN/water (40:60, v/v); S5 = 3 × 0.5 mL ACN/water (85:15, v/v). NI = not injected. – = not detected. BaA = benzo[a]anthracene; BbF = benzo[b]fluoranthene; BkF = benzo[k]fluoranthene; BaP = benzo[a]pyrene.

slope of the curve indicated the overall recovery. The experimental limits of detection (LODs) were determined at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3, and the limits of quantification (LOQs) were determined at S/N of 10 at the optimum λ_{em} and λ_{ex} of each compound.

2.7.2. Off-line/on-line method (SPE/SPE–HPLC–FD)

The linearity and precision of the SPE/SPE–HPLC–FD method were evaluated by analyzing samples of liquid culture medium (free from microorganisms) spiked at five concentration levels. For the compounds 4,5-dihydrodiol BaP and 9,10-dihydrodiol BaP, the concentrations used were 5, 20, 40, 80 and 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For the remaining analytes, the concentrations used were 10, 20, 40, 80 and 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$. For each concentration level, three replicates were made and the RSD was calculated. Precision was evaluated in terms of reproducibility by preparing and analyzing five extracts, each one in different days, from samples spiked at two different concentration levels (10 and 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The accuracy, experimental LODs and LOQs were determined as for the MSPD method.

2.8. BaP exposure tests

Several 50 mL Erlenmeyer flasks, each one containing 15 mL of liquid culture of *S. capricornutum* were divided into three groups as follows: (i) Exposed Microalgae Culture (EMC) – a liquid culture with a cell density between 2 and 5×10^6 cells mL^{-1} exposed to 5 ng mL^{-1} of BaP; (ii) Non Inoculated Control (NIC) – medium containing the aforementioned BaP concentration but without inoculation of algal cells; this group was introduced for the monitoring of abiotic losses of BaP; (iii) Blank Microalgae Culture (BMC) – a liquid culture with the same cell density, but without BaP.

The flasks were shaken on a rotary shaker (100 rpm) at room temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), with the same photoperiod (16/8-h light/dark) used for the stock algal culture but illuminated with yellow light provided by a 40-watt incandescent lamp. Warshawsky et al. [8] demonstrated that the use of yellow light avoid the formation of toxic compounds for the microalgae, for example, quinones. Thus, triplicate flasks from each group were analyzed with the developed methodology at 0.75, 1.5, 3, 6, 24 and 48 h of exposure. The residual concentrations of BaP and the metabolites produced in the medium and algal biomass were determined.

3. Results and discussion

3.1. Miniaturized off-line MSPD

To optimize the miniaturized MSPD method, using a very small amount of sample, a sample/adsorbent ratio of 1:20 (5 mg/100 mg) was used. This ratio was found to be satisfactory even though it differed from the typical 1:1 or 1:4 ratio reported in the literature for other MSPD applications [22,32–34]. Thus, various 5 mg samples of dry biomass was spiked with 20 μL of solution of PAHs and metabolites at 500 ng mL^{-1} to obtain a sample fortified at 2 ng mg^{-1} . After dispersion and packing in a cartridge, the sequence of cleaning and elution solvents applied to the MSPD cartridge was optimized by testing different volumes of water, acetonitrile or mixtures of acetonitrile/water (identified as S1–S5). The effluent was collected in 1 mL or 0.5 mL fractions in order to check the possible breakthrough of analytes. Each fraction was analyzed by injecting 20 μL into the HPLC–FD system, and the recoveries were calculated in comparison to the area obtained by the injection of 20 μL of a standard solution of all compounds at 20 ng mL^{-1} . The results of these experiments to follow the elution profile are shown in Table 3, where it can be observed that there was no breakthrough of any analytes in the S1–S3 fractions. Analytes 9,10-dihydrodiolbenzo[a]pyrene (1) and 4,5-dihydrodiol benzo[a]pyrene (2) were eluted by the S4 solvent mixture (D1

extract) and the remaining analytes (9-hydroxy benzo[a]pyrene (3)); 3-hydroxy benzo[a]pyrene (4); benzo[a]anthracene (5); benzo[b]fluoranthene (6); benzo[k]fluoranthene (7) and benzo[a]pyrene (8) were eluted by the S5 solvent mixture (D2 extract). Analytes could be recovered in small extract volumes (<1.5 mL). Dihydrodiols and PAHs showed good recoveries (>71%), but the hydroxy-BaP metabolites showed very low recoveries (<17%). In this respect, the literature reports significant instability of these compounds under different conditions of light, pH, temperature, air, etc. [16]. Therefore, efforts were made to increase the recoveries of these metabolites from different types of samples with the use of different compounds such as acids, surfactants and antioxidants [26,35–37]. Substances such as HNO_3 , H_2SO_4 , sodium lauryl-sulfate, sodium heptan-sulfate and ascorbic acid were added to the sample prior to extraction. The effects of these chemical modifiers on the recoveries of the MSPD procedure can be found in Table 4, where the data show that 20% (w/v) ascorbic acid in water gave the best results. Under this condition, recoveries were increased from 16 and 7% to 54 and 55% for compounds 3 and 4, respectively. It is important to note that the ascorbic acid markedly improved the recoveries of the hydroxy-BaP compounds (3 and 4) but the recoveries of the dihydrodiols compounds and benzo[a]anthracene (5) decreased. This effect can be attributed to the modification of the pH of the samples because dihydrodiol recoveries also decreased when solutions of HNO_3 were used. Therefore, 20% ascorbic acid was established as optimal for the MSPD, allowing recoveries of greater than 50% for all analytes.

3.2. Off-line SPE

According to some publications, the solubility of PAHs in water decreases with an increase in the number of aromatic rings. To improve the solubility of these compounds in the liquid media, isopropanol has been added at different concentrations [20,38]. Here, different SPE cartridges were loaded with 15 mL samples of liquid culture spiked with metabolites and PAHs at 8 ng mL^{-1} and containing different percentages of isopropanol. After application of the elution sequence to the cartridge, all the analytes were recovered by using 4 mL of ACN 100% to assure a complete elution of analytes; this volume was optimized in preliminary experiments. The extracts were analyzed by injecting a 20 μL volume into the HPLC–FD system, and the recoveries were calculated in comparison to the area obtained by injection of 20 μL of a standard solution of all compounds at 30 ng mL^{-1} . The results are presented in Table 5, where it can be observed that the best recoveries for PAHs (5–8), were obtained with the addition of 20% isopropanol. For metabolites, 15% isopropanol was the best choice, but 20% was selected in order to improve the SPE extraction of PAHs and to maintain the recoveries of all compounds above 62%.

Subsequently, the clean-up and elution sequence was optimized using water, acetonitrile and mixtures of water/acetonitrile (S1–S6). Desorption of analytes was observed in eluents S5 and S6, which were therefore collected in 1 mL fractions. The results are shown in Table 6, where it can be noted that only the cleaning solvent S4 has sufficient polarity to desorb a small percent (<3%) of the compounds 9 and 10 BaP dihydrodiol from the cartridge. Good simplification of the matrix (i.e., clean-up) without significant losses of this compound was obtained through the use of the cleaning solvents S1–S4. Although the solution S6 (a total of 3 mL of 100% ACN) allowed recovery of the hydroxy-BaP and PAHs, this volume was reduced to 2.5 mL without significantly decreasing the recoveries of each compound. With the SPE conditions optimized, the analytes were recovered selectively in the two extracts E1 and E2: 3 mL of S5 (PAH dihydrodiols) and 2.5 mL of S6 (hydroxy-PAHs and PAHs). In addition, good reproducibility (RSD 1–5%) in these trials

Table 4
Effects of chemical modifiers on recoveries applied to the off-line MSPD procedure.

Compound	Recovery % (\pm RSD) $n = 3$ Modifier ^a								
	WM	HSNa	LSNa	HNO ₃		H ₂ SO ₄	Ascorbic acid		
		1 M	1 M	0.1 M	1 M	0.1 M	15%	20%	40%
9,10-Dihydrodiol BaP	77 (\pm 4)	71 (\pm 3)	73 (\pm 3)	52 (\pm 1)	ND	50 (\pm 4)	56 (\pm 3)	52 (\pm 4)	42 (\pm 2)
4,5-Dihydrodiol BaP	79 (\pm 2)	76 (\pm 4)	79 (\pm 2)	95 (\pm 4)	90 (\pm 2)	67 (\pm 5)	66 (\pm 3)	61 (\pm 3)	57 (\pm 2)
9-OH BaP	16 (\pm 1)	16 (\pm 4)	14 (\pm 3)	33 (\pm 3)	42 (\pm 1)	18 (\pm 4)	53 (\pm 6)	54 (\pm 5)	61 (\pm 4)
3-OH BaP	7 (\pm 11)	7 (\pm 9)	6 (\pm 10)	26 (\pm 9)	54 (\pm 10)	15 (\pm 8)	61 (\pm 9)	55 (\pm 13)	53 (\pm 11)
BaA	91 (\pm 2)	90 (\pm 1)	92 (\pm 4)	85 (\pm 2)	83 (\pm 5)	80 (\pm 2)	88 (\pm 3)	76 (\pm 4)	77 (\pm 4)
BbF	89 (\pm 5)	91 (\pm 2)	93 (\pm 4)	83 (\pm 3)	81 (\pm 2)	80 (\pm 3)	87 (\pm 2)	82 (\pm 4)	81 (\pm 3)
BkF	87 (\pm 4)	88 (\pm 4)	89 (\pm 2)	85 (\pm 4)	81 (\pm 2)	83 (\pm 4)	87 (\pm 2)	87 (\pm 4)	85 (\pm 6)
BaP	90 (\pm 4)	91 (\pm 2)	93 (\pm 3)	86 (\pm 4)	83 (\pm 5)	81 (\pm 4)	88 (\pm 4)	86 (\pm 4)	83 (\pm 6)

^a 20 μ L added to sample.

WM = without modifier; HSNa = sodium heptanesulfate; LSNa = sodium lauryl-sulfate. BaA = benzo[a]anthracene; BbF = benzo[b]fluoranthene; BkF = benzo[k]fluoranthene; BaP = benzo[a]pyrene.

Table 5
Method optimization (off-line SPE step). Recoveries (\pm RSD) at three isopropanol percentages added to the sample.

Compound	% isopropanol		
	0%	15%	20%
9,10-Dihydrodiol BaP	77 (\pm 5)	96 (\pm 4)	89 (\pm 4)
4,5-Dihydrodiol BaP	67 (\pm 4)	87 (\pm 3)	84 (\pm 3)
9-OH BaP	59 (\pm 7)	68 (\pm 5)	69 (\pm 4)
3-OH BaP	47 (\pm 9)	64 (\pm 10)	62 (\pm 9)
BaA	49 (\pm 5)	66 (\pm 4)	75 (\pm 3)
BbF	37 (\pm 5)	64 (\pm 5)	68 (\pm 3)
BkF	38 (\pm 6)	63 (\pm 7)	72 (\pm 4)
BaP	36 (\pm 7)	63 (\pm 6)	68 (\pm 5)

BaA = benzo[a]anthracene; BbF = benzo[b]fluoranthene; BkF = benzo[k]fluoranthene; BaP = benzo[a]pyrene.

was obtained for all compounds in these trials, except for 3-OH BaP (RSD 9%).

3.3. Optimization of the on-line preconcentration

On-line preconcentration was included in the methodology because it allows very low limits of detection. However, in this work, the extracts recovered by the SPE and MSPD methods could not be preconcentrated directly on the C18 precolumn because they were dissolved in a high percent of acetonitrile, which caused the breakthrough of the analytes. To address this issue, several standard solutions were used to simulate the extracts obtained from each method. Each solution was diluted with water in order to optimize the percentage of ACN and improve recoveries, while keeping the final volume of the diluted solution constant. Fig. 2 shows the

results obtained for each preconcentrated solution: simulated E1 and E2 extracts (from SPE) or simulated D1 and D2 extracts (from MSPD).

Fig. 2A and B shows that extracts E1 and D1, containing BaP dihydrodiols, had the best recoveries when they were diluted to 10% ACN. An increase in the percentage of ACN in the extracts caused breakthrough of the analytes. Fig. 2A also shows that for the extract E2, the OH-BaP compounds had the best recoveries with 30% ACN; the PAHs in this extract had the best recoveries when the extract was diluted to 40% or 45% ACN. Thus, in the final off-line/on-line protocol, the E2 extracts were diluted to 30% ACN to preferentially achieve the highest recoveries of metabolites which are produced in very small quantities in degradation bioassays. For the D2 extracts, Fig. 2B shows that the highest recovery of the OH-BaP was obtained with 40% ACN whereas for PAHs, it was obtained with 50% ACN. For both, E2 and D2 extracts, increasing the percentage of acetonitrile to 55%, decreased the recoveries due to the breakthrough of the analytes from the precolumn. Decreasing the percentage of acetonitrile also decreased the recoveries, this time due to the adsorption of PAHs and metabolites in the vessels at a higher proportion of water. Therefore, for the final method protocol, D2 extracts were diluted to 40% ACN. In general, good recoveries were obtained for the dihydrodiols (86–104%) and lower recoveries were obtained for the other compounds (65–84%), but these values were sufficient to achieve excellent detection limits. Due to the instability of the compound 3-OH BaP during the on-line analysis, it was not possible to determine that metabolite with adequate accuracy and reproducibility in both biomass samples and liquid cultures. Therefore, the following sections discuss only the results obtained with the remaining metabolites and PAHs.

Table 6
Optimization of the off-line SPE elution sequence.

Compound	Clean-up		Analytes elution						Total recovery % (\pm RSD)
	S1, S2, S3		S5			S6			
	S1, S2, S3	S4	1	2	3	1	2	3	
9,10-Dihydrodiol BaP	NI	3	39	31	6	–	–	–	79 (\pm 4)
4,5-Dihydrodiol BaP	NI	–	32	41	9	–	–	–	82 (\pm 3)
9-OH BaP	NI	–	–	–	–	69	–	–	69 (\pm 4)
3-OH BaP	NI	–	–	–	–	62	–	–	62 (\pm 9)
BaA	NI	–	–	–	–	54	14	5	73 (\pm 3)
BbF	NI	–	–	–	–	48	16	6	70 (\pm 3)
BkF	NI	–	–	–	–	46	19	6	71 (\pm 4)
BaP	NI	–	–	–	–	41	22	4	67 (\pm 5)

S1 = 10 mL water; S2 = 10 mL ACN/water (10:90); S3 = 2.5 mL ACN/water (20:80); S4 = 1 mL ACN/water (30:70); S5 = 3 \times 1 mL ACN/water (55:45); S6 = 3 \times 1 mL ACN 100%. NI = not injected. – = not detected. BaA = benzo[a]anthracene; BbF = benzo[b]fluoranthene; BkF = benzo[k]fluoranthene; BaP = benzo[a]pyrene.

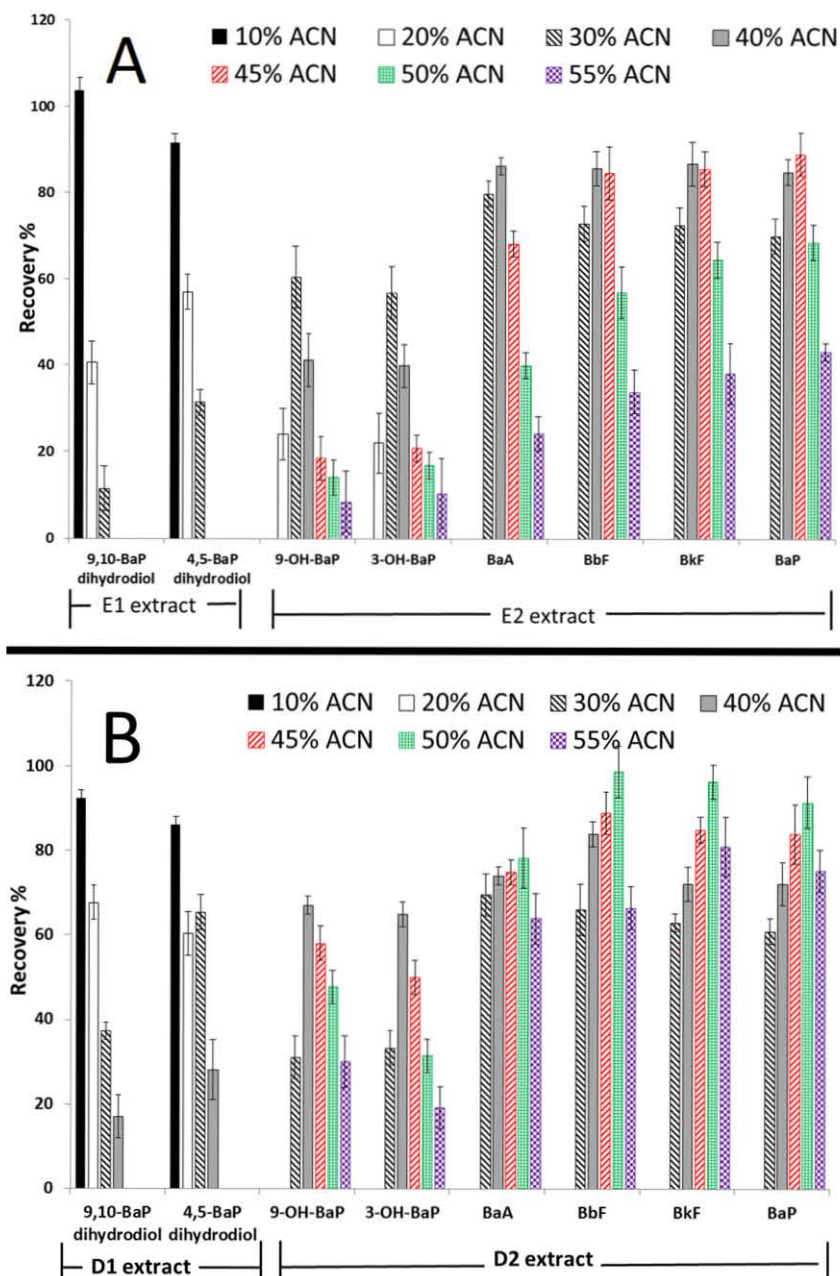


Fig. 2. Optimization of the dilution of simulated extracts for on-line SPE-HPLC preconcentration. (A) Effect of the percentage of acetonitrile on analyte recoveries loading 20 mL (E1) or 8 mL (E2) of hydro-organic standard solutions at 8 pg mL⁻¹ and 27 pg mL⁻¹, respectively. (B) Effect of the percentage of acetonitrile on analyte recoveries loading 6 mL (D1) or 2 mL (D2) of hydro-organic standard solutions at 45 pg mL⁻¹ and 160 pg mL⁻¹, respectively.

3.4. Validation

3.4.1. Off line/on-line method (MSPD/SPE-HPLC-FD)

3.4.1.1. Linearity and accuracy. The accuracy of the MSPD/SPE-HPLC-FD method developed here was evaluated by the determination of the recoveries of analytes from spiked dry biomass samples. For each compound, curves were constructed for the added vs. recovered amounts and the slope and correlation coefficients (r^2) were calculated. Good correlation coefficients (>0.9912) were obtained for all compounds. The global recoveries were obtained from the slope of this curve; they ranged from 40% to 66% for 9-OH BaP and BkF, respectively. These results are shown in Table 7. These recovery values were in agreement with EURACHEM and the AOAC International (Association of Official

Analytical Chemists), which considers a method to be accurate if the recoveries are between 40 and 120% for analytes at ppb levels (pg mg⁻¹) [39].

3.4.1.2. Precision and lower limits. Table 7 also shows the precision of the MSPD/SPE-HPLC/FD method, which was evaluated with the relative standard deviation parameter RSD in terms of reproducibility (inter-day) at two levels of fortification (8 and 120 pg mg⁻¹). Adequate precision was found for all compounds; RDS values were $\leq 4.73\%$. These values were in agreement with AOAC which considers a method to be precise when RSD% is less than 15%. The LODs and LOQs were calculated at the optimum wavelengths. The LODs ranged from 2.0 and 6.5 pg mg⁻¹ and the LOQs ranged from 6.1 and 18.7 pg mg⁻¹.

Table 7

Parameters of the added vs. recovered amount curves, precision and lower limits.

Compound ^c	9,10-Dihydrodiol BaP	4,5-Dihydrodiol BaP	9-OH BaP	BaA	BbF	BkF	BaP
Off-line/on-line MSPD/SPE-HPLC method							
Recovery (%) (slope × 100)	66	55	40	57	53	62	51
Linearity (r^2) ^a	0.9985	0.992	0.9982	0.9985	0.9941	0.9912	0.995
Reproducibility (RSD)							
8 pg mg ⁻¹	4.13	4.73	2.9	2.06	3.22	2.8	3.31
120 pg mg ⁻¹	2.77	3.09	2.35	1.87	2.65	2.06	2.97
LOD (S/N = 3) (pg mg ⁻¹)	3.3	2	2.4	3.2	6.5	5.7	2
LOQ (S/N = 10) (pg mg ⁻¹)	9.9	6.2	7.2	9.6	18.7	17.3	6.1
Off-line/on-line SPE/SPE-HPLC method							
Recovery (%) (slope × 100)	74	65	42	49	41	45	38
Linearity (r^2) ^b	0.9913	0.9955	0.998	0.9967	0.9965	0.9978	0.9985
Reproducibility (RSD)							
20 pg mL ⁻¹	5.59	5.93	4.32	4.14	7.36	6.68	5.47
80 pg mL ⁻¹	3.75	3.99	2.89	2.04	5.54	4.03	3.08
LOD (S/N = 3) (pg mL ⁻¹)	1.3	0.8	0.9	1	2.3	2.1	1
LOQ (S/N = 10) (pg mL ⁻¹)	4.4	2.5	2.8	3.2	7.5	6.9	3.4

r^2 = correlation coefficient. Precision expressed as relative standard deviation (RSD), limits of detection (LOD); limits of quantification (LOQ).

Compounds: BaA = benzo[a]anthracene; BbF = benzo[b]fluoranthene; BkF = benzo[k]fluoranthene; BaP = benzo[a]pyrene.

^a Linearity range for all compounds was 20–200 pg mg⁻¹.

^b Linearity range for compounds 9,10 and 4,5-dihydrodiol BaP was 5–120 pg mL⁻¹; for the rest of compounds the range was 10–120 pg mL⁻¹.

^c Compound 3-OH BaP did not show good parameters of validation when on-line method was used.

3.4.2. Off-line/on-line method (SPE/SPE-HPLC-FD)

3.4.2.1. Linearity and accuracy. The accuracy of the SPE/SPE-HPLC-FD method was evaluated by determination of recovery efficiencies of spiked liquid culture samples. Curves for the added vs. recovered amounts were constructed and gave excellent correlation coefficients ($r^2 > 0.9913$). Table 7 shows these values and the global recoveries obtained from the slope of this curve, which ranged from 38% to 74% for BaP and 9,10-dihydrodiol BaP, respectively. These results were considered acceptable, similar to those of the MSPD method.

3.4.2.2. Precision and lower limits. The results in Table 7 show the adequate method precision that was obtained for all compounds; RSD values were $\leq 4.13\%$ in terms of reproducibility (inter-day) at two levels of fortification (20 and 80 pg mL⁻¹). The LOD range was 0.8–2.3 pg mL⁻¹ and the LOQ range was 2.5–7.5 pg mL⁻¹. All LOQ values were below the maximum contaminant level (MCL = 200 pg mL⁻¹) established by the EPA for BaP in water samples [40].

3.5. Application of the methodology to BaP exposure assays

The validated methodology was used to measure the residual amounts of BaP and the amounts of certain metabolites in both components of the exposed cultures after different exposure times. The results of the exposure assays showed that BaP was metabolized by microalgae as demonstrated by the decreasing BaP concentrations over time, presented in Fig. 3. Interestingly, the amount of this compound recovered from the non-inoculated cultures (NIC) was less than the expected value. Assuming an analyte recovery of 100%, with 15 mL of sample at 5 ng mL⁻¹, the expected amount of recovered BaP is 75 ng. However, in NIC, the observed levels were only approximately 31 ng at the first time point measured (45 min) and this result was in accord with the global recoveries obtained for BaP (approximately 40%). It was also observed that the amount of BaP in these samples decreased as the time of exposure increased; this result was unexpected because the cultures contained no microalgae. Therefore, this result may be explained in terms of the low polarity of heavy molecular weight PAHs, like BaP. It has been reported that PAHs tend to be adsorbed to the container when they are in aqueous solutions [20]. There was no evidence of photodegradation because no signals, different from those in the blank samples, were found in the non-inoculated cultures

(NIC) that were spiked with BaP. Furthermore, Warshawsky et al. [8] studied the effect of different types of light on the photodegradation of BaP by *S. capricornutum* and they demonstrated that with the use of yellow light the process decreases significantly.

On the other hand, in the exposed microalgae cultures (EMC), the major amount of BaP was found in the biomass. It could be proposed that there was rapid adsorption of BaP to the cells, in contrast to the small residual quantity released to the liquid culture. At 45 min of exposure, averages of 23 and 5 ng were found in the biomass and liquid samples, respectively. These values show that almost 82% of recovered BaP was present in the microalgae samples. This effect has been reported for other compounds and it may be explained by the lipophilic composition of the cell membranes which have a higher affinity for nonpolar compounds than such compounds have to water [8,12,41].

From an analytical perspective, the very low detection limits achieved by the methodology developed here allowed a new biological study to be performed. This study demonstrated that with a combination of biosorption and biodegradation capacities, the microalgae *S. capricornutum* was able to reduce the BaP concentration in the liquid medium to values below the EPA limit for water (0.2 ng mL⁻¹). After 3 h of exposure, only 1.7 ng of BaP were present in aqueous liquid culture; the concentration in the 15 mL sample was 0.11 ng mL⁻¹.

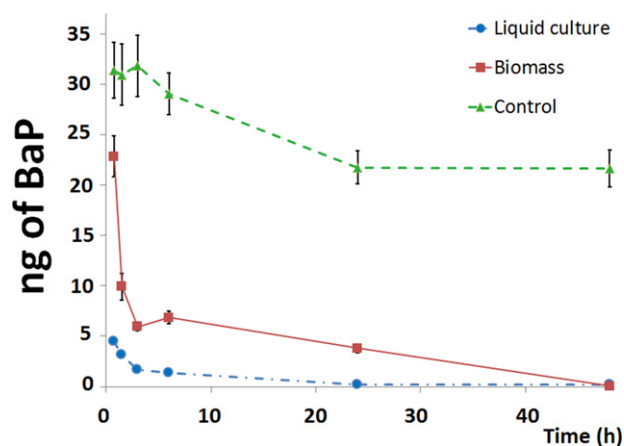


Fig. 3. Recovered amounts of BaP vs. time curves (A).

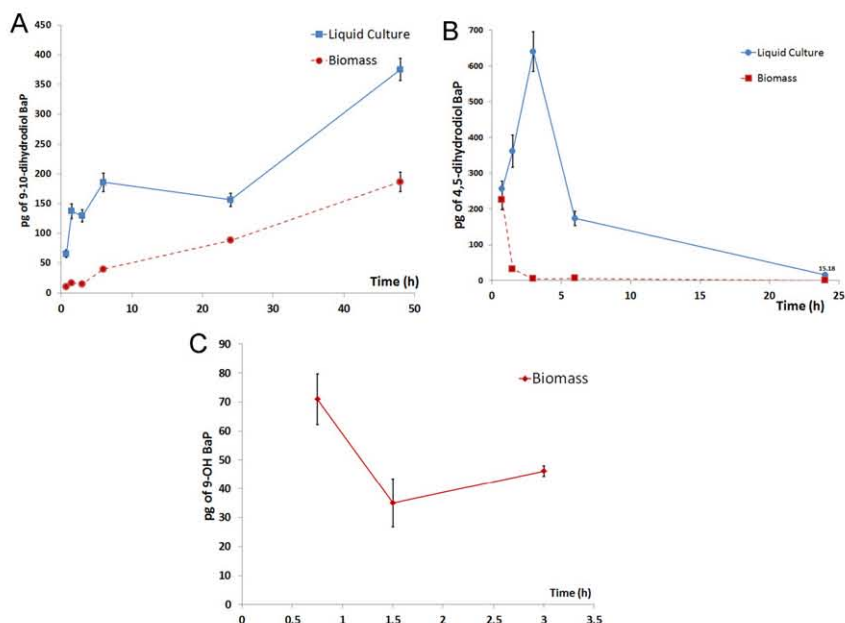


Fig. 4. Recovered amounts of (A) 9,10-dihydrodiol BaP; (B) 4,5-dihydrodiol BaP and (C) 9-OH BaP vs. time curves from the exposure to 5 ng mL^{-1} of BaP assay.

The results concerning the appearance of the metabolites *cis*-4,5-dihydrodiol BaP, *cis*-9,10-dihydrodiol BaP and 9-OH BaP showed that these compounds could be quantified in extracts from both liquid media and biomass samples. Fig. 4 shows the quantities recovered for each compound at different exposure times, and Fig. 5 shows representative chromatograms obtained from the extracts in these experiments. Fig. 4A shows that the compound 9,10-dihydrodiol BaP appeared in liquid media in less than 45 min and its amount in both biomass and liquid media increased with the time of exposure. The production of this metabolite was slow in contrast to 4,5-dihydrodiol BaP, which unlike the other metabolites was produced in maximal amounts at 3 h of exposure (see Fig. 4B). After 3 h, the amount of 4,5-dihydrodiol BaP decreased and finally, at 24 h of exposure, this metabolite could not be detected. Because, there are no reports about a posterior metabolism of this compound by the microalgae *S. capricornutum* and because the cultures were maintained in axenic conditions, the disappearance of this compound from the medium was attributed to its greater instability in aqueous solution than the other dihydrodiol. These results obtained for the dihydrodiols show the importance of monitoring PAHs metabolites because metabolism could increase the bioavailability of these contaminants in the nature. The

behavior of these metabolites during the exposure tests is shown in Fig. 5.

With respect to 9-OH BaP, the results showed that it was produced in very low amounts during the first 3 h of exposure, and after this time, this metabolite could not be determined in cells. In liquid media, it could not be detected at any time. Thus, in contrast to the dihydrodiols BaP, the 9-OH BaP was only found in the biomass and it was produced in minor quantities ($<70 \text{ pg}$). This result is in agreement with reports that the microalgae group metabolizes PAHs preferentially by the dioxygenase route instead of the monooxygenase route, so that production of dihydrodiols is favored [30].

The chromatograms from Fig. 5 show the appearance of other unidentified compounds, which were produced by metabolic activity of the microalgae because they were not found in the control cultures NIC or BMC. The compounds are labeled in Fig. 5 as U1–U5. The behavior of microalgae in an exposed culture at 50 ng mL^{-1} of BaP was similar to the behavior from the experiments at 5 ng mL^{-1} . Warshawsky et al. [8] reports the formation of several compounds, such as epoxides or quinones, in addition to other dihydrodiols and hydroxyl BaP that can be produced by *S. capricornutum*. However, further research must be performed to determine the concentration and structure of each compound.

4. Conclusions

A very sensitive and reproducible methodology was developed to determine the amounts of BaP metabolites and PAHs present in cultures of *S. capricornutum*. With the use of the off-line SPE or MSPD extraction and the on-line SPE/HPLC-FD system, the final analytical protocol produce a rapid process, with a simplified sample treatment compared to more common methods used based on traditional liquid–liquid extraction. The developed and validated methodology in this work provides very low LOQs at levels of pg mL^{-1} and pg mg^{-1} . Thus, it can be used to determine the small amounts of BaP metabolites that are produced by microalgae cultures in exposure test, using a very small size of sample of biomass and liquid media and without requiring the use of a very high concentration of BaP in an exposure bioassay. The microalgae cultures exposed to 5 ng mL^{-1} of BaP were able to reduce the levels of contaminant in the liquid medium to less than the EPA limit ($<0.2 \text{ ng mL}^{-1}$). The results obtained are in agreement with

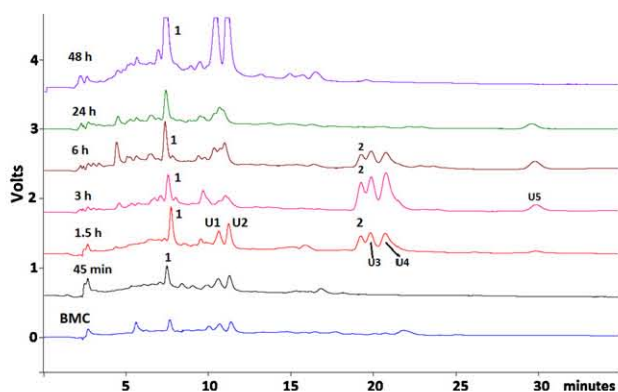


Fig. 5. Appearance of analytes in extract E1 from the exposure to 5 ng mL^{-1} of BaP assay. BMC = Blank Microalgae Culture. 1 = 9,10-dihydrodiol BaP; 2 = 4,5-dihydrodiol BaP. U1–U5 = unidentified compounds.

information reported in previous works by other authors in that the metabolites favored by the microalgae are the dihydrodiols. Though, there are some reports that monitored PAHs degradation using this type of samples, the current work presents a validated methodology that allows determination of the recovered quantities of different PAHs. Most previous reports are focused on determining the degradation only of less polar PAHs and BaP, but the current methodology could be a useful tool to provide more information about the degradation of heavy PAHs with low water solubility.

Acknowledgements

This work was supported by the *Dirección General de Asuntos de Personal Académico* from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) Projects PAPIIT IN223111 and PAPIME PE202310. Also, the authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México – CONACyT for the project 166389 and the doctoral scholarship awarded to J.J. Olmos Espejel (No. 204859).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.015>.

References

- [1] J.M. Stellman, D. Osinsky, P. Markkanen, in: M. McCann (Ed.), *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, vol. 104, Ministerio Internacional del Trabajo, Madrid, 2001, p. 104.310.
- [2] K. Haritash, C.P. Kaushik, *J. Hazard. Mater.* 169 (2009) 1.
- [3] G. Gramss, B. Kirsche, K.D. Voigt, T. Günther, W. Fritsche, *Mycol. Res.* 103 (1999) 1009.
- [4] L. Juhasz, R. Naidu, *Int. Biodeterior. Biodegradation* 45 (2000) 57.
- [5] M. da Silva, E. Esposito, J.D. Moody, V.P. Canhos, C.E. Cerniglia, *Chemosphere* 57 (2004) 943.
- [6] J. Moody, J. Freeman, C.E. Cerniglia, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 340.
- [7] H. Nyberg, *Water Res.* 22 (1988) 217.
- [8] D. Warshawsky, T. Cody, M. Radike, R. Reilman, B. Schumann, K. LaDow, J. Schneider, *Chem. Biol. Interact.* 97 (1995) 131.
- [9] K.T. Semple, R.B. Cain, S. Schmidt, *FEMS Microbiol. Lett.* 170 (1999) 291.
- [10] X. Borde, B. Guieysse, O. Delgado, R. Muñoz, R. Kaul, C. Nugier-Chauvin, H. Patin, B. Mattiasson, *Bioresour. Technol.* 86 (2003) 293.
- [11] P. Lei, Z. Hu, Y. Wong, N.F. Tam, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 273.
- [12] L. Ke, L. Luo, P. Wang, T. Luan, N.F. Tam, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6950.
- [13] B. Liu, X. Nie, W. Liu, P. Snoeijs, C. Guan, M.T.K. Tsui, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (2011) 1027.
- [14] B. Lindquist, D. Warshawsky, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130 (1985) 71.
- [15] R. Schoeny, T. Cody, D. Warshawsky, M. Radike, *Mutat. Res.* 197 (1988) 289.
- [16] A.P. Clark, *Handbook of Analytical and Spectral Data for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Benzo[a]pyrene and its Metabolites*, Midwest Research Institute, Kansas City, MO, 1993, p. 1.
- [17] L. Flowers-Geary, W. Blecinski, R.G. Harvey, T.M. Penning, *Chem. Biol. Interact.* 99 (1996) 55.
- [18] T. Luan, S. Fang, Y. Zhong, L. Lin, S.M.N. Chan, C. Lan, N.F.Y. Tam, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 37.
- [19] Liška, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 3.
- [20] M.R. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 273.
- [21] M.D. Crouch, S.A. Barker, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 287.
- [22] E.M. Kristenson, U.A.T. Brinkman, L. Ramos, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 96.
- [23] S.A. Barker, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 151.
- [24] L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2521.
- [25] T.M. Gutierrez, M.P. Garcia de Llasera, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6869.
- [26] J. Gündel, J. Angerer, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 738 (2000) 47.
- [27] P. Simon, M. Lafontaine, P. Delsaut, Y. Morele, T. Nicot, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 748 (2000) 337.
- [28] S. Rodriguez-Mozaz, M.J. Lopez de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 97.
- [29] C.F. Li, J.W.C. Wong, C.W. Huie, M.M.F. Choi, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 11.
- [30] US Department of Health Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 1995.
- [31] D. Warshawsky, M. Radike, K. Jayasimhulu, T. Cody, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152 (1988) 540.
- [32] P.C. Abhilash, V. Singh, N. Singh, *Food Chem.* 113 (2009) 267.
- [33] M.P. García de Llasera, M.L. Reyes-Reyes, *Food Chem.* 114 (2009) 1510.
- [34] L. Dawidowicz, E. Rado, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 79.
- [35] R.S. Whiton, C.L. Witherspoon, T.J. Buckley, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 665 (1995) 390.
- [36] D.M. Richardson, M.J. Gubbins, I.M. Davies, C.F. Moffat, P.M. Pollard, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 17 (2004) 79–85.
- [37] L. Rey-Salgueiro, E. Martínez-Carballo, M.S. García-Falcón, C. González-Barreiro, J. Simal-Gándara, *Food Chem.* 115 (2009) 814.
- [38] F. Busetto, A. Heitz, M. Cuomo, S. Badoer, P. Traverso, *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 104.
- [39] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 535.
- [40] US, USEPA, *National Primary Drinking Water Regulations, 2009* (Consulted on December 2011).
- [41] B.F. Smets, B.E. Rittmann, *Water Res.* 24 (1990) 355.