



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

MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LA PUNTA DE MICROPIPETA PARA EL AISLAMIENTO DE TRAZAS DE HAPs EN SUSPENSIONES ACUOSAS DE MICROORGANISMOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. MARIBEL HERNÁNDEZ CAMARILLO

TUTOR: DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. JUNIO 2015



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente: Dr. Rafael Navarro González

Secretario: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Vocal: Dra. Gloria Maribel Trejo Aguilar

1 er. Suplente: Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña

2 do. Suplente: Dra. María del Pilar Cañizares Macías

Lugar o lugares dónde se realizó la tesis: Departamento de Química Analítica. Laboratorio 208 de Análisis de Trazas. Edificio F2. Facultad de Química, UNAM

TUTOR DE TESIS:

Dra. Martha Patricia García Camacho

FIRMA

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el proyecto de Ciencia Básica 166389 *Análisis de trazas cromatográfico para la caracterización de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por microalgas.*

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el proyecto PAPIIT IT203214 *Bioremovción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos acuosos con microalgas libres e inmovilizadas.*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo al proyecto *Método de extracción en fase sólida en la punta de micropipeta para el aislamiento de trazas de HAPs en suspensiones acuosas de microorganismos*, a través de la beca otorgada número: 288975.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo y por la dirección de la tesis.

A la M. en C. María del Rosario Covarrubias por la supervisión y asesoría brindada durante el desarrollo de la tesis.

A los doctores: Rafael Navarro González y Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña; además de las doctoras Araceli Peña Álvarez, María del Pilar Cañizares Macías y Gloria Maribel Trejo Aguilar por la revisión y las observaciones realizadas al presente trabajo.

Índice general

	Resumen	1
I	Introducción	3
II	Antecedentes	7
2.1	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	7
2.2	Biodegradación de HAPs	13
2.3	Degradación por bacterias	14
2.4	Degradación por hongos	15
2.5	Degradación por algas	16
2.6	Selección de la técnica de extracción en el procedimiento analítico	17
2.7	Extracción en fase sólida (SPE)	18
2.8	Técnicas miniaturizadas	22
2.9	Extracción en fase sólida en punta de micropipeta	26
III	Objetivos	29
3.1	Objetivo general	29
3.2	Objetivos particulares	29
IV	Desarrollo experimental	30
4.1	Materiales y reactivos	30
4.1.1	Estándares y disolventes	30
4.1.2	Sistemas cromatográficos	30
4.1.3	Extracción en fase sólida en punta de micropipeta	31
4.1.4	Manejo de cultivos	31
4.2	Descripción general de la metodología desarrollada	32
4.3	Preparación y condiciones del crecimiento del cultivo de <i>Selenastrum capricornutum</i>	33
4.4	Condiciones de separación cromatográfica y de detección	34
4.4.1	Determinación de las condiciones de análisis de	34

	benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno	
4.5	Establecimiento de las condiciones del método de extracción en fase sólida en punta de micropipeta	35
4.5.1	Selección del tipo de adsorbente	35
4.5.2	Efecto de las variables en la recuperación de los analitos	36
4.5.3	Selección del número de ciclos de elución con sílice C18	37
4.5.4	Selección del número de ciclos de carga de la muestra	37
4.6	Validación instrumental y del método	38
4.6.1	Linealidad, precisión, límites de detección y límites de cuantificación	38
4.6.1.1	Linealidad	38
4.6.1.2	Precisión	39
4.6.1.3	Límites de detección y de cuantificación	40
4.6.2	Porcentaje de recuperación y selectividad del método	40
4.7	Aplicación de la metodología de extracción en fase sólida en punta de micropipeta con análisis por CLAR-DF.	41
4.7.1	Evaluación de la remoción de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno	41
4.7.2	Identificación de algunos de los metabolitos formados por la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> durante el proceso de remoción de benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno	44
V	Resultados	45
5.1	Condiciones de separación cromatográfica y detección	45
5.1.1	Determinación de las condiciones de análisis de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno	45
5.2	Establecimiento de las condiciones del método de extracción en fase sólida en punta de micropipeta	46
5.2.1	Selección del tipo de adsorbente	46
5.2.2	Efecto de las variables en la recuperación de los analitos	46

5.2.3	Selección del número de ciclos de elución con la sílice C18	46
5.2.4	Selección del número de ciclos de carga de la muestra	48
5.3	Protocolo del método de extracción en fase sólida en punta de micropipeta	49
5.4	Validación instrumental y del método	51
5.4.1	Linealidad, precisión, límites de detección y límites de cuantificación	51
5.4.1.1	Linealidad	51
5.4.1.2	Precisión	52
5.4.1.3	Límites de detección y de cuantificación	53
5.4.2	Porcentaje de recuperación y selectividad del método	54
5.5	Aplicación de la metodología de extracción en fase sólida en punta de micropipeta con análisis por CLAR-DF.	57
5.5.1	Evaluación de la remoción de benzo[<i>a</i>]pireno y benzo[<i>a</i>]antraceno	57
5.5.2	Identificación de algunos de los metabolitos formados por la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> durante el proceso de remoción de benzo[<i>a</i>]pireno y benzo[<i>a</i>]antraceno	64
VI	Conclusiones	71
VII	Referencias	73

Índice de tablas

Tabla	Descripción	Página
1	Propiedades físicas y químicas de algunos HAPs	10
2	Toxicidad de los 16 HAPs descritos como prioritarios según la USEPA	11
3	Características generales de la extracción en fase sólida	20
4	Empleo de la extracción en fase sólida para el aislamiento de HAPs	21
5	Determinación de HAPs en matrices acuosas empleando técnicas miniaturizadas en el proceso de preparación de la muestra	25
6	Estudios desarrollados empleando extracción en fase sólida en punta de micropipeta	28
7	Combinaciones del diseño de experimentos 2^n , $n=3$ (concentración de analito, cantidad de fase y ciclos de carga de la muestra)	36
8	Tipos de muestra empleados en los ensayos de exposición	42
9	Parámetros estimados a través de la regresión lineal por mínimos cuadrados para las curvas del método e instrumentales de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno	52
10	Evaluación de la precisión para benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno	53

Índice de figuras

Figura	Descripción	Página
1	Ejemplos de las características estructurales de los HAPs	7
2	Eventos clave del modo de acción carcinogénica de los HAPs	13
3	Etapas generales involucradas en el metabolismo de HAPs por bacterias, hongos y algas	17
4	Descripción general de la metodología desarrollada	32
5	Preparación de un medio de cultivo sólido de la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	33
6	Preparación de un medio de cultivo líquido de la microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	34
7	Separación cromatográfica de una disolución estándar de B[a]A y B[a]P a 75 ng mL ⁻¹	45
8	Porcentaje de recuperación de benzo[a]pireno en función del número de ciclos de elución	47
9	Comparación del porcentaje de recuperación de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno en función del número de ciclos de elución para un ensayo a 100 ng mL ⁻¹	48
10	Efecto de los ciclos de carga en el porcentaje de recuperación para benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno	49
11	Esquema general de la metodología de extracción en punta de micropipeta	50
12	Linealidad del método del benzo[a]antraceno	51
13	Linealidad del método del benzo[a]pireno	51
14	Cromatogramas obtenidos empleando una columna XDB-C18 con una fase móvil de MeOH al 100 % a un flujo de 1 mL min ⁻¹ . Cromatogramas A y B corresponden a los blancos de matriz de los tiempos 0 y 18 h. Cromatograma C: Extracto obtenido después de un	55

	tiempo de 18 h proveniente del ensayo de exposición con 50 ng mL ⁻¹ de HAPs	
15	Evaluación de la recuperación del método para benzo[<i>a</i>]pireno.	56
16	Evaluación de la recuperación del método para benzo[<i>a</i>]antraceno	56
17	Cromatogramas de los extractos correspondientes a los diferentes tiempos del monitoreo del ensayo con microorganismos vivos expuestos a: 100 ng mL ⁻¹ de benzo[<i>a</i>]pireno y benzo[<i>a</i>]antraceno	57
18	Cromatogramas de los extractos correspondientes a los diferentes tiempos del monitoreo del ensayo con microorganismos muertos expuestos a 266 ng mL ⁻¹ de benzo[<i>a</i>]pireno y benzo[<i>a</i>]antraceno	58
19	Concentración de B[<i>a</i>]A en función del tiempo de monitoreo en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 266 ng mL ⁻¹	59
20	Concentración de B[<i>a</i>]P en función del tiempo de monitoreo en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 266 ng mL ⁻¹	59
21	Concentración de B[<i>a</i>]A en función del tiempo de monitoreo en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 100 ng mL ⁻¹	59
22	Concentración de B[<i>a</i>]P en función del tiempo de monitoreo en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 100 ng mL ⁻¹	59
23	Concentración de B[<i>a</i>]A en función del tiempo de monitoreo, en los ensayos con microorganismos vivos y muertos expuestos a una concentración del contaminante de 50 ng mL ⁻¹	60
24	Concentración de B[<i>a</i>]P en función del tiempo de monitoreo, en los ensayos con microorganismos vivos y muertos expuestos a una concentración del contaminante de 50 ng mL ⁻¹	60
25	Comparación de la recuperación de benzo[<i>a</i>]antraceno y	61

	benzo[<i>a</i>]pireno desde un medio con y sin microorganismos.	
26	Comparación de la concentración de benzo[<i>a</i>]pireno y benzo[<i>a</i>]antraceno respecto al tiempo de monitoreo en el ensayo con microorganismos vivos expuestos a 100 ng mL ⁻¹ de HAP	61
27	Comparación a tres diferentes concentraciones de la remoción de benzo[<i>a</i>]pireno	63
28	Comparación a tres diferentes concentraciones de la remoción de benzo[<i>a</i>]pireno	63
29	Cromatogramas comparativos de: A) extracto del ensayo de exposición con microorganismos vivos a 3 h y B) el mismo extracto con adición de una mezcla de metabolitos. Condiciones de análisis: sistema CLAR-DF, columna: XDB-C18 y fase móvil 70 % metanol 30 % agua a un flujo de 1 mL min ⁻¹	65
30	Identificación de metabolitos en los extractos a 1.5, 3 y 6 h del ensayo a 266 ng mL ⁻¹ . Condiciones de análisis: sistema CLAR-DF, columna: XDB-C18 y fase móvil 70 % metanol 30 % agua a un flujo de 1 mL min ⁻¹	66
31	Separación de metabolitos en: A) una disolución estándar y en B) el extracto de 6 h del ensayo a 266 ng mL ⁻¹ . Condiciones de análisis: sistema CLAR-DAD, columna: C18 y fase móvil 70 % metanol 30 % agua a un flujo de 1 mL min ⁻¹ . Las longitudes de onda de detección fueron 265.3 y 364.2 nm	68
32	Espectros de las señales correspondientes a los picos de los metabolitos en una disolución con los estándares y en el extracto a 6 h. Condiciones de análisis: sistema CLAR-DAD, columna: C18 y fase móvil 70 % metanol 30 % agua a un flujo de 1 mL min ⁻¹	69

Símbolos y abreviaturas

°C	Grado Celsius
mL	Mililitro
min	Minuto
h	Hora
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
μL	Microlitro
μg	Microgramo
Pa	Pascal
C.V.	Coficiente de variación
HAP	Hidrocarburo aromático policíclico
PDMS	Polidimetilsiloxano
B[a]P	Benzo[a]pireno
B[a]A	Benzo[a]antraceno
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CG	Cromatografía de gases
EM	Espectrometría de masas
DF	Detector de fluorescencia
USEPA	Agencia de protección al ambiente de los Estados Unidos de América
SPE	Extracción en fase sólida
DAD	Detector de arreglo de diodos
Kow	Coficiente de reparto o distribución octanol-agua

Resumen

La presencia de compuestos considerados contaminantes ambientales ubicuos con potencial efecto en salud, demanda en primer instancia el desarrollo de metodologías analíticas que permitan su identificación y cuantificación en matrices complejas y adicionalmente y dado el interés por aportar una solución a dicha problemática, se requiere de la implementación de procesos que permitan su remoción.

De manera particular, en este proyecto de investigación se desarrolló una metodología analítica, en la que se empleó la extracción en fase sólida en punta de micropipeta y la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (CLAR-DF) para la determinación de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno (considerados contaminantes ambientales ubicuos) presente en un medio de cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum*. Además, se evaluó la eficiencia de este microorganismo para la remoción de dichos contaminantes.

En términos generales, el método desarrollado consistió en: 1) la obtención de muestras provenientes del cultivo de la microalga, 2) el aislamiento de los analitos de interés desde la matriz biológica y 3) el análisis cromatográfico de los extractos. La metodología se validó en un intervalo de concentraciones de 5 a 300 ng mL⁻¹, dando como resultado valores de precisión expresados en términos del C.V. menores al 10 % en todos los casos; además de una buena correlación entre las variables con valores de $r^2 \geq 0.99$; mientras que, los porcentajes de recuperación fueron del 49 y 48 % para benzo[*a*]antraceno y benzo[*a*]pireno respectivamente. En relación con sus límites de cuantificación estos fueron de 2.35 y 2.93 ng mL⁻¹. Finalmente, la metodología desarrollada fue aplicada en el monitoreo en continuo del proceso de remoción de benzo[*a*]antraceno y benzo[*a*]pireno a distintas concentraciones (50, 100 y 266 ng mL⁻¹), alcanzándose valores cercanos al 90 % después de 18 h de exposición.

Adicionalmente, la metodología desarrollada permitió el aislamiento de metabolitos de tipo dihidrodiol, formados durante el proceso de remoción; lo cual fue verificado a partir del análisis de los extractos previamente obtenidos por CLAR-DF y subsecuentemente por

un sistema de pre concentración en línea acoplado a un cromatógrafo de líquidos con detección espectrofotométrica de arreglo de diodos (CLAR-DAD).

I. Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) corresponden a una clase de compuestos orgánicos conformados únicamente por carbono e hidrógeno en forma de anillos fusionados (WHO 1998, IARC 2010), que de acuerdo con sus características estructurales (presencia de regiones tipo bahía o fiordo y número de anillos) presentan mayor o menor actividad carcinogénica (Chang *et al.*, 1981; Buterin *et al.*, 2000).

En relación con su potencial carcinogénico y/o mutagénico podemos mencionar que ya en 1775 se vislumbraba la posible influencia de estos compuestos como precursores de cáncer en humanos (Brown y Thornton, 1957) y siglos más tarde de acuerdo con experimentos llevados a cabo con animales, se demostró que benzo[*a*]antraceno, dibenzo[*a,h*]antraceno y benzo[*a*]pireno podían inducir cáncer (Phillips, 1983).

Las evidencias anteriores han permitido el desarrollo de una amplia investigación acerca de la formación, presencia, distribución y el efecto de estos compuestos sobre la salud y el ambiente. Respecto al proceso de formación de los HAPs se sabe que éste incluye dos etapas, que son la pirólisis y la pirosíntesis; éstas son comunes en procesos de combustión incompleta generándose así fuentes de emisión que incluyen tanto procesos naturales como antropogénicos (Tran *et al.*, 2007; Ravindra *et al.*, 2008a).

Como consecuencia de las múltiples fuentes de emisión, a los HAPs presentes en el ambiente, se les considera como contaminantes ubicuos (IARC, 2010); su distribución depende de algunas de sus propiedades, por ejemplo: su presión de vapor está vinculada con su distribución en la fase particulada o gaseosa en los aerosoles atmosféricos, por otro parte pequeñas concentraciones de ellos son encontradas en los sistemas acuosos debido a su baja solubilidad, lo que no significa que éstos no representen un peligro potencial (Arey y Atkinson, 2003; Barro *et al.*, 2009). En relación con esto último, el peligro potencial a nivel de la salud que representan estos compuestos se encuentra asociado a las diversas fuentes de exposición en humanos; entre las que se incluyen: la inhalación, el contacto dérmico, e incluso su ingesta a través de alimentos contaminados; sin embargo, en términos de carcinogenicidad los estudios se han restringido a los 16 HAPs considerados

como prioritarios, según lo estipulado por la Agencia de Protección al Ambiente de los EE.UU (USEPA, por sus siglas en inglés); de ellos el benzo[*a*]pireno se ha seleccionado como marcador debido a su alta potencia carcinogénica aún a bajos niveles de concentración (Petry *et al.*, 1996).

Con base en lo anterior, la presencia de estos compuestos demanda en primera instancia el desarrollo e implementación de metodologías que permitan identificarlos en matrices ambientales, con la menor incertidumbre posible. Dichas metodologías contemplan desde la extracción hasta el análisis instrumental. En cuanto a la preparación de la muestra, destacan las técnicas clásicas de extracción en fase sólida para matrices acuosas o bien técnicas con empleo de disolventes para muestras sólidas; mientras que, el análisis comúnmente se lleva a cabo por medio de sistemas de detección como la espectrometría de masas o con detectores de fluorescencia, ambos acoplados por lo general a cromatógrafos de líquidos o gases. Por otra parte, quizás uno de los mayores retos y esfuerzos en las últimas décadas está enfocado en la mejora de las técnicas de preparación de muestra, por lo que se ha buscado que el consumo de sustancias químicas, el número de etapas de manipulación de la muestra, el tiempo y los costos disminuyan; ello a través de metodologías simples que incluyen la automatización y miniaturización de los procesos (Ramos, 2012).

En el caso particular del análisis de HAPs, se han implementado técnicas novedosas y miniaturizadas basadas en el empleo de disolventes, especialmente en el tratamiento de muestras líquidas. Entre estas técnicas, se encuentra la microextracción líquido-líquido dispersiva (LLDME, por sus siglas en inglés), la microextracción con una única gota (SDME, por sus siglas en inglés) en modo inmersión o “head space”, la microextracción en fase líquida (LPME, por sus siglas en inglés) y la microextracción con emulsión asistida por ultrasonido (USAEME, por sus siglas en inglés); las principales ventajas de estas técnicas incluyen los altos factores de concentración, además de su bajo costo y simplicidad, y en algunos casos tiempos menores de procesamiento, debido a un incremento en la velocidad de transferencia de masa entre la muestra y el disolvente extractante (Wu *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2013; Regueiro *et al.*, 2008).

Respecto a las técnicas basadas en procesos de sorción, la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) destaca por su amplio uso en la determinación de HAPs en muestras ambientales (agua de lluvia, agua de mar, aguas residuales, suelo), biológicas (orina, saliva) y alimenticias (agua, miel, aceite de oliva) (Peñalvert *et al.*, 1999; Wandercki *et al.*, 2007); sin embargo, esta técnica demanda el uso de sistemas altamente sensibles ya que la extracción no es exhaustiva y se encuentra restringida por el espesor de la fibra ante lo cual podría considerarse que (Kolahgar *et al.*, 2002) la microextracción en barra magnética (SBME, por sus siglas en inglés) es una mejor opción.

En el presente trabajo se desarrolló una metodología en la que se utilizó la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) en punta de micropipeta, como técnica para el aislamiento en conjunto de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno de un medio de cultivo; esta técnica en comparación con la extracción en fase sólida clásica (SPE) es más rápida, fácil de operar y una herramienta de fácil acceso, además representa ventajas en costo al disminuir la cantidad de adsorbente y disolventes; sin embargo, hasta el momento su uso se ha enfocado principalmente en la purificación y concentración de péptidos más que de contaminantes orgánicos.

Finalmente es importante destacar, que no sólo existe la necesidad de identificar y cuantificar a los HAPs en distintas matrices ambientales como se mencionó inicialmente; sino que también, se ha buscado como una segunda etapa el desarrollo de procesos que permitan su remoción; entre los que se han encontrado como opciones a la fotólisis, la degradación química, la volatilización, la adsorción sobre partículas y la remoción microbiana (Park *et al.*, 1990; Wild y Jones, 1995); siendo ésta última, la de interés en el presente trabajo.

En este sentido es preciso mencionar que la remoción de contaminantes orgánicos puede efectuarse por simple sorción celular o por degradación y que además, existen diversos micro organismos incluyendo bacterias, algas y hongos capaces de degradar HAPs a través de su metabolismo o en procesos co-metabólicos (Habe y Omori, 2003) bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Algunos de estos microorganismos pueden llevar a cabo la

mineralización de los contaminantes, lo que implica su transformación hasta dióxido de carbono y agua (condiciones aeróbicas) o metano (condiciones anaeróbicas). Sin embargo, en muchos de los casos la biodegradación únicamente transforma los compuestos en especies de menor complejidad (Singh y Ward, 2004).

En el presente estudio la metodología desarrollada se aplicó en la evaluación de la capacidad de la microalga *Selenastrum capricornutum* para degradar benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) y benzo[*a*]antraceno (B[*a*]A), ya que ésta ha sido empleada en algunos otros estudios dando resultados favorables (Warshawsky *et al.*, 1990). Sin embargo, los estudios reportados utilizan métodos de extracción tradicionales con disolventes que requieren volúmenes relativamente grandes de muestras, alrededor de 15 mL o más y además, necesitan analizar todo el volumen establecido para cada tiempo de exposición a los contaminantes en los bioensayos.

Así que el objetivo general de este trabajo fue: desarrollar un método analítico por extracción en fase sólida en punta de micropipeta y análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (CLAR-DF), para la determinación de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno en un medio proveniente del cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum*. La utilización de una punta de micropipeta empacada con un adsorbente apropiado para retener a los HAPs permitió efectuar monitoreos a diferentes tiempos de exposición en un mismo cultivo, procedimiento que hasta el momento no se ha realizado en bioensayos para el estudio de remoción y degradación de los HAPs por microalgas.

II. Antecedentes

2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

El término hidrocarburo aromático policíclico (HAP) designa una clase de compuestos orgánicos conformados únicamente por carbono e hidrógeno en forma de anillos fusionados. En ésta los derivados alquilados son incluidos, no así, los HAPs que contengan nitrógeno, azufre, oxígeno o algún heterociclo; ya que éstos son parte de una clasificación más amplia denominada compuestos aromáticos policíclicos (CAP) (WHO, 1998; IARC, 2010).

Los HAPs que sólo contienen en su estructura anillos bencénicos se denominan no alternantes; mientras que aquellos que además presentan anillos de cinco átomos son alternantes. Una característica adicional en la estructura de los HAPs es la presencia de una región tipo “bahía” que les confiere propiedades específicas vinculadas directamente con su reactividad química (figura 1) (Bostrom *et al.*, 2002).

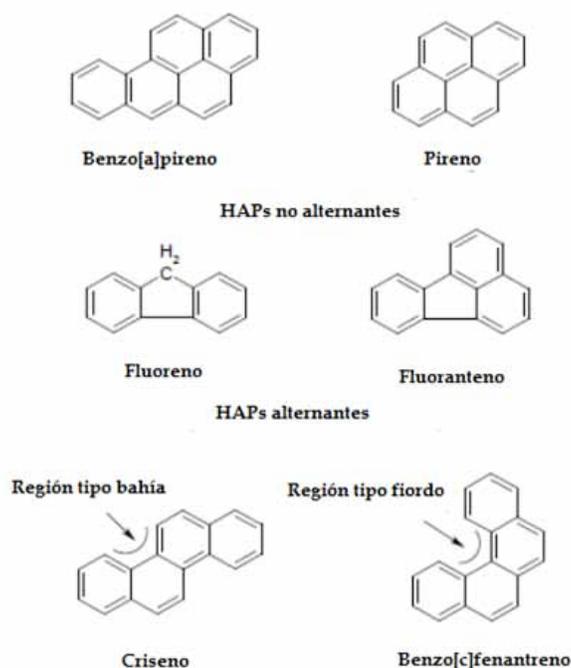


Figura 1. Ejemplos de características estructurales de los HAPs

Las características estructurales antes mencionadas, se encuentran relacionadas con la actividad carcinogénica de estos compuestos; por ejemplo: las estructuras alternantes que

contienen más de 4 anillos presentan mayor potencia carcinogénica respecto a la de sus similares de dos y tres anillos. De igual manera HAPs con regiones tipo bahía o fiordo son carcinógenos de mayor potencia en comparación con HAPs de estructura lineal (Chang *et al.*, 1981; Buterin *et al.*, 2000).

Este potencial efecto carcinogénico y mutagénico ha sido motivo de estudio desde siglos atrás. Ya en 1775 se vislumbraba la posible influencia de estos compuestos como precursores de cáncer en humanos con base en los resultados de Sir Percivall Pott, quien identificó el hollín como causa de cáncer en escroto en trabajadores de chimeneas (Brown y Thornton, 1957) formulándose así la primera atribución de cáncer a una causa específica. Siglos más tarde, a principios de 1900 científicos comenzaron el desarrollo de investigaciones que permitirían el aislamiento de benzo[*a*]antraceno, dibenzo[*a,h*]antraceno, benzo[*a*]pireno y algunos otros HAPs, así como la demostración de que éstos podían inducir cáncer de acuerdo con experimentos llevados a cabo con animales (Phillips, 1983).

Esta evidencia ha permitido el desarrollo de una amplia investigación, aunque no suficiente del efecto de estos compuestos, no sólo en humanos, sino también en el ambiente, ya que son considerados como contaminantes ambientales ubicuos. Por ende, se han encontrado en aire, agua, suelo y sedimentos, aunque generalmente en niveles traza, excepto en regiones cercanas a sus fuentes (IARC, 2010).

La presencia generalizada de los HAPs es consecuencia de sus múltiples fuentes de emisión, las cuales pueden ser naturales tales como: los incendios forestales, los procesos hidrotérmicos y las emisiones volcánicas (Tran *et al.*, 2007); o bien pueden ser de origen antropogénico; por ejemplo: la quema de combustibles fósiles, las emisiones de calefacción doméstica, el humo de tabaco, las emisiones provenientes de automóviles (principalmente de aquellos con motor a base de diesel), así como procesos involucrados con la producción de aluminio (Booth y Gribben, 2005) o acero (Almaula, 2005).

Sin embargo, pese a que las fuentes de emisión son diversas, el proceso de formación de los HAPs se restringe a dos etapas que son la pirólisis y la pirosíntesis. En la primera, los

componentes orgánicos se fragmentan parcialmente en moléculas de menor tamaño de tipo radicalario, que se recombinan para generar hidrocarburos aromáticos estables en la etapa de pirosíntesis. La temperatura mínima para que se puedan generar estos compuestos es de 300 °C, aunque la mayoría de ellos son formados entre 500 y 700 °C (Tran *et al.*, 2007; Ravindra *et al.*, 2008a).

Por otra parte, la forma en que los HAPs se distribuyen en el ambiente depende de algunas de sus propiedades. Por ejemplo, en el aire los HAPs de peso molecular menor a 228 g mol⁻¹, se encuentran predominantemente en la fase gaseosa, a diferencia de aquellos que tienen un peso molecular superior y que se depositan sobre material particulado. Esta distribución está asociada directamente con las presiones de vapor de los compuestos y afecta su tiempo de persistencia en el aire; así, los primeros permanecen en un lapso menor a 24 h, mientras que los depositados en partículas pueden persistir durante semanas (Arey y Atkinson, 2003; Barro *et al.*, 2009).

En lo que respecta a los sistemas acuáticos la concentración de HAPs comúnmente es muy pequeña (debido a su baja solubilidad), excepto en zonas altamente contaminadas. En la tabla 1 se muestran las propiedades físicas y químicas de los HAPs designados como prioritarios de acuerdo con la USEPA.

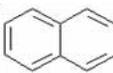
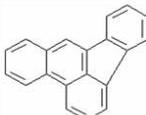
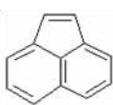
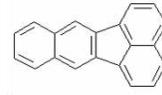
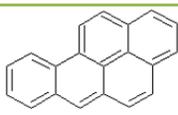
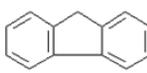
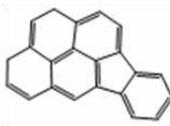
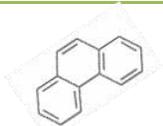
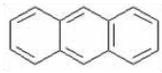
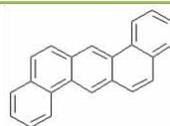
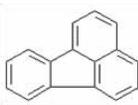
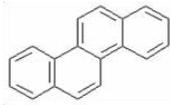
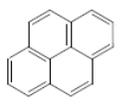
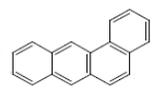
Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de algunos HAPs (IARC, 2010)

HAP	Temperatura de ebullición [°C]	Temperatura de fusión [°C]	Densidad [g cm ⁻³]	Solubilidad en agua [mg L ⁻¹] a 25 °C	Presión de vapor [Pa] a 25°C	Log K _{ow}
Naftaleno	n.r	81	1.16 ^a	32 ^a	0.012 ^b	3.30 ^a
Acenaftileno	n.r	n.r	1.19 ^a	3.93	0.004 ^b	4.07 ^a
Acenafteno	279	95	1.19	3.9	0.29	3.92
Fluoreno	295	116-117	1.20	1.68	0.08	4.18
Antraceno	342	218-216.4	1,28	0.0436	8.0 X10 ⁻⁴	4.45
Fenantreno	340	100-100.5	1.18	1.18	0.016	4.52
Fluoranteno	384	108.8-110.2	1.25 ^f	0.205	0.00123	5.20
Pireno	404	150.4	1.,27 ^d	0.130	0.00060	5.00
Benzo[a]antraceno	n.r	160.7	1.17 ^a	0.0090	2.8X10 ⁻⁵	5.91
Criseno	448	253.8-254	1.27 ^e	0.00179	n.r	5.79
Benzo[a]pireno	310-312 ^c	179-179.3	1.28	0.00162	n.r	6.35
Benzo[b]fluoranteno	n.r	168	n.r	0.0015	n.r	5.78
Dibenzo[ah]antraceno	n.r	266	n.r	0.00050	n.r	6.75
Benzo[k]fluoranteno	480	215.7-217	n.r	0.0008	n.r	6.11
Benzo[ghi]perileno	n.r	278.3	n.r	0.00026	n.r	6.90
Indeno[1,2,3-cd]pireno	n.r	163.6	n.r	0.00019	n.r	

K_{ow}: Coeficiente de reparto octanol/agua. **n.r** Dato o información no reportada. **a**: Datos obtenidos de ATSDR, 1995. **b**: Datos obtenidos de Cram, 2005. **c**: Valor obtenido a una presión de 10 mm Hg. **d**: Valor obtenido a 23 °C. **e**: Valor obtenido a 20 °C. **f**: Valor obtenido a 0 °C.

Como una consecuencia de la presencia generalizada de estos compuestos, las fuentes de exposición en humanos son diversas e incluyen la inhalación, el contacto dérmico, e incluso su ingesta a través de alimentos contaminados; generándose así un peligro potencial para la salud. En términos de carcinogenicidad los estudios se han restringido a los 16 HAPs considerados como prioritarios según lo estipulado por (USEPA). En la tabla 2 se muestran dichos compuestos, así como su identificación en términos de carcinogenicidad.

Tabla 2. Toxicidad de los 16 HAPs descritos como prioritarios según la USEPA

Nombre	Estructura	MM	Toxicidad	Nombre	Estructura	MM	Toxicidad
Naftaleno		128	2b	Benzo[b]fluoranteno		252	2b
Acenaftileno		152	n.c	Benzo[k]fluoranteno		252	2b
Acenafteno		154	3	Benzo[a]pireno		252	1
Fluoreno		166	3	Indeno[1,2,3-cd]pireno		276	2b
Fenantreno		178	3	Benzo[ghi]perileno		276	3
Antraceno		178	3	Dibenzo[a,h]antraceno		278	2a
Fluoranteno		202	3	Criseno		228	2b
Pireno		202	3	Benzo[a]antraceno		228	2b

MM: Masa molecular [g mol^{-1}]. Clasificación de carcinogenicidad: **1:** El agente o mezcla es carcinogénico a humanos **2a:** El agente o mezcla es probablemente carcinogénico para humanos. **2b:** El agente o mezcla es posiblemente carcinogénico para humanos. **3:** El agente (mezcla o condiciones de su exposición) no son clasificables como carcinogénicos para humanos. **4:** El agente o mezcla es probablemente no carcinogénico para humanos. **n.c:** no clasificado.

Dentro de los 16 HAPs presentados en la tabla 2, el benzo[a]pireno ha sido seleccionado como marcador a fin de obtener comparaciones relativas de la potencia carcinogénica de sus congéneres a través de los estudios desarrollados de éste (Petry *et al.*, 1996). Además,

dicho compuesto comúnmente se encuentra en muestras de distintos ambientes ocupacionales y entornos urbanos (ATSDR, 1995; Petry *et al.*, 1996 y WHO, 1998) convirtiéndose así, en el HAP quizá mejor estudiado en el ámbito toxicológico y que posee una base de datos robusta de bioensayos y de su modo de acción; asimismo es un carcinógeno completo que actúa por la iniciación de tumores a través de un daño directo en el DNA; así como, por la promoción de crecimiento del tumor (IARC, 2010).

Sus diversos modos de acción carcinogénica incluyen:

- Alteración de las etapas que regulan la proliferación y supervivencia celular (Tannheimer *et al.*, 1998)
- Inhibición de la comunicación intracelular (Rummel *et al.*, 1999; Blaha *et al.*, 2002; Sharovskaia *et al.*, 2003)
- Modulación de células y proliferación de células, alteración de su crecimiento vía generación de estrés oxidativo (Miller y Ramos, 2001; Burdick *et al.*, 2003)
- Alteración del proceso de apoptosis (Chen *et al.*, 2003)
- Alteración de la cinética del ciclo celular en cáncer de mama (Jeffy *et al.*, 2000, 2002)
- Interrupción de la reparación del DNA a través de la alteración de la actividad de ARN-polimerasa (Shah y Bhattacharya, 1989)

De manera general la actividad carcinogénica de los HAPs se ha propuesto a través de tres distintos mecanismos moleculares, diferenciados por la especie química que actúa en el proceso de iniciación de tumores, estas son: epoxi dioles, cationes radicales y estructuras de tipo quinoide. En todos los casos se lleva a cabo la formación de aductos estables e inestables con el DNA, principalmente con adenina y guanina; sin embargo, en el primer caso se genera la mutación en los genes supresores de tumores; mientras que en el segundo, la mutación ocurre en HRAS. Finalmente en el último proceso, aunado a los aductos de DNA se generan también especies reactivas de oxígeno. En la figura 2 se esquematizan los tres mecanismos propuestos (IRIS, 2010).

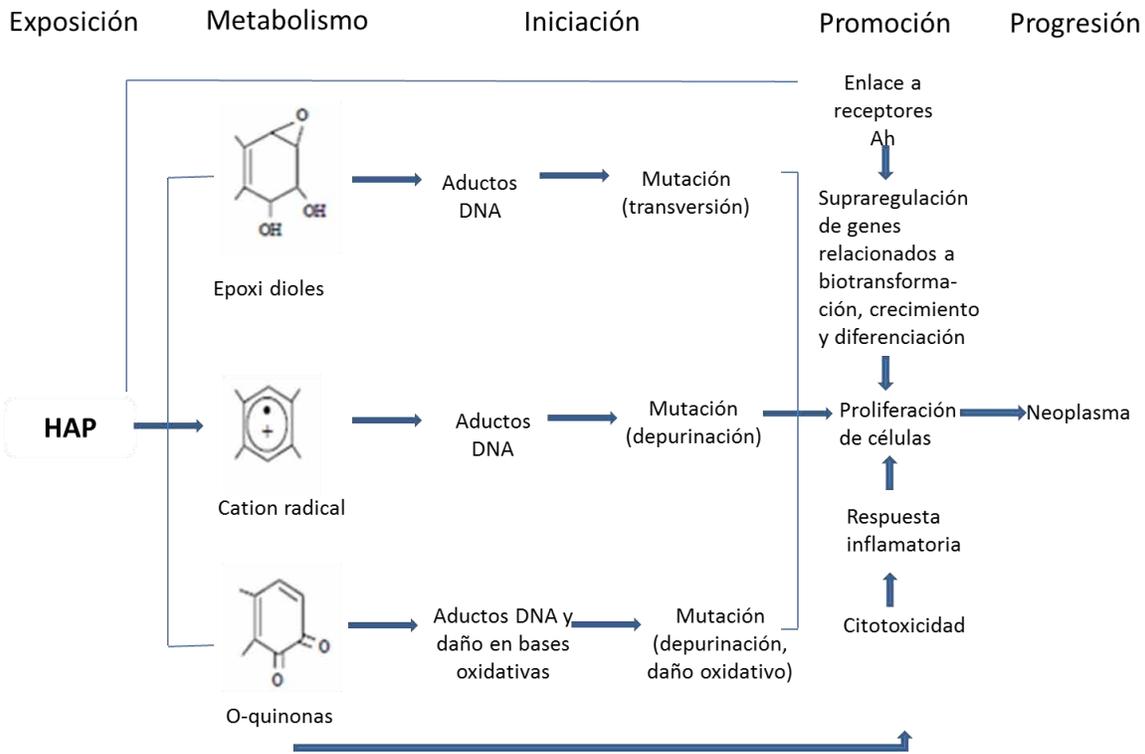


Figura 2. Eventos clave del modo de acción carcinogénica de los HAPs

2.2. Biodegradación de HAPs

Algunas de las principales razones por las que los HAPs han recibido especial atención incluyen: la presencia de éstos en todos los componentes del ambiente, su resistencia a la biodegradación, su potencial de bioacumulación y en consecuencia su transferencia a través de cadenas alimentarias a organismos de niveles tróficos superiores; además de, su potencial actividad carcinogénica y mutagénica (Trielli *et al.*, 2007; Haristash y Kaushik, 2009; IARC, 2010).

Los procesos de remoción de HAPs desde ambientes contaminados incluyen la fotólisis, la degradación química, la volatilización, la adsorción sobre partículas, la bioacumulación y la degradación microbiana; siendo esta última la más importante (Park *et al.*, 1990; Wild y Jones, 1995). Aun cuando los procesos de degradación por microorganismos resultan complejos, ya que en muchos de los casos estos dependen de una diversidad de factores (por ejemplo: la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, las propiedades de

transporte celular, el pH, el tipo de población microbiana, la estructura química de los compuestos y su toxicidad; así como efectos de inhibición competitiva o sinérgica), éstos siguen siendo una alternativa prometedora a las tecnologías convencionales en el tratamiento de suelos y aguas contaminadas (Dean Ross *et al.*, 2002; Haristash y Kaushik, 2009).

Existe un grupo amplio de organismos que incluyen bacterias, algas y hongos, capaces de degradar HAPs a través de su metabolismo o en procesos co-metabólicos (Habe y Omori, 2003) bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Algunos de estos microorganismos pueden llevar a cabo la mineralización de los contaminantes, lo que implica su transformación hasta dióxido de carbono y agua (condiciones aeróbicas) o metano (condiciones anaeróbicas). Sin embargo, en muchos de los casos la degradación únicamente transforma los compuestos en especies de menor complejidad (Singh y Ward, 2004). Cabe mencionar que éstas no necesariamente serán de menor toxicidad (Shuttleworth y Cerniglia, 1995), pero comúnmente presentan características químicas que facilitan su biodisponibilidad, por lo que pueden ser degradadas por completo por algún otro microorganismo. A continuación, se describen con más detalle los procesos de degradación por diferentes tipos de microorganismos, siendo las bacterias y los hongos en donde se han encontrado más reportes.

2.3. Degradación por bacterias

Las bacterias son una clase de microorganismos involucrados activamente en la degradación de contaminantes orgánicos. Algunas han sido aisladas desde suelos o sedimentos contaminados, mostrando ser eficientes en la degradación, no sólo de HAPs de bajo peso molecular sino también de aquellos con estructuras más complejas (Haristash y Kaushik, 2009). Ejemplo de esto son los microorganismos *Bacillus*, *Burkholderia* y *Sphingomonas* todos ellos capaces de degradar B[a]P (Aitken *et al.*, 1998); además de éstas, algunas otras especies como *Rhodococcus sp.*, *Mycobacterium* y una mezcla de *Pseudomonas* y *Flavobacterium*, también han presentado este comportamiento (Walter *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1996; Trzesicka y Ward, 1995). En general, tanto

bacterias gram positivas como gram negativas son capaces de llevar a cabo la degradación de naftaleno, fenantreno y antraceno; además, existe un gran número de estudios acerca de la degradación de HAPs más complejos, aunque la mayoría de estos se encuentran enfocados principalmente en el B[a]P (Cerniglia, 1993).

Respecto al proceso de degradación de los HAPs por bacterias se sabe que éste inicia con la incorporación de una molécula de oxígeno en el anillo aromático para dar lugar a un cis-dihidrodiol (Muller *et al.*, 1996) que posteriormente, a través de enzimas de deshidrogenación generan un intermediario orto-dihidroxiado (Patel y Gibson, 1974) el cual comúnmente presenta rupturas en posiciones orto y meta (Muller *et al.*, 1996). Este proceso se esquematiza en la figura 3.

2.4. Degradación por hongos

La mayoría de los mecanismos de degradación de HAPs por hongos son co-metabólicos, lo que significa que estos organismos emplean otra fuente de carbono para su crecimiento y energía al mismo tiempo que el HAP es transformado (Surtherland, 1992).

Al igual que en las bacterias, existen diversos tipos de hongos capaces de degradar HAPs; aquellos de bajo peso molecular (estructuras de 2 y 3 anillos) son principalmente degradados por *Aspergillus sp.*, *Tricholadium canadense* y *Fusarium oxysporum*; mientras que la máxima degradación de HAPs de 4 a 7 anillos se lleva a cabo por las primeras dos especies antes mencionadas además de *Verticillium sp.* y *Achremonium* (Haristash y Kaushik, 2009).

El proceso de degradación de HAPs por hongos involucra dos grupos enzimáticos denominados: mono-oxigenasa del citocromo P-450 y lignina peroxidasa (Cerniglia, 1984). En general se han observado como subproductos de degradación estructuras de tipo quinoide (Cajthaml *et al.*, 2002); en la figura 3 se muestra un esquema general de la degradación de HAPs por hongos.

2.5. Degradación por algas

Existen diversos estudios que han demostrado que tanto especies de algas eucariontes como procariontes son capaces de llevar a cabo la degradación de HAPs; cabe señalar que este tipo de organismos se encuentran ampliamente distribuidos en sistemas acuáticos lo que los convierte en una potencial herramienta en el tratamiento de aguas contaminadas (Mueller *et al.*, 1996).

Respecto a los mecanismos de degradación, se ha encontrado que algunas especies generan derivados cis-dihidroxiados (9-10 dihidrodiol benzo[*a*]pireno, 4-5 dihidrodiol benzo[*a*]pireno, 7-8 dihidrodiol benzo[*a*]pireno) por medio de un sistema enzimático de dioxigenasas, tal es el caso de la degradación de B[*a*]P por *Selenastrum capricornutum* (Warshawsky *et al.*, 1990). Sin embargo, en algunos otros casos se ha observado la formación de óxidos de aro como intermediarios, lo que sugiere reacciones similares a las catalizadas por monooxigenasas en los hongos; ejemplo de ello se obtuvo de la degradación de fenantreno por *Agmenellum quadruplicatum*; así como de la degradación de naftaleno por *Oscillatoria sp* (Narro *et al.*, 1992). Las dos vías propuestas para el mecanismo de degradación por algas se muestran en la figura 3.

El presente estudio se encuentra enfocado en la evaluación de la microalga *Selenastrum capricornutum* en la degradación de distintos HAPs.

El monitoreo “*in vitro*” de la remoción y degradación de los HAPs se efectúa en bioensayos en donde: se agregan los contaminantes a un medio de cultivo líquido o sólido (en el cual están presentes los microorganismos) y se toman muestras a diferentes tiempos, para así conocer la variación de las concentraciones de los contaminantes. Para ello se tienen que usar métodos analíticos fiables; en donde la primera etapa involucra el aislamiento selectivo de los analitos en los cultivos a través de alguna determinada técnica de extracción.

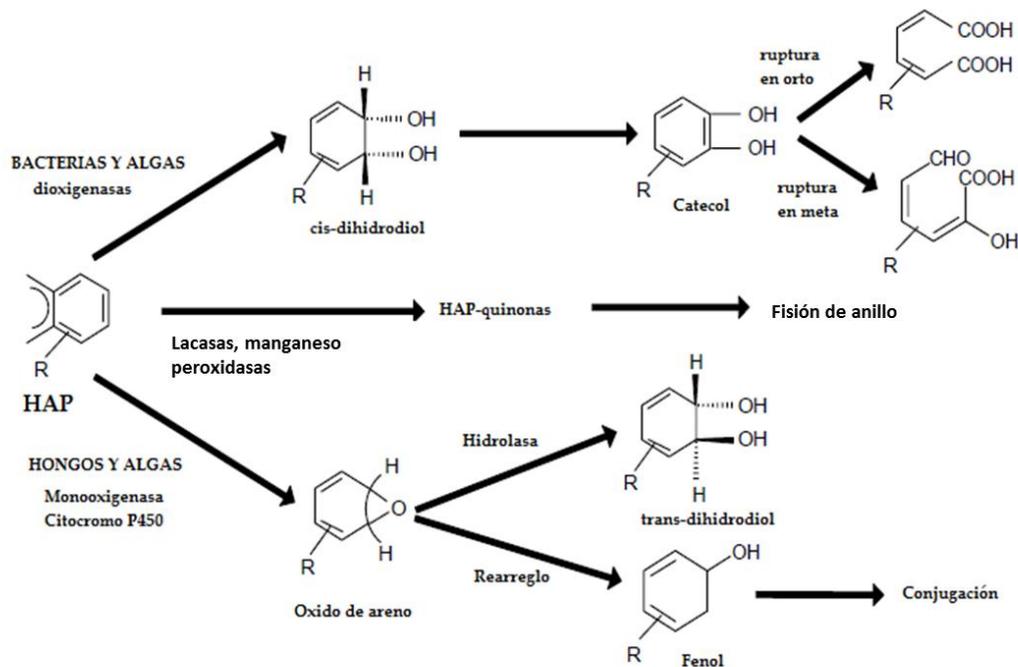


Figura 3. Etapas generales involucradas en el metabolismo de HAPs por bacterias, hongos y algas (Labana *et al.*, 2007)

2.6. Selección de la técnica de extracción en el procedimiento analítico

Aun cuando no existe una estrategia específica para la implementación de un procedimiento analítico, es importante considerar la interdependencia de las diversas etapas que le constituyen; tales como: a) el muestreo, b) el tratamiento de la muestra, c) la separación, d) la identificación y cuantificación de los compuestos de interés y finalmente e) el tratamiento de datos.

Dentro del procedimiento analítico; la preparación de la muestra tiene una alta incidencia tanto en el tiempo total del análisis (llegando a consumir dos terceras partes de este) así como en la calidad de los resultados; ya que es considerada como la principal fuente de errores y discrepancias entre laboratorios (Hennion, 1999). Cabe mencionar que el objetivo de esta etapa es proveer una fracción de la muestra enriquecida en los analitos de interés, que se encuentre tan libre como sea posible de otros componentes de la muestra. Por ende, es común subdividir esta etapa en un proceso de extracción, concentración y remoción de interferentes.

Cada una de estas sub etapas depende del tipo y estado físico de la matriz (biológica, ambiental, alimenticia; líquido, sólido, gas); así como de la naturaleza de los analitos a determinar (volatilidad, polaridad, peso molecular). Con base en esto se selecciona la técnica de extracción.

Respecto a esto, existe una amplia gama que abarca desde técnicas tradicionales o convencionales como: la extracción líquido-líquido clásica, la extracción en fase sólida o la extracción Soxhlet, hasta algunas técnicas novedosas desarrolladas en su gran mayoría a partir de modificaciones de las anteriores, y que buscan ya sea una mayor eficiencia o selectividad en la extracción o bien, un menor consumo de reactivos o de muestra.

A continuación se presenta una breve descripción de los fundamentos y consideraciones de la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) clásica, ya que ésta representa una base para el método analítico implementado en este trabajo de investigación (extracción en fase sólida en punta de micropipeta), y es además una técnica ampliamente utilizada en la extracción de HAPs presentes en matrices líquidas (Urbe y Ruana, 1997; Buseti *et al.*, 2006; Filipkowska *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2004; Fard *et al.*, 2012).

2.7. Extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés)

Esta es considerada como una técnica de reparto entre una fase líquida (la muestra) y una fase sólida (el adsorbente) en la cual, los analitos son retenidos y recuperados subsecuentemente a través de una etapa de elución. Es quizás una de las principales alternativas a la extracción líquido-líquido; utilizada para el análisis de compuestos orgánicos presentes en muestras de agua. Algunas de sus ventajas son el menor consumo de disolventes y la minimización de riesgo de contaminación o pérdida de la muestra debida a etapas de evaporación. Esta técnica puede llevarse a cabo en modo “off line” también llamado fuera de línea o diferido; o bien en modo “on line”. En el primero de ellos, la muestra es tratada de manera independiente y el extracto obtenido es entonces analizado; mientras que, en el segundo caso la técnica de extracción se encuentra acoplada con el sistema de análisis; para ello se emplean válvulas de conmutación o multipuertos conectadas a un dispositivo de SPE (pre columna), además de

una bomba de concentración y la correspondiente al sistema cromatográfico. Es a través de la manipulación de la válvula que se permite la extracción o elución de los analitos. La SPE ha mostrado ser una técnica de fácil acoplamiento con sistemas de cromatografía de líquidos o gases, destacando el primero de ellos dada su compatibilidad con muestras biológicas o ambientales que comúnmente son de naturaleza acuosa.

Respecto a las ventajas y limitantes de cada uno de los modos en que se puede efectuar esta técnica destacan: la cantidad de fase adsorbente en los sistemas “off line” puede incrementarse fácilmente favoreciéndose los valores de volumen de fuga; mientras que en los sistemas “on line” las cantidades de fase a utilizar son del orden de 20 a 100 mg por lo que la retención de los analitos dependerá fuertemente de la naturaleza del adsorbente. Además, en este tipo de sistemas la compatibilidad entre la precolumna y la columna analítica depende de la naturaleza de las fases adsorbentes empleadas. Por otro lado, los sistemas “on line” son favorables cuando la cantidad de muestra es limitada, o bien, los analitos de interés se encuentran en muy bajas concentraciones; es decir esta modalidad de la SPE es una herramienta que permite un incremento de la sensibilidad al inyectar no sólo una fracción del extracto obtenido, sino todo el volumen de éste. Es importante mencionar que en algunos casos la extracción de los analitos de interés desde una determinada matriz es llevada fuera de línea pero subsecuentemente el extracto es pre concentrado en un sistema SPE “on line” que permite su preconcentración favoreciendo así su detección.

De manera general, en la tabla 3 se muestran los pasos generales de esta técnica y se resumen sus mecanismos de adsorción, además de las características de algunos de sus dispositivos; mientras que en la tabla 4 se ilustran algunos ejemplos de empleo de esta técnica para el aislamiento de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en sistemas acuosos.

Tabla 3. Características generales de la extracción en fase sólida

Extracción en fase sólida	
Etapa	Objetivo
Acondicionamiento: Se hace pasar un disolvente orgánico y posteriormente se introduce un disolvente de características similares a aquel en que se encuentra contenida la muestra	Solvatar los grupos funcionales del adsorbente y eliminar impurezas.
Carga de la muestra: Se introduce la muestra por gravedad o con ayuda de un sistema de vacío a través del sistema de SPE.	Retener los analitos de interés y algunos otros componentes de la matriz.
Limpieza: El disolvente empleado debe ser capaz de eluir a los interferentes, no así a los analitos de interés.	Eliminar interferentes.
Recuperación: En esta etapa se eluyen los analitos de interés empleando un volumen de disolvente orgánico comúnmente menor que el volumen inicial de muestra.	Recuperar y pre concentrar los analitos.
Mecanismos de interacción en función del adsorbente	
Interacción	Adsorbentes
Adsorción: Interacciones hidrofóbicas y tipo π	No polares (C8, C18, C2) Poliméricas (estireno divinilbenceno)
Formación de quelatos: Se requieren grupos funcionales con átomos capaces de formar complejos	Grupos funcionales: Con nitrógeno (grupos amino, azo, amida y nitrilo) Con oxígeno (grupos carbonilo e hidroxilo) Con azufre (grupos fosforilo, tiocabamatos y tioeteres). También se pueden emplear adsorbentes funcionalizados o modificados físicamente por adherencia del ligando.
Intercambio iónico	Poseen un grupo funcional catiónico o aniónico que intercambia el contra ion asociado
Operación	
Sistemas	Características
Micro columnas	Los caudales se encuentran limitados por el diámetro interno del dispositivo, comúnmente se tienen flujos de 1 a 10 mL min ⁻¹
Cartuchos y cuerpos de jeringa	Dispositivos fabricados en polipropileno y polietileno con capacidades de 100 mg a 1 g de adsorbente.
Discos	El adsorbente esta embebido en micro fibrillas de politetrafluoroetileno o fibra de vidrio. La composición típica es 10 % microfibras 90 % adsorbente. Estos sistemas estan generalmente diseñados para su uso con sistemas de filtración
Precolumnas	Fabricadas en acero inoxidable para resistir las altas presiones en los sistemas cromatográficos. Sus dimensiones van de 2 a 15 mm de longitud y de 1 a 4.6 mm de diámetro interno. Empacadas con fases que poseen un tamaño de partícula desde 5 a 40 μ m.

Tabla 4. Empleo de la extracción en fase sólida para aislamiento de HAPs

Cantidad de muestra	500 a 1000 mL	n.r	250 mL	10 y 20 mL respectivamente	100 mL
Matriz	Agua de mar y agua potable	Aguas de efluentes industriales (con previa adición de HgCl ₂ y filtración)	Agua de mar (previamente filtrada y acidificada)	Agua y café instantáneo (ambas con adición previa de un 20 % de CH ₃ CN. Además el café fue filtrado)	Aguas de mar y residuales
Analitos	6 HAP	16 HAP	12 HAP	B[α]P	10 HAP
Adsorbente	C 18 en: -Columna -Discos con matriz de PTFE -Discos con fibra de vidrio	n.r	C18 en discos	De 100 a 200 mg de polímeros y micro esferas molecularmente impresos (4 VP-co-DVB)	1.5 g de micropartículas de azufre
Acondicionamiento	Columna: 1. n-hexano (6 mL), 2. MeOH (3 mL) y 3. H ₂ O (6 mL) Discos: 1. Ciclohexano (5 mL) 2.n-hexano (5 mL) 3. MeOH (5 mL) y 4. H ₂ O (5 mL)	1. CH ₃ CN (9 mL) 2. 2-propanol (9 mL) 3. Propanol:agua (12 mL)	1. MeOH (5mL)	1.CH ₃ CN (2 mL) 2. CH ₃ CN:H ₂ O (50:50 v/v, 2 mL)	1. MeOH (5 mL) 2. H ₂ O (10 mL)
Limpieza	n.r	1. H ₂ O-2propanol (95:5 v/v), 2. H ₂ O-2propanol (90:10 v/v) 3. H ₂ O-2propanol (85:15 v/v) 30 mL en todos los casos	1. H ₂ O (10 mL)	1. CH ₃ CN (20:80 V/V, 2 mL)	1. H ₂ O (10 mL)

Elución	Columna: Hexano (0.5 mL x 4) Discos: Hexano (5 mL)	1. n-hexano 2.- hexano:acetona (90:10 v/v) 3.n-hexano:acetona:2-propanol (90:5:5 v/v)	1. CH ₃ CN (2x20 mL, con ayuda de sonicación)	1. CH ₃ CN (1 mL)	1. Secado previo 2. CH ₃ CN (2 mL)
Tratamiento del extracto	1. Secado (Na ₂ SO ₄) 2. Reducción (N ₂), 3.Reconstitución (CH ₃ CN, 200 µL)	1.Combinación de todas las fracciones 2. Adición de (2-propanol, 1 mL) 3. Reducción (N ₂ a 0.5 mL) 4.Reconstitución (2 propanol, 1 mL)	2.Eliminación de agua (centrifugación) 2.Reducción con rotaevaporador 3. Reconstitución (CH ₃ CN, 3 mL)	n.r	1. Remoción de trazas de azufre 2. Filtrado
Recobro (%)	Columna: (58 a105) Disco de PTFE (75 a 92) Disco con fibra de vidrio (78 a 93)	>70 %	(11 a 30)	84.7 (agua) y 72.5 (en café)	(78 a 108)
Análisis	CLAR-DF	CLAR-DF y CLAR-DAD	CG-EM	CLAR-DF	CLAR-DAD
Límites de detección	0.08-2.57	0.52 a 1.2 ng/L	1.5 ng/mL	n.r	0.008-0.048 µg/L
Referencia	Urbe y Ruana, (1997)	Buseti <i>et al.</i> , (2006)	Filipkowska <i>et al.</i> , (2005)	Lai J.P. <i>et al.</i> , (2004)	Fard <i>et al.</i> , (2012)
PTFE: Politetrafluoroetileno. n.r: Dato no reportado. CG-EM: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. CLAR-DF: Cromatografía de líquidos acoplada a un detector de fluorescencia. CLAR-DAD: Cromatografía de líquidos acoplada a un detector de arreglo de díodos.					

2.8. Técnicas miniaturizadas

Quizás uno de los mayores retos y esfuerzos en las últimas décadas están enfocados en la mejora de las técnicas de preparación de muestra. Se ha buscado que el consumo de sustancias químicas, el número de etapas de manipulación de la muestra, el tiempo y los costos disminuyan; esto comúnmente a través de metodologías que buscan la simplificación, la integración de más de una etapa del proceso, la automatización y miniaturización del mismo. Sin embargo, cabe mencionar que uno de los retos principales a considerar son los bajos niveles de concentración y la complejidad de las muestras en

que se encuentran los analitos de interés y como consecuencia de ello, la necesidad de sistemas de análisis altamente sensibles (Ramos, 2012).

Respecto al aislamiento de HAPs se han implementado técnicas novedosas basadas en el empleo de disolventes, especialmente en el tratamiento de muestras líquidas. Entre estas técnicas se encuentra la microextracción líquido-líquido dispersiva (LLDME, por sus siglas en inglés) donde una mezcla del disolvente extractante y el dispersante se introduce en la muestra formando una emulsión que permite la extracción eficiente de los analitos. Al romperse la emulsión se recupera la fase orgánica, la cual es comúnmente del orden de microlitros. Por otro lado, se ha reportado (Deschamps *et al.*, 2007) el empleo de la microextracción con una única gota (SDME, por sus siglas en inglés), en modo inmersión o “head space”; la cual resulta ser más selectiva y puede subsanar problemáticas debidas a la complejidad de la muestras, aunque por otro lado se encuentra restringida a la volatilidad de los analitos; por lo que su empleo se enfoca principalmente en el análisis de HAPs de bajo peso molecular (Wu *et al.*, 2008). Por otra parte, una de las principales ventajas de estas técnicas es el alto factor de concentración, además de su bajo costo y simplicidad; mientras que, la baja gama de disolventes de extracción en DLME y la estabilidad de la gota de extractante son sus principales desventajas.

Como un intento por resolver las problemáticas presentes en DLLME, algunos autores han utilizado una técnica novedosa denominada microextracción en fase líquida (LPME, por sus siglas en inglés), cuya ventaja principal consiste en tener el disolvente de extracción soportado en una fibra hueca de polipropileno permitiéndole así tener mayor estabilidad. Un ejemplo de la implementación de esta técnica, es el trabajo desarrollado por Hong y colaboradores (2013), quienes determinaron HAPs en agua potable, los factores de enriquecimiento encontrados fueron de 90 a 150, la recuperación fue superior al 93 % y se alcanzaron límites de detección cercanos a las 10 partes por trillón. Una tercera opción es la microextracción con emulsión asistida por ultrasonido (USAEME), implementada por Regueiro y colaboradores (2008), quienes la utilizaron para la determinación de contaminantes emergentes en agua, la cual representa una mejora en la eficiencia de la extracción debido a un incremento en la velocidad de transferencia de masa entre la

muestra y el disolvente extractante dispersado en ésta con ayuda del sistema de ultrasonido.

Respecto a las técnicas basadas en procesos de sorción, la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) destaca por su amplio uso en la determinación de HAPs tanto en muestras ambientales (agua de lluvia, agua de mar, aguas residuales, suelo), biológicas (orina, saliva) y alimenticias (agua, miel, aceite de oliva). La selectividad de esta técnica está vinculada principalmente con el reparto del analito entre la muestra en que está contenido y la fase adsorbente de la fibra (Peñalvert *et al.*, 1999; Wandercki *et al.*, 2007); mientras que, la eficiencia de la concentración no sólo depende del tipo de fibra sino también de su espesor (Wandercki *et al.*, 2007). De acuerdo con lo mencionado la selección de la fibra es uno de los factores iniciales más importantes. En el caso particular de los estudios con HAPs es común el empleo de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm de espesor como fase adsorbente, aunque es posible el uso de un polímero de anilina o en algunos otros casos adsorbentes de mejores características respecto a sus temperaturas de trabajo y durabilidad, tal como lo muestra Li y colaboradores (2012), quienes emplearon un polímero de anilina modificado con flúor. Por otro lado, es común para las metodologías que incluyen esta técnica, que el análisis sea llevado a cabo por sistemas de cromatografía de gases acoplados a espectrómetros de masas (EM) o en su defecto, detectores de ionización de flama (DIF). El uso de sistemas altamente sensibles es una necesidad por las limitantes propias de la técnica ya que la extracción no es exhaustiva y depende de una condición de equilibrio, además de estar restringida por la capacidad de la fibra. Este último parámetro de acuerdo con algunos autores es una de las principales desventajas de SPME (Kolahgar *et al.*, 2002) respecto a la microextracción en barra magnética (SBME, por sus siglas en inglés), por lo que como es de esperarse está última también ha sido ampliamente utilizada.

De manera general se resumen algunos trabajos en la tabla 5 empleando técnicas miniaturizadas en el aislamiento de HAPs en matrices acuosas.

Tabla 5. Determinación de HAPs en matrices acuosas empleando técnicas miniaturizadas en el proceso de preparación de la muestra

Técnica	Condiciones	Análisis	Muestra	Recuperación [%]	Límites de detección	Precisión
^a DLLME	Extractante 50 µL de hexano, dispersante 500 µL de acetona	CG-EM	Agua de río (5.0 mL)	68 a 95	3.7 a 39.1 ng L ⁻¹	n.r
SPE miniaturizada	Adsorbente: Sílice C18	UV	n.r	98 (únicamente se analiza antraceno)	n.r	n.r
^c SPME	Adsorbente: polianilina fluorurada 60 min de extracción a 60 °C	CG-DIF	Agua de lluvia	89 a 111	0.01 a 0.1 0.02 mg L ⁻¹	C.V.: 3.4 a 8.6
^d UAEM	Extractante: Tween 80 y ciclohexano	n.r	Agua de río y residual (5.0 mL)	n.r	n.r	n.r
^e SBSE	Acondicionamiento: con (a: CH ₂ Cl ₂ : MeOH, b: CH ₃ CN) Adsorción: 100 min de agitación a 39 °C a 800 rpm Desorción a 50 °C, 25 min en 100 µL CH ₃ CN (3 réplicas)	CLAR-DF	Agua de lluvia (10 mL)	88-121	0.2 y 1.5 ng L ⁻¹	C.V.: 5-10
^f HS-SDME	Empleo de β-ciclodextrinas para hacer más selectiva la extracción e incrementar la respuesta de detección	CLAR-DF	Agua de lago	94-111	0.004–0.247 ng mL ⁻¹	n.r
^g SBSE	Modificador orgánico: MeOH o hiamina. Acondicionamiento: 1h con CH ₃ CN a 300 °C. Secado: N ₂ a 100 mL min ⁻¹ t ext: 3.5 h	CG-EM	Agua	n.r	0.1 a 2 ng L ⁻¹	n.r
^h SBSE	Adsorción: 60 min a 1100 rpm. Desorción: 250 µL de CH ₃ CN	CLAR	Extractos de suelo (10 mL)	82-104	n.r	C.V.: (8 a 11) y 40 para inter e intra laboratorio

DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva. **SPE:** Extracción en fase sólida. **SPME:** Micro extracción en fase sólida. **UAEM:** Micro extracción asistida por ultrasonido. **HS-SDME:** Microextracción con una única gota, en modo de espacio confinado. **CG-EM:** Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas **FID:** Detector de ionización de flama. **DF:** Detector de fluorescencia. **a.** Guo y Lee, 2011. **b.** Lafleur *et al.*, 2010. **c.** Li *et al.*, 2012. **d.** Cheng *et al.*, 2011. **e.** Deschamps *et al.*, 2007. **f.** Wu *et al.*, 2008. **g.** Kolahgar *et al.*, 2002. **h.** Krüger *et al.*, 2011. **n.r:** No reportado

2.9. Extracción en fase sólida en punta de micropipeta

La extracción en fase sólida representa quizá una de las técnicas de más amplio uso en la preparación de muestras, entre sus principales ventajas se encuentra el menor consumo de disolventes, así como su sencillez en el manejo y la posibilidad de automatización. Por todo lo anterior y en concordancia con las tendencias actuales se ha buscado llevar a cabo la miniaturización de dicha técnica. Con relación a ello los sistemas de membrana representan uno de los primeros avances en lo que a dispositivos se refiere; mientras que respecto a la selectividad y eficiencia de la extracción, el desarrollo de nuevos materiales, (polímeros molecularmente impresos, inmuno adsorbentes y sílice monolítica) ha representado una ventaja.

Con base en los avances antes mencionados ha sido posible el desarrollo de la extracción en fase sólida en punta de micropipeta, quién en comparación con la SPE puede considerarse como una técnica más rápida, fácil de operar y una herramienta de fácil acceso, además de que representa ventajas en costo al disminuir la cantidad de adsorbente y disolventes utilizados.

En relación con las condiciones de manipulación de esta técnica, se debe decir en primera instancia que el adsorbente se encuentra contenido en una punta de micropipeta y que es común que éste sea de tipo monolítico. Además, la solución de la muestra así como el disolvente de extracción son aspirados y dispensados a través de la punta de pipeta para la extracción de los analitos con ayuda de una micropipeta; lo que constituye un ciclo de extracción o de elución, respectivamente. Este proceso es quizás una de las principales diferencias con la SPE común.

La extracción en fase sólida en punta de micropipeta representa uno de los sistemas miniaturizados más novedosos y de gran utilidad en la purificación; modificación y concentración de proteínas o péptidos principalmente en estudios de proteómica, metabolómica o genómica (Pluskal *et al.*, 2002; Keough *et al.*, 2002). En la tabla 6 se muestran algunos trabajos desarrollados en punta de micropipeta, en los que se observa

que su uso también es común en el aislamiento de fármacos principalmente desde matrices biológicas (Sun *et al.*, 2013; Kumazawa *et al.* 2006; Hasegawa *et al.* 2012; Hout *et al.*, 2001); mientras que, su aplicación es nula para algunos otros contaminantes de interés común tal como lo son los HAPs de acuerdo con la revisión llevada a cabo hasta este momento.

Tabla 6. Estudios desarrollados empleando extracción en fase sólida en punta de micropipeta

Muestra (cantidad)	10 mL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Matriz	Agua del ambiente	Orina humana	Orina humana	Plasma humano	Plasma humano
Tipo de analitos	Sulfonamidas	Metanfetamina y anfetamina	Mequitazina (fármaco)	Dimemorfano	Lidocaína y diazepam
Adsorbente	Grafeno (1.0 mg)	C18 monolítica	C18 monolítica	C18 monolítica	C18-AR
Acondicionamiento	1 mL MeOH y 1 mL H ₂ O	200 µL de MeOH y 200 µL H ₂ O	200 µL MeOH y 200 µL H ₂ O	200 µL MeOH y 200 µL H ₂ O	300 µL Acetato de etilo, 200 µL MeOH y 100 µL de amortiguador (0.1 M, KHPO ₄)
Limpieza	1.0 mL de una mezcla (1:9 v/v) MeOH: H ₂ O	200 mL H ₂ O	200 µL H ₂ O	n.r	100 µL H ₂ O
Elución (ciclos)	1.0 mL de una disolución de amoniaco al 5 % en metanol	100 µL MeOH (5 veces)	100 µL MeOH (5 veces)	100 µL MeOH (5 veces)	n.r
Recobro [%]	90.4-108.2	82.9–88.3 82.2–88.2	90-91.4	83-94	n.r
Detección	Fluorescencia	n.r	EM-SIM	EM	DIF/ EM (SIM)
Limites	0.5–1.7 pg mL ⁻¹	0.04 y 0.05 ng/0.5 mL	n.r	0.125 ng/100 L (1.25 ng/mL) para plasma	0.75 ng mL ⁻¹ y 2.5 ng mL ⁻¹
Ciclos de carga de la muestra	n.r	25	25	20	n.r
Referencia	Sun <i>et al.</i> , 2013	Kumazawa <i>et al.</i> , 2007	Kumazawa <i>et al.</i> , 2006	Hasegawa <i>et al.</i> , 2012	Hout <i>et al.</i> , 2001

n.r: Dato o valor no reportado. EM: Espectrometría de masas. SIM: Monitoreo de ion seleccionado. DIF: Detector de ionización de flama

III. Objetivos

3.1. Objetivo general: Desarrollar un método analítico por extracción en fase sólida en punta de micropipeta y análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (CLAR-DF), para la determinación de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno en un medio proveniente del cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum*.

3.2. Objetivos particulares: 1) Determinar las condiciones de separación cromatográfica y de análisis de los analitos de interés. 2) Validar el sistema y la metodología desarrollada y 3) Aplicar el método a bioensayos de exposición de las microalgas a diferentes concentraciones de los contaminantes para evaluar su remoción del medio.

IV. Desarrollo Experimental

4.1. Materiales y reactivos

4.1.1. Estándares y disolventes

- Disolventes: acetonitrilo y metanol grado cromatográfico marca J.T. Baker (Trinidad y Tobago).
- Agua grado cromatográfico obtenida a través de un sistema de desionización marca Millipore modelo Simplicity UV (Bedford, MA, USA).
- Estándar de Benzo[*a*]pireno marca ChemService (PA, EUA), pureza 99.5 %.
- Estándar de Benzo[*a*]antraceno marca ChemService (PA, EUA) pureza de 99 %.
- Estándares del: 9-10, 4-5 y 7-8 dihidrodiol benzo[*a*]pireno obtenidos de MRI Global Research (Missouri USA), con una pureza >99 %.
- Estándares del: 8-9, 5-6 y 10-11 dihidrodiol benzo[*a*]antraceno obtenidos de MRI Global Research (Missouri USA), con una pureza > 99 %.

4.1.2. Sistemas cromatográficos:

- Jeringa Hamilton de 50 μ L (Reno, NV, EUA).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Varian, modelo 210 (Palo Alto, CA, EUA).
- Detector de fluorescencia marca Varian Pro star, modelo 363.
- Software para el control y procesamiento de datos "Star Workstation" Varian, versión 6.0 1989-2003.
- Bombas isocráticas Varian, modelo 9012.
- "Loop" de 23.5 μ L.
- Columna analítica de acero inoxidable marca Agilent (EUA) de 4.6 X 150 mm empacada con XDB-octadecilsilano con tamaño de partícula de 5 μ m.
- Columna de guarda de acero inoxidable de 13 x 4.5 mm d.i UPCHURCH SCIENTIFIC (Oak, Wa, EUA) empacada con sílice fase inversa Nucleosil C18 MACHEREY-NAGEL (Alemania) tamaño de partícula 5 μ m.
- Válvula multipuertos Rehodyne.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters, modelo 2998.

4.1.3. Extracción en fase sólida en punta de micropipeta

- Puntas para micropipeta con capacidad de 1 mL.
- Micropipetas Eppendorf (Canadá) con capacidades de 100 a 1000 μL y de 20 a 200 μL .
- Sílice C18 y C8 marca Supelclean Sigma-Aldrich.
- Matraz volumétrico de 1 mL marca Pyrex.
- Frit de polipropileno.

4.1.4. Manejo de cultivos

- Agar bacteriológico y peptona proteosa obtenidos de MCD LAB (México).
- Nitrato de sodio (NaNO_3) marca J.T. Baker.
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) marca J. T. Baker.
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) marca J.T. Baker.
- Fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4) marca J.T. Baker.
- Cloruro de sodio (NaCl) marca J.T. Baker.
- Matraces Erlenmeyer de 50 y 200 mL.
- Microscopio óptico marca National, modelo B2-220(Carnation, WA, USA).
- Agitador orbital ThermoScientific, modelo 2346 (Dubuque, IA, USA).
- Asa bacteriológica.
- Algodón y gasa.
- Cepa pura de la microalga *Selenastrum capricornutum* obtenida de “The Culture Collection of Algae” (UTEX) de la Universidad de Texas (Austin, TX, USA).
- Alcohol etílico al 75 %.
- Espátula de acero inoxidable.
- Temporizador para el control de los ciclos de luz y oscuridad.
- Autoclave automática Tuttnauer, modelo 2540 EL (Países bajos).
- Papel estroza.
- Pipetas graduadas de 10 mL.

4.2. Descripción general de la metodología desarrollada

En la figura 4 se muestra un esquema en el que se ilustran de manera general las etapas involucradas en la metodología desarrollada.

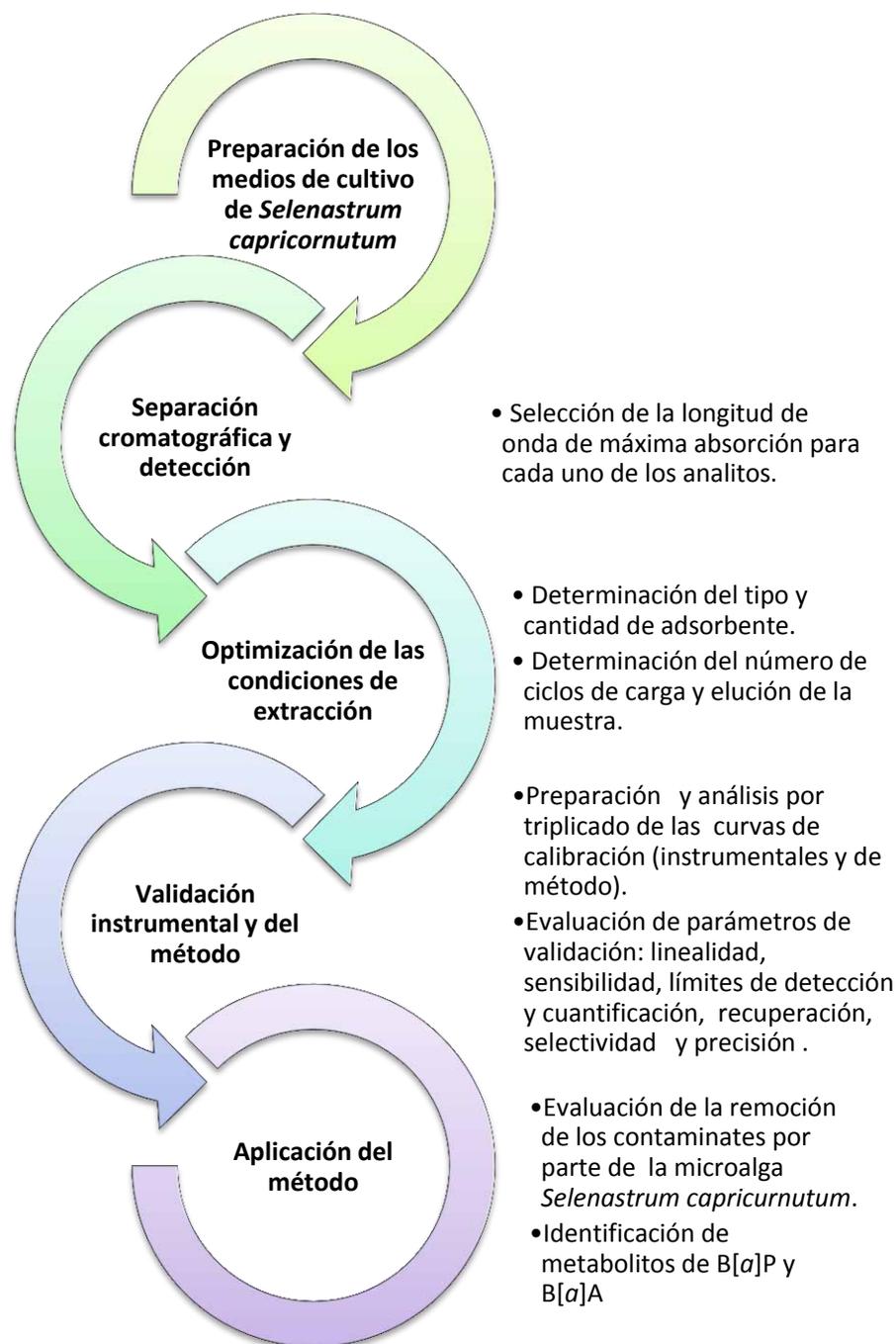


Figura 4: Descripción general de la metodología desarrollada

4.3. Preparación y condiciones del crecimiento de los cultivos de *Selenastrum capricornutum*

Los cultivos de la microalga *Selenastrum capricornutum* se prepararon en medio sólido y líquido; en ambos casos bajo condiciones axénicas. Los medios sólidos permitieron la preservación de la cepa y los medios líquidos fungieron como muestra en los experimentos de: desarrollo, validación analítica y bioensayos de exposición de este trabajo, los cuales son descritos posteriormente. Para la preparación de ambos cultivos se empleó medio Bristol el cual presenta la siguiente composición: NaNO_3 2.94 M, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.30 M, Na_2HPO_4 0.53 M, KH_2PO_4 1.29 M y NaCl 0.43 M.

En relación con las condiciones de crecimiento, ambos cultivos se expusieron a periodos de luz y oscuridad de 12 y 8 h respectivamente, de manera adicional los medios líquidos se mantuvieron en un agitador orbital ThermoScientific hasta su uso (absorbancia=1, equivalente a 5×10^6 células por mililitro de cultivo) (Olmos, 2013).

En las figuras 5 y 6 se muestran esquemas con una descripción detallada acerca de las etapas involucradas en la preparación de los cultivos sólidos y líquidos empleados.

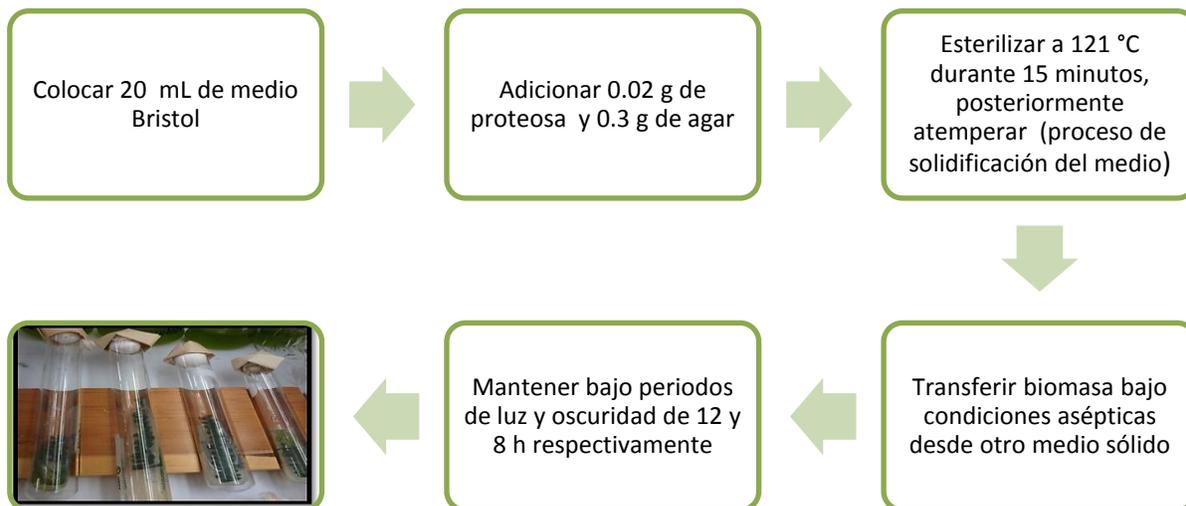


Figura 5. Preparación de un medio de cultivo sólido de la microalga *Selenastrum capricornutum*

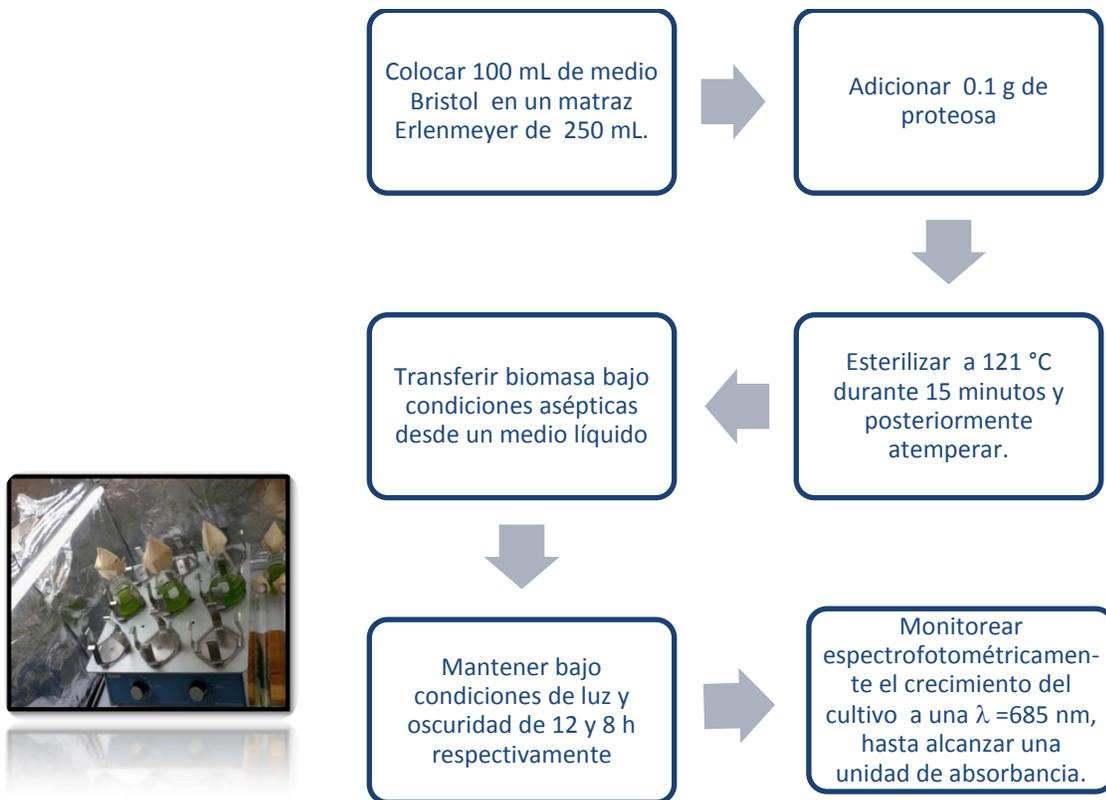


Figura 6. Preparación de un medio de cultivo líquido de la microalga *Selenastrum capricornutum*

4.4. Condiciones de separación cromatográfica y de detección

4.4.1. Determinación de las condiciones de análisis de benzo[*a*]antraceno y benzo[*a*]pireno

Las condiciones de análisis cromatográfico de los analitos se obtuvieron tras haber inyectado una disolución estándar de cada compuesto a una concentración de 50 ng mL^{-1} en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Varian, modelo 210 acoplado a un sistema de detección por fluorescencia (CLAR-DF), empleando elución isocrática con metanol como fase móvil a un flujo de 1 mL min^{-1} y una columna analítica de $4.6 \times 150 \text{ mm}$ empacada con XDB-octadecilsilano. En relación con la detección por fluorescencia se evaluaron las condiciones de máxima respuesta para cada HAP a través de la obtención de sus respectivos espectros de absorción y emisión para los cuales se realizó un barrido desde 300 a 500 nm.

4.5. Establecimiento de las condiciones del método de extracción en fase sólida en punta de micropipeta

El dispositivo de extracción consistió en una punta de micropipeta con capacidad de 1 mL empacada con 50 mg de sílice C18, la cual se mantuvo en medio de dos frites de polipropileno adaptados a la punta. Una vez contenido el adsorbente, la punta se colocó en una micropipeta para permitir la aspiración y desorción de: los disolventes de acondicionamiento, la muestra y el disolvente de elución. La etapa de acondicionamiento consistió en pasar 200 μ L de acetonitrilo a través del dispositivo en un sólo ciclo de aspiración y desorción, seguido de cinco ciclos, cada uno de ellos con 200 μ L de una disolución acuosa de acetonitrilo al 20 %.

Subsecuentemente para obtener el protocolo de extracción completo se evaluó: el tipo y cantidad de adsorbente y el número óptimo de ciclos tanto de carga de la muestra como de elución de los analitos. Es preciso mencionar que las primeras evaluaciones se llevaron a cabo empleando únicamente benzo[*a*]pireno, ya que en principio el método a desarrollar estaba enfocado en la determinación de modo individual de cada uno de los analitos; además se esperaba que el comportamiento de éste fuera similar al del benzo[*a*]antraceno tal como se observó en la evaluación de los ciclos de carga y elución; éstas y las otras variables evaluadas son descritas a continuación.

4.5.1. Selección del tipo de adsorbente

En relación con el tipo de adsorbente se probaron sílice C8 y C18; los experimentos consistieron en pasar 1 mL de una disolución acuosa de benzo[*a*]pireno a 266 ng mL⁻¹ empleando tres ciclos de carga de la muestra y seis ciclos de elución con 0.5 mL de acetonitrilo. Respecto al adsorbente la cantidad empleada en estos ensayos fue de 100 mg. Cada ciclo consiste en la aspiración y subsecuente desorción del medio líquido en cuestión, a través de una punta de micro pipeta en la que está contenido el adsorbente. Finalmente la selección del adsorbente se hizo con base en el porcentaje de recuperación obtenido, calculado a través del cociente del área de los picos cromatográficos de los compuestos en el extracto entre el área de los compuestos en el estándar.

4.5.2. Efecto de las variables en la recuperación de los analitos

Una vez establecido el tipo de fase adsorbente a utilizar, se desarrolló un diseño de experimentos de tipo 2^n sin réplicas, para evaluar el efecto de: la cantidad de adsorbente, el número de ciclos de carga del estándar y la concentración del analito sobre el porcentaje de recuperación. Los experimentos se efectuaron utilizando como analito benzo[a]pireno en 1 mL de una disolución acuosa y manteniendo seis ciclos de elución de la muestra. Los niveles de cada variable (n) corresponden en el caso de la cantidad de adsorbente con: 100 y 50 mg de sílice C18; mientras que, los ciclos de carga del estándar probados fueron 3 y 6; finalmente las concentraciones utilizadas fueron 5 y 266 ng mL⁻¹. De este modo el número de experimentos efectuados corresponde con 8 combinaciones de las variables antes mencionadas (tabla 7). Los resultados del porcentaje de recuperación de cada ensayo sirvieron para determinar si las variables eran o no significativas sobre dicho parámetro.

Tabla 7. Combinaciones del diseño de experimentos 2^n , n=3 (concentración de analito, cantidad de fase y ciclos de carga de la muestra)

Experimento	Concentración [ng mL ⁻¹]	Cantidad de fase [g]	Ciclos de carga de la muestra
1	266	0.1	6
2	5	0.1	6
3	266	0.05	6
4	5	0.05	6
5	266	0.1	3
6	5	0.1	3
7	266	0.05	3
8	5	0.05	3

4.5.3. Selección del número de ciclos de elución con la sílice C18

Con base en los resultados de la sección anterior, se llevó a cabo un estudio más amplio y univariante para la determinación del número óptimo de ciclos de elución, ya que ésta es la forma más comúnmente empleada en trabajos de extracción en punta de micropipeta. Para ello, se desarrollaron una serie de experimentos, en los que a 1 mL de medio proveniente del cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum* se le adicionó de manera previa a su manipulación benzo[*a*]pireno a una determinada concentración (50, 100 o 266 ng mL⁻¹). Posteriormente esta muestra se pasó en tres ciclos a través de una punta de micropipeta empacada con 50 mg de sílice C18; mientras que, la recuperación del analito desde el adsorbente se hizo con 500 µL de acetonitrilo empleando diferentes ciclos de elución (1, 3, 6, 9 y 12). Es importante mencionar que esta prueba se realizó por triplicado.

En el caso del benzo[*a*]antraceno se decidió realizar sólo una prueba por triplicado posterior a los experimentos de benzo[*a*]pireno a una concentración de 100 ng mL⁻¹ a fin de determinar si el comportamiento era similar al de su congénere y con base en esto seleccionar un valor óptimo de ciclos de elución para ambos compuestos.

4.5.4. Selección del número de ciclos de carga de la muestra.

En relación con los ciclos de carga de la muestra también se decidió realizar un estudio más amplio acerca de su influencia en el porcentaje de recuperación; para ello se utilizó una muestra y un dispositivo para la extracción de las mismas características que lo descrito en el apartado anterior; sólo que en este caso los ciclos de elución empleados fueron seis (determinados con base en los resultados del apartado 4.5.2); mientras que los ciclos de carga probados fueron: 1, 2, 3, 4 y 5. Los experimentos para ambos analitos se llevaron a cabo únicamente a la concentración de 100 ng mL⁻¹.

4.6. Validación instrumental y del método

4.6.1. Linealidad, precisión, límites de detección y límites de cuantificación

4.6.1.1. Linealidad

Las curvas de calibración (área del pico vs concentración) instrumentales de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno se construyeron a partir del análisis cromatográfico de disoluciones de los analitos preparadas en acetonitrilo. Cada una de éstas curvas incluyó 7 niveles de concentración que corresponden con 5, 25, 50, 75, 100, 150 y 300 ng mL⁻¹.

Cada nivel de calibración se preparó adicionando tanto benzo[*a*]antraceno como benzo[*a*]pireno y partiendo de disoluciones individuales de cada uno de ellos. La preparación en conjunto se hizo para efectuar el monitoreo de ambos compuestos en una misma corrida cromatográfica.

Los niveles correspondientes a 100, 150 y 300 ng mL⁻¹ se obtuvieron a partir de disoluciones de trabajo de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno a una concentración de 1.05 µg mL⁻¹. En lo que respecta a los niveles que van de 25 a 75 µg L⁻¹ se partió de disoluciones de trabajo a 0.53 µg mL⁻¹ y finalmente el nivel de 5 µg L⁻¹ se obtuvo por dilución a partir de una disolución de trabajo a 0.1 µg mL⁻¹.

Por otro lado, las curvas para evaluar la linealidad del método se prepararon adicionando alícuotas de las disoluciones de trabajo antes mencionadas y que contenían a ambos analitos sobre la matriz (medio de cultivo en absorbancia igual a uno que corresponde con un número promedio de células de 5x10⁶, Olmos *et al.*, 2013) de modo tal que, se tuvieran las mismas concentraciones que las indicadas en la preparación de la curva instrumental. Una vez enriquecida la muestra con los analitos de interés ésta se trató de acuerdo con la metodología optimizada (descrita en la sección de resultados, apartado 4.6). Cabe mencionar que tanto las curvas instrumentales como las de método se obtuvieron por triplicado.

Una vez preparados cada uno de los niveles de calibración de las curvas instrumentales y del método, éstos se analizaron a través de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (CLAR-DF) bajo las condiciones descritas en la sección de resultados, apartado 5.1.1. Posteriormente el tratamiento de los resultados involucró: a) la inspección gráfica de la respuesta dada por el sistema de análisis en función de la concentración (para cada uno de los compuestos) y la evaluación de la relación entre las variables a través del cálculo del coeficiente de correlación y b) la construcción de un modelo para la descripción de los datos a través de mínimos cuadrados y el análisis de varianza de la regresión lineal.

Inspección gráfica de datos y determinación del coeficiente de correlación

a) Si en la inspección gráfica de los datos se observó que las variables podían ser descritas por una correlación de tipo lineal; entonces se evaluó la bondad con que los datos se ajustarían a una línea a través del coeficiente de correlación momento producto (r).

Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados

b) Finalmente con base en los resultados de las pruebas antes descritas se creó un modelo de regresión lineal a través de mínimos cuadrados para la descripción de los datos cuya bondad de ajuste se evaluó a través del estadístico F de Fisher calculado con base en un análisis de varianza (ANOVA).

4.6.1.2. Precisión

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y reproducibilidad. Los experimentos desarrollados para ello, consistieron en la preparación por triplicado y el análisis subsecuente de disoluciones estándar o extractos, correspondientes únicamente en ambos casos a las concentraciones de los extremos del rango de las curvas de calibración. Los ensayos fueron realizados en un mismo día y en días consecutivos; de modo que en el primer caso consideramos variaciones en la preparación y entre una corrida cromatográfica y otra; mientras que, en el segundo ensayo se incluye además la

variabilidad dada entre días. En ambos casos la variabilidad se expresó en términos del coeficiente de variación (C.V.).

4.6.1.3. Límites de detección y de cuantificación

La estimación de los límites de detección (L.D) y cuantificación (L.C) fue teórica y se realizó con base en el análisis de regresión lineal de curvas de calibración instrumental y de método construidas en un intervalo de concentraciones que va de 2.5 a 15 ng mL⁻¹ de analito. Es importante mencionar que cada nivel de calibración de éstas curvas se realizó por triplicado.

Así, a partir de las ecuaciones 1 y 2 se estimaron los límites de detección y cuantificación respectivamente.

$$L. D = \frac{[3.3 \times S_{y/x}]}{b_1} \quad \text{Ecuación 1} \qquad L. C = 3.3 L. D \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$S_{y/x}$: es la desviación estándar de la regresión

b_1 : es el valor de la pendiente de la curva de calibración

4.6.2. Porcentaje de recobro y selectividad del método

Antes de llevar a cabo la adición de los analitos de interés sobre la matriz analítica (medio de cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum*) para evaluar el porcentaje de recobro del método, se efectuó la extracción de una muestra no adicionada, a fin de obtener un blanco de matriz que permitiese conocer la existencia de potenciales interferentes y con base en ello establecer si fuese necesario la evaluación de la selectividad del método. Posteriormente, distintas cantidades de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno se adicionaron conjuntamente sobre la matriz y se trataron de acuerdo con la metodología de extracción optimizada (descrita en la sección de resultados apartado 5.3); finalmente los extractos se analizaron por CLAR-DF a las condiciones pre establecidas. La respuesta (área del pico cromatográfico) obtenida del análisis de cada

muestra adicionada, se comparó con la de disoluciones estándar a las concentraciones respectivas; asumiendo que la señal de ésta última corresponde con el 100 % del analito adicionado inicialmente en la muestra. Así, el porcentaje de recuperación se obtuvo a través del cociente del área del extracto sobre el área del estándar y se multiplicó por cien.

4.7 Aplicación de la metodología de extracción en fase sólida en punta de micropipeta con análisis por CLAR-DF

4.7.1 Evaluación de la remoción de benzo[*a*]antraceno y benzo[*a*]pireno

La aplicación del método desarrollado consistió en detectar y cuantificar a los HAPs en bioensayos en los que la microalga *Selenastrum capricornutum* fue expuesta a los contaminantes; estos bioensayos fueron de tres tipos, el primero de ellos se consideró como un blanco y corresponde a un medio con HAPs libre de microorganismos. El segundo tipo de ensayo se efectuó empleando un medio con HAPs y microorganismos muertos al cual se le denominó control de algas muertas. En ambos casos se adicionaron conjuntamente tanto benzo[*a*]antraceno como benzo[*a*]pireno a una concentración de (50, 100 o 266 ng mL⁻¹ de cada hidrocarburo por ensayo). Es importante mencionar que a través de éstos dos ensayos se pretendió diferenciar la pérdida de los HAPs desde el medio líquido de cultivo, debida a factores abióticos como son: la foto oxidación, la adsorción al vidrio y específicamente en el segundo caso la adsorción a la superficie del microorganismo. Es de notarse que el control de algas muertas incluye la influencia de todos los factores de interés y es además, una matriz cuya composición es de mayor similitud con respecto a la muestra de los bioensayos con microorganismo vivos, razón por la cual, el blanco se realizó únicamente a la concentración de 266 ng mL⁻¹ mientras que, el control con algas muertas se llevó a cabo a las concentraciones de 50 100 y 266 ng mL⁻¹ que también corresponden con las evaluadas en el tercer tipo de ensayo. En éste último la muestra es un medio de cultivo con microorganismos vivos al cual se le adicionó benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno a las concentraciones antes mencionadas. Este último bioensayo fue el que permitió evaluar la remoción de los contaminantes por parte de la microalga.

En todos los casos, se usaron 15 mL de medio de cultivo con un número de células constante de 5×10^6 células por mililitro de cultivo. Los diferentes tiempos de monitoreo fueron 0.5, 0.75, 1.5, 3, 6, 9, 15 y 18 h; mientras que, las concentraciones de HAPs probadas corresponden con 50, 100 y 266 ng mL^{-1} . Una descripción general de las características de la muestra empleada en cada tipo de ensayo y del proceso de su obtención se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Tipos de muestra empleados en los ensayos de exposición

Ensayos de exposición	1: Medio libre de microorganismos (blanco)	Colocar en un matraz Erlenmeyer 15 mL de medio centrifugado proveniente de un cultivo del microorganismo a absorbancia de una unidad. Esterilizar. Adicionar una alícuota de una disolución de B[a]P y B[a], tal que se obtengan las concentraciones de exposición (Evaluado únicamente a 266 ng mL^{-1}).
	2: Medio con microorganismos muertos (control de algas muertas)	Colocar en un matraz Erlenmeyer 15 mL de un cultivo en una unidad de absorbancia . Esterilizar . Adicionar una alícuota de una disolución de B[a]P y B[a], tal que se obtengan las concentraciones de exposición ($50, 100 \text{ y } 266 \text{ ng mL}^{-1}$).
	3: Medio con microorganismos (muestra adicionada)	Colocar en un matraz Erlenmeyer 15 mL de un cultivo en una unidad de absorbancia. Adicionar una alícuota de una disolución de B[a]P y B[a], tal que se obtengan las concentraciones de exposición ($50, 100 \text{ y } 266 \text{ ng mL}^{-1}$).

Cada tipo de ensayo se realizó por triplicado en el mismo día y el monitoreo a los distintos tiempos (0.5, 0.75, 1.5, 3, 6, 9 y 18 h) fue en continuo, es decir de un mismo cultivo se tomaron alícuotas de 1 mL a los diferentes tiempos. Adicionalmente, en todos los casos

los matraces que contenían el medio de cultivo se mantuvieron en agitación y expuestos a luz amarilla durante todo el proceso.

Por otro lado, cada muestra se trató de acuerdo con lo descrito en el protocolo de extracción y se analizó por CLAR-DF bajo las condiciones descritas en la sección de resultados en los apartados 5.1 y 5.3.

Finalmente, la estimación de la cantidad de analito (benzo[*a*]antraceno y benzo[*a*]pireno) presente en los extractos a los distintos tiempos y en los diferentes ensayos se calculó a través de las curvas de calibración de método respectivas a cada compuesto. Los valores de área (provenientes del análisis de cada uno de los extractos) se introdujeron en las ecuaciones de regresión y entonces el valor de la concentración en el extracto fue estimado. Las ecuaciones empleadas fueron:

$$\frac{\text{Área del compuesto en el extracto} + 9445.1}{682.9} = \text{Concentración de B[*a*]A en el extracto} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\frac{\text{Área del compuesto en el extracto} + 21798.2}{2407} = \text{Concentración de B[*a*]P en el extracto} \quad \text{Ecuación 4}$$

Con los valores de concentración de los diferentes extractos analizados correspondientes a los diferentes tiempos de monitoreo se construyeron gráficos de concentración de los contaminantes en función del tiempo. Adicionalmente, se estimaron los porcentajes de remoción a través de la siguiente ecuación:

$$\left(1 - \frac{[\text{HAP}]_{t \neq 0}}{[\text{HAP}]_{t=0}}\right) 100 = \text{Remoción [\%]} \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde:

[HAP _{t≠0}]: Corresponde con los valores de concentración determinados para los extractos a los diferentes tiempos de monitoreo.

[HAP _{t=0}]: Corresponde al valor de concentración con que se adicionó inicialmente el cultivo (266, 100 o 50 ng mL⁻¹).

4.7.2. Identificación de algunos de los metabolitos formados por la microalga *Selenastrum capricornutum* durante el proceso de remoción de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno

Como parte de la verificación del proceso de transformación de los hidrocarburos debido a la acción de los microorganismos, se buscó identificar en los extractos obtenidos del ensayo de exposición a 266 ng mL^{-1} a los metabolitos de tipo dihidrodiol derivados de los HAPs adicionados inicialmente a los medios de cultivo.

El primer acercamiento para llevar a cabo esta prueba, consistió en analizar los blancos de matriz y los extractos obtenidos del monitoreo del ensayo de exposición en el mismo sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia que se utilizó para los HAPs; pero en este caso empleando una fase móvil: 70 % MeOH 30 % H₂O a un flujo de 1 mL min^{-1} , y obteniendo los cromatogramas a longitudes de excitación y emisión de 260 y 410 nm respectivamente. Estas condiciones se han establecido como óptimas para el análisis de los metabolitos en estudios previos desarrollados en nuestro grupo de trabajo (Olmos, 2013; Velasco, 2011)

Como una segunda etapa de identificación de los metabolitos y con base en los resultados del análisis por CLAR-DF antes descrito, se propuso que en caso de observar señales que dieran indicio de la presencia de los metabolitos se realizaría una corroboración a través de un subsecuente análisis en un equipo de cromatografía de líquidos con detector espectrofotométrico UV de arreglo de diodos marca WATERS modelo 2998; para lo cual los extractos se preconcentraron en una precolumna de acero inoxidable de $13 \times 4.5 \text{ mm}$, empacada con sílice C18 con tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$, la cual se acopló en línea al sistema cromatográfico empleando como fase móvil: 70 % MeOH 30 % H₂O a un flujo de 1 mL min^{-1} y monitoreando las señales cromatográficas a tres longitudes de onda (265.3, 277.2 y 364.2 nm). Estas condiciones de preconcentración y análisis en línea de los metabolitos fueron optimizadas previamente por el grupo de trabajo; sin embargo, aún no han sido publicadas.

V. Resultados

5.1. Condiciones de análisis

5.1.1. Determinación de las condiciones de análisis de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno

Los tiempos de retención obtenidos para benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno bajo las condiciones cromatográficas utilizadas, fueron de 3.3 y 4.5 min respectivamente, con una resolución estimada de 5.2. En relación con su detección, las condiciones de máxima respuesta fueron a una λ de excitación de 280 nm y una λ de emisión de 412 nm para benzo[a]antraceno; mientras que, para benzo[a]pireno los valores respectivos fueron 250 y 416 nm.

Finalmente, con base en los tiempos de retención fue posible la creación de un método de análisis en el que ambos compuestos se monitorearon simultáneamente en una misma corrida cromatográfica, dado que se trabajó con un detector programable. De modo que del tiempo 0 a los 3.8 min de la separación cromatográfica se mantuvieron las condiciones de detección para benzo[a]antraceno y posteriormente y hasta los 6 min se mantuvieron las condiciones de detección del benzo[a]pireno. En la figura 7, se muestra el cromatograma obtenido de una disolución estándar con benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno.

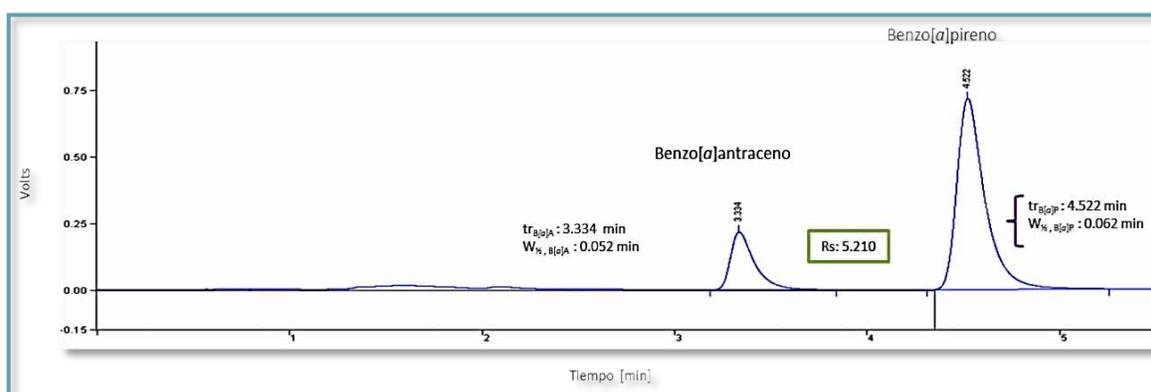


Figura 7. Separación cromatográfica de una disolución estándar de B[a]A y B[a]P a 75 ng mL^{-1} . Columna: Agilent de $4.6 \times 150 \text{ mm}$ empacada con XDB-C18 de $5 \mu\text{m}$. Fase móvil metanol 100 % a un flujo de 1 mL min^{-1} . Resolución obtenida: 5.210. Detección: Fluorescencia (de 0 a 3.8 min se utilizó una λ de excitación de 280 nm y una λ de 412 nm; de 3.8 a 6 min se utilizó una λ de excitación de 250 nm y una λ de 416 nm).

5.2. Establecimiento de las condiciones del método de extracción en fase sólida en punta de micropipeta

5.2.1. Selección del tipo de adsorbente

Los resultados del porcentaje de recuperación del benzo[*a*]pireno empleando 100 mg de sílice C8 y C18 con tres ciclos de carga de la muestra y seis ciclos de elución fueron de 36 y 32 %, respectivamente. Con base en lo anterior y aunque los recobros fueron muy similares, se eligió una sílice de tipo C18 con fines de uso comparativos a procesos de extracción similares a los desarrollados en el laboratorio.

5.2.2. Efecto de las variables en la recuperación de los analitos

En relación con el diseño de experimentos 2ⁿ, se encontró que la variabilidad del porcentaje de recuperación obtenido en los experimentos desarrollados en esta sección, es únicamente de tipo aleatorio y en consecuencia los factores probados (cantidad de fase: 50 o 100 mg, ciclos de carga de la muestra: 3 o 6 y concentración del analito: 5 o 266 ng mL⁻¹) no tienen influencia significativa sobre la recuperación, por lo anterior se decidió emplear 50 mg de fase, ya que esto representó un menor consumo de reactivo. Adicionalmente para la prueba subsecuente se emplearon tres ciclos de carga de la muestra.

5.2.3. Selección del número de ciclos de elución con la sílice C18

En la figura 8 se muestra un gráfico del porcentaje de recuperación obtenido en función de los ciclos de elución a diferentes concentraciones de benzo[*a*]pireno. En ésta gráfica se observa un incremento del porcentaje de recuperación principalmente de 1 a 6 ciclos de elución; mientras que después de éstos permanece prácticamente constante a las distintas concentraciones probadas; además dada la variabilidad observada resultó difícil diferenciar estadísticamente entre los porcentajes de recuperación de los 6 ciclos de elución respecto a sus posteriores (9 y 12 ciclos), aunado a ello una mejor precisión fue encontrada para los 6 ciclos, por lo que éstos se seleccionaron como el valor óptimo de dicho parámetro .

Por su parte, para el benzo[*a*]antraceno y de acuerdo con lo ilustrado en la figura 9, la evaluación de la recuperación en función de los ciclos de elución a la concentración de 100 ng mL⁻¹; mostró un comportamiento similar respecto a su congénere, y dado que se planeaba extraer conjuntamente dichos analitos se decidió seleccionar el mismo número de ciclos de elución, es decir 6. La figura 9 muestra la comparación del porcentaje de recuperación de benzo[*a*]antraceno y benzo[*a*]pireno en función del número de ciclos de elución a la concentración mencionada.

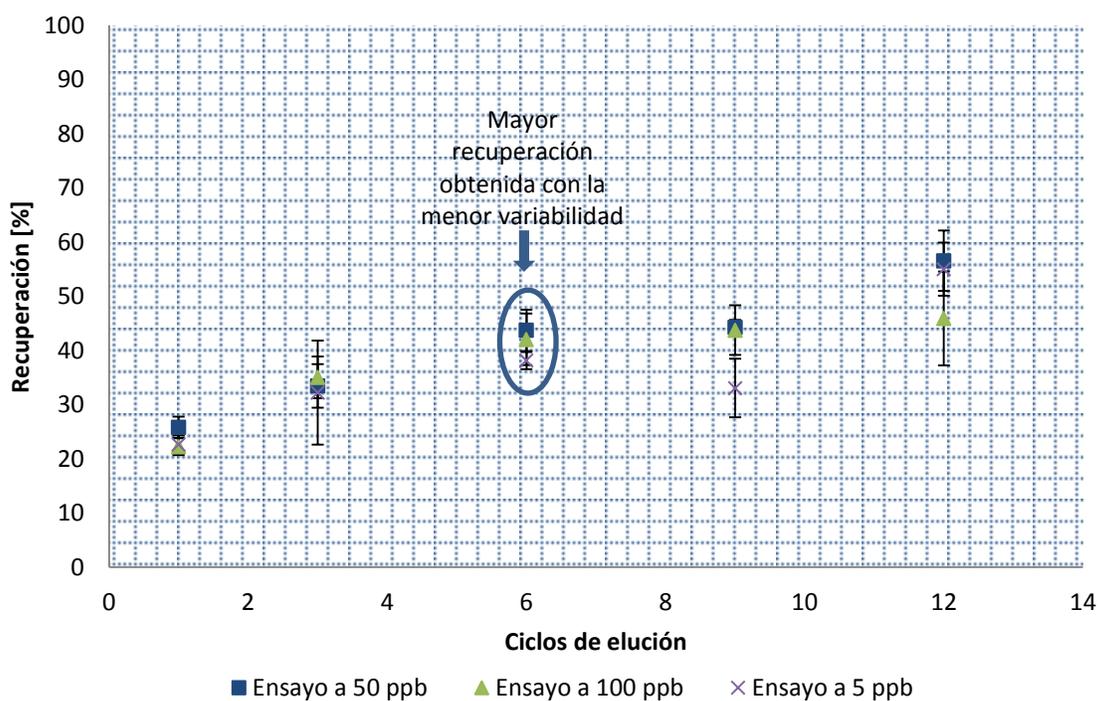


Figura 8. Porcentaje de recuperación de benzo[*a*]pireno en función del número de ciclos de elución

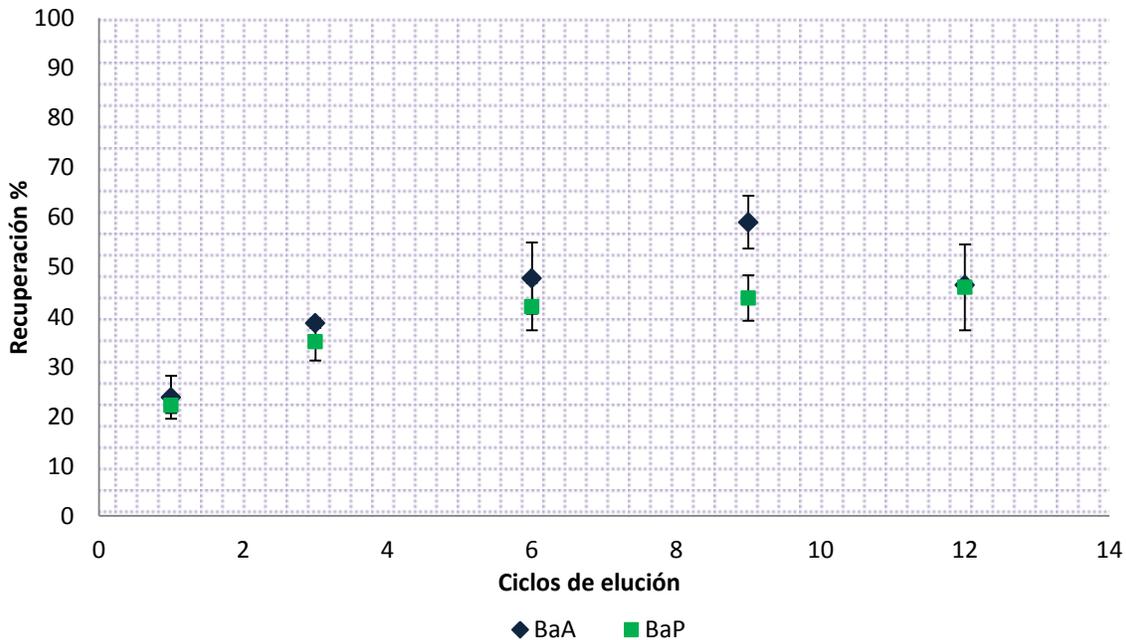


Figura 9. Comparación del porcentaje de recuperación de benzo[*a*]antraceno y benzo[*a*]pireno en función del número de ciclos de elución para un ensayo a 100 ng mL⁻¹.

5.2.4. Selección del número de ciclos de carga de la muestra

La Figura 10 presenta la variación del porcentaje de recuperación en función del número de ciclos de carga para el B[*a*]P y el B[*a*]A. Los resultados de esta prueba mostraron que un sólo ciclo de carga era adecuado en el proceso, porque es donde se obtiene la máxima recuperación (51 y 53 % para benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno respectivamente). Cabe mencionar que en estos experimentos, tanto los extractos como el efluente fueron analizados, mostrando que alrededor del 5 % del analito se mantenía en el efluente, por lo que los bajos recobros obtenidos no estaban asociados con una inadecuada transferencia del analito desde la muestra al dispositivo de extracción. Adicionalmente, muestras sin adición de HAPs y quienes fungieron como blancos de matriz fueron tratadas de acuerdo con el protocolo de extracción optimizado (descrito en la sección de resultados, apartado 5.3). El análisis de éstas mostró que no era necesaria una etapa de limpieza durante el proceso de extracción, ya que no se observaron señales cromatográficas en los tiempos de retención de B[*a*]A y B[*a*]P que pudiesen ser considerados como interferentes.

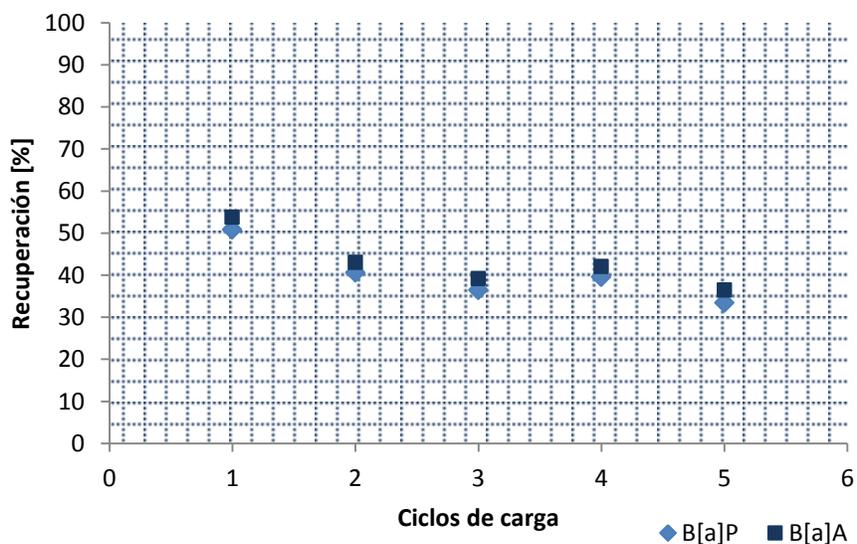


Figura 10. Efecto de los ciclos de carga en el porcentaje de recuperación para benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno

5.3. Protocolo del método de extracción en fase sólida en punta de micropipeta

La primer etapa del protocolo de extracción consistió en el acondicionamiento del adsorbente, para lo cual se pasaron 200 μL de acetonitrilo a través del dispositivo de extracción en un sólo ciclo de aspiración y desorción, seguido de cinco ciclos de 200 μL cada uno con una disolución acuosa de acetonitrilo al 20 %. Posteriormente se pasó 1 mL de muestra a través del dispositivo en que esta contenido el adsorbente empleando un sólo ciclo de carga, para finalmente llevar a cabo la elución de los analitos a través de 6 ciclos de aspiración y desorción empleando 500 μL de acetonitrilo. Se destaca que la muestra es una alícuota no centrifugada del medio de cultivo de la microalga *Selenastrum capricornutum* por lo que en ella se contenían a las células a diferencia de lo que se hace en la mayoría de los trabajos reportados en la literatura e inclusive los de nuestro grupo de investigación (Warshawsky *et al.*, 1995 y 2007; Olmos *et al.*, 2012) en dónde se maneja por separado el medio líquido y la biomasa al momento de realizar la extracción. En este protocolo las muestras se tomaron sin realizar la separación de sus fases ya que el método se planteó como una opción de monitoreo “in situ” rápido y sencillo del proceso de remoción. Respecto a la cantidad de biomasa contenida en 1 mL se obtuvo un valor

promedio de 0.3 mg (dato obtenido de la relación existente entre la cantidad de biomasa contenida en 15 mL de cultivo, la cual es de aproximadamente 5 mg (Olmos *et al.*, 2012), de modo que ello no representó algún inconveniente en términos técnicos, tal como la obstrucción de los frites.

En relación con el medio de cultivo éste fue adicionado previamente con los analitos de interés e inmediatamente se tomó la muestra a la cual se le colocaron 240 µL de acetonitrilo como modificador orgánico (Marcé *et al.*, 2000). Finalmente, el protocolo completo de extracción se presenta en la figura 11.

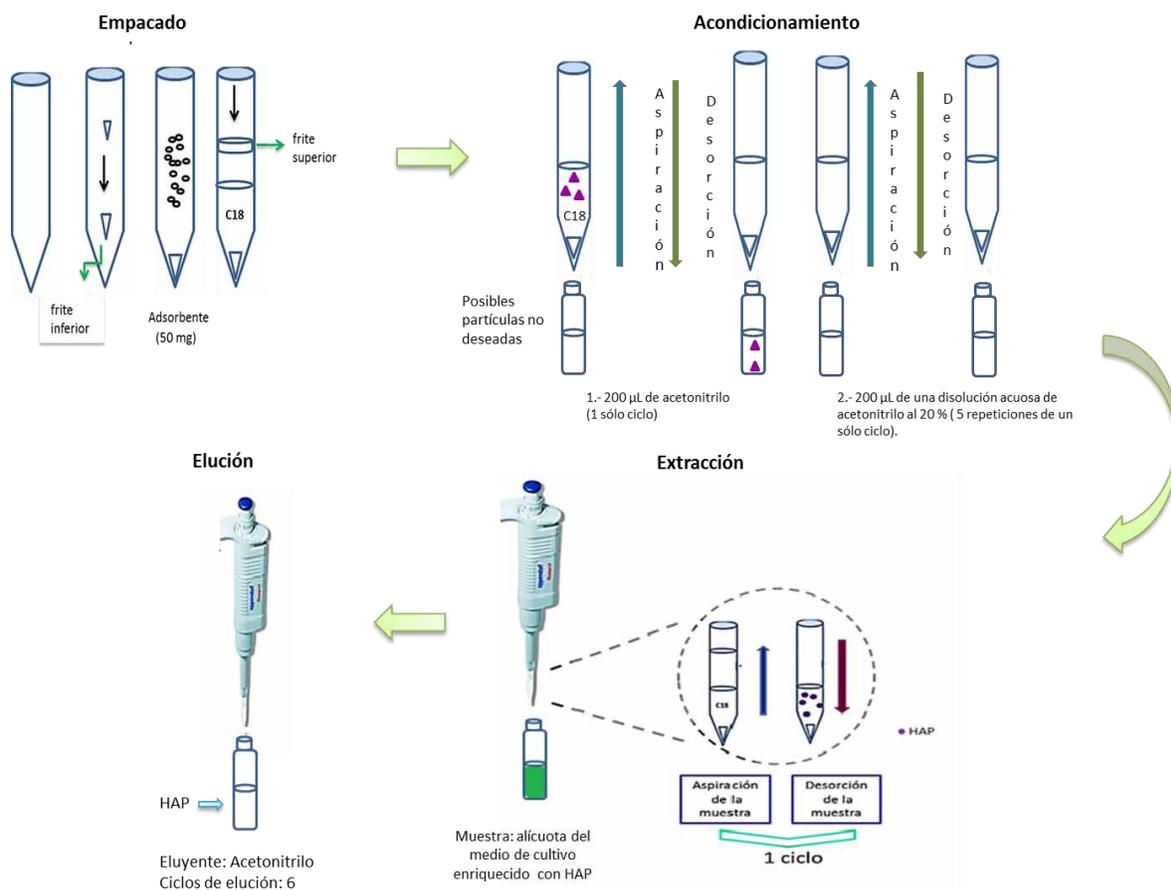


Figura 11. Esquema general de la metodología de extracción en punta de micropipeta

5.4. Validación instrumental y del método

5.4.1. Linealidad, precisión, límites de detección y límites de cuantificación

5.4.1.1. Linealidad

En relación con los gráficos de área en función de la concentración, en todos los casos éstos mostraron correlación de tipo lineal (como ejemplo se presentan las curvas de linealidad del método de los analitos estudiados en las figuras 12 y 13), lo que concordó con sus valores de “r” superiores a 0.99.

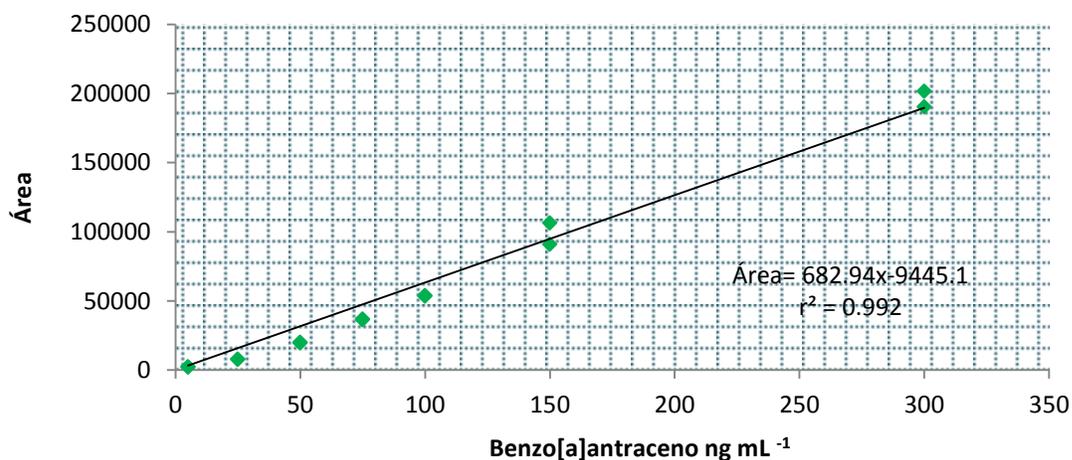


Figura 12. Linealidad del método del benzo[a]antraceno

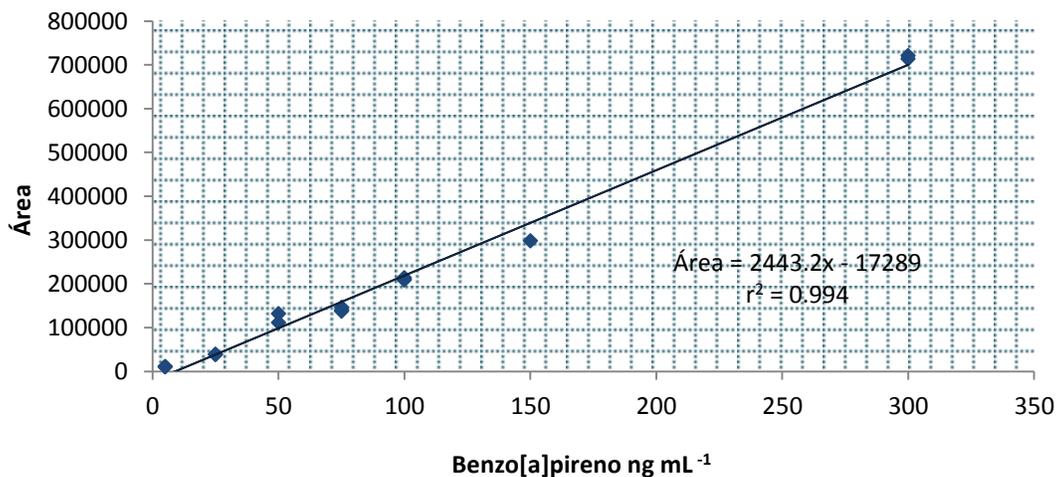


Figura 13. Linealidad del método del benzo[a]pireno

En relación con el análisis de regresión lineal los valores de ordenada y pendiente tanto de las curvas instrumentales como de método son presentados en la tabla 9. Mientras que; los valores del estadístico r^2 , indicaron en todos los casos que los modelos obtenidos fueron capaces de explicar el 99 % de la variabilidad observada en las respuestas analíticas. Con base en lo anterior el intervalo lineal de trabajo de ambos analitos quedó delimitado por los niveles superior e inferior de sus respectivas curvas de calibración instrumentales o del método. Es decir van desde los 5 ng mL⁻¹ a 300 ng mL⁻¹ comprendiendo un rango de 295 ng mL⁻¹, en todos los casos.

Tabla 9. Parámetros estimados a través de la regresión lineal por mínimos cuadrados para las curvas del método e instrumentales de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno

Benzo[a]antraceno			Benzo[a]pireno		
Instrumental			Instrumental		
Parámetro	Estimado	Estimado	Parámetro	Estimado	Estimado
Intercepto	895.1	728.6	Intercepto	10187.4	6778.4
Pendiente	717.8	17.4	Pendiente	2533.5	51.4
Método			Método		
Intercepto	-9445.1	2636.1	Intercepto	-21798.2	7863.1
Pendiente	682.9	19.3	Pendiente	2407.6	60.2

Finalmente los resultados del análisis de varianza para la evaluación del ajuste del modelo lineal propuesto, arrojaron en todos los casos un valor de $p < 0.05$ indicando con un nivel de confianza del 95 % una correlación estadísticamente significativa entre las respuestas analíticas y las concentraciones estimadas por el modelo.

5.4.1.2. Precisión

En la tabla 10 se muestran los valores del coeficiente de variación (C.V.), que indican la precisión en los niveles extremos de las curvas instrumentales y del método. Dichos resultados indicaron en todos los casos un C.V. menor al 15 %, lo que podríamos

considerar como un valor aceptable para el tipo de muestras empleado, consideradas como complejas.

Tabla 10. Evaluación de la precisión para benzo[σ]pireno y benzo[σ]antraceno.

C.V.	B[σ]P				B[σ]A			
	Repetibilidad		Reproducibilidad		Repetibilidad		Reproducibilidad	
	Instrumental	Método	Instrumental	Método	Instrumental	Método	Instrumental	Método
5 ng mL ⁻¹	1.3	1.25	6.6	2.1	3.3	1.6	4.4	3.2
300 ng mL ⁻¹	2.2	0.8	5.0	1.2	2.7	1.9	3.6	8.4

Finalmente en lo que a exactitud se refiere, se puede decir que aunque no se efectuaron experimentos específicos para su estimación, se puede asumir que el porcentaje de recuperación, la precisión con que este fue obtenido y su independencia de la concentración son indicativos de dicho parámetro. Es importante mencionar que pese a que los valores de recuperación para ambos analitos podrían considerarse insuficientes éstos no lo son, ya que se encuentran cercanos a los valores esperados debido a las bajas concentraciones en que estos se evaluaron y también debido al empleo de una matriz de tipo complejo. Aunado a ello, el buen ajuste del modelo lineal de los gráficos presentados en la sección de resultados en el apartado 5.4.2 indican la independencia de la recuperación con la concentración y finalmente en todos los casos los valores del C.V. con los que dicho parámetro fue estimado a cada nivel de concentración no fue mayor al 15 % valor que consideramos aceptable.

5.4.1.3. Límites de detección y de cuantificación

Las curvas de calibración construidas para la estimación de los límites de detección y cuantificación mostraron un comportamiento no homogéneo de la varianza a través de sus distintos niveles de calibración o concentración; lo cual repercutía en la estimación de los límites, dando valores muy altos de los mismos. Para solucionar esto, se realizó una transformación de las variables de dichas curvas de calibración que permitiera la homogenización de las varianzas para así posteriormente llevar a cabo el análisis de regresión lineal. Con esta modificación fue posible la estimación de los límites de

detección y cuantificación teóricos. En el caso de las curvas instrumentales los límites de detección fueron de 0.26 y 0.34 ng mL⁻¹ para benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno respectivamente; mientras que en las curvas del método éstos fueron de: 0.71 y 0.89 ng mL⁻¹. Finalmente, los límites de cuantificación instrumentales fueron de 0.88 y 1.15 ng mL⁻¹; mientras que los de método fueron de 2.3 y 2.9 ng mL⁻¹ para benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno respectivamente.

5.4.2. Porcentaje de recuperación y selectividad del método

De la extracción de la muestra analítica no fortificada se concluyó que no existen especies que pudieran ser consideradas como potenciales interferentes en la detección de los analitos de interés.

Cabe mencionar que también se extrajeron muestras de blancos de matriz a los distintos tiempos de monitoreo bajo las condiciones de los ensayos de exposición; de dicho estudio se observó que el perfil cromatográfico del blanco de matriz permanecía constante; es decir no se observó la aparición o desaparición de señales entre una muestra de blanco de matriz a un tiempo cero comparada con alguno de los correspondientes a los tiempos de monitoreo. En la figura 14 se muestran los cromatogramas de un blanco de matriz al tiempo cero y su análogo a un tiempo de 18 h bajo las condiciones de exposición, además del cromatograma correspondiente al extracto de una muestra adicionada.

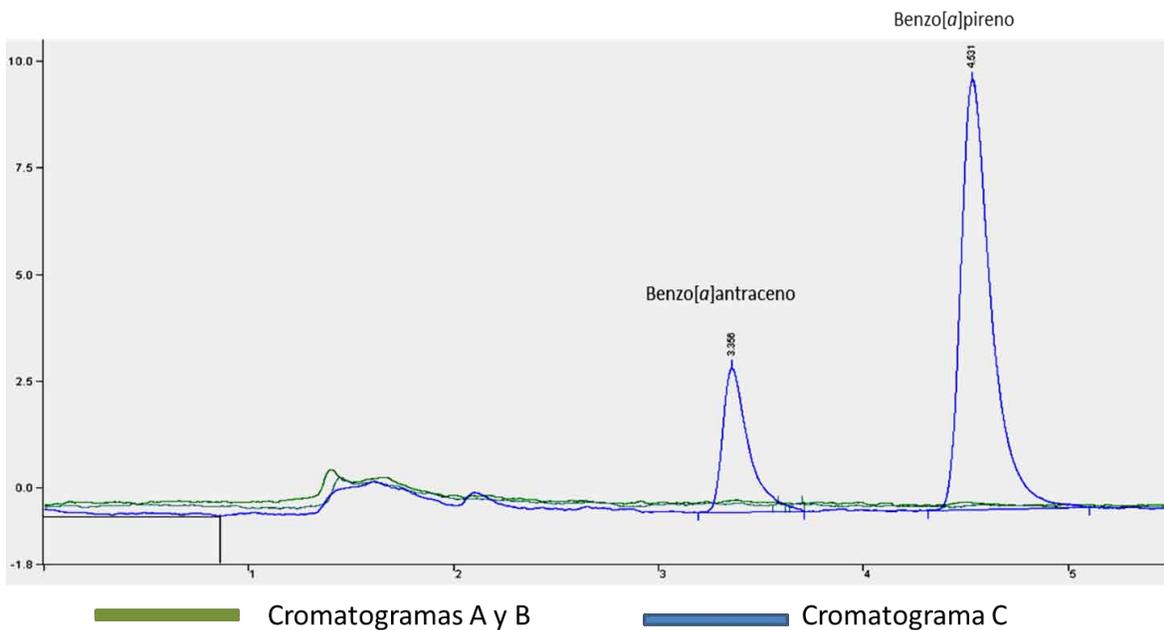


Figura 14. Cromatogramas obtenidos empleando una columna XDB-C18 con una fase móvil de MeOH al 100 % a un flujo de 1 mL min^{-1} . Cromatogramas A y B corresponden a los blancos de matriz de los tiempos 0 y 18 h. Cromatograma C: Extracto obtenido después de un tiempo de 18 h proveniente del ensayo de exposición con 50 ng mL^{-1} de HAPs

En relación con el porcentaje de recuperación del método de extracción, éste se determinó a los distintos niveles de concentración de las curvas de calibración de cada compuesto a partir del análisis de muestras adicionadas. Adicionalmente se crearon gráficos (figura 15 y 16) para la representación de los nanogramos recuperados de cada analito respecto a los adicionados, observándose en ellos una correlación de tipo lineal entre las variables. Para ambos compuestos los modelos lineales predichos fueron capaces de explicar aproximadamente el 98 % de la variabilidad de los datos. En conclusión dado que el incremento en la cantidad recuperada es proporcional a la cantidad adicionada podemos decir que el recobro es constante a través del intervalo de concentraciones probadas y que su valor se deduce de la pendiente de los gráficos construidos; dando un porcentaje de recuperación del 48 % para benzo[a]pireno y del 49 % para benzo[a]antraceno.

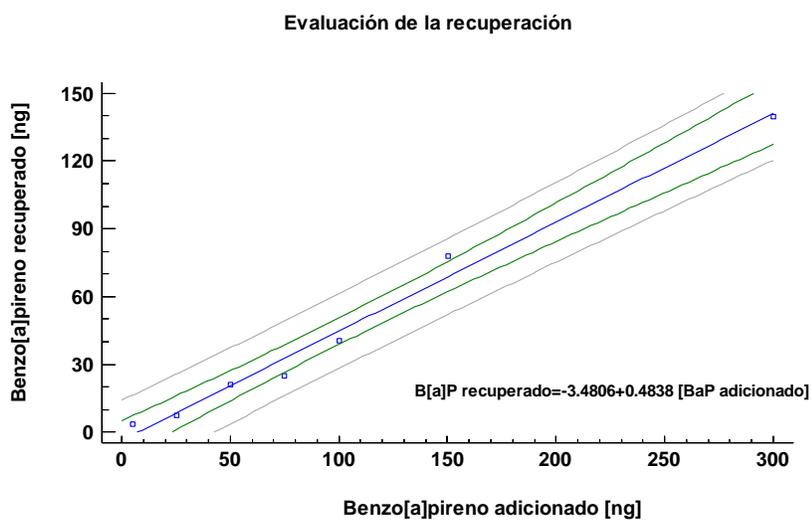


Figura 15. Evaluación de la recuperación del método para benzo[a]pireno

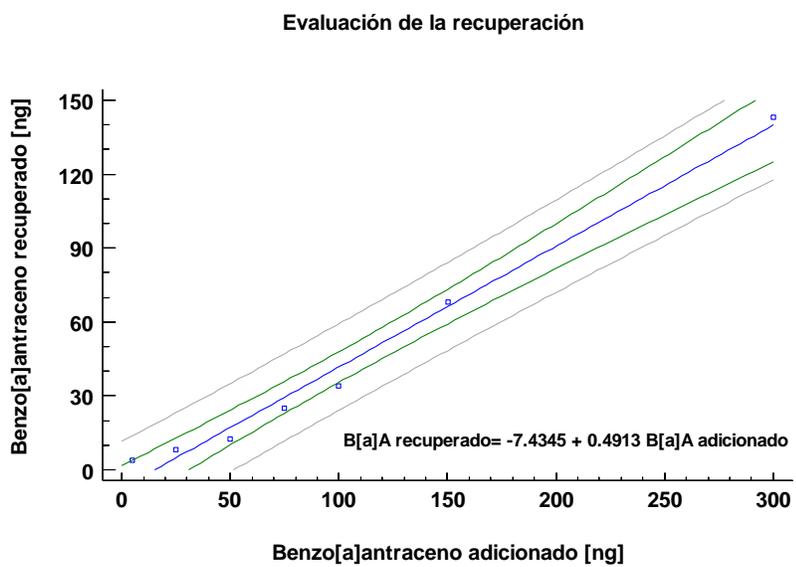


Figura 16. Evaluación de la recuperación del método para benzo[a]antraceno

5.5. Aplicación de la metodología de extracción en fase sólida en punta de micropipeta con análisis por CLAR-DF

5.5.1. Evaluación de la remoción de benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno

La estimación de la cantidad de analito presente en los extractos a los distintos tiempos y en los diferentes ensayos se hizo con base en los resultados de su respectivo análisis por CLAR-DF. En la figura 17 se muestran los cromatogramas correspondientes a algunos de los tiempos de monitoreo del ensayo con microorganismo vivos a 100 ng mL^{-1} donde se ilustra una disminución de los analitos en función del tiempo. Por otro lado, en la figura 18 se muestran los cromatogramas del ensayo con microorganismos muertos a la concentración de 50 ng mL^{-1} donde se observa que las señales de ambos analitos no presentan variaciones a los distintos tiempos del monitoreo, por lo que la tendencia parece constante.

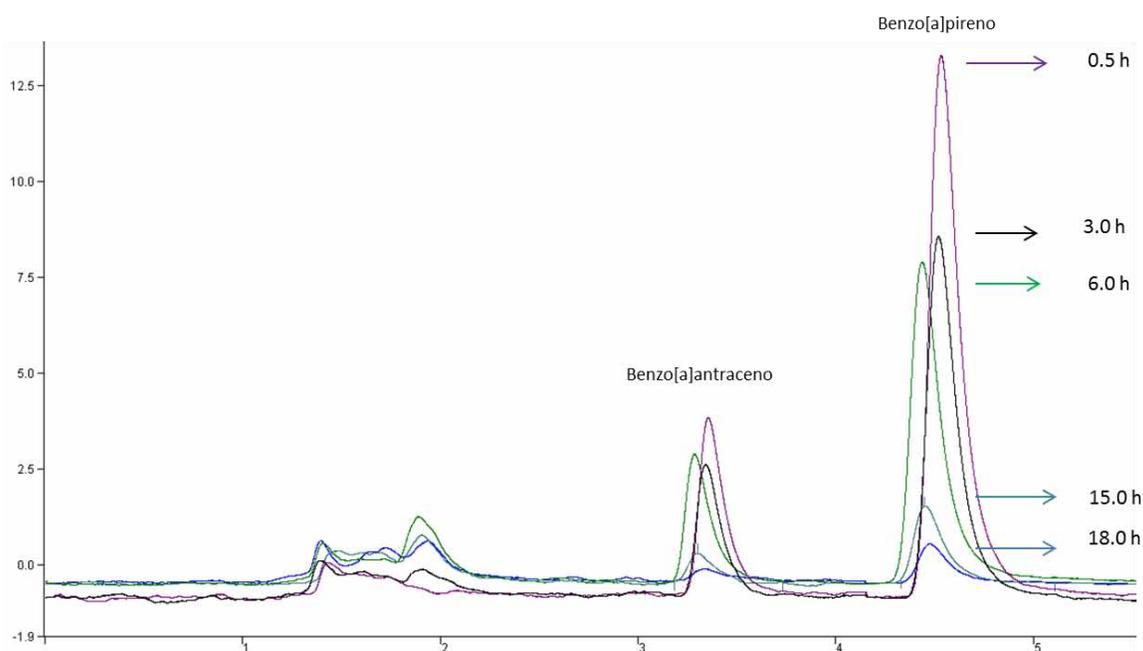


Figura 17. Cromatogramas de los extractos correspondientes a los diferentes tiempos del monitoreo del ensayo con microorganismos vivos expuestos a: 100 ng mL^{-1} de benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno

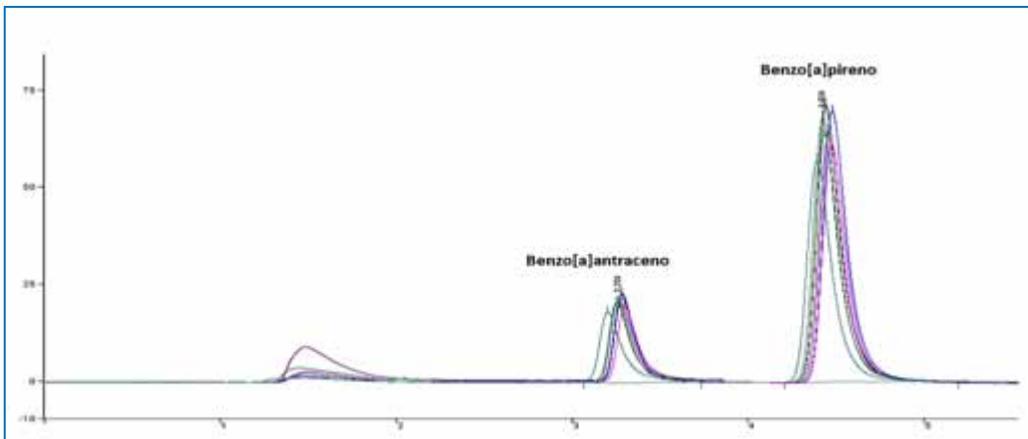


Figura 18 Cromatogramas de los extractos correspondientes a diferentes tiempos del monitoreo del ensayo con microorganismos muertos expuestos a 266 ng mL^{-1} de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno

En las figuras 19 a 24 se muestran las curvas de la cantidad recuperada promedio de los HAPs en función del tiempo en los cultivos de microalgas vivas y muertas expuestas a diferentes concentraciones de B[*a*]P y B[*a*]A. Además, la línea verde en todos los casos indica la cantidad inicial de hidrocarburo con que se adicionó el medio. Los cálculos de la cantidad de analito presente en los extractos se realizaron a partir de las curvas de calibración.

En las figuras mencionadas se puede observar que en lo que concierne a los ensayos con microorganismos muertos, las concentraciones de los analitos se mantuvieron prácticamente constantes y cercanos al valor de su concentración inicial a través de los distintos tiempos de monitoreo en los ensayos a 266 y 50 ng mL^{-1} ; mientras que en el ensayo a 100 ng mL^{-1} se observó una mayor variabilidad en los datos, la cual sin embargo, no representó más de un 20 % de la concentración inicial.

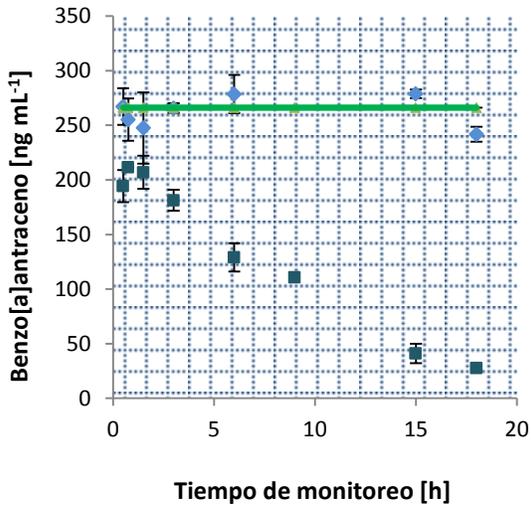


Figura 19. Concentración de B[a]A en función del tiempo de monitoreo en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 266 ng mL⁻¹

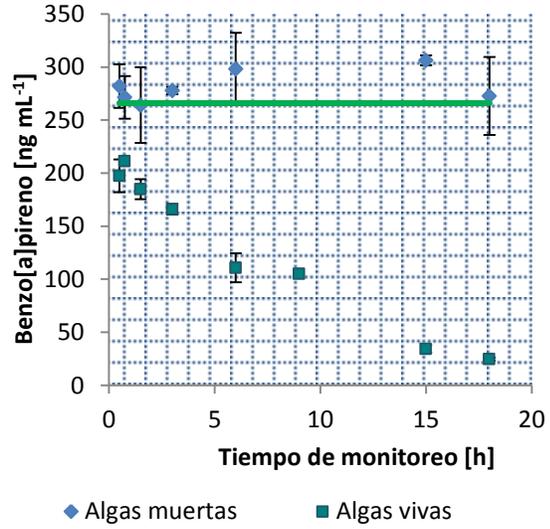


Figura 20. Concentración de B[a]P en función del tiempo de monitoreo en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 266 ng mL⁻¹

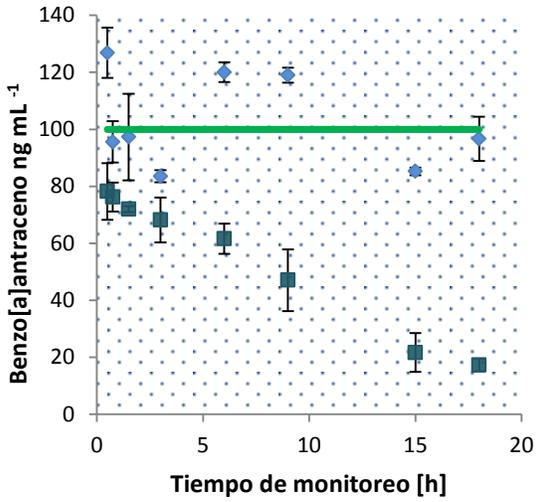


Figura 21. Concentración de B[a]A en función del tiempo de monitoreo, en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 100 ng mL⁻¹

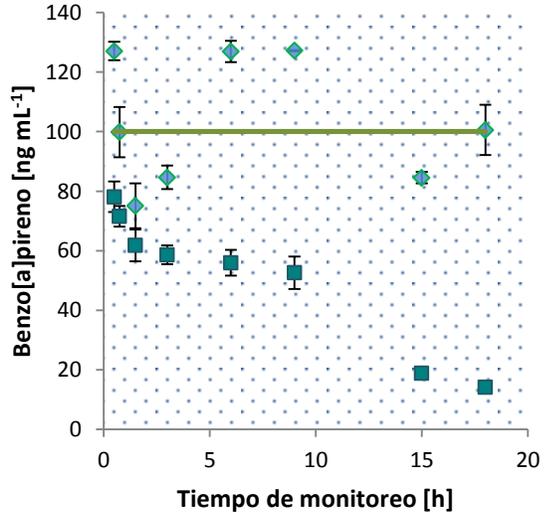


Figura 22. Concentración de B[a]P en función del tiempo de monitoreo en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 100 ng mL⁻¹

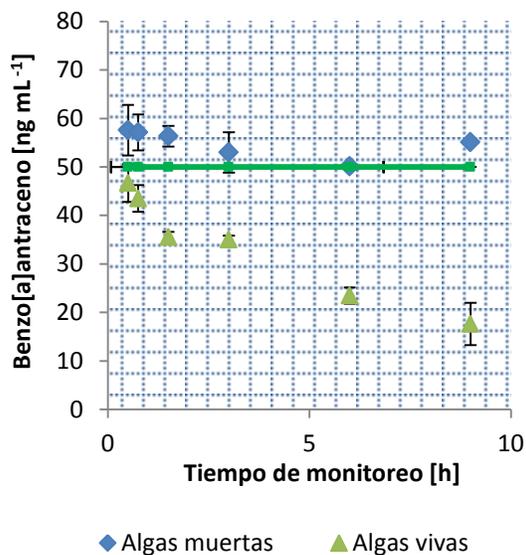


Figura 23. Concentración de B[a]A en función del tiempo de monitoreo en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 50 ng mL⁻¹

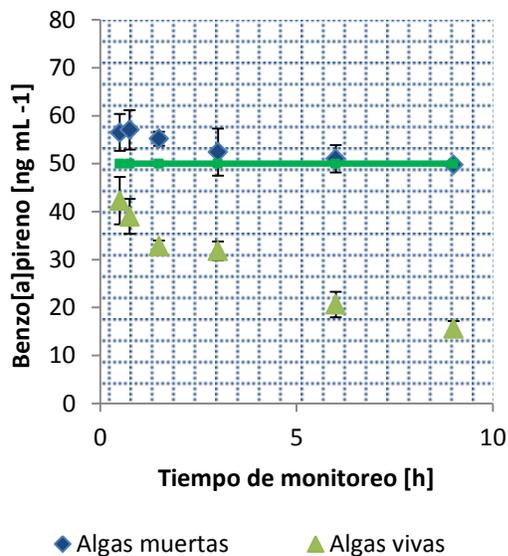


Figura 24. Concentración de B[a]P en función del tiempo de monitoreo en los ensayos de exposición con microorganismos vivos y muertos a 50 ng mL⁻¹

En el caso particular de los extractos del medio libre de microorganismos (blanco) las concentraciones fueron estimadas a partir de su comparación con un estándar correspondiente a la concentración de exposición, ya que se observó que los porcentajes de recuperación eran mayores (ver figura 25) en relación a aquellos que se obtienen en las curvas de calibración de método, debido quizás a que en términos estrictos la matriz no es igual.

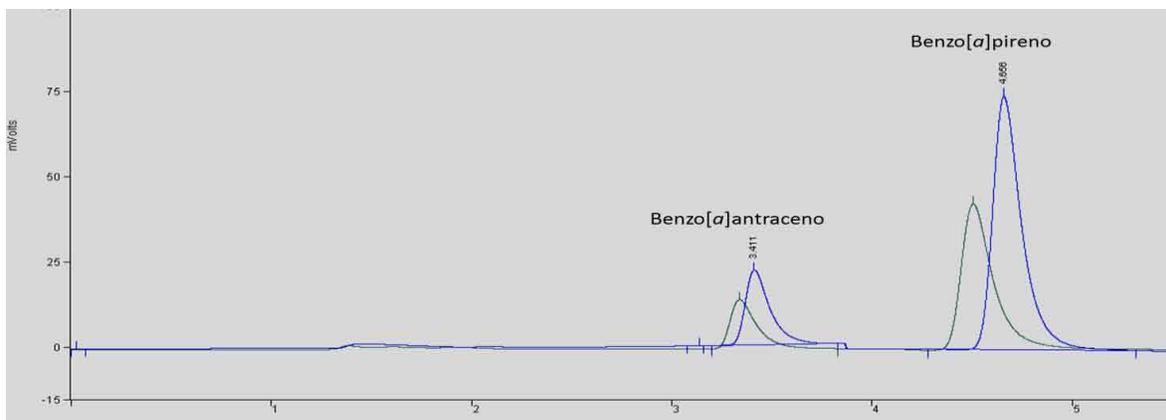


Figura 25. Comparación de la recuperación de benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno desde un medio con y sin microorganismos. En color azul se muestra el cromatograma correspondiente al extracto del medio libre de microorganismos adicionado con una concentración de HAPs de 266 ng mL^{-1} y en verde se muestra el cromatograma correspondiente al extracto de un medio adicionado con la misma concentración de HAPs pero con la presencia de microorganismos.

Por otra parte, en la figura 26 se observó que en los ensayos con microorganismos vivos el patrón de disminución de los hidrocarburos es similar; dicho comportamiento fue observado a las distintas concentraciones probadas.

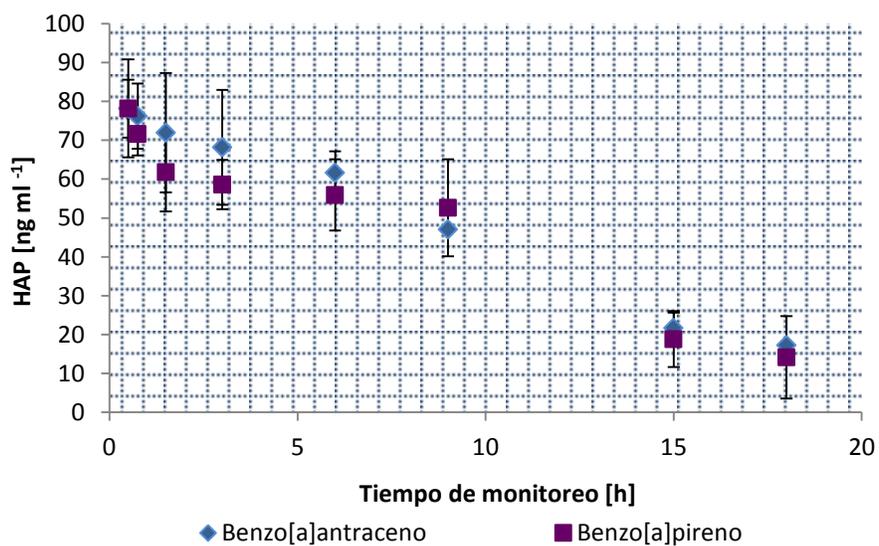


Figura 26. Comparación de la concentración de benzo[a]pireno y benzo[a]antraceno respecto al tiempo de monitoreo en el ensayo con microorganismos vivos expuestos a 100 ng mL^{-1} de HAP.

Finalmente los porcentajes de remoción de cada analito en los diferentes puntos del monitoreo se calcularon con la ecuación 5 (presentada en la sección de desarrollo experimental, apartado 4.7.1), un ejemplo de esto se muestra a continuación:

Estimación del porcentaje de remoción de benzo[*a*]pireno a partir de la concentración estimada al tiempo de 18 h en el ensayo con microorganismos vivos expuestos a 266 ng mL⁻¹ del contaminante.

$$\left(1 - \frac{24.7}{266}\right) 100 = 90.7 \%$$

Las figuras 27 y 28 muestran los resultados del porcentaje de remoción para ambos analitos. En ellas se observó que desde el primer tiempo del monitoreo (0.5 h), ya hay una disminución de la cantidad de hidrocarburo mayor o igual al 20 % excepto en el ensayo de menor concentración (50 ng mL⁻¹), donde los valores fueron de 6.7 % y 15.4 % para benzo[*a*]antraceno y benzo[*a*]pireno, respectivamente. Adicionalmente se observó una remoción alrededor del 90 % después de 18 h de exposición para los ensayos de 100 y 266 ng mL⁻¹. Por otro lado, el tiempo máximo de monitoreo para el caso de menor concentración fue de 9 h alcanzándose una remoción de 65 y 69 % para B[*a*]A y B[*a*]P, respectivamente. Dicho comportamiento, sugiere que en términos de porcentaje de remoción, la tendencia es prácticamente la misma, independientemente de la concentración de hidrocarburo con que ha sido adicionado el medio, y que no parece haber mayor o menor factibilidad por la remoción de alguno de los dos analitos probados.

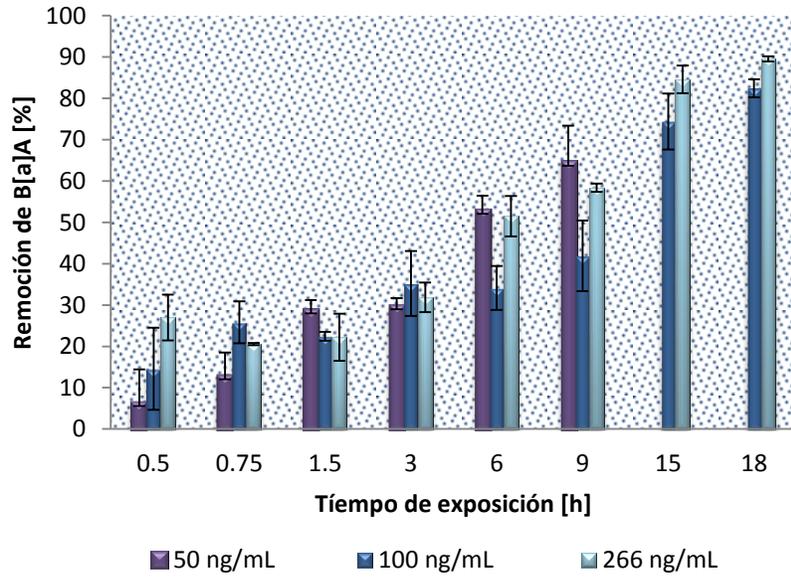


Figura 27. Comparación a tres diferentes concentraciones de la remoción de benzo[a]antraceno

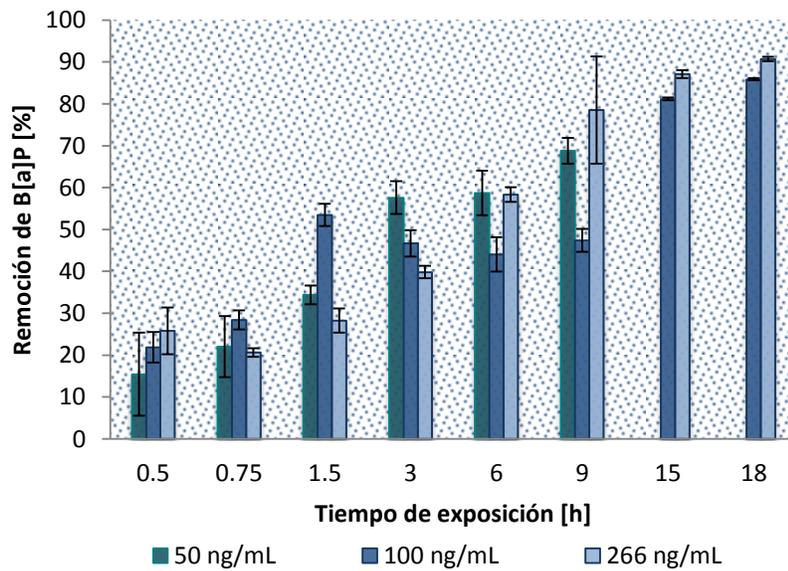


Figura 28. Comparación a tres diferentes concentraciones de la remoción de benzo[a]pireno

5.5.2. Identificación de algunos de los metabolitos formados por la microalga *Selenastrum capricornutum* durante el proceso de remoción de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno

Dado que se sabe que el proceso de remoción de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno llevado a cabo por la microalga *Selenastrum capricornutum* es debido a la degradación de los contaminantes (Warshasky *et al.*, 1995 y 2007; Olmos *et al.*, 2012) se decidió averiguar si el método de extracción en punta de micropipeta aquí desarrollado para los HAPs mencionados, también permitía extraer a los metabolitos de tipo dihidrodiol formados por las microalgas.

Para ello los extractos correspondientes a los blancos de matriz y los bioensayos de exposición con microorganismos vivos, se analizaron a través de un sistema de cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia (CLAR-DF) empleando una fase móvil de mayor polaridad en comparación con la utilizada previamente en el análisis de los HAPs. Además, es importante mencionar que bajo dichas condiciones se analizaron inicialmente disoluciones estándar correspondientes a los metabolitos de tipo dihidrodiol tanto de benzo[*a*]pireno como de benzo[*a*]antraceno.

Como resultado del análisis de los blancos de matriz, se observó que no existían señales que pudiesen ser consideradas como interferentes para la identificación de los metabolitos. En lo que respecta a los resultados de los bioensayos, únicamente en aquellos que correspondían a los tiempos de 1.5, 3 y 6 h de exposición se observaron algunos picos cromatográficos, que de acuerdo con sus tiempos de retención se infirió que podrían ser algunos de los metabolitos. A modo de ejemplo, en la figura 29 A se presenta el cromatograma del extracto del bioensayo a 3 h. En él aparecen dos señales que podrían corresponder con el 10-11 dihidrodiol benzo[*a*]antraceno y el 7-8 dihidrodiol benzo[*a*]pireno, ya que se presentan en los mismos tiempos de retención de éstos. Lo anterior se verificó a través de la adición de una disolución que contenía una mezcla de estándares de los metabolitos (9-10, 4-5 y 7-8 dihidrodiol B[*a*]P; además de, 5-6, 8-9 y 10-11 dihidrodiol B[*a*]A) sobre el extracto anteriormente analizado, lo que dio como

resultado un incremento en la señal cromatográfica de los picos inicialmente identificados, esto se ilustra en el cromatograma B de la figura 29.

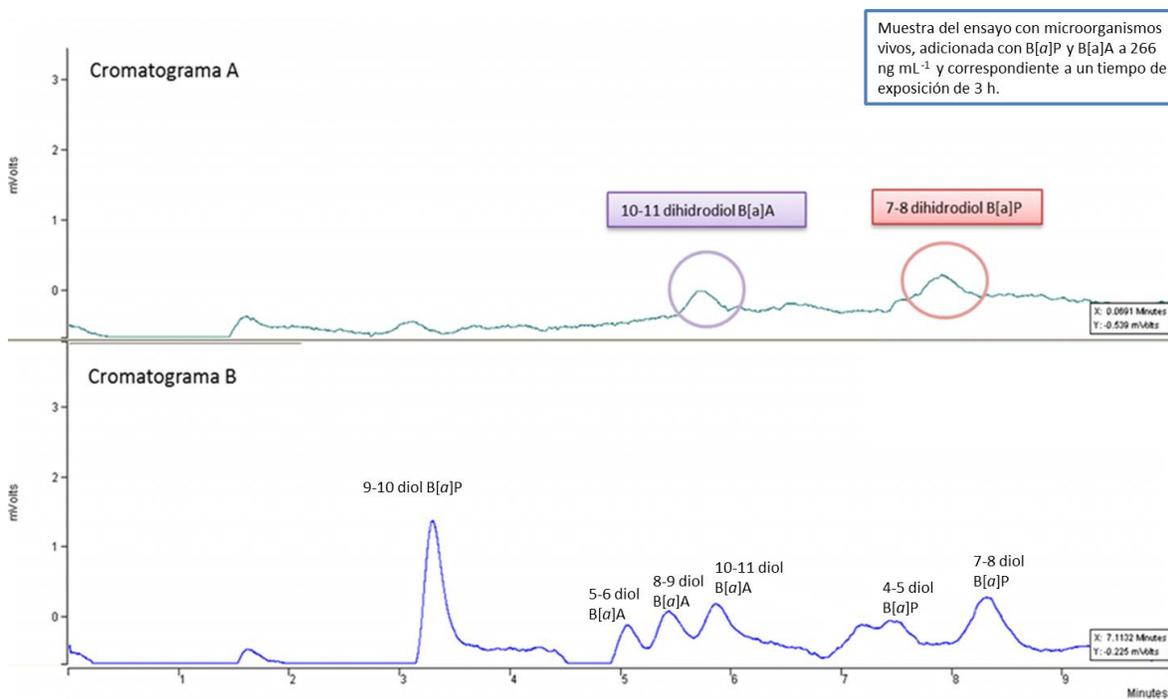


Figura 29. Cromatogramas comparativos de: A) extracto del ensayo de exposición con microorganismos vivos a 3 h y B) el mismo extracto con adición de una mezcla de metabolitos. Condiciones de análisis: sistema CLAR-DF, columna: XDB-C18 y fase móvil 70 % metanol 30 % agua a un flujo de 1 mL min⁻¹

Por otra parte, en la figura 30 se observa como varía la intensidad de las señales identificadas del extracto de 3 h (cromatograma B) comparadas con las del extracto de 6 h (cromatograma C). En este último se observó además la aparición de dos nuevas señales las cuales se asociaron con los estándares del 9-10 dihidrodiol benzo[*a*]pireno y el 5-6 dihidrodiol benzo[*a*]antraceno; con base en los tiempos de retención del extracto adicionado con estándares, presentado previamente en la figura 29 B. En la figura 30 también se observó que al tiempo de monitoreo de 1.5 h aún no se detectaron los metabolitos.

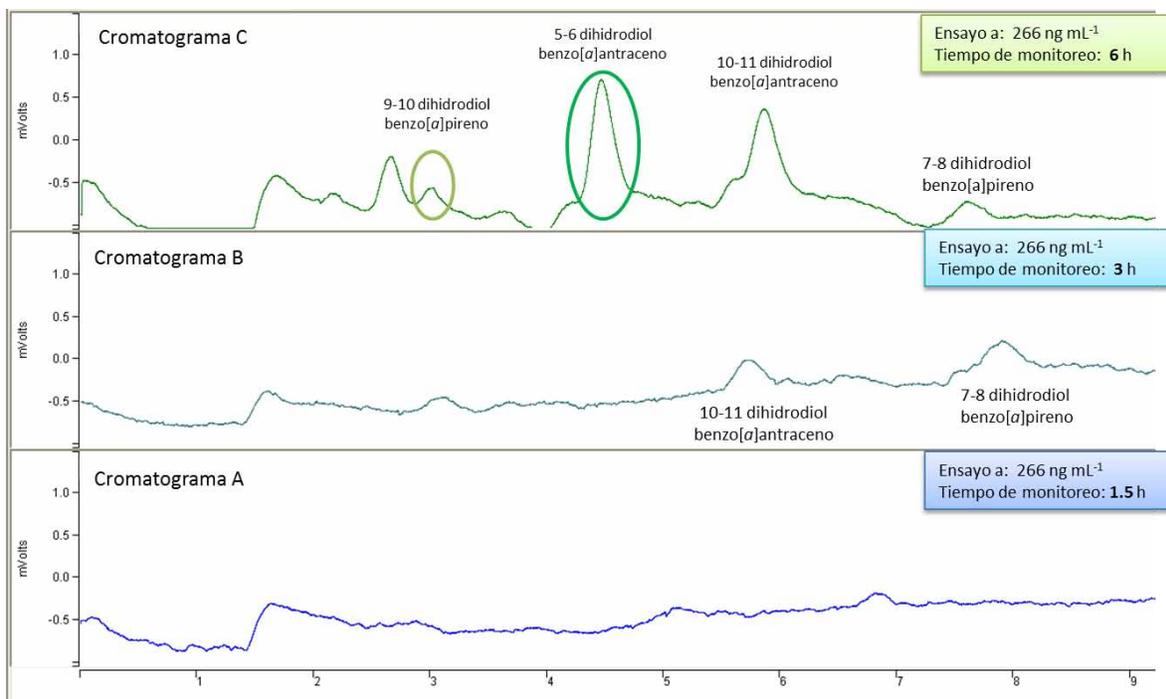


Figura 30. Identificación de metabolitos en los extractos a 1.5, 3 y 6 h del ensayo a 266 ng mL^{-1} . Condiciones de análisis: sistema CLAR-DF, columna: XDB-C18 y fase móvil 70 % metanol 30 % agua a un flujo de 1 mL min^{-1}

Finalmente, con base en los resultados obtenidos del análisis por CLAR-DF se decidió corroborar la presencia de los metabolitos identificados en los extractos de 3 y 6 h, a través de un sistema de cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica de arreglo de diodos (CLAR-DAD). Para ello los extractos obtenidos por extracción en fase sólida en punta de micropipeta se preconcentraron en una precolumna acoplada en línea al sistema cromatográfico, para posteriormente llevar a cabo su análisis y con ello la obtención de los espectros de cada uno de los picos cromatográficos presentes en la muestra; los cuales se compararon con los correspondientes a los de los estándares de los metabolitos para así poder llevar a cabo la identificación.

La determinación de los tiempos de retención de los metabolitos (9-10, 4-5 y 7-8 dihidrodiol benzo[a]pireno y 5-6, 8-9 y 10-11 dihidrodiol benzo[a]antraceno) en el sistema CLAR-DAD se hizo a partir de la inyección directa de una disolución estándar de los mismos. En la figura 31 A se muestra el cromatograma correspondiente a dicho análisis.

Mientras que el cromatograma B de ésta misma figura corresponde al extracto preconcentrado de 6 h; a partir del cual se logró corroborar la presencia del 7-8 dihidrodiol benzo[*a*]pireno, el 10-11, el 5-6 dihidrodiol benzo[*a*]antraceno y el 9,10 dihidrodiol benzo[*a*]pireno que previamente habían sido identificados en el análisis por CLAR-DF. Respecto al 7-8 dihidrodiol benzo[*a*]pireno es importante mencionar que aun cuando su señal cromatográfica fue muy pequeña, la identificación espectral (presentada en la figura 32) corroboró la presencia de dicho analito; por el contrario en el caso del 9-10 dihidrodiol benzo[*a*]pireno aun cuando en el extracto preconcentrado existe una señal cromatográfica que coincide con el tiempo de retención de dicho analito, la identificación espectral no fue posible. Adicionalmente en el cromatograma B de la figura 31 se muestra una señal que corresponde con el 4-5 dihidrodiol benzo[*a*]pireno quien no se identificó través del sistema CLAR-DF.

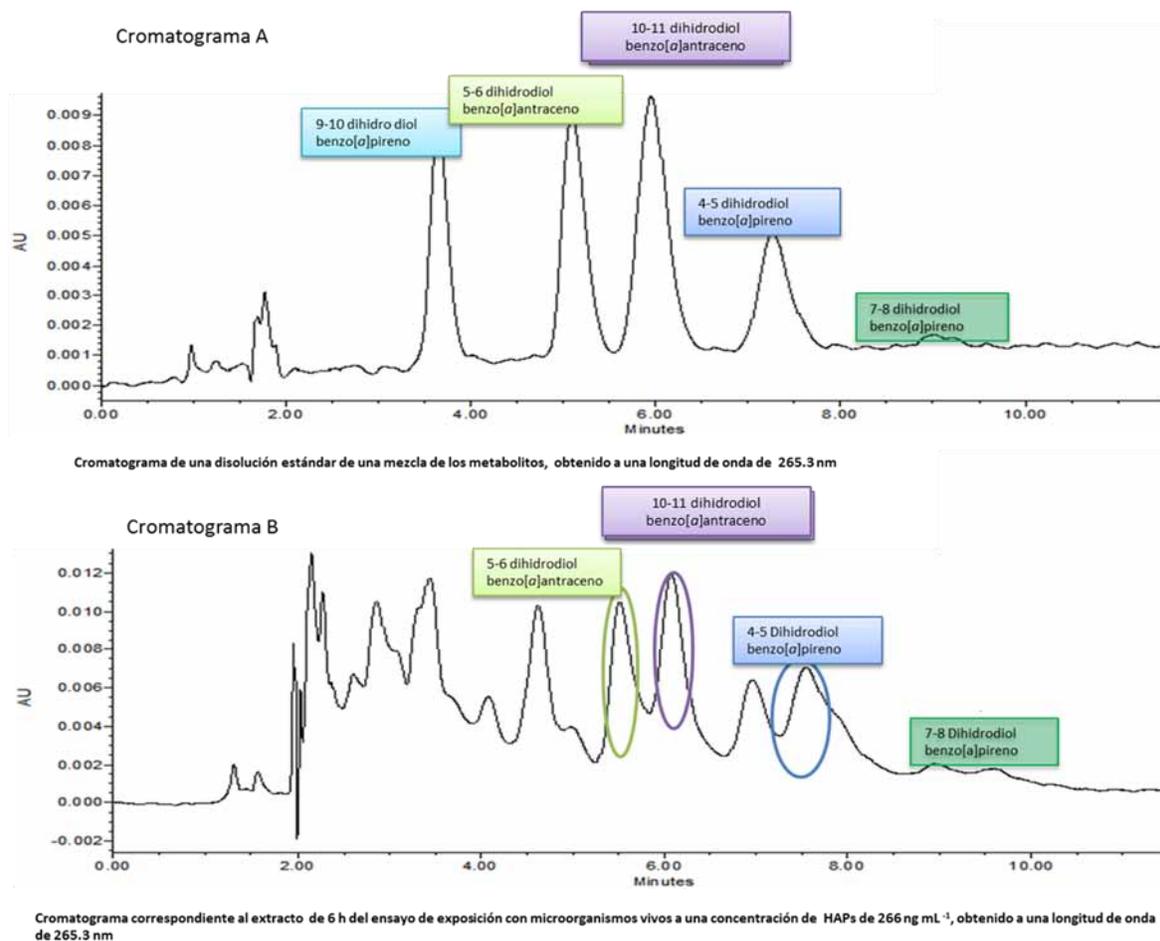


Figura 31. Separación de metabolitos en: A) una disolución estándar por inyección directa y en B) el extracto preconcentrado de 6 h del ensayo a 266 ng mL⁻¹. Condiciones de análisis: sistema CLAR-UV, columna: C18 y fase móvil 70 % metanol 30 % agua a un flujo de 1 mL min⁻¹. Las longitudes de onda de detección fueron 265.3 y 364.2 nm

Finalmente, como sustento de la identificación de los metabolitos, en la figura 32 se muestra una comparación entre los espectros de los estándares de algunos de los metabolitos así como los provenientes de las señales identificadas en el cromatograma del extracto a 6 h presentado previamente.

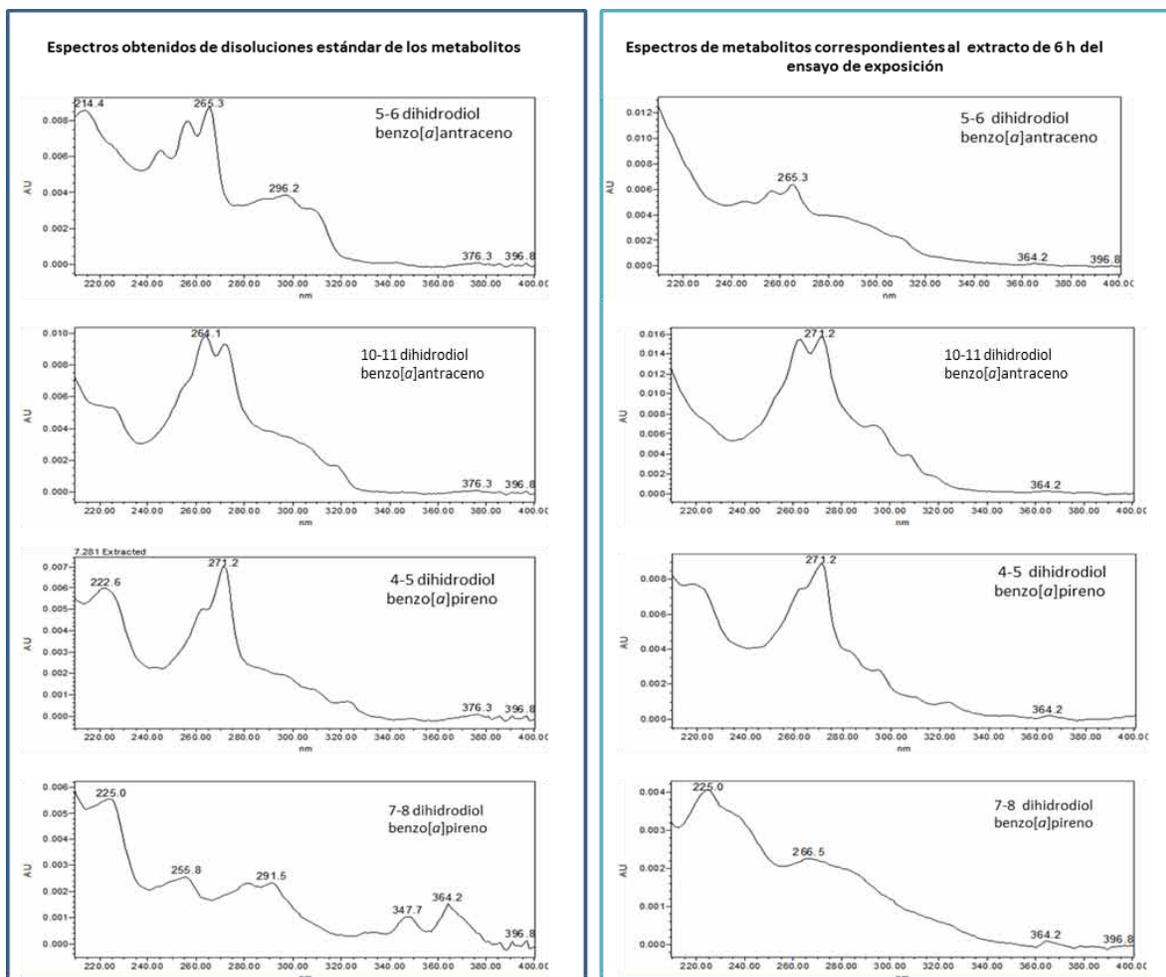


Figura 32. Espectros obtenidos de las señales correspondientes a los picos de los metabolitos en una disolución con los estándares y en el extracto a 6 h. Condiciones de análisis: sistema CLAR-UV, columna: C18 y fase móvil 70 % metanol 30 % agua a un flujo de 1 mL min^{-1}

Finalmente, los metabolitos de benzo[a]pireno identificados en este trabajo coinciden con los reportados en la literatura (Warshasky *et al.*, 1995 y Olmos *et al.*, 2012), cabe mencionarse que no fue posible la identificación espectral del 9-10 dihidrodiol porque se confunde con interferencias de la matriz. Sin embargo, en relación a la identificación de los metabolitos de benzo[a]antraceno los metabolitos detectados coinciden con lo encontrado en otros trabajos desarrollados en nuestro grupo de trabajo aún no publicados.

Por tanto, es importante mencionar que nuestra metodología permitió tanto la evaluación de la remoción de los hidrocarburos probados, así como la identificación del: 5-6 y 10-11 dihidrodiol benzo[*a*]antraceno y el 4-5 y 7-8 dihidrodiol benzo[*a*]pireno lo cual confirmó que el proceso de remoción antes mencionado, involucra no sólo una adsorción del contaminante en el microorganismo; sino que además existe una transformación química del mismo.

VI. Conclusiones

La extracción en punta de micropipeta con las condiciones optimizadas: 50 mg de sílice C18, acondicionamiento con 200 μ L de acetonitrilo en un sólo ciclo y cinco ciclos posteriores con 200 μ L de agua, un sólo ciclo de carga para 1 mL de muestra y una elución con 0.5 mL de acetonitrilo, resultó ser adecuada para el aislamiento en conjunto de benzo[*a*]pireno y benzo[*a*]antraceno en un intervalo de concentraciones de 5 a 300 ng mL⁻¹.

La validación instrumental y de método mostró que las concentraciones de cada uno de los HAPs y la respuesta obtenida de su análisis se encuentran correlacionadas linealmente, lo que concordó con las pruebas de ANOVA y los valores del coeficiente de determinación (r^2) superiores o iguales a 0.99.

La metodología desarrollada fue selectiva y precisa (valores de C.V. \leq 15 %). Presentó valores de recuperación independientes de la concentración de analito y que corresponden con 48 y 49 % para benzo[*a*]antraceno y benzo[*a*]pireno respectivamente.

Los límites de detección y cuantificación del método fueron de 0.71 y 0.89 ng mL⁻¹ y de 2.3 y 2.9 ng mL⁻¹ para B[*a*]P y B[*a*]A respectivamente.

La metodología desarrollada y validada permitió la cuantificación de B[*a*]A y B[*a*]P en bioensayos de exposición con la microalga *Selenastrum capricornutum* obteniéndose así el monitoreo de sus concentraciones en el tiempo.

Los ensayos de exposición con microorganismos muertos indicaron que no hay una remoción mayor al 20 % del hidrocarburo durante todo el periodo de monitoreo y que esto es independiente de la concentración del contaminante adicionada inicialmente al medio de cultivo. Los ensayos con microorganismos vivos arrojaron un porcentaje de remoción alrededor del 90 % a un tiempo de 18 h para los ensayos a 100 y 266 ng mL⁻¹; aunado a ello, la tendencia en la remoción tanto de benzo[*a*]pireno como de benzo[*a*]antraceno fue similar en todos los casos.

Finalmente fue posible el aislamiento y la identificación del 7-8-dihidrodiol benzo[*a*]pireno, del 10-11 y 5-6 dihidrodiol-benzo[*a*]antraceno y del 4-5 dihidrodiol-benzo[*a*]pireno, indicando que la remoción es efectuada no sólo por adsorción sino por el metabolismo de la propia microalga.

Referencias:

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1995). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA: US. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Aitken, M., Stringfellow, W., Nagel, R., Kazunga, C., y Chen S. (1998). Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 743-752.

Almaula, S. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons from steelmaking. *Environmental Forensics*, 6 (2), 143-150.

Arey y Atkinson. (2003). Photochemical reactions of PAH in the atmosphere. In: Douben, P.E.T., ed., PAHs: An Ecological Perspective, New York, John Wiley & Sons, pp 47-63.

Barro, R., Regueiro, J., Lompart, M., y García, C. (2009). Analysis of industrial contaminants in indoor air: Part 1. Volatile organic compounds, carbonyl compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. *Journal of Chromatography A*, 1216, 540-566.

Blaha, L., Kapplová, P., Vondráček, J., Upham, B., y Machala, M. (2002). Inhibition of gap-junctional intracellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology Science*, 65 (1), 43-51.

Booth, R., y Gribben, K. (2005). A review of formation, environmental fate, and forensic methods for PAHs from aluminum smelting processes. *Environmental Forensics*, 6, 133-142.

Bostrom, E., Engen, S., y Eide I. (1998). Mutagenicity testing of organic extracts of diesel exhaust particles after spiking with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Archives of Toxicology*, 72, 645-649.

Brown, J., y Thornton J. (1957). Percivall Pott and chimney sweeper's cancer of the scrotum. *Occupational and Environmental Medicine*, 14, 68-70.

Burdick, A., Davis, J., Liu, K., Hudson, L., Shi, H., Monske, M., y Burchiel, S. (2003). Benzo[a]pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cell. *Cancer Research*, 63, 7825-7833.

Buseti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., y 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.

Buterin, T., Hess, M., Luneva, N., Geacintov, N., Amin, S., Kroth, H., Seidel, A., y Naegeli N. (2000). Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in *ras* codon 61 mutational hot spots. *Cancer Research*, 60, 1849-1856.

Cajthaml, T., Moder, M., Kacer, P., Sasek, V., y Popp, P. (2002). Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 974, 213-222.

Cerniglia, C (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology*, 30, 31-71.

Cerniglia (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons National Center for Toxicological Research, Jefferson, USA *Current Opinion in Biotechnology* 4, 331-338.

Chen, S., Nguyen, N., y Tamura, K. (2003). The role of Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 19526-19533.

Cheng, J., Matzadiq, G., Liu, L., Zhou, W., y Chen, G. (2011). Development of a novel ultrasound assisted surfactant enhanced emulsification extraction and its application to the analysis of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2476-2482.

Cram S., Siebe C., Ortiz R., y Herre, A. (2004). Mobility and persistence of petroleum hydrocarbons in peat soils of Southeastern Mexico. *Soil and Sediment Contamination*. 13(5). CRC- Lewis, Florida, USA.

Dean-Ross, D., Moody, J., y Cerniglia, C. (2002). Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 1-7.

Deschamps, B., Daudin, J., y Barriuso, E. (2007) An experimental design approach to design to optimize to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from rainfall water using stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatography- fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1167, 143-153.

Fard, K., Ghanemi, K., Nikpour., y Mehrjardi, F. (2012). Application of sulfur microparticles for solid phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from sea water and wastewater samples. *Analytica Chimica Acta*, 714, 89-97

Filipkowska, A., Lubecki, L., y Kowalewska, G. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment. *Analytica Chimica Acta*, 547, 243-254

Guo, L., y Lee, H. (2011). Low density solvent based solvent demulsification dispersive liquid liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5040-5046.

Habe, H., y Omori, T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 225-243.

Haristash, A., y Kaushik, C. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 1-15.

Hasegawa, C., Kumazawa, T., Terada, M., Lee, X.P., Sato, K., Uchigasaki, S., y Kurosaki, K. (2012). A new method for quantitative determination of Dimemorfan in human plasma using monolithic silica solid phase extraction tips. *Legal Medicine*, 14, 267-271.

Henion M.C., CauDit C., y Pichon V. (1998) Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples. Tools for the rapid prediction and optimization of the solid phase extraction parameters. *Journal of Chromatography A*, 823, 147-161.

Hong, S., Loha, B., Mohd, C., Wan, I., y Mohamed N. (2013). Solvent-impregnated agarose gel liquid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Chromatography A*, 1302, 14– 19.

Hout van M.W.J., Egmond van W.M.A., Franke J.P., Zeeuw R.A., Jong G.J., (2001). Feasibility of the direct coupling of solid phase extraction pipette tips with a programmed temperature vaporizer for gas chromatographic analysis of drugs in plasma. *Journal of Chromatography B*, 766, 37-45.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2010). In: Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Vol 92. Lyon France pp 35.

Jeffy, D., Chen, J., y Gudas, M. (2000). Disruption on cell cycle kinetics by benzo[a]pyrene: inverse expression patterns of BRCA-1 and p53 in MCF-7 cells arrested in S and G2. *Neoplasia*, 2, 460-470.

Jeffy, D., Chirnomas, B., y Chen J. (2002). Activation of the aromatic hydrocarbon receptor pathway is not sufficient for transcriptional repression of BRCA-1: requirements for metabolism of benzo[a]pyrene to 7r,8t-dihydroxy-9t,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Cancer Research*, 62, 113-121.

Keough, T., Lacey, M., y Youngquist. (2002). Solid-phase derivatization of tryptic peptides for rapid protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in Mass Spectrometry*, 16, 1003-1015.

Kolahgar, B., Hoffmann, A., y Heiden A. (2002). A pplication of stir bar sorptive extraction to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 963, 225-230.

Kumazawa, T., Hasegawa, C., Lee, X., Hara, K., Seno, H., Suzuki, O., y Sato, K. (2007). Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44, 602-607.

Kumazawa, T., Hasegawa, C., Lee, X., Marumo, A., Shimmen, N., Ishii, A., Seno H., y Sato K. (2006). Pipette tip solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of mequitazine in human plasma. *Talanta*, 70, 474-478.

Krüger, O., Christoph, G., Kalbe, U., y Berger, W., (2011). Comparison of stir bar sorptive extraction (SBSE) and liquid liquid extraction (LLE) for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in complex aqueous matrices. *Talanta*, 85, 1428-1434.

Lafleur, J., Rackov, A., McAuley, S., y Salin, E. (2010). Miniaturised centrifugal solid phase extraction platforms for in-field sampling, preconcentration and spectrometric detection of organic pollutants in water samples. *Talanta*, 81, 722-726.

Lai, J., Niessner, R., y Knopp. (2004). Benzo[a]pyrene imprinted polymers synthesis characterization and SPE application in water and coffee samples. *Analytica Chimica Acta*, 522, 137-144

Li, Y., Wang, Y., y Zhang, J. (2012). Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorinated polyaniline based solid phase microextraction coupled with gas chromatography. *Environmental Monitoring Assessment*, 184, 4345-4353.

Miller K., y Ramos, K. (2001). Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metabolism Reviews*, 33, 1-35

Mueller, J., Cerniglia, C., y Pritchard, P. (1996). Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Crawford RL, Crawford DL (eds) *Bioremediation: Principles and Applications*, Cambridge University Press, U.K., pp 1215-1294

Narro, M., Cerniglia, C., Van Baalen, C., y Gibson, D. (1992). Evidence for a NIH Shift in Oxidation of Naphthalene by the Marine Cyanobacterium *Oscillatoria* Species Strain JCM. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1360-1363

Olmos Espejel, J. (2013). Metodologías cromatográficas en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microorganismos. (Tesis doctoral inédita). Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. México

Olmos, E., García de Llasera, M., y Velasco, C. (2012). Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1262, 138-142.

Patel, T., y Gibson, D (1974). Purification and properties of (+)-cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas putida* *Journal of Bacteriology*, 19, 879-888

Park, K., Sims, R., Dupont, R., Dougette, W., y Matthews, J. (1990). Fate of PAH Compounds in two Soil Types: Influence of Volatilization, Abiotic Loss and Biological Activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 187-195

Peñalvert, A., Pocurull, E., Borull, F., y Marceè, R. (1999). Trends in solid phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 8(8), 557-568.

Petry, T., Schmid, P., y Schlatter, C. (1996). The use of toxic equivalency factors in assessing occupational and environmental health risk associated with exposure to airborne mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Chemosphere*, 32, 639:648.

Phillips, D. (1983). Fifty years of benzo[a]pyrene. *Nature*, 303, 468-472.

Pluskal, M., Bogdanova, A., Lopéz, M., Gutiérrez, S., y Pitt, A. (2002). Multiwell in-gel protein digestion and microscale simple preparation for protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*, 2, 145-150.

Ramos, L. (2012). Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221, 84-98.

Ravindra, K., Sokhi, R., y Van Grieken R. (2008^a). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42, 2895-2921.

Rummel, A., Trosko, J., Wilson, M., y Upham, B. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons with bay-like regions inhibited gap junctional intracellular communication and stimulated MAPK activity. *Toxicological Science*, 49, 232-240.

Sanglard, D., Leisloa, M., y Fiechter, A. (1986). Role of extracellular liginases in biodegradation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microbial Technology*, 8, 209-212.

Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., y Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benz[a]anthracene and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 13-19.

Shah, G., y Bhattacharya, K. (1989). Alteration in hepatic nuclear RNA polymerase activity following benzo[a]pyrene administration in rat. *In Vivo* 3, 125-127.

Sharaovskaia I., Rokitskaia TI., Kobliakov VA. (2003). Efect of some polycyclic aromatic hydrocarbons on gap junction intracellular communication in hepatoma Hep G2 cell culture. *Tsitologiya*, 45, 51-58.

Shuttleworth, K., y Cerniglia C. (1995). Environmental aspects of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 54, 291-302.

Sing, A., y Ward, O. (2004). Biodegradation and Bioremediation: Series: Soil Biology VOL 2, Springer- Verlag, New York.

Sun, N., Han Y., Yan H., y Song Y. (2014). A self assembly pipette tip graphene solid phase extraction coupled with liquid chromatography for the determination of three sulfonamides in environmental water. *Analytica Chimica Acta*, 810, 25-31.

Tran, T., Amador, M., Purcaro, G., y Marriott P. (2007). Gas chromatographic analysis of polyaromatic hydrocarbons. *Research Signpost*, 2-22.

Trielli, F., Amaroli, A., Sifredi, F., Marchi, B., Falugi, C., y Delmonte, C. (2007). Effects xenobiotic compounds on the activities of *Euplotes crassus*, a single-cell eukaryotic test organism from the study of the pollution of marine sediments. *Aquatic Toxicology*, 83, 272-283.

Trzesicka-Mlynarz, D., y Ward, O. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 470-476.

Urbe, I., y Ruana, J. (1997). Application of solid phase extraction discs with glass fiber matrix to fast determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Chromatography A*, 778 337

Velasco Cruz, M., (2011). Metodología analítica cromatográfica para la determinación de metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microalgas. (Tesis de licenciatura inédita). Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. México. .

Walter, U., Beyer, M., Klein, J., y Rehm, H. (1991). Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 671-676.

Wardencki, W., Curyto, J., y Namieśnik, J. (2007). Trends solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 275–288.

Warshawsky, D., Keenan, T., Reilman, R., Cody, T., y Radike, M. (1990). Conjugation of benzo[a]pyrene metabolites by the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Chemico-Biological Interactions*, 73, 93-105.

Wild S., y Jones, C. (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget, *Environmental Pollution*, 88(1) 91-108.

WHO (World Health Organization). (1998). Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental health criteria. Vol 202. International programme on chemical safety, Geneva, Switzerland.

Wu, Y., Xia L., Chen, R., y Hu, B. (2008) Head space single drop microextraction combined with HPLC for determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *Talanta*, 74, 470-477