



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

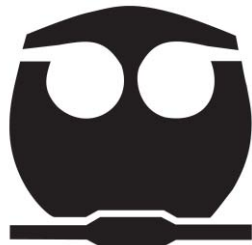
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM INMOVILIZADA
EN ALGINATO PARA REMOVER BENZO[A]PIRENO
DE MEDIO DE CULTIVO ACUOSO.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:
DULCE NAYELI BERNAL TORIS**



MÉXICO, D.F.

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JOSEFINA ELIZALDE TORRES

VOCAL: Profesor: MARÍA DEL ROSARIO COVARRUBIAS HERRERA

SECRETARIO: Profesor: MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

1er. SUPLENTE: Profesor: SILVIA CITLALLI GAMA GONZALEZ

2° SUPLENTE: Profesor: JOSE GUADALUPE DE LA ROSA CANALES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Martha Patricia García Camacho

SUSTENTANTE:

Dulce Nayeli Bernal Toris

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por darme la oportunidad de aprender y por la formación profesional adquirida.

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo y la beca otorgada en el proyecto PAPIIT IT203214 *Bioremoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos acuosos con microalgas libres e inmovilizadas* y también 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 Dra. Martha Patricia García por su asesoría durante la realización de este trabajo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	12
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	13
1.1. Características generales de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).	13
1.1.1. Características de benzo(a)pireno	14
1.2. Toxicidad	15
1.3. Fuentes de HAPs	16
1.4. Remoción de HAPs	18
1.5. Inmovilización de microorganismos.....	20
1.5.1. Inmovilización de microalgas	21
1.5.2. Inmovilización pasiva	21
1.5.3. Inmovilización activa	22
1.5.3.1. Agentes floculantes.....	22
1.5.3.2. Unión química.....	23
1.5.3.3. Inmovilización en polímeros.....	23
1.6. Inmovilización en alginato de calcio	24
1.7. Características de <i>Selenastrum capricornutum</i>	28
1.8. Análisis de HAPs en muestras complejas	29
1.8.1. Extracción en fase sólida (EFS).....	31
1.8.2. Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS).....	33
1.9. Cromatografía de líquidos	34
1.9.1. Parámetros cromatográficos	35
CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	38
2.1. Material y equipo	38
2.1.1. Sistema cromatográfico	38
2.1.2. Preparación de muestras	38
2.1.2.1. EFS y DMFS	38
2.1.3. Disolventes, reactivos y estándares.....	39
2.1.4. Inmovilización.....	39

2.1.5. Medio de cultivo con microalgas <i>Selenastrum capricornutum</i>	39
2.2. Metodología Experimental.....	41
Figura 2.1. Esquema general de experimentación.....	42
2.3. Optimización de las condiciones de inmovilización	43
2.3.1. Selección de las concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio	43
2.3.1. Viabilidad celular	43
2.4. Obtención de muestras	43
2.5. Validación del sistema cromatográfico.....	44
2.5.1. Linealidad del sistema.....	44
2.5.2. Precisión del sistema.....	44
2.5.3. Límites de detección y cuantificación del sistema.....	45
2.6. Extracción en fase sólida.....	45
2.6.1. Disolución del precipitado con citrato de sodio	46
2.6.2. Lavado del matraz vacío con diferentes porcentajes de isopropanol	46
2.6.3. Método de extracción en fase sólida modificado.....	46
2.6.4. Validación de la metodología de EFS-CLAR-UV	47
2.6.4.1. Linealidad del método.....	47
2.6.4.2. Precisión del método	47
2.8. Método de dispersión de matriz en fase sólida	48
2.8.1 Validación del método de DMFS.....	49
2.8.1.2. Linealidad del método.....	49
2.8.1.3. Precisión del método	49
2.9. Bioensayos de exposición.....	50
2.9.1. Efecto de la temperatura	51
2.9.2. Efecto de la cantidad de algas por cuenta	51
2.9.3. Comparación con algas libres.....	51
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1. Optimización de las condiciones de inmovilización	52
3.1.1. Selección de las concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio	52
3.1.2. Procedimiento global para inmovilizar a <i>S. capricornutum</i>	53

3.1.3 Viabilidad celular	55
3.2. Validación del sistema	55
3.2.1. Linealidad.....	55
3.2.2. Precisión	56
3.2.3. Límites de detección y de cuantificación instrumentales	56
3.3. Extracción en fase sólida.....	57
3.4. Validación de las metodologías EFS y DMFS	58
3.4.1. Linealidad.....	58
3.4.2. Precisión	59
3.5. Bioensayos de exposición a BaP	60
3.5.1. Evaluación de la capacidad de <i>S. capricornutum</i> inmovilizada para remover BaP del medio de cultivo.	60
3.5.2. Efecto de la temperatura	63
3.5.3. Efecto de la cantidad de microalgas por cuenta.....	64
3.5.4. Comparación con algas libres	66
CAPITULO 4. CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA.....	73
Anexo I.....	78
Anexo II.....	79

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
BaP	Benzo(a)pireno
C₈	Octil silano
C₁₈	Octadecil silano
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLAR-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detector de arreglo de diodos
CLAR-DFL	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detector de fluorescencia
CLAR-UV	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detector UV
%CV	Porcentaje de coeficiente de variación
DMFS	Dispersión de matriz en fase sólida
EFS	Extracción en fase sólida
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
LLE	Extracción líquido-líquido
MeOH	Metanol
PVA	Polivinil alcohol
PEG	Polietilen glicol
PCS	Policarbomil sulfato
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura de los HAPs	14
Figura 1.2. Modelo de la “caja de huevo” que representa la coordinación de calcio con cadenas de guluronato donde los círculos negros son los átomos de oxígeno participantes.	25
Figura 1.3. <i>Selenastrum capricornutum</i>	29
Figura 1.4. Procedimiento EFS (Camel, 2003)	32
Figura 1.5. Procedimiento DMFS (Barker, 2003)	33
Figura 2.1. Esquema general de experimentación	42
Figura 2.2. Metodología de EFS para extraer BaP del medio de cultivo	47
Figura 2.3. Metodología para extraer BaP de la biomasa	49
Figura 2.4. Procedimiento de ensayos de exposición	50
Figura 3.1. Cuentas obtenidas a diferentes a diferentes concentraciones de alginato de sodio y CaCl ₂ .	52
Figura 3.2. Cuentas con microalgas inmovilizadas con alginato de sodio 2% y CaCl ₂ 1%.	53
Figura 3.3. Obtención de muestras de cultivo y biomasa.	54
Figura 3.4. Linealidad del sistema	56
Figura 3.5. Cantidad de BaP recuperada por EFS en función de la cantidad de BaP adicionada a muestras de medio de cultivo.	58
Figura 3.6. Cantidad de BaP recuperada por DMFS en función de la cantidad de BaP adicionada a la biomasa.	59
Figura 3.7. Cantidad de BaP recuperada del medio de cultivo líquido.	61
Figura 3.8. Cantidad de BaP encontrada en la biomasa.	62
Figura 3.9. %BaP total recuperado de medio líquido y biomasa.	63
Figura 3.10. %BaP recuperado después de 6 h a 25° y 30°	64
Figura 3.11. %BaP en el medio de cultivo después de 6 h de exposición. Con 6 mL (88 cuentas) y 3 mL (42 cuentas) de la suspensión alginato:algas.	65
Figura 3.12. %Removido del medio de cultivo en función del tiempo por las microalgas libres e inmovilizadas.	66
Figura 3.13. %BaP total recuperado después de 6 h, microalgas inmovilizadas y libres	68
Figura 3.14. %BaP degradado por las microalgas inmovilizadas y libres.	69
Figura 3.15. %BaP total a 30°, microalgas inmovilizadas y libres	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Comparación entre polímeros naturales (carrageno y alginato) y polímeros sintéticos polivinil alcohol (PVA), polietilen glicol (PEG) y policarbomil sulfato (PCS) usados en la inmovilización microbiana, aplicado en el tratamiento de aguas residuales domésticas.	24
Tabla 1.2. Remoción de contaminantes con microalgas inmovilizadas.	31
Tabla 1.3. Aplicación de las técnicas de EFS y DMFS para extraer HAPs de muestras biológicas y ambientales.	
Tabla 2.1. Composición del medio Bristol	40
Tabla 3.1. Precisión del sistema a dos niveles de concentración.	56
Tabla 3.2. Recobros promedio obtenidos usando lavados del matraz de la muestra con diferentes porcentajes de isopropanol, n=3.	57

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de compuestos orgánicos con dos o más anillos de benceno fusionados. Ellos se forman durante la descomposición térmica de moléculas orgánicas y su posterior recombinación (Haritash y Kaushik, 2009). Los HAPs se encuentran ampliamente distribuidos en todo el entorno natural y se encuentran en suelo, sedimentos, agua, aire, plantas y animales, como resultado de procesos naturales y antropogénicos (Rubio-Clemente et al., 2014). La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA por sus siglas en inglés) ha incluido 16 HAPs en su lista de contaminantes prioritarios entre los cuales se encuentra el benzo(a)pireno (Skupinska et al., 2004; Rubio-Clemente et al., 2014).

El benzo(a)pireno (BaP) es uno de los HAPs carcinógenos más potentes, y como tal, es el compuesto más estudiado de este grupo. Múltiples estudios en animales de diversas especies han demostrado la carcinogenicidad de BaP después de su administración por diferentes vías, por lo que su presencia en el ambiente es de gran preocupación (Juhasz y Naidu, 2000).

Cuando los HAPs se encuentran en el medio ambiente pueden pasar por alguno de estos procesos: volatilización, foto-oxidación, oxidación química, adsorción sobre las partículas del suelo y la degradación microbiana, siendo esta última la principal forma en que los HAPs son removidos del medio ambiente (Haritash y Kaushik, 2009). Los microorganismos generalmente remueven contaminantes mediante la adsorción de éstos a la superficie celular o degradándolos con ayuda de enzimas (Chan et al., 2006). La degradación de BaP por microorganismos puede enfrentar algunas complicaciones tales como estar poco disponible para los microorganismos debido a su baja solubilidad en agua, o que puede ser tóxico para algunos microorganismos. Pocos estudios han informado de la degradación de benzo(a)pireno por microalgas; de éstos, Lindquist y Warshawsky, 1985 y Warshawsky, 1988, demostraron la oxidación de benzo(a)pireno por las microalgas *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus* y *Ankistrodes musbraunii*. Ke et al., 2010, utilizaron *Selenastrum capricornutum* para remover BaP del agua en presencia de metales pesados.

También, diferentes microorganismos inmovilizados han sido utilizados en la remoción de contaminantes orgánicos (Aksu, 2005) y metales pesados (Al Rub et al., 2004; Da Costa y

Leite, 1991). Existen diversas técnicas de inmovilización que permiten mantener al microorganismo vivo; para la inmovilización de microalgas lo primero que se debe tomar en cuenta es su necesidad de luz. La inmovilización en polímeros es la técnica más utilizada para inmovilizar microalgas y el alginato de sodio es el polímero más ampliamente utilizado para este fin, el cual puede formar estructuras esféricas al ser goteado en cloruro de calcio (Moreno-Garrido, 2008).

La idea de atrapar microalgas en geles esféricos es para facilitar su extracción después del tratamiento de aguas residuales, ya que en el tratamiento de aguas contaminadas, la mayoría de los estudios se han realizado con microalgas en suspensión y se han encontrado dificultades de recolección o eliminación de la gran población de microalgas desarrollada en el agua después del tratamiento; esto implica un alto costo y tiempo de filtración y centrifugación, que no son técnicas aplicables cuando se tienen grandes volúmenes. (De Bashan y Bashan, 2010).

Como ya se mencionó, se sabe que la microalga *Selenastrum capricornutum* es capaz de remover BaP del medio. Sin embargo, no se tiene información acerca de su capacidad para remover HAPs del medio cuando se encuentra inmovilizada. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la remoción de BaP del medio de cultivo por la microalga *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en alginato de calcio a diferentes tiempos de exposición, estableciendo una comparación con la remoción de este HAP que lleva a cabo esta alga en el medio libre con datos reportados por Beltran, 2014, en condiciones de luz, temperatura y agitación controladas. Para efectuar la determinación del BaP en ensayos de exposición, la extracción de BaP de los componentes del cultivo, el medio líquido y biomasa, se llevó a cabo por la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) y Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) respectivamente. El análisis de los extractos se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector UV.

Los trabajos realizados previamente en el grupo de investigación (Velasco 2011 y Díaz, 2013), en los cuales se analizó el BaP en medio de cultivo y de biomasa para observar su remoción por la microalga *Selenastrum capricornutum* en su forma libre, sirvieron de base para el desarrollo de los métodos de extracción y análisis del BaP de las muestras provenientes de las microalgas inmovilizadas en este estudio.

OBJETIVOS

General

- Evaluar la capacidad de la microalga *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en alginato para remover Benzo(a)pireno de medio acuoso, utilizando metodologías de extracción basadas en el uso de adsorbentes y análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Particulares

- Establecer condiciones de inmovilización de la microalga *S. capricornutum*, adecuadas para asegurar la viabilidad celular: concentración de cloruro de calcio y de alginato de sodio.
- Desarrollar y validar metodologías basadas en la EFS y DMFS para la extracción del BaP remanente en los componentes de los cultivos con algas inmovilizadas (medio líquido y la biomasa) y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector UV.
- Realizar ensayos de exposición de *S. capricornutum* inmovilizada en cuentas de alginato de calcio frente a BaP bajo condiciones de luz, temperatura y agitación controladas.
- Comparar la capacidad de remoción de la microalga en su forma libre e inmovilizada

CAPÍTULO 1.

ANTECEDENTES

1.1. Características generales de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos, también conocidos como hidrocarburos aromáticos polinucleares, o más simplemente como poliaromáticos, son un grupo de más de cien compuestos orgánicos conocidos por su toxicidad y persistencia medioambiental (Rubio-Clemente et al., 2014).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) contienen dos o más anillos de benceno fusionados. Ellos se forman durante la descomposición térmica de moléculas orgánicas y su posterior recombinación (Haritash y Kaushuik, 2009). Los HAPs se pueden dividir en dos categorías: compuestos de bajo peso molecular que consisten en menos de cuatro anillos y compuestos de alto peso molecular de cuatro o más anillos. Los HAPs puros son generalmente, sólidos cristalinos de color a temperatura ambiente. Las propiedades físicas de los HAPs varían de acuerdo con su peso molecular y estructura. Por ejemplo la presión de vapor disminuye al aumentar el peso molecular. Los HAPs son altamente lipofílicos y por lo tanto solubles en disolventes orgánicos, además la solubilidad acuosa disminuye al aumentar el número de anillos. Los HAPs poseen un espectro característico de absorbanza UV, cada isómero exhibe un espectro único de absorbanza, esto es especialmente útil en su identificación. (Kim et al., 2013).

Los HAPs son contaminantes orgánicos persistentes debido a su estabilidad química y resistencia a la biodegradación. Por estas razones, están estrictamente regulados por ley en la mayoría de los países industrializados. Sin embargo, muchos de ellos no están regulados en los países en desarrollo (Rubio-Clemente et al., 2014).

La lista de prioridad de HAPs varía según el país aunque dieciséis de los HAPs han sido incluidos en la lista de contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA por sus siglas en inglés), debido a sus posibles efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos en los organismos, incluidos los seres humanos.

Estos 16 HAPs son los siguientes: antraceno, naftaleno, benzo(a) antraceno, benzo(a) pireno, criseno, benzo(b) fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo (a,h) antraceno, fluoranteno, pireno, fluoreno, fenantreno, indeno(123-c,d)pireno, benzo(g,h,i)pirileno, acenaftileno, acenafteno (Skupinska et al., 2004; Rubio Clemente et al., 2014). En esta lista se incluye al BaP que es el compuesto estudiado en este trabajo, sus características se mencionan en la siguiente sección.

La figura 1.1 muestra las estructuras de algunos HAPs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios por la USEPA.

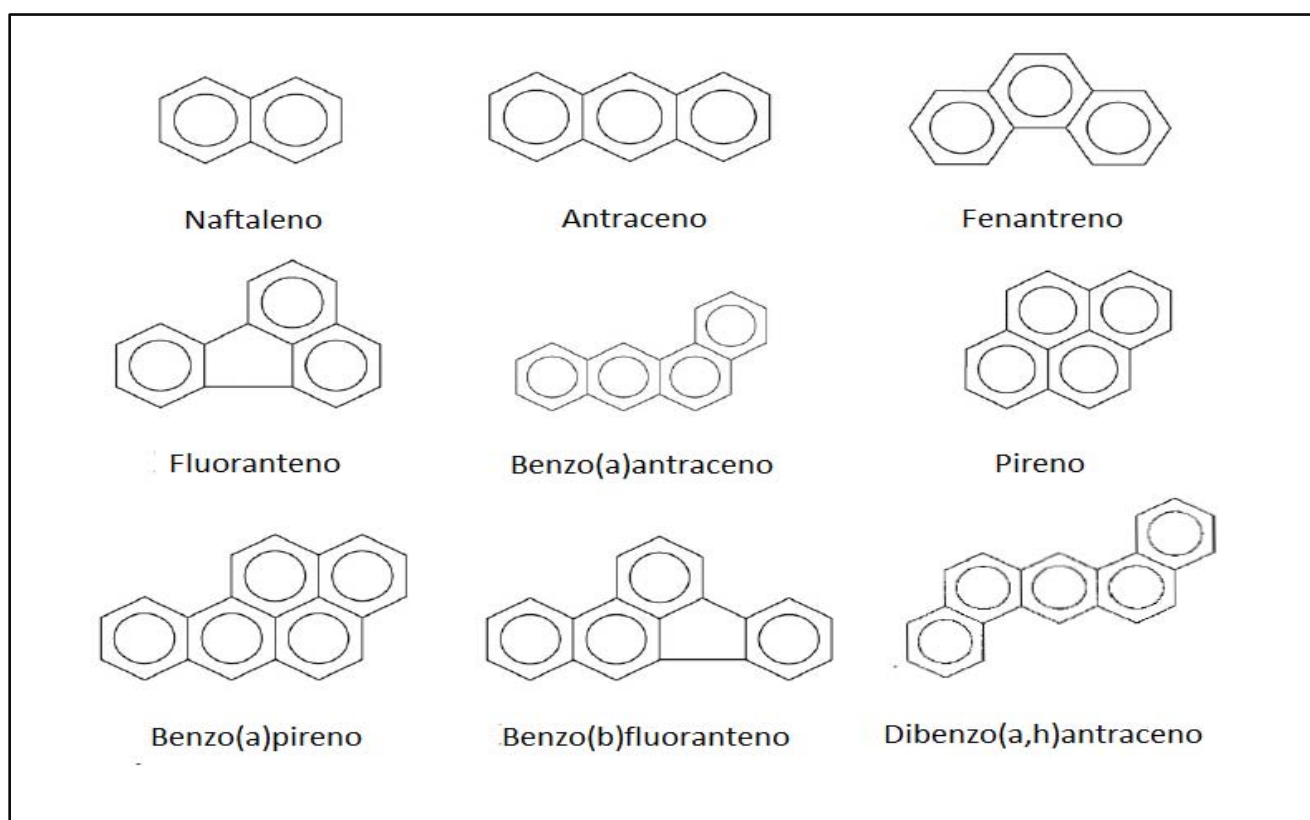


Figura 1.1 Estructura de los HAPs.

1.1.1. Características de benzo(a)pireno

El benzo(a) pireno (BaP) es un HAP de cinco anillos fusionados y dispuestos en una forma agrupada. El BaP tiene una baja solubilidad acuosa (0.0038 mg l^{-1}) y presión de vapor (5×10^{-7} torr), y un alto coeficiente de reparto octanol:agua P ($\log P=6.04$), lo que sugiere su preferencia por fases no acuosas (Juhasz y Naidu, 2000).

El BaP es uno de los HAPs carcinógenos más potentes, y como tal, es el compuesto más estudiado de esta clase de compuestos. Múltiples estudios en animales de variadas especies han demostrado la carcinogenicidad de BaP después de su administración por diferentes vías (IARC, 2012). Además, se ha demostrado que BaP causa efectos genotóxicos en una amplia gama de ensayos con células procariotas y de mamíferos (Mersch-Sundermann et al., 1992), por lo tanto su presencia en el medio ambiente es de gran preocupación. El nivel de BaP en el medio ambiente es la base para el desarrollo de la normativa de evaluación y de limpieza ambiental en todo el mundo.

1.2. Toxicidad

En los últimos años, la presencia y concentración de HAPs en el medio ambiente se ha reportado en varias partes del mundo. La principal conclusión de estos informes es que la acumulación y persistencia de los HAPs en el medio ambiente pueden producir efectos nocivos, en los ecosistemas acuáticos y terrestres (Rubio-Clemente et al., 2014).

Debido a que los HAPs son altamente liposolubles, se absorben fácilmente en el tracto gastrointestinal de mamíferos; se distribuyen rápidamente en una amplia variedad de tejidos con una marcada tendencia a la localización en la grasa corporal (Sudip et al., 2002).

No todos los HAPs presentan la misma toxicidad, numerosos estudios han indicado que compuestos de uno dos y tres anillos presentan toxicidad aguda, mientras que los HAPs de mayor peso molecular se consideran genotóxicos (Juhasz y Naidu, 2000).

El naftaleno, es un microcontaminante común en el agua potable este HAP se une covalentemente a moléculas en los tejidos del hígado, riñón y pulmón, aumentando así su toxicidad. El fenantreno es conocido por ser un fotosensibilizador de la piel humana, un alérgeno suave y mutagénico a los sistemas bacterianos bajo condiciones específicas. Hay poca información disponible para otros HAPs como acenafteno, fluoranteno y fluoreno con respecto a su toxicidad en los mamíferos. Sin embargo, la toxicidad de benzo(a)pireno, benzo (a)antraceno, benzo (b)fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, dibenzo (a, h) antraceno y el indeno (1,2,3-c, d) pireno han sido estudiadas y hay evidencia experimental suficiente para demostrar que son cancerígenos (Sudip et al., 2002).

El benzo(a)pireno es un carcinógeno que induce tumores en muchas especies animales. Algunos de los ejemplos relevantes son: tumores de pulmón, hígado y piel en ratones y ratas, tumores en las glándulas mamarias en las ratas. En los seres humanos, la exposición ocupacional a benzo(a)pireno se ha asociado con cáncer en pulmón, vejiga, piel, esófago, sistema linfático, labio, cavidad oral y faringe (IARC 2012).

La exposición humana a los HAPs se produce por inhalación, ingestión y absorción tópica, y posteriormente los metabolitos formados pueden convertirse en productos hidrófilos y excretarse, o pueden ser bioactivados y unirse a macromoléculas celulares (Pratt et al., 2011).

Los HAPs presentes en el ambiente no son activos y son capaces de causar carcinogénesis solamente después de ser metabolizados y transformarse en compuestos carcinogénicos. El mecanismo de esta activación es conocido y se ha encontrado que es similar para todos los HAPs. La primera fase de la transformación metabólica implica reacciones de oxidación catalizadas por enzimas de la familia del citocromo P450 y la hidroxilación catalizada por la enzima epóxido hidrolasa. En la segunda fase ocurre una reacción de conjugación con el glutatión cuyo único objetivo es facilitar la excreción (Skupinska et al., 2009). Mientras que en los mamíferos la oxidación de HAPs se asocia a la actividad de las enzimas mono-oxigenasas de la familia del citocromo P450, en los microorganismos como bacterias y algas se relaciona con la actividad de dioxigenasas (Cerniglia, 1993; Juhaz y Naidu, 2000).

Los metabolitos reactivos (por ejemplo, epóxidos y dihidrodioles) de HAPs representan un riesgo para la salud debido a su potencial para unirse a las proteínas celulares y el ADN produciendo efectos tóxicos (Kim et al., 2013). La formación de aductos de ADN-HAP, es considerado un paso necesario en la carcinogénesis, ha sido ampliamente estudiado en modelos experimentales y se ha documentado en los tejidos humanos (Pratt et al., 2011).

1.3. Fuentes de HAPs

Los HAPs se forman durante la descomposición térmica de moléculas orgánicas y su posterior recombinación. La combustión incompleta a alta temperatura (500 a 800 °C) o calentamiento de material orgánico a baja temperatura (100 a 300 °C) durante períodos largos dan como resultado la producción de HAPs (Haritash y Kaushik, 2009).

Los HAPs se encuentran ampliamente distribuidos en todo el entorno natural y se encuentran en suelo, sedimentos, agua, aire, plantas y animales, como resultado de procesos naturales y antropogénicos. En la naturaleza se generan por los incendios forestales y las erupciones volcánicas. Sin embargo, los HAPs son más comúnmente generados por las actividades antropogénicas, principalmente como resultado de los procesos de combustión, especialmente la combustión incompleta de materiales orgánicos en la industria y en otro tipo de actividades humanas por ejemplo, la descarga industrial, el transporte, la cocina, el consumo de tabaco, la combustión de carbón, gasolina, gas y madera y la incineración de residuos (Rubio-Clemente et al., 2014).

La liberación de los HAPs en el medio ambiente es muy extendida ya que estos compuestos son productos ubicuos de la combustión incompleta. Se han detectado HAPs en una amplia variedad de muestras ambientales, incluyendo el aire, suelo, sedimentos, agua, aceites, alquitranes y productos alimenticios. Los HAPs son una clase de agentes contaminantes tóxicos que se han acumulado en el medio ambiente debido a una variedad de actividades antropogénicas (Juhász y Naidu, 2000).

Las principales fuentes antropogénicas de HAPs son plantas industriales y calefacción (51%); la incineración de materia orgánica y combustión al aire libre aportan 28% de las emisiones a la atmósfera, las industrias (aluminio, fundidoras de acero e ingeniería de gas) 20% y el transporte terrestre 0.9% de las emisiones (Skupinska et al., 2004).

El comportamiento de los HAP en la atmósfera depende de sus propiedades físico-químicas, interacciones con otros contaminantes, transformaciones fotoquímicas y el transporte mediante el viento y lluvia hasta llegar al suelo y agua (deposición seca y húmeda). Existen HAPs en el aire en fase de vapor o se adsorben en las partículas en el aire dependiendo de las condiciones atmosféricas (temperatura ambiente, humedad relativa, etc.), y las propiedades de los HAPs. En general, los HAPs de bajo peso (es decir, con dos y tres anillos) son más volátiles (con bajas temperaturas de condensación) y existen principalmente en la fase gaseosa. Aunque los HAPs más ligeros se consideran ser menos tóxicos, son capaces de reaccionar con otros contaminantes (tales como el ozono, óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre) para formar dionas, nitro- y dinitro-HAP, de los cuales la toxicidad puede ser más significativa. Los HAPs con cuatro o más anillos muestran vaporización insignificante en todas

las condiciones ambientales. La mayoría de los HAPs de alto peso molecular, por tanto, se encuentran principalmente en la fase de partículas en la atmósfera debido a su baja presión de vapor (Kim et al., 2013). Su destino en el entorno incluye volatilización, foto-oxidación, la oxidación química, adsorción sobre las partículas del suelo y la degradación microbiana (Haritash y Kaushik, 2009).

La concentración de BaP en muestras ambientales se utiliza como un indicador de los niveles de contaminación por HAPs (Kazerouni et al., 2001), por lo tanto la presencia de BaP ha sido determinada en muestras ambientales y biológicas tales como aire (Greenberg y Darack, 1985), agua de lluvia y de ríos (Pena, 2009; Brum, 2008), en muestras de comida como carne, pollo y vegetales (Lijinsky, 1991; Kazerouni et al., 2001) y en organismos marinos como pescados, moluscos, algas, etc. (Juhasz y Naidu, 2000).

1.4. Remoción de HAPs

La remoción de HAPs del ambiente se puede realizar a través de procesos físicos, biológicos y químicos. En el caso de la eliminación de HAPs de sistemas acuosos, procesos físicos, tales como volatilización y adsorción, tienen un papel importante, reduciendo en gran medida la cantidad de HAPs en el agua. Sin embargo, los procesos físicos no resuelven el problema de la contaminación de HAPs debido a su incapacidad para degradar estos contaminantes (Rubio-Clemente et al., 2014).

La persistencia de los HAPs en el medio ambiente depende de las características físicas y químicas de los HAPs. Los HAPs se degradan por foto-oxidación y oxidación química, pero la transformación biológica es probablemente la ruta predominante de la pérdida de HAPs. La recalcitrancia de los HAPs a la degradación microbiana aumenta directamente con el peso molecular y el coeficiente de reparto octanol:agua ($\log K_{ow}$). El BaP por ejemplo es uno de los más recalcitrantes al ser de alto peso molecular. En el ambiente una serie de factores físicos, químicos, biológicos o ambientales pueden influir en la velocidad y el grado de biodegradación de BaP, ya que es el principal modo de remoción natural. Sin embargo, la biodegradación de BaP puede no ocurrir debido a la falta de nutrientes esenciales (tales como nitrógeno, fósforo, potasio) o sustratos de crecimiento, las temperaturas óptimas, la disponibilidad de oxígeno o el pH. También el BaP puede no ser accesible a los organismos debido a su baja solubilidad

en agua o puede estar en una concentración en la que es tóxico para las bacterias, hongos o algas (Juhaszy Naidu, 2000).

El término "biorremediación", describe el proceso de degradación de contaminantes en el medio ambiente por métodos biológicos utilizando el potencial metabólico de los microorganismos para degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos (Pena et al., 2010). El uso de biorremediación para degradar sustancias químicas peligrosas es una alternativa práctica a las tecnologías de tratamiento tradicionales de remediación. La eficacia de la biorremediación en la desintoxicación de productos químicos orgánicos potencialmente peligrosos que contaminan el suelo está directamente relacionada con la estructura química de los contaminantes (Cerniglia, 1993).

La degradación de un contaminante y su velocidad dependen de las condiciones del medio ambiente, el número y tipo de los microorganismos, la naturaleza y estructura química del compuesto que se está degradando. El alcance y la velocidad de biodegradación dependen de muchos factores, incluyendo pH, temperatura, oxígeno, la población microbiana, el grado de aclimatación, la accesibilidad de los nutrientes, la estructura química del compuesto. Los microorganismos capaces de degradar HAPs son algas, bacterias y hongos. Se trata de la descomposición de compuestos orgánicos mediante biotransformación en metabolitos menos complejos. Se han observado numerosos géneros de microorganismos para oxidar HAPs. Si bien existe una gran diversidad de organismos capaces de degradar los HAPs de bajo peso molecular, tales como naftaleno, acenafteno y fenantreno, se han observado relativamente pocos géneros para degradar los HAPs de alto peso molecular, tales como el BaP (Harirash y Kaushik, 2009).

Las bacterias participan activamente en la degradación de contaminantes orgánicos. Un número de especies bacterianas son conocidas por degradar HAPs (Harirash y Kaushik, 2009). Por ejemplo *Alcaligenes denitrificans*, y bacterias del género *Pseudomonas* como *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. paucimobilis* son capaces de degradar naftaleno (Sudip et al., 2002). Lei et al., 2007 evaluó la capacidad de las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* y *Selenastrum capricornutum*, para degradar fluoranteno y pireno, encontrando que *C. vulgaris* fue la menos eficiente para remover estos compuestos y *S. capricornutum* fue la que presentó mayor capacidad para

remover estos HAPs. Olmos et al., 2012 detectó la presencia de los metabolitos de BaP en medio de cultivo y en la biomasa después de que *S. capricornutum* fue expuesta a BaP.

En cuanto al uso de microorganismos inmovilizados, estos han sido utilizados en la remoción de contaminantes orgánicos como colorantes, pesticidas (Aksu, 2005) y metales pesados (Al Rub et al., 2004; Da Costa y Leite, 1991). El aumento en la biomasa, la resistencia a condiciones ambientales, el aumento en la actividad metabólica y la posibilidad de reusar la biomasa son algunas de las ventajas que proporcionan los sistemas de tratamiento con microorganismos inmovilizados (Aksu, 2005; Cohen, 2001). En el tratamiento de aguas contaminadas con microalgas la mayoría de estudios se han realizado con microalgas en suspensión, las dificultades de recolección o la eliminación de la gran población de microalgas desarrollada en el agua después del tratamiento, representa un gran obstáculo en el tratamiento de agua contaminada. Esto implica un alto costo y tiempo de filtración y centrifugación, que no son técnicas aplicables cuando se tienen grandes volúmenes. La forma más común de inmovilizar microalgas es atrapándolas en esferas o cuentas de alginato. La idea de atrapar microalgas en geles esféricos es para facilitar su extracción después del tratamiento de aguas residuales (De Bashan y Bashan, 2010). Acerca de la inmovilización de microorganismos se proporcionan mas detalles en la siguiente sección.

1.5. Inmovilización de microorganismos

Muchas especies microbianas han sido inmovilizadas en diversas matrices para diferentes aplicaciones. Algunas especies de hongos se han inmovilizado para el control biológico y la biodegradación. Las microalgas han sido inmovilizadas para la eliminación de metales tóxicos de aguas residuales (Fry, 1992). Se han reportado trabajos sobre la absorción de metales y compuestos tóxicos por bacterias inmovilizadas (Cassidy et al., 1996).

La inmovilización de células se definió como "el confinamiento físico o localización de las células intactas en una región específica con la preservación de alguna actividad catalítica deseada". La inmovilización a menudo imita lo que se produce naturalmente cuando las células crecen en superficies o en las estructuras naturales. Muchos microorganismos poseen la capacidad de adherirse a superficies en la naturaleza (Kourkoutas et al., 2004).

Una célula inmovilizada se define como una célula viva que, por medios naturales o artificiales, está impedida para moverse independientemente de su ubicación original a todas las partes de una fase acuosa de un sistema (De Bashan y Bashan, 2010).

1.5.1. Inmovilización de microalgas

La mayoría de las técnicas de inmovilización diseñadas para los microorganismos en general se pueden aplicar a las microalgas, con la limitación de la transmisión de la luz. Las técnicas de inmovilización de microalgas pueden ser divididas en técnicas pasivas y activas (Moreno-Garrido et al., 2008).

Los requisitos que debe cumplir la superficie de inmovilización son los siguientes (Mallick, 2002):

- La superficie no debe ser tóxica
- Debe permitir el paso de luz
- Debe ser estable al tener contacto con el medio de crecimiento
- Buena retención de la biomasa
- Debe ser resistente a la interrupción por el crecimiento celular

1.5.2. Inmovilización pasiva

Muchos microorganismos (incluidos algunos grupos de microalgas) tienen una tendencia natural a adherirse a las superficies y crecer en ellas. Los materiales adsorbentes (portadores) para la inmovilización pasiva pueden ser naturales o sintéticos. Los portadores naturales, implican el uso de esponjas de loofa, la cual se obtiene a partir de frutos secos después de quitar el tejido del pericarpio. Este portador no es tóxico y reactivo, es barato, mecánicamente fuerte y estable en cultivos a largo plazo. Un problema en las investigaciones que involucran la loofa como portador de biomasa es la repetibilidad. La estructura del esqueleto de frutas varía de una planta a otra en función de las condiciones de cultivo: cada esponja loofa tiene diferente estructura. Otras superficies naturales como vidrio, madera y plástico también han sido utilizadas para inmovilizar microalgas (Moreno-Garrido et al., 2008).

Los materiales sintéticos son ampliamente utilizados en la inmovilización pasiva. Urrutia et al., 1995 inmovilizó *Scenedesmus oblicus* en polivinilo y poliuretano para remover nitrato del

agua. Yamaguchi et al., 1999 utilizó espuma de poliuretano para inmovilizar a *Prototheca zopfii*.

La inmovilización de la célula sobre un soporte sólido se lleva a cabo por adsorción física debida a fuerzas electrostáticas o mediante la unión covalente entre la membrana celular y el portador. El espesor de la película formada es generalmente de 1 mm o más. Los sistemas que utilizan células inmovilizadas sobre una superficie son populares debido a la relativa facilidad de llevar a cabo este tipo de inmovilización (Kourkoutas et al., 2004).

1.5.3. Inmovilización activa

1.5.3.1. Agentes floculantes

Una de las limitaciones prácticas más importantes en los sistemas de tratamiento con algas es la recolección o la separación de la biomasa del agua tratada. Una eliminación eficiente de la biomasa es esencial para el reciclaje de las aguas residuales (Mallick, 2002). Los agentes floculantes se utilizan principalmente con el fin de evitar técnicas laboriosas y costosas como la centrifugación, cuando se necesita separar la biomasa del medio líquido (Moreno-Garrido et al., 2008).

La floculación celular se ha definido por muchos autores como una agregación de células para formar una unidad más grande o la propiedad de las células en suspensiones de adherirse en grupos y sedimentos rápidamente (Kourkoutas et al., 2004).

Entre los floculantes utilizados comúnmente, el quitosano ha sido el más empleado. Este polisacárido presenta grupos aminos cargados positivamente, esto proporciona propiedades muy interesantes para la adsorción de partículas cargadas negativamente. El inconveniente de la inmovilización con quitosano es su baja estabilidad (Moreno-Garrido et al., 2008). Buelna et al., 1990 realizó la evaluación de agentes floculantes para recolectar a la microalga *Chlorella sp.* utilizando polímeros sintéticos de poliacrilamida y el quitosano un polímero natural, encontrando que los polímeros sintéticos pueden ser tóxicos, además indica que en un proceso de floculación se deben tomar en cuenta varios parámetros como el pH, concentración inicial de la biomasa, temperatura y naturaleza y concentración del floculante.

1.5.3.2. Unión química

La unión química presenta algunas desventajas, debido a que la interacción química (debido principalmente a la unión covalente y reticulación, que implica el uso de glutaraldehído y resinas fotorreticulables) con los microorganismos puede causar daños en la superficie celular y reducir drásticamente la viabilidad de las células. Sin embargo, en algunos experimentos que no requieren metabolismo activo de las células, y en los que se utilizan organismos no vivos, se utiliza la técnica de inmovilización por unión química. Seki y Suzuki, 2002, inmovilizaron a la microalga *Heterosigma akashiwo* inactiva, para remover Cd y Pb de medios acuosos. Para retirar a las microalgas del medio las floclaron con caseína y estos flóculos posteriormente fueron incorporados a la matriz de glutaraldehído.

1.5.3.3. Inmovilización en polímeros

La mayoría de las técnicas de inmovilización diseñadas para microorganismos se pueden modificar fácilmente y usarse para inmovilizar algas aunque, debe tomarse en cuenta que son microorganismos fotosintéticos que requieren luz. El método más utilizado es la inmovilización en polímeros también conocido como el atrapamiento y encapsulación (De Bashan y Bashan, 2010). Este método es la técnica más ampliamente utilizada para la inmovilización de algas. La inmovilización en polímeros es un método que consiste en atrapar microorganismos dentro de una matriz de tres dimensiones. Los poros en la matriz son más pequeños que las células microbianas, manteniéndolas atrapadas dentro del material, los poros permiten la penetración de los sustratos a través de la matriz de polímero hacia los microorganismos atrapados (Cohen, 2001). Las resinas de epóxido, polivinil y poliuretano son algunos de los polímeros sintéticos que han sido utilizados para inmovilizar microalgas, encontrándose alta toxicidad para las células debido a los restos de pre polímeros. La inmovilización en matrices de polisacáridos naturales es la técnica más utilizada para la inmovilización de microorganismos en general (y microalgas en particular). Entre ellos, la carragenina y el alginato son los más empleados (Moreno-Garrido et al., 2008).

Una comparación entre algunos polímeros naturales y sintéticos utilizados para el atrapamiento de microorganismos, con el objetivo de seleccionar un material de soporte que tuviera las características deseadas para su aplicación en las aguas residuales domésticas, ha sido hecha por Leenen et al., 1996, tabla 1.1. (Cohen, 2001).

Tabla 1.1. Comparación entre polímeros naturales (carrageno y alginato) y polímeros sintéticos polivinil alcohol (PVA), polietilen glicol (PEG) y policarbomil sulfato (PCS) usados en la inmovilización microbiana, aplicado en el tratamiento de aguas residuales domésticas.

Características	Polímeros naturales		Polímeros sintéticos		
	Carragenina	Ca-alginato	PVA	PCS	PEG
Solubilidad	Alto	Alto	Bajo/nulo	Bajo/nulo	Bajo/nulo
Biodegradabilidad	Posible	Posible	Bajo	Bajo	Bajo
Estabilidad	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Medio
Difusividad	Muy bueno	Muy bueno	Bueno	Moderado	No determinado
Crecimiento	Bueno	Bueno	Moderado	Moderado	Bueno
Proceso de inmovilización.	Simple	Simple	Laborioso	Laborioso	Laborioso

Los polímeros naturales, tales como alginato y carragenina, se aíslan principalmente de algas microscópicas. El gel se produce generalmente por enfriamiento y / o el contacto con una solución que contiene diferentes iones (Cohen, 2001). La carragenina es un término colectivo para los polisacáridos obtenidos de algas Rhodophyceae (algas rojas), sobre todo de las familias de Gigartinaceae y Solieriaceae. Se precipita en forma de gel en la presencia de iones metálicos. La estabilidad de perlas k-carragenina es menor que las de alginato de calcio bajo las mismas condiciones experimentales. El alginato es producido por algas marrones, principalmente *Macrocystis pyrifera* aunque también por *Laminaria digitata*, *L. hyperborea* y *Eklonia cava* (Cassidy et al., 1996). El gel de polisacárido más ampliamente utilizado para atrapar las células vivas es el alginato. Una ventaja importante de atrapamiento en gel de alginato es que las células inmovilizadas no sufren cambios en condiciones físico-químicas extremas durante el proceso de inmovilización. La permeabilidad, nula toxicidad y la transparencia de matriz formada implican un ambiente muy apacible para células inmovilizadas (Smidsrød y Skjak, 1990; Moreno-Garrido et al., 2008).

1.6. Inmovilización en alginato de calcio

El gel de polisacárido más ampliamente utilizado para atrapar las células vivas es alginato. Los alginatos constituyen una familia de copolímeros binarios no ramificados de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) con enlaces 1,4 en diferentes proporciones y secuencias, en función del organismo del que son aislados. Los alginatos comerciales se

extraen de las algas pardas, principalmente de diferentes especies del género *Laminaria* (*L. hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*), la especie *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Lesonia negrescens* o especies del género *Sargassum*, aunque todas las algas pardas contienen alginato en diferentes proporciones alcanzando hasta 40% de peso seco (Moreno-Garrido et al., 2008).

La formación del gel está relacionada con interacciones específicas y fuertes, entre unidades G y cationes divalentes, tales como Ca^{2+} o Sr^{2+} . La importancia de las unidades G en este proceso se pone de relieve por el hecho de que la dureza del gel está directamente relacionada con el contenido total de unidades G (Sikorski et al., 2007). La afinidad de los alginatos por iones divalentes disminuye en el siguiente orden: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+}$, Ni^{2+} , $\text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$, sin embargo Ca^{2+} , es el catión más comúnmente usado para inducir la formación de gel de alginato (Siddhesh, 2012).

En la figura 1.2. se muestra el modelo de la “caja de huevo” que es el más conocido y aceptado, fue propuesto por Grant et al., 1973, éste describe la unión entre unidades G y cationes divalentes como el Ca^{2+} (Sikorski et al., 2007).

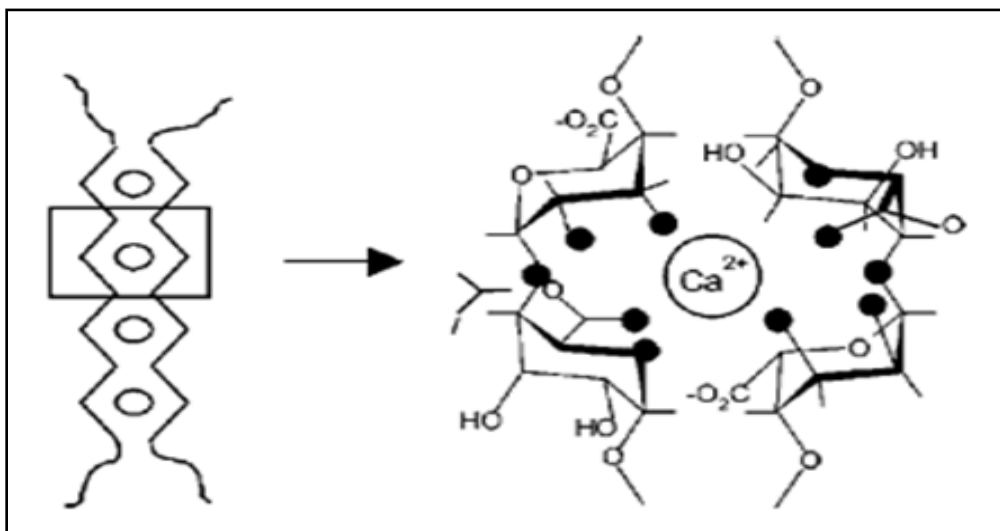


Figura 1.2. Modelo de la “caja de huevo” que representa la coordinación de calcio con cadenas de guluronato donde los círculos negros son los átomos de oxígeno participantes.

Una ventaja importante de atrapamiento de gel de alginato es que las células inmovilizadas no sufren cambios fisicoquímicos extremos durante el proceso de inmovilización. La

permeabilidad, la nula toxicidad y la transparencia de la matriz formada implican un entorno muy apacible para células inmovilizadas (Smidsrød y Skjak, 1990; Moreno-Garrido et al., 2008).

La gelificación de sales monovalentes de este polisacárido (normalmente alginato de sodio) disuelto en agua se produce cuando se gotea una mezcla de células y sales monovalentes de alginato y se mezclan con una solución que contiene iones formadores de gel. La formación del gel es un proceso muy rápido. El catión más común utilizado para formar geles de alginato es el Ca^{2+} . Las cuentas de alginato de calcio pueden ser redisueltas al ponerlas en contacto con disoluciones de citrato o fosfato, debido a que los cationes de calcio pueden ser secuestrados por aniones solubles o pueden ser sustituidos en la matriz por cationes monovalentes con el fin de desestabilizar la estructura. (Moreno-Garrido et al., 2008).

Las perlas esféricas es la forma más común para su aplicación, se hacen dejando caer poco a poco la mezcla de alginato y microorganismos a través de un pequeño orificio, usando una jeringa o equipo específico diseñado para tal fin (bomba peristáltica).

Generalmente, la resistencia mecánica del polímero final aumenta con el aumento de la concentración de los monómeros (alginato de sodio) y el agente de reticulación utilizado (Ca^{2+}). Con el aumento de la dureza, el tamaño de poro de la perla de alginato de calcio disminuye (De Bashan y Bashan, 2010).

Moreno-Garrido et al., 2005, realizó estudios sobre el crecimiento de las células inmovilizadas y la estabilidad de cuentas de alginato de calcio en un experimento de 17 días con 11 especies de microalgas marinas, encontrando que la estabilidad de las cuentas puede también depender de la especie inmovilizada. No existen condiciones ideales de inmovilización en alginato de calcio que cumplan con los requerimientos de cada microorganismo. Sin embargo, las propiedades esenciales de todas las cuentas de alginato deben ser de alta estabilidad mecánica y química, propiedades de hinchamiento controlables, de bajo contenido de contaminantes tóxicos, pirógenos e inmunogénicos (Smidsrød y Skjak, 1990).

En la tabla 1.2. se presentan trabajos realizados con microalgas inmovilizadas en alginato de calcio para remover contaminantes, estableciéndose diferentes condiciones de inmovilización, dependiendo de la especie.

En la mayoría de los casos, la inmovilización es benéfica para los microorganismos atrapados porque aparte de los efectos positivos directos, tales como evitar depredación por el zooplancton agresivo y reducción de la competencia por los nutrientes con otras especies microbianas, varias mejoras en el metabolismo, la función y el comportamiento de las microalgas fueron registradas (De Bashan y Bashan, 2010).

La inmovilización en perlas de alginato de la microalga, *Botryococcus braunii* y *Botryococcus protuberans*, produjo un aumento significativo en la clorofila, carotenoides y lípidos durante la fase de estacionaria, en comparación con las células de vida libre. La fotosíntesis en ambas especies se mejoró, con respecto a las células libres, la senescencia se retrasó considerablemente (Singh, 2003). Sin embargo, la inmovilización o encapsulación de microorganismos en polímeros también ejerce una tensión significativa sobre los microorganismos debido a las fuerzas químicas y las interacciones entre la matriz de inmovilización y la pared celular. El confinamiento en un espacio limitado afecta igualmente el metabolismo de los microorganismos. El efecto más notable, detectado hace décadas en bacterias inmovilizadas, es la reducción de la población inmovilizada, en comparación con la población antes de la polimerización (De Bashan y Bashan, 2010).

Tabla 1.2. Remoción de contaminantes con microalgas inmovilizadas.

Especie	Condiciones de inmovilización	Contaminante	Remoción	Autor
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginato de sodio 2%, CaCl ₂ 2.5%.	Níquel	60%	Al Rub et al., 2004
<i>Chlorella homosphaera</i>	Cultivo mezclado con 30mL de alginato de sodio 16g/L, CaCl ₂ 8.6g/L.	Zinc	>90%	Da Costa y Leite, 1991
		Cadmio	>90%	
<i>Chlorella salina</i>	Mezcla de 25ml de alginato de sodio con 25 mL de cultivo 1x10 ⁶ células/mL, CaCl ₂ 0.2M.	Cobalto	62%	Garnham et al., 1992
		Zinc	54%	
		Manganeso	40%	
<i>Chlorella sorokiniana</i> GXNN01	Cultivo con 10 ⁸ células/mL mezclado con alginato de sodio 4%, CaCl ₂ 2%.	Amonio	21.84%	Liu et al., 2012
		Fosfato	14.35%	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cultivo con densidad celular 3.7x10 ⁸ mezclado con alginato de sodio 4% para llegar a una concentración final de 3%, CaCl ₂ 2.5%.	Tributilo de estaño (TBT)	60%	Luan et al., 2006
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cultivo con 1.25x10 ⁹ células/mL mezclado con volumen igual de alginato de sodio 4%, CaCl ₂ 2.5%.	Cobre	>95%	Tam et al., 1998
<i>Dunaliella salina</i>	100mL de cultivo absorbancia 1 (660nm) mezclado con alginato de sodio 4%, CaCl ₂ 0.2M.	Nitrato	62%	Thakur y Kumar 1999
		Amonio	42.2%	
		Fosfato	64.7%	

1.7. Características de *Selenastrum capricornutum*

El género y la especie de *Selenastrum capricornutum* fueron modificados formalmente a *Pseudokirchneriella subcapitata* (Hindak, 1990); sin embargo, para mantener consistencia con la literatura que la refiere, se empleará su nombre original *S. capricornutum* en el presente trabajo. *S. capricornutum* es una alga verde (clorofita) unicelular con forma de media luna (figura 1.3.) y un volumen aproximado de entre 40 y 60 μm^3 , que puede encontrarse en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos u oligotróficos.

Cuando las células son expuestas a contaminantes tóxicos su reproducción se afecta, alterando la tasa de crecimiento de la población de las algas (Castillo, 2004).

Pocos estudios han informado de la degradación de BaP por algas. De estos, Lindquist y Warshawsky (1985) y Warshawsky (1988), como ya se mencionó anteriormente demostraron la degradación de BaP por la microalga *Selenastrum capricornutum* con la formación de cis-dihidrodiolés mediante la enzima dioxigenasa.

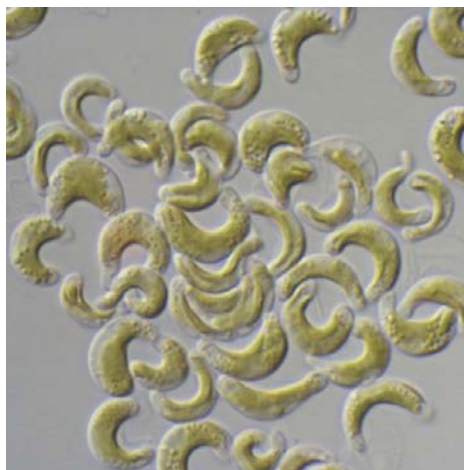


Figura 1.3. *Selenastrum capricornutum*
<http://www.mokkka.hu/drupal/en/node/4193>

1.8. Análisis de HAPs en muestras complejas

La determinación de HAPs en agua se realiza generalmente mediante técnicas cromatográficas después de la extracción de HAPs de las muestras. La cromatografía de gases de alta resolución con detección de espectrometría de masas (CG-MS) o la detección de ionización de llama y la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección de fluorescencia se han utilizado para la determinación de HAPs después de su extracción a partir de agua y otros medios (Brum, et al., 2008).

A pesar de la importancia de tales técnicas instrumentales, todo el proceso analítico puede ser inútil si se emplea un procedimiento de preparación de la muestra inadecuado antes de que la muestra alcance el detector. Esto es especialmente importante en el análisis de muestras ambientales donde la complejidad de muchas matrices, por ejemplo, biota, y las bajas

concentraciones en las que se encuentran los analitos hacen necesario el tratamiento previo de la muestra.

Entonces el concepto básico de una preparación de la muestra es la de convertir una matriz compleja en una muestra con características adecuadas para el análisis instrumental final. Las técnicas de preparación de muestras tienen los siguientes objetivos: extraer los analitos de la matriz, llevarlos a un nivel de concentración adecuado, eliminar posibles interferencias (paso de limpieza) y, cuando es necesario, convertir los analitos en una forma adecuada para la detección o separación (Fidalgo et al., 2007).

La preparación de la muestra y especialmente la extracción es un paso crítico en el análisis de HAPs debido a que estos compuestos hidrófobos son fuertemente adsorbidos a los materiales sólidos. Tradicionalmente, la extracción de Soxhlet se ha utilizado para la extracción de los HAPs en lodos de aguas residuales, pero este procedimiento requiere tiempos de extracción muy largos y grandes cantidades de disolventes orgánicos (Pena et al., 2010).

Brum et al., 2008, extrajo HAPs de agua contaminada utilizando la técnica de extracción líquido-líquido. La extracción líquido-líquido (LLE) se utiliza solamente en el tratamiento de muestras líquidas, sus principales inconvenientes son el uso de grandes cantidades de disolventes, la formación de emulsiones y pasos adicionales de concentración de las muestras debidas a los bajos recobros (Ahmed, 2003).

Existen técnicas alternativas que utilizan adsorbentes para la extracción, tales como la extracción en fase sólida (EFS) la cual ha sido utilizada para extraer HAPs de muestras ambientales líquidas debido a que permite limpiar la muestra, y concentrar a los analitos (Marcé y Borrull, 2000) y la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) que se utiliza para extraer a los analitos de muestras sólidas, semisólidas y viscosas evitando las complicaciones de las técnicas clásicas para tratar muestras de este tipo (Barker, 2000). En el cuadro 1.3. se presentan algunos trabajos en los que se utilizaron estas dos técnicas para extraer HAPs de muestras ambientales y biológicas. En la siguiente sección se describen los principios y procedimientos de las técnicas de EFS y DMFS, las cuales fueron utilizadas en este trabajo para la extracción de BaP del medio de cultivo y de la biomasa respectivamente.

Tabla 1.3. Aplicación de las técnicas de EFS y DMFS para extraer HAPs de muestras biológicas y ambientales.

Analito	Método de extracción	Cantidad de muestras	Extracción	Análisis	Referencia
16 HAPs	EFS	Agua de mar, 30mL	Diclorometano/ ácido acético 2mL	CG-MS	Song et al., 2012
16 HAPs	EFS	Agua de ríos, lagos y mar, 500mL	Hexano 15mL	CG-MS	Ma et al., 2010
16 HAPs	EFS	Descargas industriales y aguas tratadas, 900mL	n-hexano/2-propanol/acetona 12mL	CLAR-UV-DAD y DFL	Buseti et al., 2006
14 HAPs	EFS	Aceites comestibles, 0.5g	Hexano	CLAR-DFL	Barranco et al., 2003
4 HAPs	DMFS	Microalgas de <i>Selenastrum capricornutum</i> , 5mg	Acetonitrilo/agua 1mL	CLAR-DFL	Olmos et al., 2012
17 HAPs	DMFS	Lodos de aguas residuales, 0.2g	Diclorometano/metanol 6mL	CLAR-DFL	Pena et al., 2008
16 HAPs	DMFS	Suelo, 0.5g	Hexano/acetona 6mL	CLAR-DFL	Pena et al., 2007
27 HAPs	DMFS	Sedimentos marinos, 2g	Diclorometano 6mL	CG-MS	Sánchez Brunete et al., 2007

1.8.1. Extracción en fase sólida (EFS)

La extracción en fase sólida implica la distribución de un compuesto entre una fase líquida (muestra o disolvente con analitos) y una fase sólida (adsorbente). Esta técnica de tratamiento de la muestra permite la concentración y purificación de analitos retenidos en un adsorbente sólido. Los mecanismos de retención más comunes en EFS se basan en fuerzas de Van der Waals (interacciones no polares), enlaces de hidrógeno, fuerzas dipolo-dipolo (interacciones polares) y las interacciones catión-anión (interacciones iónicas).

La extracción en fase sólida de un compuesto se logra mediante la interacción de tres componentes: el adsorbente, el analito y el disolvente. El analito debe ser atraído más fuertemente al adsorbente que a la matriz. El mejor mecanismo y los procedimientos de extracción en fase sólida se definen por las características del analito en la muestra (Zwir-Ferenc y Biziuk, 2006).

Los adsorbentes sólidos pueden ser de carácter hidrófobo o polar. Es común llamar adsorbentes de fase inversa a los que son apolares, y se utilizan con frecuencia con muestras acuosas. Por otro lado, los adsorbentes de fase normal se refieren a los que son más polares y se utilizan por lo general cuando la muestra es un disolvente orgánico que contiene los compuestos de interés.

El procedimiento general de EFS consiste en cargar la muestra con los analitos en la fase sólida, lavar componentes no deseados y por último recuperar los analitos de interés, este procedimiento se ilustra en la figura 1.4.

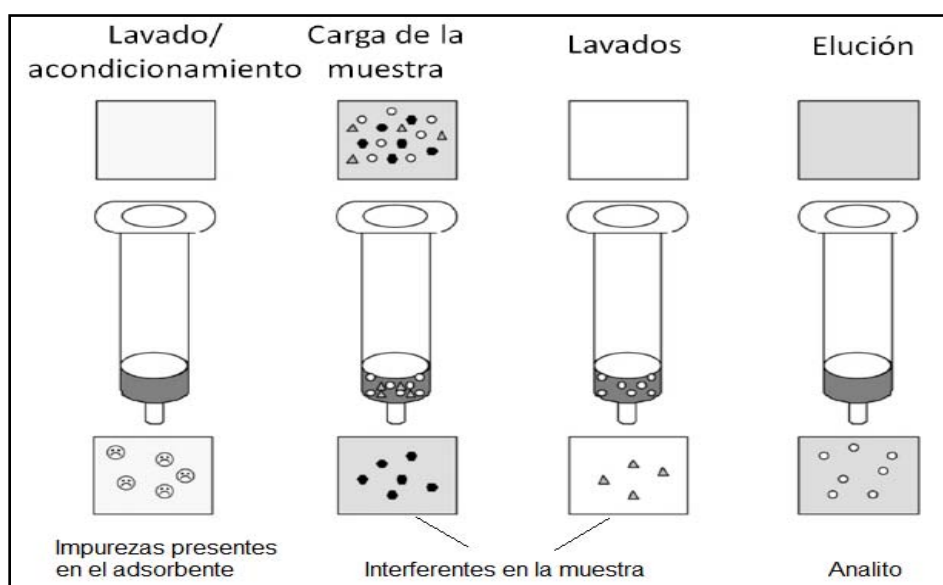


Figura 1.4. Procedimiento EFS (Camel, 2003).

En primer lugar, el adsorbente sólido debe acondicionarse utilizando un disolvente apropiado, seguido por el mismo disolvente en el que se encuentra la muestra. Este paso es crucial, ya que permite la humectación del material de empaque y la solvatación de los grupos funcionales. Además, elimina las posibles impurezas contenidas inicialmente en el adsorbente o el embalaje. Además, esta etapa elimina el aire presente en la columna y se llena el volumen de huecos con disolvente.

El segundo paso consiste en hacer pasar la muestra a través del adsorbente sólido. Dependiendo del sistema usado, los volúmenes pueden variar desde 1mL a 1L. La muestra

puede ser aplicada a la columna por gravedad, bombeo, mediante vacío o por un sistema automatizado. Durante este paso, los analitos se concentran en el adsorbente.

El tercer paso es el lavado del adsorbente con el disolvente adecuado, este debe tener fuerza de elución baja para eliminar componentes de la matriz que se han retenido en el adsorbente, sin desplazar a los analitos de interés.

El paso final consiste en la elución de los analitos de interés utilizando un disolvente apropiado. El volumen de disolvente debe ajustarse de modo que la recuperación de los analitos sea cuantitativa (Camel, 2003).

1.8.2. Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)

La técnica de dispersión de matriz en fase sólida introducida por Barker en 1989 ha encontrado aplicación particular en el tratamiento de muestras sólidas, semi-sólidas y / o viscosas. La DMFS es una técnica que se basa principalmente en la disgregación de la muestra y dispersión de sus componentes sobre y dentro de un soporte sólido. El procedimiento para realizar la técnica de DMFS se presenta en la figura 1.5.

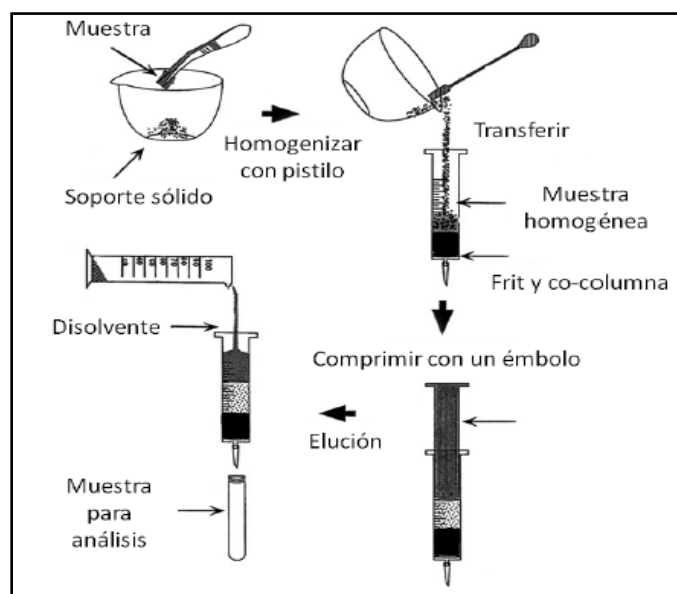


Figura 1.5. Procedimiento DMFS (Barker, 2007).

Como primer paso la muestra debe ser mezclada con un adsorbente en un mortero de ágata, este primer paso tiene como objetivos romper la estructura de la matriz y lograr su distribución homogénea en todas las partículas del adsorbente, esta mezcla se empaca en una columna

vacía, de la cual los analitos de interés se eluyen con un disolvente orgánico adecuado mientras que los compuestos de matriz que interfieren son retenidos selectivamente en la columna. Otra posibilidad es la elución de los compuestos de interferencia en una etapa de lavado, mientras que los analitos de interés se eluyen posteriormente con un disolvente orgánico (Kristenson et al., 2006).

La DMFS ha sido extensamente aplicada, debido a que elimina la mayoría de las complicaciones de las técnicas clásicas de extracción líquido-líquido y / o extracciones de fase sólida de muestras sólidas y semisólidas, en particular de muestras biológicas complejas. De hecho, la cromatografía de líquidos requiere que la muestra y sus componentes se encuentren en un estado líquido, libre de partículas, homogéneo y no viscoso. Para llegar a estas características muchos fluidos biológicos, tales como orina o sangre de plasma o suero, se pueden aplicar directamente a las columnas de EFS, mientras que otras muestras no son directamente aplicables a la EFS, en particular los sólidos y semisólidos que se derivan de orígenes biológicos. Así, los enfoques clásicos para la preparación de muestras sólidas o semisólidas para la cromatografía generalmente consisten en perturbar la arquitectura de la muestra utilizando disolventes, ácidos, bases, tampones, sales, detergentes etc e iniciar la extracción y fraccionamiento de los diversos componentes de la muestra. En este punto de la preparación puede ser necesario filtrar o centrifugar además de la formación de emulsiones que a menudo son intratables como consecuencia de estas acciones (Barker, 2008).

1.9. Cromatografía de líquidos

La cromatografía agrupa un conjunto importante de métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se desplaza en una fase móvil, la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o en una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. En el inicio la cromatografía de líquidos se llevaba a cabo en columnas de vidrio con grandes longitudes y a través de las cuales pasaba la fase estacionaria a un flujo muy lento. Por consiguiente, los tiempos de separación eran largos.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a que pase por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. El equipo de HPLC consta de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y un ordenador para controlar el equipo y visualizar los resultados. La cromatografía de líquidos es la técnica analítica más ampliamente utilizada. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla y su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles.

El tipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) más ampliamente utilizado es la cromatografía de reparto. Con base en las polaridades de las fases móvil y estacionaria se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto.

Cromatografía de fase normal: se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, una fase móvil más polar tiene fuerza eluyente mayor, en este tipo de cromatografía el componente menos polar eluye primero. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria contiene grupos polares como ciano, diol, amino y dimetilamino, siendo el grupo ciano el menos polar y el amino el más polar, la elución se lleva a cabo con una fase móvil no polar como el etiléter, el cloroformo y el hexano.

Cromatografía de fase inversa: es la más utilizada, se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar o débilmente polar y la fase móvil es polar, una fase móvil menos polar tiene mayor fuerza eluyente, los compuestos mas polares eluyen primero. La fase estacionaria consiste en partículas de sílice unidas químicamente con cadenas de C_8 (n-octilo) o cadenas de C_{18} (n-octildecilo), ejemplos de fases móviles utilizados en cromatografía de fase inversa son acetonitrilo, metanol y soluciones acuosas con diferentes concentraciones de estos dos disolventes.

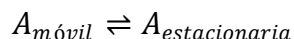
1.9.1. Parámetros cromatográficos

Tiempo de retención (t_r): es el tiempo que transcurre desde la inyección de una mezcla en la columna hasta que ese componente llega al detector.

Tiempo muerto (t_m): es el tiempo necesario para que una especie no retenida alcance el detector.

Constante de distribución

Los equilibrios de distribución en cromatografía se expresan mediante ecuaciones sencillas que suponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y móvil. Entonces, para la especie A se puede escribir:



La constante de equilibrio K para la distribución de la especie A entre las dos fases se denomina constante de distribución o coeficiente de reparto y se define como

$$K = C_S / C_M$$

Donde C_S es la concentración molar del soluto en la fase estacionaria y C_M es la concentración molar del soluto en la fase móvil.

Factor de Capacidad (k'): se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna. Para una especie A, el factor de capacidad k'_A se define como:

$$k'_A = K_A V_S / V_M$$

El factor de capacidad se puede obtener a partir de un cromatograma con la siguiente ecuación:

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

Factor de selectividad (α): la selectividad es la capacidad del sistema cromatográfico para distinguir entre los componentes de una muestra. Se mide como una relación de los factores de capacidad (k') de los dos compuestos en cuestión y se puede visualizar como la distancia entre los vértices de los dos picos correspondientes. Valores altos de α indican una buena separación de los dos picos. Por definición el valor de α siempre es mayor que 1 ya que cuando α es igual a 1 significa que los dos compuestos coeluyen. El factor de selectividad α para dos solutos A y B se define como

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

Donde k'_B es el factor de retención para la especie más fuertemente retenida B, y k'_A es la constante para la especie A menos retenida.

Eficiencia de la columna

La eficiencia de una columna cromatográfica se ve afectada por la cantidad de ensanchamiento de banda que ocurre a medida que un compuesto pasa por la columna. El ensanchamiento de la zona está relacionado de manera directa con el tiempo de residencia en la columna y de manera inversa con la velocidad de flujo de la fase móvil. Mientras mayor es la capacidad de la columna de producir picos más estrechos mayor es su eficiencia. Dos términos afines se utilizan ampliamente como medidas cuantitativas de la eficiencia de una columna cromatográfica: 1) *la altura de plato teórico (H)* y 2) *el número de platos teóricos (N)*. Los dos están relacionados por la ecuación

$$N = L/H$$

Donde L es la longitud del relleno de la columna. La eficiencia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos N y cuanto menor es la altura H del plato.

Resolución (R_S): La resolución de una columna señala que tan separadas están las bandas en relación con sus anchos. La resolución proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos. La resolución de una columna se mide como

$$R_S = \frac{t_{rB} - t_{rA}}{W_A + W_b}$$

Donde W_A y W_B son los anchos de banda de los solutos A y B respectivamente. Un valor de resolución de 1.5 o mayor entre dos picos asegura que los componentes de la muestra están bien separados.

La relación entre el número de platos de una columna, el factor de capacidad, la selectividad y la resolución es:

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

Donde k'_B es el factor de capacidad de la especie más retenida y α es el factor de selectividad.

CAPÍTULO 2.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Material y equipo

2.1.1. Sistema cromatográfico

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (KNAUER, Alemania), con dos bombas modelo Smartline 1000.
- Detector UV KNAUER modelo Smartline 2600.
- “Software” de control y procesamiento de datos “EuroChrom” edición V3.05.
- Precolumna de 20x2mm empacada con adsorbente Nucleosil 100-5 C18 5µm MACHEREY-NAGEL.
- Columna analítica Thermoscientific de 150x4.6mm empacada con fase inversa C18 tamaño de partícula 5µm.
- Bucle de inyección de 20 µL KNAUER.
- Jeringa de 100 µL (HAMILTON, EUA).

2.1.2. Preparación de muestras

- Centrifuga Fisher Scientific, modelo 225.
- Agitador con controlador de temperatura, JEIO TECH, modelo SI-300/300R/600/600R.
- Balanza analítica OHAUS, modelo AV114C.
- Tubos para centrifuga de 15 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 50 y 250 mL.
- Micropipeta 100-1000 µL, Eppendorf.
- Espátula cromo-níquel.

2.1.2.1. EFS y DMFS

- Cartuchos de empaque para extracción en fase sólida de 6 y 1 mL, frites (Varian, EUA).
- Jeringa de 20 mL con adaptador.
- Sílice C-18 Supelclean de 45 µm de diámetro de partícula (Supelco, EUA).
- Mortero y pistilo de ágata de 20 mL.

- Viales con tapón de rosca de 1, 10 y 40 mL.

2.1.3. Disolventes, reactivos y estándares

- Metanol (MeOH) grado cromatográfico (J.T. Baker. USA).
- Acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico (J.T. Baker. USA).
- Isopropanol (J.T. Baker. USA).
- Agua tipo I obtenida de un equipo de purificación Simplicity UV (Millipore, MA, USA).
- Estándar benzo(a)pireno (ChemService, PA, USA) pureza 99.5%.

2.1.4. Inmovilización

- Alginato de sodio Sigma-Aldrich W201502.
- Cloruro de calcio Sigma-Aldrich C1016.
- Citrato de sodio tribásico dihidratado Sigma-Aldrich C8532.
- Sistema aséptico Sterifil con porta filtros de 47 mm (Millipore, USA).
- Filtros de nitrocelulosa estériles con tamaño de poro de 0.22 μm y 47 mm de diámetro (Millipore, Ireland).
- Campana de Bioseguridad clase 2 AA 11231 BBC86 (BIOBASE, Shandong, China)
- Tubos de ensayo.
- Pipeta graduada de 10 mL.

2.1.5. Medio de cultivo con microalga *Selenastrum capricornutum*

- La microalga *Selenastrum capricornutum* fue adquirida de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Texas (TX, USA).
- Medio Bristol: nitrato de sodio (NaNO_3), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato dibásico de potasio (Na_2HPO_4), fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), cloruro de sodio (NaCl). (JTBaker, DF, MEX).
- Proteosa peptona (MCD Lab, Edo. De México, MEX).
- Autoclave eléctrica, Tuttnauer 25400EL.
- Lámpara con foco de luz amarilla 10 watts (OSRAM, México).
- Espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (ThermoScientific, EUA).

La cepa se mantuvo en condiciones axénicas sembrándola en medio sólido con agar al 1%. Los medios líquidos se sembraron con un asa bacteriológica que ayudó a transferir a la microalga del medio sólido al medio líquido.

Los medios de cultivo líquido de *S. capricornutum* que se utilizaron en este trabajo para los ensayos de exposición al BaP fueron tomados con un valor de absorbancia de 1, que fue medida con un espectrofotómetro a 685 nm (longitud de onda de máxima absorción de la clorofila) de acuerdo con la curva de crecimiento de esta microalga (Olmos, 2013), para este valor de absorbancia hay 5×10^6 células/mL. Para llegar a esta absorbancia la microalga fue cultivada en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo Bristol cuya composición se describe en la tabla 2.1. adicionado con peptona al 1%, los medios de cultivo fueron esterilizados por autoclave (121°, 30 minutos), con ciclos de iluminación de 16 horas de luz y 8 horas de obscuridad, a temperatura ambiente y agitación constante aproximadamente 20 días.

Tabla 2.1. Composición del medio Bristol

Componente	Disolución "Stock"	Volumen de solución "Stock" para 1 L de cultivo	Concentración final en 1 L de cultivo (mM)
NaNO ₃	10g/400mL agua destilada	10 mL	2.94
CaCl ₂ • 2H ₂ O	1g/400mL agua destilada	10 mL	0.17
MgSO ₄ • 7H ₂ O	3g/400mL agua destilada	10 mL	0.3
Na ₂ HPO ₄	3g/400mL agua destilada	10 mL	0.43
KH ₂ PO ₄	7g/400mL agua destilada	10 mL	1.29
NaCl	1g/400mL agua destilada	10 mL	0.43

2.2. Metodología Experimental

La microalga *S. capricornutum* fue inmovilizada en cuentas de alginato de calcio para ser expuesta a BaP y estudiar su remoción a diferentes tiempos. Para lo anterior se cuantificó el BaP residual en los componentes del cultivo (medio líquido y biomasa), los cuales fueron separados por centrifugación. Para efectuar la extracción de BaP de las muestras de medio de cultivo líquido y biomasa se modificaron metodologías de extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida previamente optimizadas para microalgas libres (Velasco 2011; Diaz 2013). El análisis de los extractos se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de fase inversa C18 y fase móvil 100% MeOH, con detector UV a una longitud de onda de 264 nm.

En la figura 2.1. se presenta un esquema general de la metodología que se siguió en este trabajo.

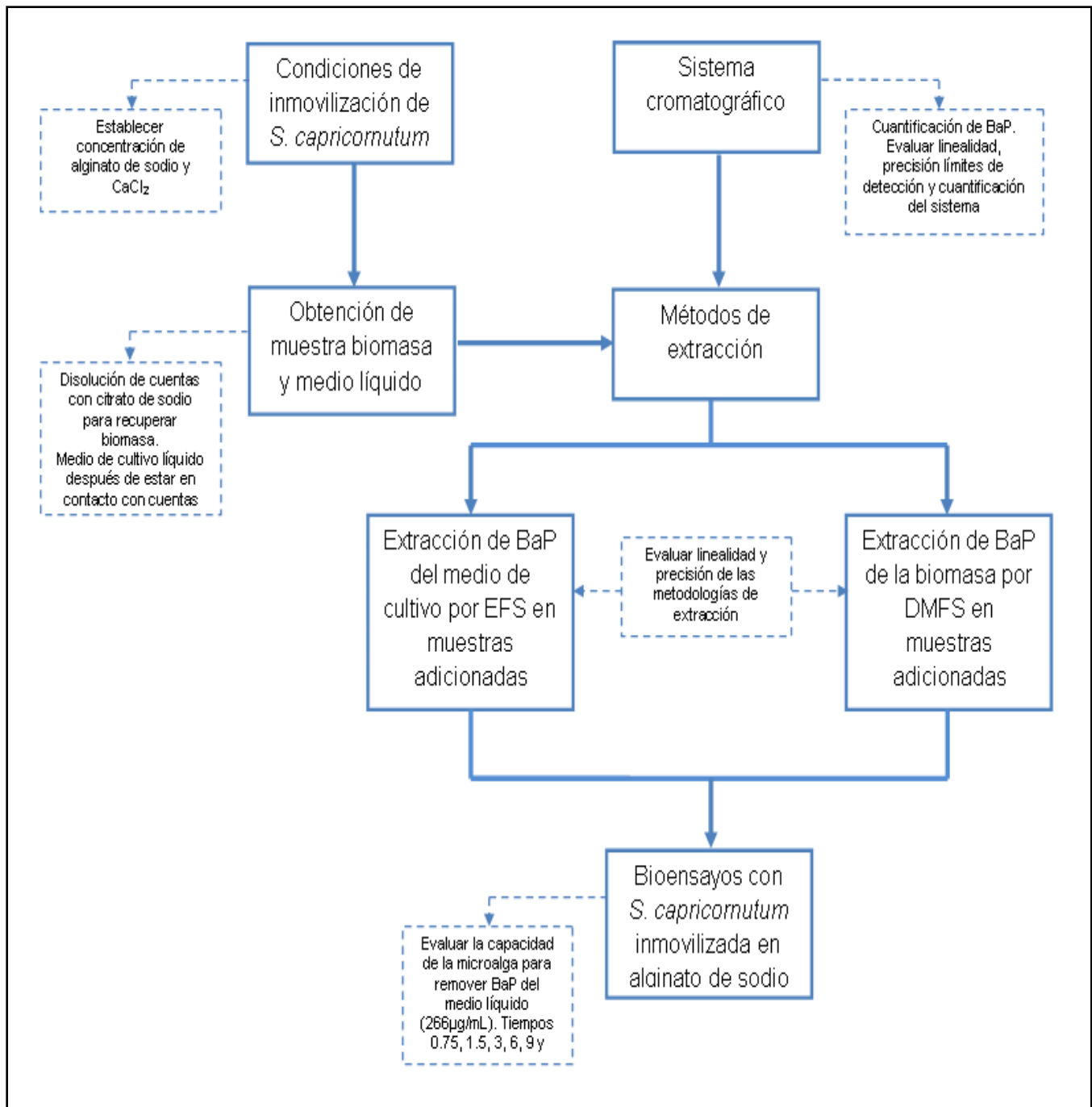


Figura 2.1. Esquema general de experimentación.

2.3. Optimización de las condiciones de Inmovilización

2.3.1. Selección de las concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio

Los ensayos preliminares se efectuaron sin microalgas para evaluar la consistencia y transparencia de las cuentas; para esto un mililitro de alginato de sodio 5% se goteó con ayuda de una pipeta graduada en disoluciones de CaCl_2 en concentraciones de 5, 2.5 y 1.5%. Después de 20 segundos las cuentas se sacaron de la disolución de CaCl_2 y se observaron sus características. Se realizó lo mismo con una disolución de alginato de sodio 3% y las diferentes concentraciones de CaCl_2 mencionadas.

Para efectuar los ensayos para lograr la inmovilización de las algas en las cuentas de alginato se centrifugaron 15 mL de medio de cultivo con absorbancia 1 y el “botón” obtenido se resuspendió en 2 mL de sobrenadante; posteriormente estos 2 mL de medio con las microalgas se mezclaron con 4 mL de una solución de alginato de sodio 5% para obtener un volumen final de 6 mL y una concentración final de alginato de 3%. Todo el volumen de esta suspensión se goteó en 20 mL de una disolución de CaCl_2 al 1.5%. Se realizó lo mismo con una disolución de alginato de sodio 3% para llegar a una concentración final de 2% y se goteó en una disolución de CaCl_2 1%.

2.3.1. Viabilidad celular

Para comprobar la viabilidad celular dentro de las cuentas de alginato, se llevó a cabo la inmovilización de las células presentes en 15 mL de medio de cultivo de *Selenastrum capricornutum* en absorbancia 1 y después de esperar 24 h las cuentas se deshicieron con una disolución de citrato de sodio al 9%; la disolución obtenida se centrifugó y el “botón” de biomasa se colocó en un portaobjetos para que se secase, una vez seca, la biomasa se pesó. La inmovilización se llevó a cabo mezclando alginato de sodio 3% con la biomasa en una proporción 2:1, llegando a una concentración final de 2% de alginato de sodio y un volumen de 6 mL de una suspensión alginato/algas y ésta fue goteada en 20 mL de una disolución de CaCl_2 al 1%.

2.4. Obtención de muestras

La inmovilización de *Selenastrum capricornutum* se realizó con las condiciones optimizadas como se indica mas adelante, en la sección de resultados 3.1.2. y de esta manera se

2.5.3. Límites de detección y cuantificación del sistema.

Se elaboró una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 µg/mL, se obtuvieron las áreas y se realizó una regresión lineal para obtener la desviación estándar de la regresión y la pendiente, para determinar el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) se utilizaron las siguientes ecuaciones.

$$LD = \frac{3.3 * S_{y_x}}{b} \dots \dots \dots 2.2.$$

$$LC = \frac{10 * S_{y_x}}{b} \dots \dots \dots 2.3.$$

Donde S_{y_x} es la desviación estándar de la regresión y b es la pendiente.

Se determinó el límite de detección experimental inyectando disoluciones estándar de BaP cada vez mas diluidas hasta que la señal del pico fue 3 veces la señal del ruido de fondo.

2.6. Extracción en fase sólida

La metodología previamente desarrollada (Velazco, 2011; Díaz, 2013) para la extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto peso molecular describe el uso de un cartucho de 6 mL empacado con 300 mg de sílice C18 (previamente activada) entre dos frits. La fase sólida pasa por una etapa de acondicionamiento con 3 mL de ACN y después 10 mL de agua, la muestra líquida pasa a través del cartucho y esto es seguido por una secuencia de lavados: 5 mL agua, 4 mL acetonitrilo:agua 10:90 y 3 mL acetonitrilo:agua 55:45, finalmente los analitos son eluidos con 4 mL de ACN y el extracto se analiza por cromatografía de líquidos. En el método se reporta la adición de 20% de isopropanol en la muestra para disminuir la interacción de los HAPs con el vidrio y obtener mejores porcentajes de recobro, antes de pasar la muestra por el cartucho.

En el presente trabajo se modificó la metodología reportada, dado que en el medio de cultivo que estuvo en contacto con las algas inmovilizadas en cuentas, precipitó el alginato residual disuelto al agregarle isopropanol, lo que dificultó el paso de la muestra a través del cartucho. A continuación se explican los procedimientos seguidos para disolver el precipitado con citrato y para evitar su formación sin la adición de isopropanol a la muestra de cultivo líquido, con los resultados se evaluó el porcentaje de recobro utilizando la siguiente ecuación.

$$\% \text{Recobro} = \frac{\text{Area de extracto}}{\text{Area estandar}} * 100 \dots \dots \dots 2.4.$$

2.6.1. Disolución del precipitado con citrato de sodio

A una muestra de 15 mL de medio de cultivo que previamente estuvo en contacto con las cuentas, se le agregó isopropanol a una concentración final en la muestra de 20%, provocando la formación del precipitado, posteriormente se agregaron 300 µL de citrato de sodio 20% para disolver el alginato. Finalmente se siguió la metodología de EFS descrita arriba y se calculó el porcentaje de recobro.

2.6.2. Lavado del matraz vacío con diferentes porcentajes de isopropanol

Para evitar la formación del precipitado no se agregó isopropanol a la muestra del cultivo líquido y los 15 mL de la misma se pasaron directamente a través del cartucho. Sin embargo el matraz fue lavado posteriormente con 10 mL de una mezcla isopropanol:agua y éste lavado se pasó a través del cartucho. Entonces se siguió la metodología de extracción en fase sólida ya descrita para obtener el recobro con diferentes porcentajes de isopropanol utilizados. Los porcentajes de isopropanol utilizados para lavar el matraz fueron 20%, 30% y 40%.

2.6.3. Método de extracción en fase sólida modificado

Con base en los resultados obtenidos de la sección anterior y presentados y discutidos más adelante en la sección 3.3 (pág. 57) de resultados, se seleccionó usar 10 mL de 20% de isopropanol:agua como solución de lavado del matraz después de la aplicación del cultivo líquido centrifugado al cartucho de EFS.

Entonces la metodología de EFS utilizada en este trabajo basada en los trabajos realizados por Velazco, 2011 y Diaz, 2013, se modificó para el manejo de los cultivos de algas inmovilizadas, con un lavado del matraz de la muestra empleando una disolución de isopropanol 20%, la cual fue también aplicada al cartucho EFS.

La figura 2.2. ilustra la metodología de EFS modificada, para extraer BaP del medio de cultivo proveniente de las microalgas inmovilizadas. Se evaluó linealidad y precisión de esta metodología y se utilizó en los ensayos de exposición para recuperar el BaP residual.

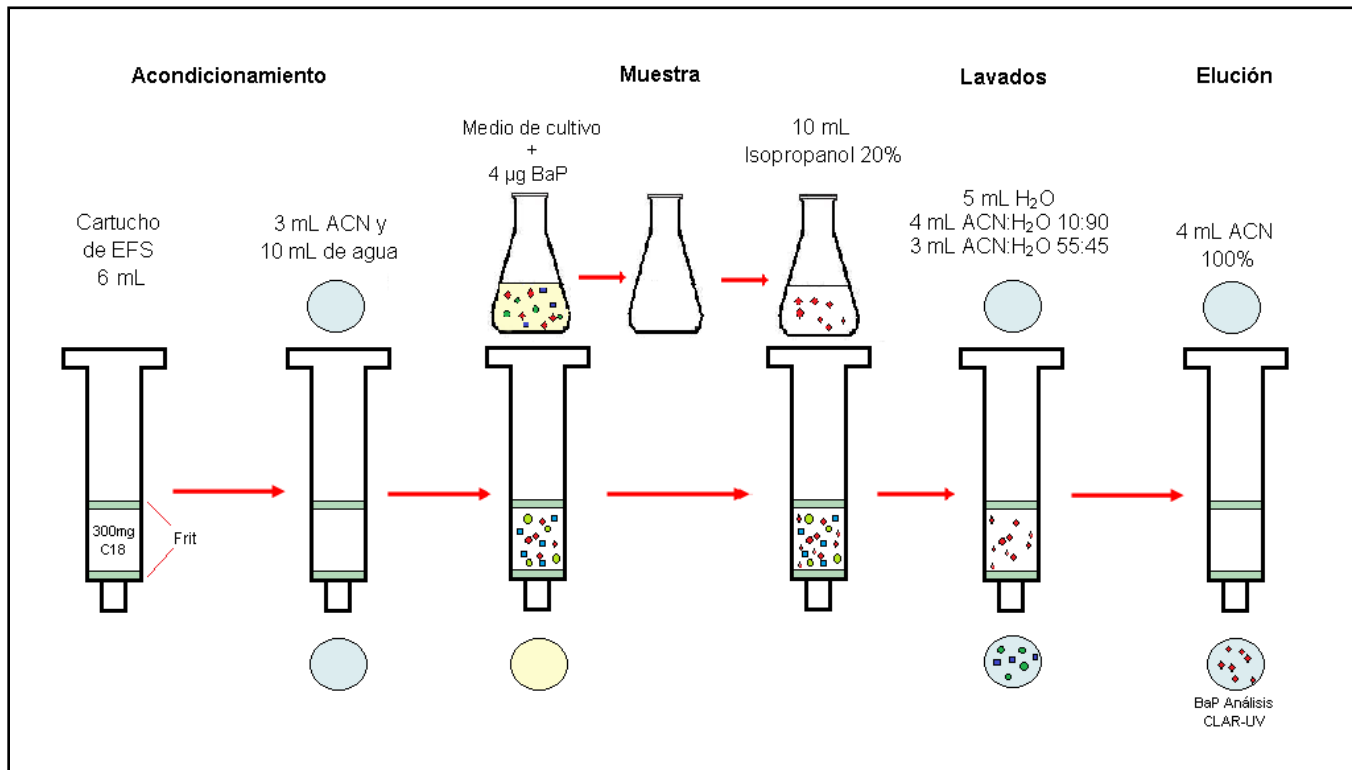


Figura 2.2. Metodología de EFS modificada para extraer BaP del medio de cultivo con microalgas inmovilizadas en alginato.

2.6.4. Validación de la metodología de EFS-CLAR-UV

2.6.4.1. Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó en un intervalo de concentraciones de BaP en la muestra de 27, 67, 133, 266 y 400 µg/L. Así, se fortificaron 15 mL de medio de cultivo con el volumen necesario de una solución de 40 µg/mL para llegar a cada una de las cinco concentraciones de la curva y posteriormente se siguió la metodología de extracción en fase sólida descrita en el esquema 2.2. para obtener un extracto de 4 mL que se analizó por CLAR-UV. La curva se realizó por triplicado, con los datos obtenidos se trazó una gráfica de µg de BaP recuperados en función de los µg de BaP adicionados en donde la pendiente multiplicada por 100 representa el recobro global y como parámetro de linealidad se calculó r^2 .

2.6.4.2. Precisión del método

Se fortificaron 15 mL de medio de cultivo con BaP para llegar a una concentración de 266 µg/L en la muestra, se realizó extracción en fase sólida por triplicado en un mismo día bajo las mismas condiciones para evaluar repetibilidad. Para evaluar la reproducibilidad se realizaron

tres extracciones en tres días diferentes. Para ambas medidas de precisión se determinó el %CV del recobro obtenido. El porcentaje de recobro se calculó con la ecuación 2.4.

2.8. Método de dispersión de matriz en fase sólida

Para realizar la dispersión de matriz en fase sólida se siguió una metodología antes desarrollada para la extracción de HAPs de la biomasa (Velazco, 2011; Diaz, 2013) con la adición de un primer paso que consistió en la disolución de las cuentas de alginato con una disolución de citrato de sodio para liberar a las microalgas y después ponerlas a secar. En esta metodología 5 mg de biomasa seca son adicionados con el HAP y mezclados con 100 mg de sílice C18 en un mortero de ágata, hasta obtener una mezcla homogénea, esta mezcla se empaca entre dos frits en un cartucho de 1 mL y después se realiza una secuencia de lavados que consiste en 10 mL de agua, 5 mL de una solución 20% ACN en agua y 1.5 mL de una solución 60% ACN en agua, estos lavados fueron desechados y finalmente el HAP es eluído con 500 μ L de una disolución al 90% de ACN en agua y el extracto fue analizado por cromatografía de líquidos con detector UV.

La figura 2.3. presenta la metodología de DMFS para extraer BaP de la biomasa recuperada, después de haber sido inmovilizada en alginato de sodio.

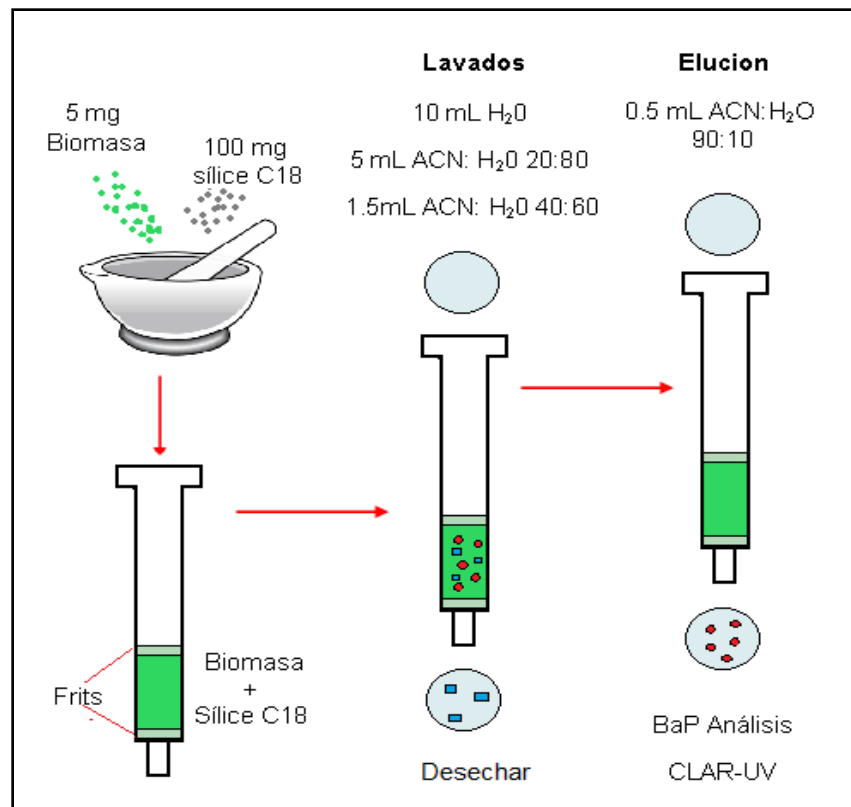


Figura 2.3. Metodología para extraer BaP de la biomasa.

2.8.1 Validación del método de DMFS

2.8.1.2. Linealidad del método

Para evaluar la linealidad del método de DMFS se fortificaron 5 mg de biomasa con el volumen necesario de una disolución de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BaP para llegar a cada una de las concentraciones de la curva, el intervalo de concentraciones en el que se evaluó la linealidad fue de 0.1, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de muestra, posteriormente se siguió la metodología establecida para DMFS antes descrita. La curva se realizó por triplicado, con los datos obtenidos se trazó una gráfica de μg de BaP recuperados en función de los μg de BaP adicionados para obtener el recobro global y como parámetro de linealidad se calculó r^2 .

2.8.1.3. Precisión del método

La variabilidad en un mismo día para el método de DMFS fue evaluada con el valor del %CV asociado a los recobros obtenidos después de realizar DMFS a una muestra de 0.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ por triplicado. Para la variabilidad entre días se realizó por triplicado, en tres días diferentes.

2.9. Bioensayos de exposición

Se inmovilizó en alginato a *S. capricornutum* siguiendo el procedimiento que se ilustra en detalle en la figura 3.3. (pág. 54) de la sección de resultados; de esta manera se obtuvieron cuentas de alginato con las microalgas inmovilizadas, las cuales fueron sumergidas en 15 mL de medio Bristol. Las cuentas de alginato con las microalgas inmovilizadas se expusieron a una concentración de BaP de 266 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para fijar esta concentración en el medio, se tomaron 100 μL de una solución de BaP con una concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se realizaron ensayos de exposición a los tiempos de 0.75, 1.5, 3, 6, 9 y 15 h, utilizando luz amarilla, 25°C y agitación constante a 50 rpm.

Los ensayos de exposición de *S. capricornutum* frente a BaP a cada uno de los tiempos de exposición se realizaron por triplicado. Una vez transcurrido el tiempo de exposición el medio líquido fue tratado por EFS para extraer BaP y las cuentas que contenían a las microalgas se deshicieron con citrato de sodio 9% y se recuperó la biomasa para extraer BaP mediante el método de DMFS. Los extractos fueron analizados por CLAR-UV

Los bioensayos se realizaron para evaluar la capacidad de *S. capricornutum* inmovilizada en alginato para remover BaP del medio de cultivo, el procedimiento se muestra en la figura 2.4.

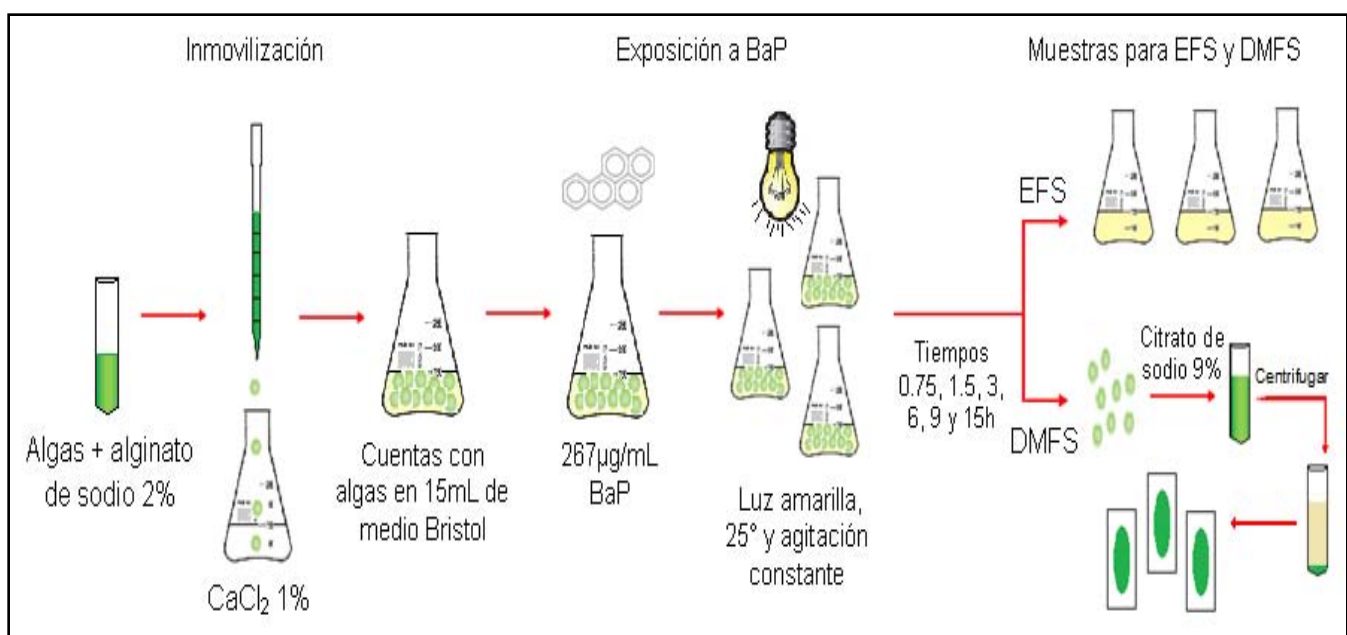


Figura 2.4. Procedimiento de ensayos de exposición.

La remoción de BaP del medio de cultivo se calculó con la siguiente fórmula

$$\% \text{remoción} = \frac{\text{ng adicionados} - \text{ng recuperados}}{\text{ng adicionados}} * 100 \dots \dots \dots 2.5.$$

Donde los ng adicionados de BaP son 4000 y los ng recuperados son los que se obtuvieron por EFS en el medio después de que *S. capricornutum* inmovilizada fue expuesta a BaP a diferentes tiempos.

2.9.1. Efecto de la temperatura

Se realizó un ensayo de exposición por triplicado a un tiempo de 6 h bajo las mismas condiciones de luz y agitación que las que se describieron en la sección anterior, a una temperatura de 30° y los resultados se compararon con los obtenidos en el ensayo de exposición de 6 h a 25°, cuyo procedimiento es descrito en la sección 2.9.

2.9.2. Efecto de la cantidad de algas por cuenta

Para esta prueba se utilizó una muestra de cultivo de *S. capricornutum* de 15 mL con absorbancia 1 conservando el mismo número de algas que en todos los ensayos (5×10^6 células/mL), y se inmovilizó como se describe a continuación. Una disolución de alginato de sodio 3% se mezcló con medio de cultivo con algas en una proporción 2:1 para tener un volumen final de 3 mL, este volumen se goteó en una solución de CaCl₂ 1%, las cuentas se colocaron en 15 mL de medio de cultivo Bristol y fueron expuestas a BaP por un periodo de tiempo de 6 h, a 25° con luz amarilla y agitación constante, esta prueba se realizó por triplicado, los resultados se compararon con los obtenidos en el ensayo de exposición de 6 h realizado en la sección 2.9. en el cual el volumen que se goteó en la solución de CaCl₂ fue de 6 mL.

2.9.3. Comparación con algas libres

Los resultados obtenidos en los ensayos de exposición de *S. capricornutum* inmovilizada en cuentas de alginato a 0.75, 1.5, 3 y 6 h realizados como se indica en la sección 2.9. fueron comparados con los resultados de los ensayos de exposición de *S. capricornutum* en forma libre para remover BaP del medio de cultivo reportados por Beltran, 2014.

CAPITULO 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Optimización de las condiciones de inmovilización

3.1.1. Selección de las concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio

Uno de los requisitos para escoger una superficie de inmovilización para microalgas es que éste permita el paso de luz (Mallick, 2002), también es importante considerar que el paso de sustratos es necesario para que las microalgas puedan remover el BaP. De Bashan y Bashan, 2010, mencionan que el tamaño de poro de las cuentas de alginato de calcio disminuye con el aumento de la dureza y ésta es mayor con el aumento de las concentraciones de alginato de sodio y del agente de reticulación utilizado (Ca^{2+}). Por lo tanto, en el presente trabajo la dureza y la transparencia fueron dos características a evaluar para encontrar las concentraciones de alginato de sodio y de CaCl_2 apropiadas para inmovilizar a *Selenastrum capricornutum* y mantener su viabilidad.

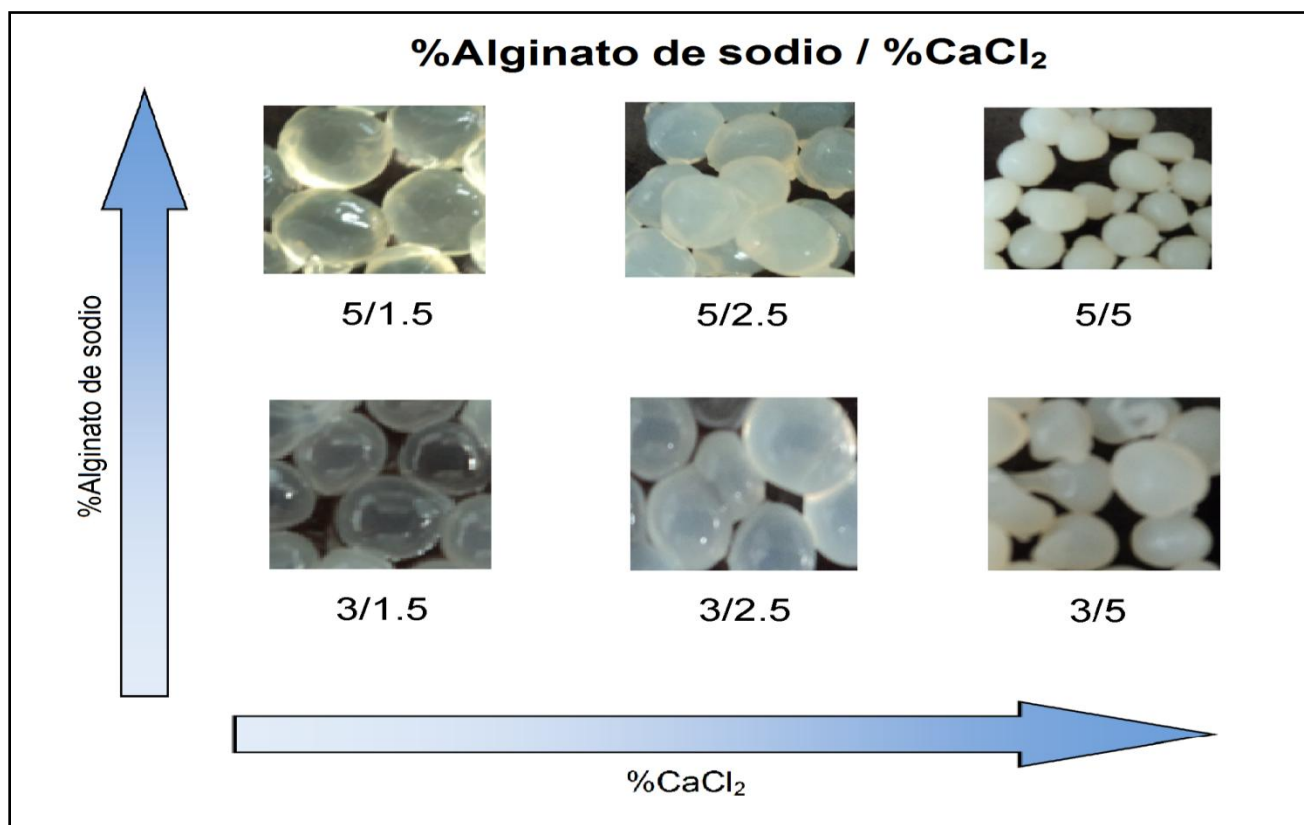


Figura 3.1. Cuentas obtenidas a diferentes concentraciones de alginato de sodio y de CaCl_2 .

En la figura 3.1. se observan las diferentes cuentas obtenidas con diferentes proporciones de alginato y cloruro de calcio. Al aumentar la concentración de CaCl_2 las cuentas fueron más blancas y por lo tanto más duras. Se obtuvieron cuentas transparentes con 5% de alginato y 1.5% CaCl_2 , sin embargo la solución de alginato de sodio en esta concentración fue difícil de gotear debido a que es muy viscosa, además de que es complicado prepararla ya que el alginato de sodio no es soluble en agua a temperatura ambiente y es necesario calentar. Por lo tanto, se tuvo que disminuir la concentración de alginato de sodio a 3% para obtener cuentas transparentes y con una dureza adecuada. Entonces, las cuentas con las mejores características de transparencia y dureza fueron las obtenidas con alginato de sodio 3% y CaCl_2 1.5%.

Estas condiciones se utilizaron inicialmente para inmovilizar a las microalgas. Sin embargo, al inmovilizar las microalgas así se observó que las cuentas tenían un aspecto blanquecino que no permitían bien el paso de luz, por lo que se tuvo que disminuir la concentración de alginato de sodio de 3 a 2% y la de CaCl_2 de 1.5 a 1%. Entonces, la inmovilización de *S. capricornutum* se llevó a cabo con alginato de sodio 2% y CaCl_2 1%. En la figura 3.2. se observan las cuentas que se obtuvieron con las concentraciones mencionadas.



Figura 3.2. Cuentas con microalgas inmovilizadas con alginato de sodio 2% y CaCl_2 1%.

3.1.2. Procedimiento global para inmovilizar a *S. capricornutum*

Se tomó una muestra de 15 mL de medio de crecimiento de la microalga *S. capricornutum* con absorbancia 1 y se centrifugó; el botón con la biomasa fue resuspendido en 2 mL del sobrenadante y se mezcló con 4 mL de alginato de sodio al 3%.

La mezcla de alginato de sodio 3% y medio de cultivo se realizó en una proporción 2:1 para obtener una concentración final de alginato de sodio del 2% y un volumen de 6 mL. Esta mezcla fue goteada con una pipeta graduada en 20 mL de una solución de CaCl_2 1% contenida en un matraz. Se obtuvieron en promedio 88 cuentas ($n=5$, %CV= 5.4). Después de esperar 1 minuto, la solución de CaCl_2 se retiró del matraz y se colocaron 15 mL de medio Bristol estéril a las cuentas con microalgas. El procedimiento se efectuó bajo condiciones asépticas.

Es importante destacar que la disolución de alginato se esterilizó previamente mediante filtración con una membrana de nitrocelulosa con poro de $0.22 \mu\text{m}$ y la disolución de CaCl_2 1% se esterilizó en autoclave (121° , 30 min).

En la figura 3.3. se presenta el procedimiento para inmovilizar a *S. capricornutum* y la obtención de las muestras que se usaron para realizar la optimización y la validación de las metodologías de EFS y DMFS.

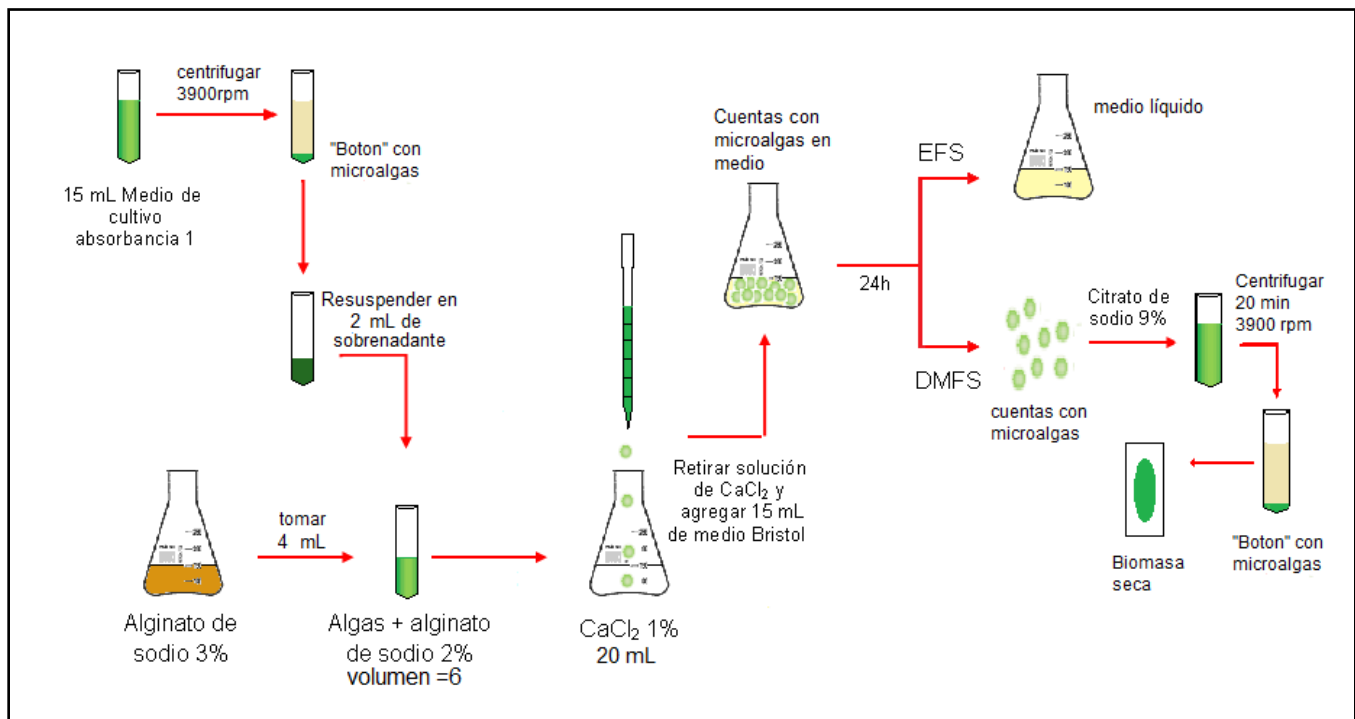


Figura 3.3. Obtención de muestras de cultivo y biomasa.

3.1.3 Viabilidad celular

Olmos, 2013 monitoreó el crecimiento de *Selenastrum capricornutum* y encontró que el peso seco de la biomasa presente en 15 mL de medio de crecimiento líquido con absorbancia de 1 a 685 nm, es de aproximadamente 5 mg. La relación anterior fue determinada con las microalgas libres en cultivo de crecimiento. Al considerar la inmovilización de la cantidad total de las microalgas contenidas en los mismos 15 mL durante 24 horas, se observó que el peso seco promedio fue de 5.56 mg con $\sigma = 0.63$ y $n = 6$. Entonces, el peso seco de la biomasa después de haber estado inmovilizada en las cuentas de alginato es muy similar al reportado previamente cuando *Selenastrum capricornutum* se encuentra en medio libre, lo que indica que las condiciones de inmovilización establecidas permiten mantener viva a la microalga, y con posibilidades de reproducirse. Las pruebas de viabilidad se hicieron considerando un tiempo de 24 h, ya que es el tiempo máximo que durarían los ensayos de exposición; sin embargo esto no significa que con las condiciones de inmovilización establecidas la microalga no resista más tiempo inmovilizada. El haber obtenido una cantidad un poco mayor de microalgas después de que estas permanecieron 24 h inmovilizadas, tomando inicialmente el cultivo en absorbancia 1, podría indicar que el crecimiento continúa dentro de la misma cuenta de alginato. Ruiz-Marin et al., 2011, inmovilizó a la microalga *S. obliquus* en cuentas de alginato de calcio y observó que el número de microalgas por cuenta aumenta gradualmente con el tiempo y sugiere que después de la inmovilización, la microalga *S. obliquus* todavía fue capaz de experimentar división celular y llevar a cabo fotosíntesis.

3.2. Validación del sistema

3.2.1. Linealidad

El análisis de BaP se efectuó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en una columna de fase inversa con metanol puro como fase móvil. En estas condiciones el t_r de BaP es de 3.6 minutos. La linealidad del sistema se evaluó mediante la respuesta obtenida en función de la concentración en un intervalo de concentraciones de BaP de 0.5 a 10 $\mu\text{g/mL}$. En la gráfica 3.4. se muestra, que se obtuvo un valor de $r^2 = 0.997$, esto indica que el sistema tiene una respuesta lineal en este intervalo de concentraciones seleccionado, además el sistema cumple con la recomendación de la USEPA la cual indica se debe tener un valor de $r^2 > 0.99$.

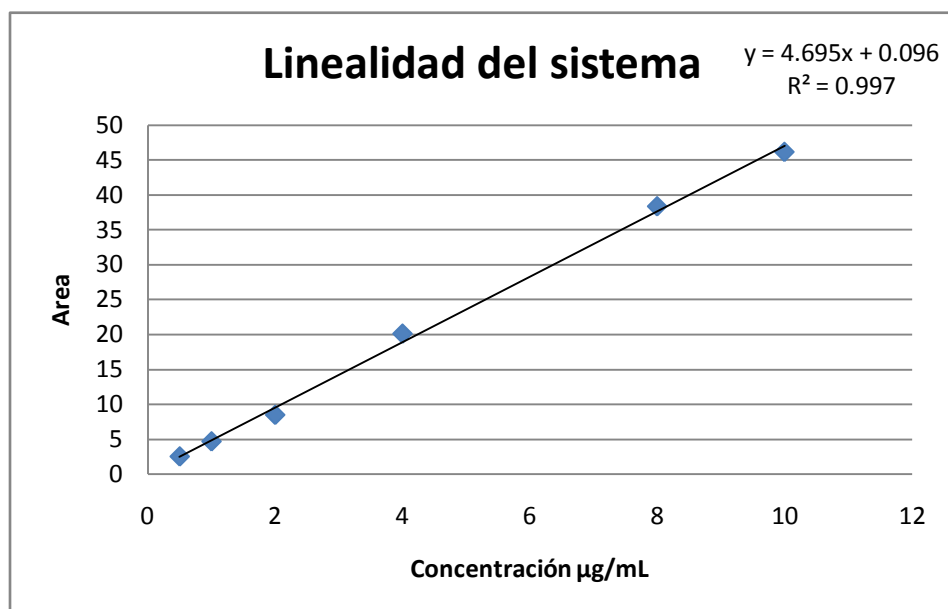


Figura 3.4. Linealidad del sistema

3.2.2. Precisión

En la tabla 3.1. se observa que se obtuvieron coeficientes de variación menores de 1.2% para la repetibilidad, el coeficiente de variación para la reproducibilidad fue menor de 1.7% para las dos concentraciones evaluadas. Por lo tanto, se puede decir que el sistema es repetible y reproducible.

Tabla 3.1. Precisión del sistema a dos niveles de concentración.

Concentración (µg/mL)	Repetibilidad %CV	Reproducibilidad %CV
0.5	0.74	1.67
8	1.17	1.54

3.2.3. Límites de detección y de cuantificación instrumentales

El LD y LC fueron obtenidos a partir de una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 0.025 a 1 µg/mL. La concentración más baja que puede ser detectada por el sistema, es decir el LD fue 0.056 µg/mL y el LC fue de 0.17 µg/mL, este valor representa la concentración más baja que el sistema puede cuantificar con precisión y exactitud aceptables. El valor del LD obtenido de manera experimental fue 0.025 µg/mL.

3.3. Extracción en fase sólida

Smidsrod y Skjak, 1990 indican que las cuentas de alginato pueden desestabilizarse en presencia de fosfatos, citratos y Na^+ . Entonces, dado que, el medio de cultivo Bristol contiene pequeñas cantidades de fosfatos y Na^+ , se considero la posibilidad de que las cuentas que estuvieron en contacto con él medio Bristol pudieron haberse desestabilizado y liberado alginato. En efecto, cuando al medio de cultivo se le agregó el isopropanol, como propone la metodología desarrollada por Velasco, 2011 y Díaz, 2013 para disminuir la interacción de BaP con el vidrio del matraz, se presentó la formación de un precipitado el cual se pudo solubilizar posteriormente con la adición de 300 μL de citrato de sodio al 30%. De esta manera se efectuó en un primer tiempo la extracción en fase sólida de BaP del medio de cultivo líquido por la metodología de EFS. Sin embargo, se obtuvo un porcentaje de recobro promedio de 42.6%, el cual es considerado muy bajo y no se encuentra dentro de los recobros recomendados por USEPA (70-130%).

Entonces, se realizaron pruebas con otros disolventes orgánicos como metanol y acetonitrilo pero también hubo formación de precipitado, por lo que finalmente se decidió no agregar ningún disolvente orgánico a la muestra y aplicarla así directamente al cartucho de EFS y posteriormente lavar el matraz que la contenía con 10 mL de una mezcla isopropanol:agua, las proporciones probadas fueron 20:80, 30:70 y 40:60 con el objetivo de recuperar el BaP adsorbido a la superficie del matraz. Este lavado se pasó también a través del cartucho de EFS y se realizó la secuencia de lavados propuesta por Velasco, 2011 y Díaz, 2013 y la elución de BaP con acetonitrilo. El porcentaje de recobro obtenido para cada porcentaje de isopropanol probado se reporta en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Recobros promedio obtenidos usando lavados del matraz de la muestra con diferentes porcentajes de isopropanol, n=3.

%Isopropanol	%Recobro
20	75 \pm 3.8
30	76 \pm 4.2
40	63 \pm 4.8

Con base en los resultados presentados en la tabla 3.2. donde se observa que los recobros obtenidos entre el 20 y 30% son similares mientras que con 40% disminuyen, se seleccionó el 20% de isopropanol:agua como lavado. Entonces la metodología de EFS utilizada en este trabajo basada en los trabajos realizados por Velazco, 2011 y Diaz, 2013 se modificó para el manejo de los cultivos con algas inmovilizadas con un lavado del matraz de la muestra con 10mL de una disolución de isopropanol 20%, que después también fue aplicado al cartucho EFS, para seguir con el procedimiento descrito en la sección 2.6. (pág. 45) de la metodología.

Por otra parte, la biomasa fue preparada por DMFS según el procedimiento descrito en la sección 2.8 (pág. 48) de la metodología.

3.4. Validación de las metodologías EFS y DMFS

3.2. Linealidad

En la figura 3.5. se presenta la cantidad de BaP recuperada por EFS en función de la cantidad adicionada, se obtuvo una $r^2 > 0.99$ lo que indica que la metodología es lineal en el intervalo de concentraciones evaluado. De la ecuación de la recta la pendiente por 100 representa al %recobro global, que en el caso del método de EFS fue de 72.4%.

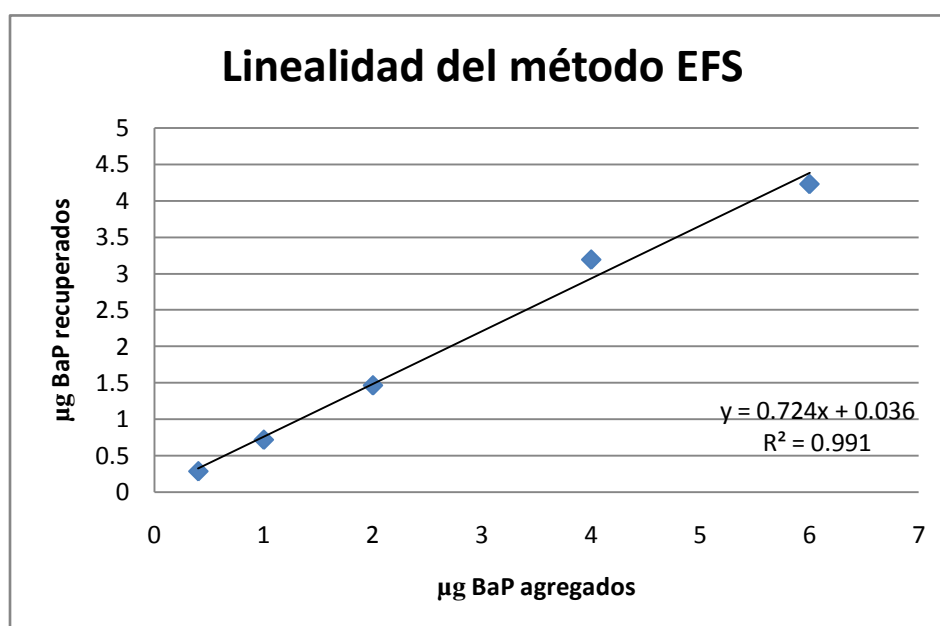


Figura 3.5. Cantidad de BaP recuperada por EFS en función de la cantidad de BaP adicionada a muestras de medio de cultivo.

Igualmente, se observa en la figura 3.6. que la metodología de DMFS fue lineal en el intervalo de concentraciones evaluadas con un valor de $r^2 > 0.99$, de la ecuación de la recta que se obtiene de graficar μg de BaP recuperados de la biomasa a las diferentes concentraciones evaluadas mediante DMFS en función de los μg de BaP adicionados. En este caso se obtuvo un recobro global de 85.7%.

El recobro global obtenido para ambas metodologías es aceptable ya que la USEPA (método 8100) indica que el porcentaje de recobro debe encontrarse entre 70 y 130%.

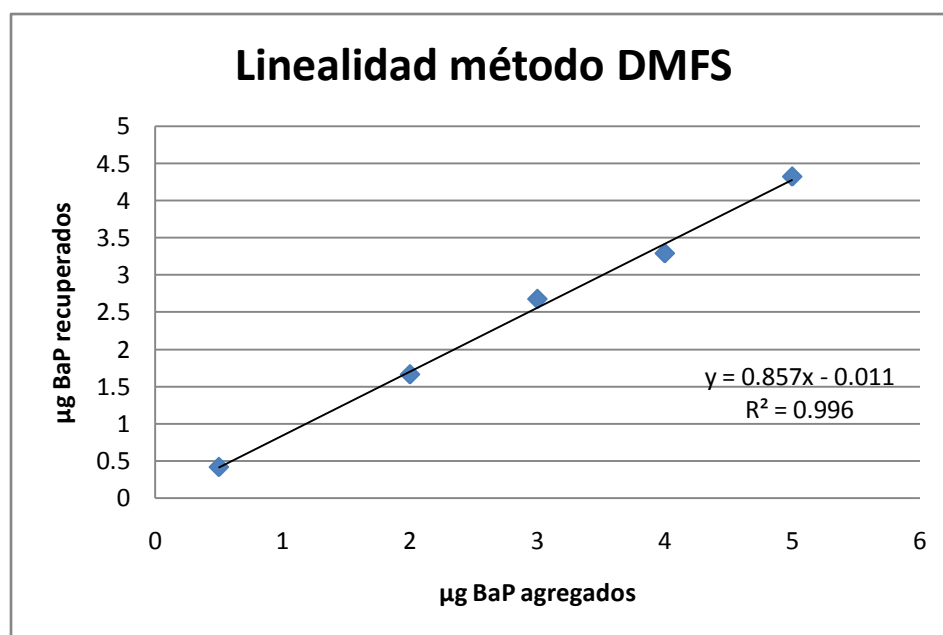


Figura 3.6. Cantidad de BaP recuperada por DMFS en función de la cantidad de BaP adicionada a la biomasa.

3.4.2. Precisión

Para ambas metodologías se evaluaron la repetibilidad y reproducibilidad como medidas de precisión. El %CV obtenido para la metodología de EFS a una concentración de BaP en la muestra de 266 $\mu\text{g/L}$, fue de 8.5% en triplicados realizados un mismo día y para las extracciones realizadas en 3 días diferentes a esta misma concentración fue de 9.2%. La repetibilidad y reproducibilidad para la metodología de DMFS fueron evaluadas a una concentración en la muestra de 0.8 $\mu\text{g/mg}$, el %CV obtenido para un triplicado en un mismo día fue de 4.0% y en 3 días diferentes fue de 5.8%. Los valores de %CV obtenidos para

ambas metodologías indican que las metodologías tienen una buena repetibilidad y reproducibilidad.

3.5. Bioensayos de exposición a BaP

3.5.1. Evaluación de la capacidad de *S. capricornutum* inmovilizada para remover BaP del medio de cultivo.

El sistema CLAR-UV para la detección y cuantificación de los HAPs extraídos del medio y la biomasa mediante EFS y DMFS respectivamente, permitió el seguimiento de la remoción de BaP en bioensayos de exposición a diferentes tiempos con concentración de BaP fija de 266 µg/mL. Se observó que a mayor tiempo de exposición, la señal cromatográfica disminuía, mostrándose que existe la remoción de BaP (Anexo II). A partir del área de cada pico a cada uno de los tiempos de exposición, se calculó la cantidad de BaP en el medio y la biomasa.

En la figura 3.7. se presenta la variación de BaP del medio con respecto al tiempo de exposición. Se puede observar que a los primeros tiempos de exposición 0.75 y 1.5 h la cantidad de BaP en el medio varía poco, pero a partir de las tres horas es cuando empieza a disminuir, entre 3 y 15 h se observa que la cantidad de BaP en el medio disminuye rápidamente, después de 15 h la cantidad presente en el medio de cultivo es muy pequeña representando un poco más del 6% de la cantidad inicial. La disminución de la cantidad recuperada de BaP en el medio de cultivo indica que la microalga *Selenastrum capricornutum* inmovilizada con las condiciones establecidas en este trabajo, fue capaz de remover BaP del medio de cultivo.

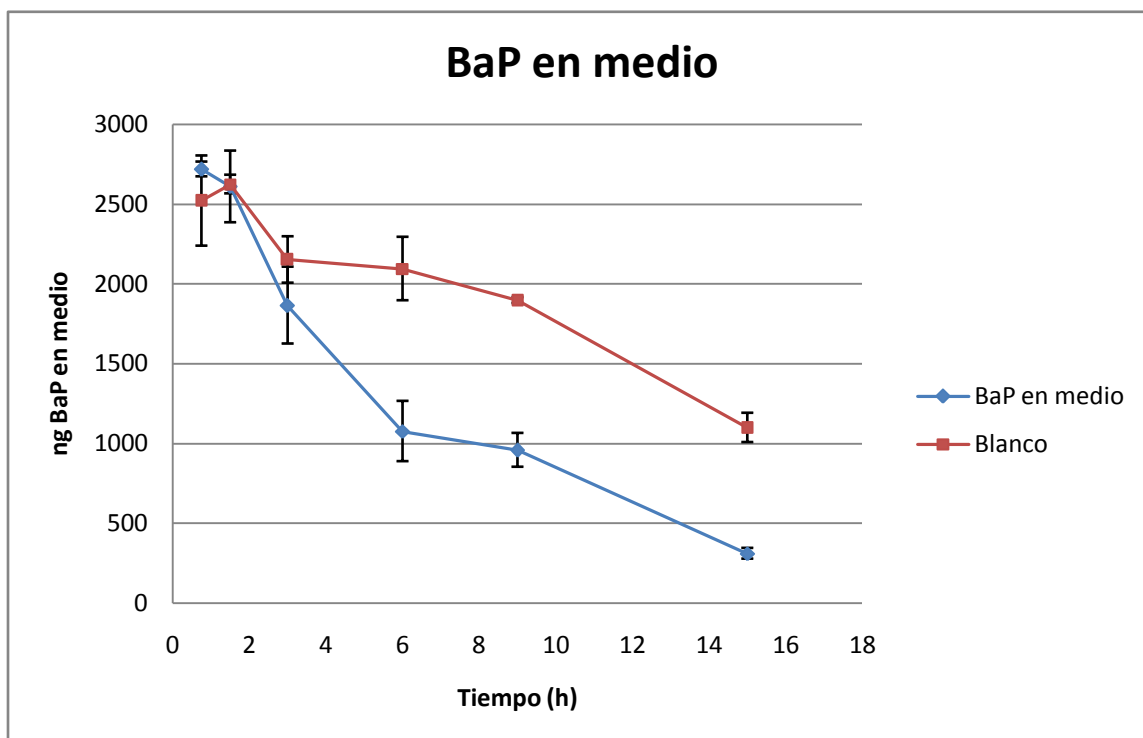


Figura 3.7. Cantidad de BaP recuperada del medio de cultivo líquido.

Con respecto al blanco también se observó disminución, aunque menor que con las microalgas; se puede decir que la disminución de BaP en el medio de cultivo representa la remoción abiótica como la fotoxidación. Es importante mencionar que la disminución de BaP en el medio de cultivo del blanco siempre es menor a la que ocurre en el medio de cultivo con las algas inmovilizadas a los tiempos de exposición realizados. De esta manera, las cantidades de BaP recuperadas en el blanco fueron mayores que las del ensayo con la microalga.

La figura 3.8. presenta la cantidad de BaP encontrada en la biomasa en función del tiempo de exposición. Se puede observar que la cantidad de BaP encontrada en la biomasa aumenta con el tiempo de exposición hasta las 9 h, esto debido a la adsorción en la superficie celular y entre 9 y 15 h la cantidad empieza a disminuir esto debido a la degradación. Algo importante a considerar es que la cantidad encontrada en la biomasa representa un porcentaje muy pequeño de la cantidad inicial, siendo 5% el porcentaje máximo encontrado en la biomasa a un tiempo de exposición de 9 h.

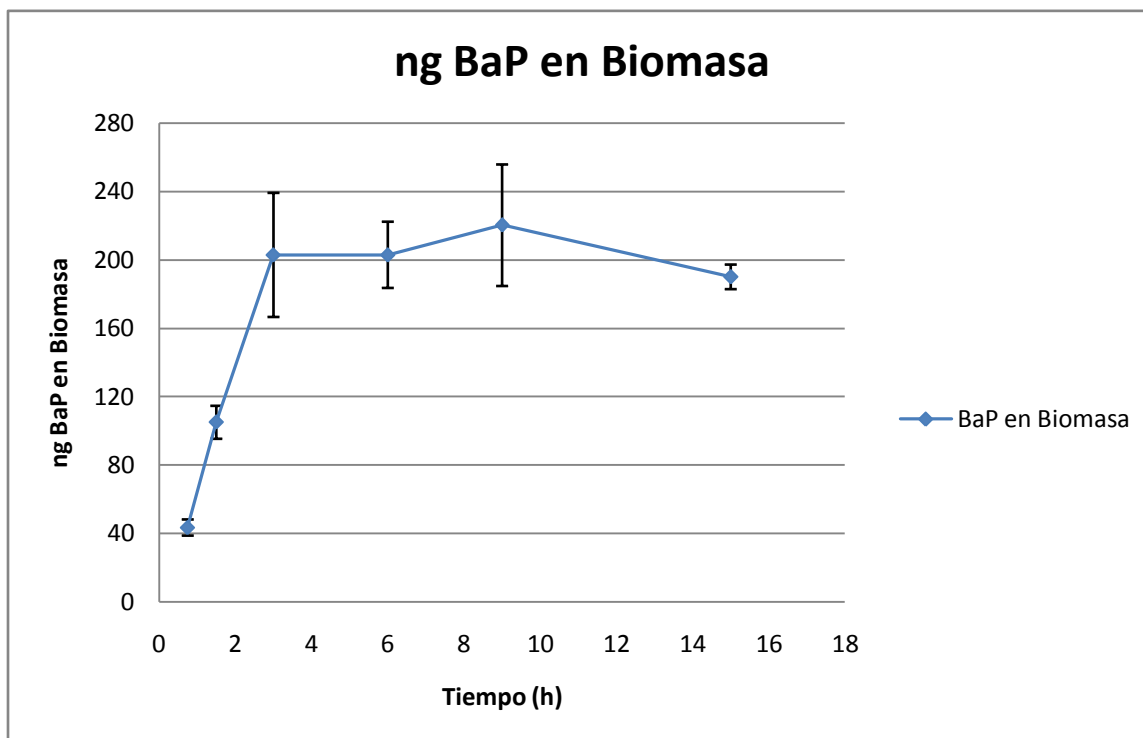


Figura 3.8. Cantidad de BaP encontrada en la biomasa.

En la figura 3.9. se presenta el porcentaje total de BaP extraído después de cada uno de los tiempos de exposición, que es el resultado de sumar el %BaP extraído de la biomasa por el método de DMFS y el %BaP extraído del medio de cultivo mediante el método de EFS. De manera general puede decirse que a todos los tiempos de exposición realizados, la cantidad de BaP encontrada en la biomasa representa una parte mínima del total recuperado, estos resultados sugieren que la remoción llevada a cabo por *S. capricornutum* inmovilizada en alginato se da principalmente por biodegradación y no por adsorción a la superficie celular.

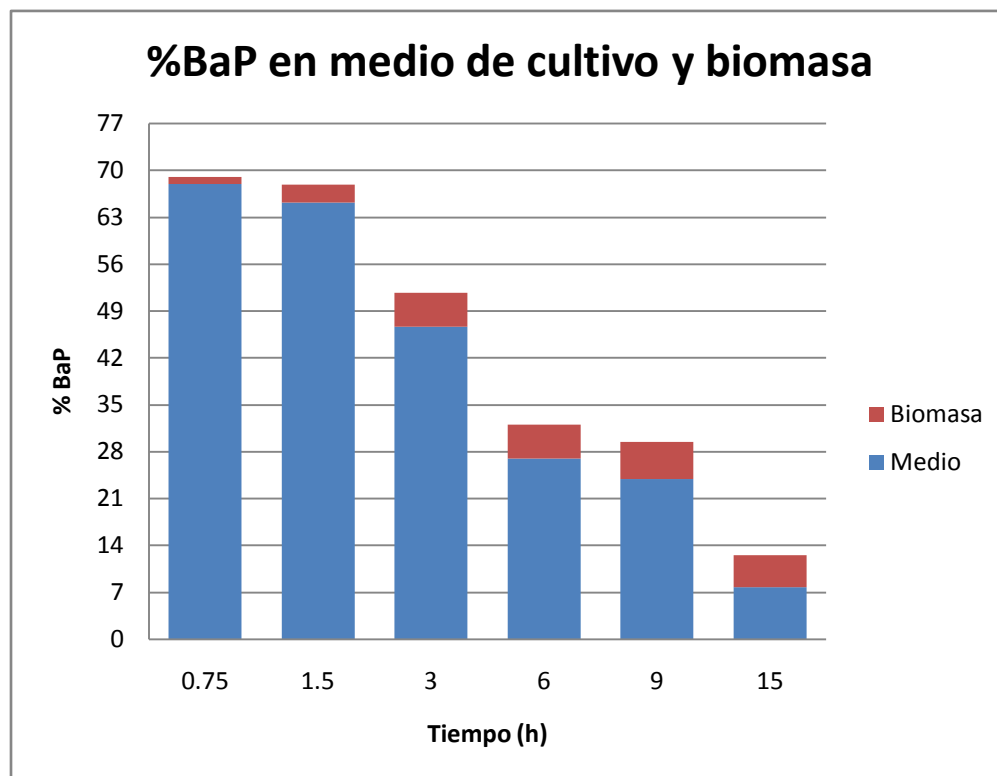


Figura 3.9. %BaP total recuperado de medio líquido y biomasa.

3.5.2. Efecto de la temperatura

Beltrán, 2014 observó la influencia de la temperatura en la remoción de BaP del medio de cultivo llevada a cabo por *S. capricornutum* en medio libre y encontró diferencia estadísticamente significativa entre 25 ° y 30 °C, obteniendo que cuando la microalga era expuesta a BaP a 30 °C, la cantidad recuperada era menor que cuando el ensayo de exposición era realizado a 25°. Con base en la influencia comprobada de la temperatura en la remoción de BaP, en esta sección se realiza una comparación entre estas dos temperaturas con *S. capricornutum* inmovilizada.

Los ensayos de exposición de *S. capricornutum* inmovilizada, descritos en la sección anterior se realizaron a 25°, a partir de estos resultados se sabe que a las 6 h es cuando hay una mayor disminución de la cantidad de BaP en el medio, por lo que para comparar la remoción que realiza la *S. capricornutum* inmovilizada a 30° se realizó un ensayo de exposición de 6 h con esta temperatura, los resultados se muestran en la figura 3.10. En esta figura se observa que el porcentaje en el medio recuperado a 30° es menor que el recuperado a 25°. Por lo

tanto, con 6 h de exposición y a 30° las microalgas inmobilizadas remueven mas BaP que el que remueven a 25° en ese mismo periodo de tiempo

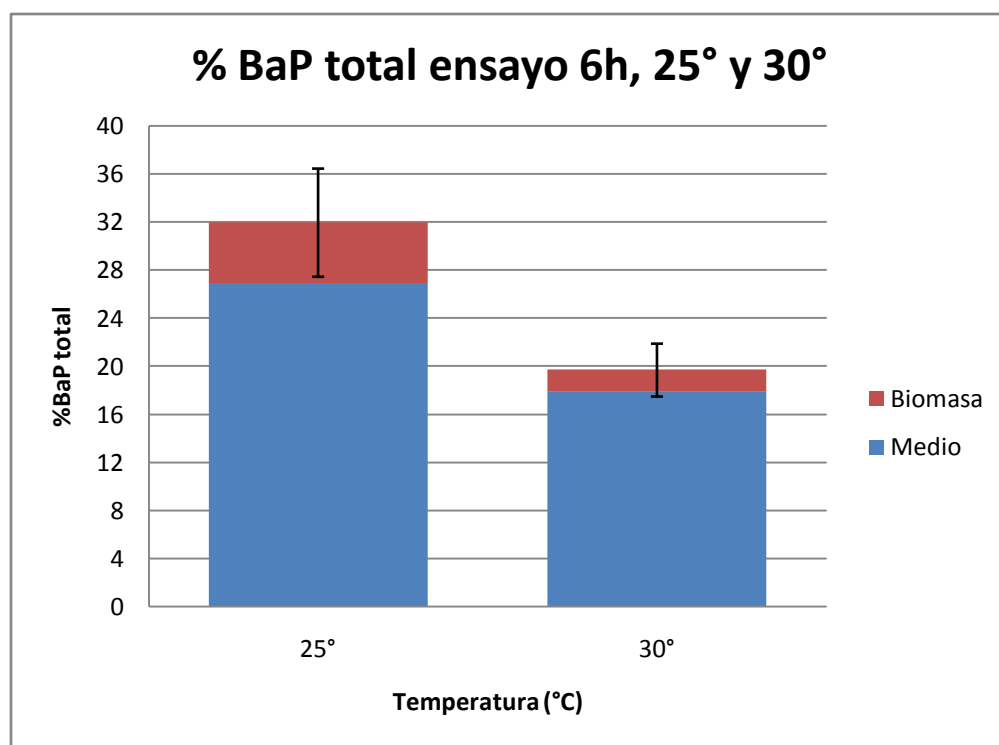


Figura 3.10. %BaP total recuperado después de 6h a 25° y 30°.

3.5.3. Efecto de la cantidad de microalgas por cuenta.

La inmobilización de microorganismos trata de imitar la capacidad de éstos para adherirse a superficies de manera natural, formando biofilms en los que hay mayor concentración de biomasa que en el agua donde se encuentran libres. Se ha observado que en los biofilms hay mayor actividad metabólica, la cual se atribuye a las altas cantidades de nutrientes que hay alrededor de éste. Una de las ventajas de la inmobilización en matrices poliméricas en forma esférica, es que con esta técnica se puede tener una alta concentración de microorganismos viables conservando las características de una inmobilización que se da por la tendencia natural de los microorganismos a adherirse a una superficie, sin embargo en cierta parte se sabe que una alta carga de microorganismos en las cuentas limita la difusión de sustratos y se ha encontrado que hay una menor difusión de oxígeno y una disminución del crecimiento (Cohen, 2001; Cassidy et al., 1991).

Por esta razón, se realizó una prueba aumentando al doble la concentración de microalgas por cuenta, es importante mencionar que el número de algas total fue el mismo que el utilizado en todos los ensayos realizados en este trabajo. Con la inmovilización realizada siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.1.2. (pág. 54) se obtienen 88 cuentas en promedio ($n=5$, $\%CV=5.4$), en esta sección se describen los resultados obtenidos al disminuir a la mitad el volumen goteado, obteniendo un mayor número de microalgas por cuenta, el número de cuentas promedio obtenido fue de 42 ($n=5$, $\%CV=6.21$). El porcentaje de BaP recuperado en el medio se presenta en la figura 3.11. con las microalgas inmovilizadas en diferente número de cuentas.

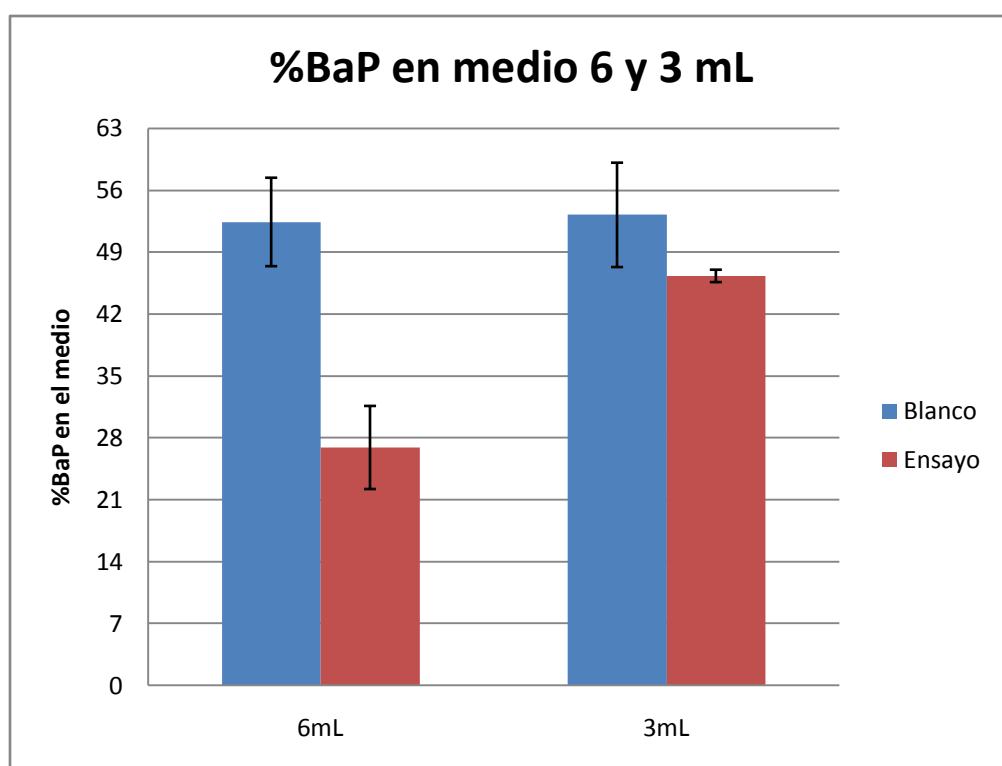


Figura 3.11. %BaP en el medio de cultivo después de 6 h de exposición. Con 6 mL (88 cuentas) y 3 mL (42 cuentas) de la suspensión alginato:algas.

En la figura 3.11. se observa que el %BaP en el medio de cultivo es mayor cuando las microalgas se encuentran distribuidas en 42 cuentas, esto indica que la remoción de BaP del medio de cultivo fue menor que la realizada por las microalgas cuando éstas se encuentran distribuidas en 88 cuentas, estos resultados podrían deberse a que la mayor densidad de microalgas por cuenta limitaron la difusión de sustratos incluyendo al BaP, teniendo un

impacto en la remoción de éste. Ruiz Marín et al., 2011, reportaron que la tasa fotosintética de *S. obliquus* cuando esta se encuentra inmovilizada en cuentas de alginato, es mayor en cuentas con baja densidad celular en comparación con la tasa fotosintética en cuentas con alta densidad celular, en las que existe limitación de luz.

3.5.4. Comparación con algas libres

En la figura 3.12. se muestra la comparación del porcentaje removido de BaP (calculado con la ecuación 2.5. por *S. capricornutum*, inmovilizada y en medio libre (Beltrán, 2014), con un tiempo máximo de exposición de 6 h, en donde se observa que la remoción llevada a cabo por las microalgas libres es más rápida llegando a remover aproximadamente el 90% de la cantidad inicial de BaP a las 6 h, mientras que con las microalgas inmovilizadas se removió un valor cercano de 70% de BaP después del mismo periodo de tiempo. Sin embargo, la tendencia para las microalgas inmovilizadas fue de remover cada vez más BaP del medio de cultivo, así que a las 9 h removieron ya el 76% y a las 15 h removieron 92% alcanzando así a remover el mismo porcentaje que removieron las microalgas libres a las 6 h. Con estos resultados se puede decir que la *S. capricornutum* inmovilizada puede remover la misma cantidad de BaP que cuando se encuentra libre, pero la remoción es más lenta.

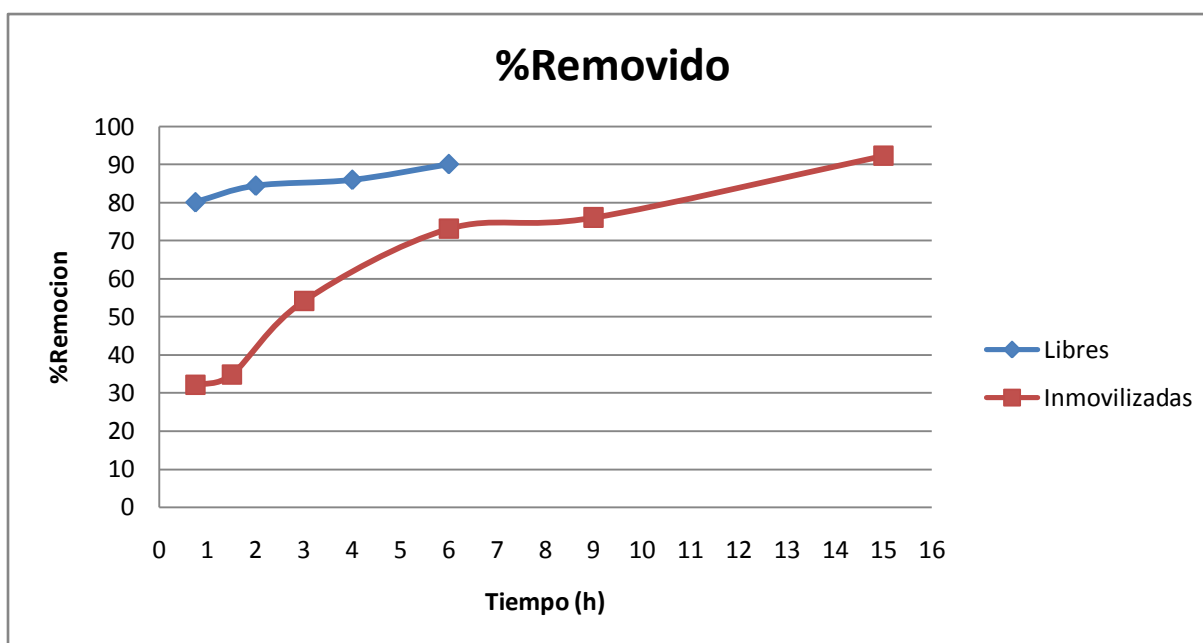


Figura 3.12. %Removido del medio de cultivo en función del tiempo por las microalgas libres e inmovilizadas.

La remoción de contaminantes utilizando microorganismos puede llevarse a cabo por la adsorción del compuesto a la superficie celular o por la biodegradación del contaminante. Con base en los trabajos realizados por Lindquist y Warshawsky, 1985 y Warshawsky, 1988, se sabe que *S. capricornutum* puede biodegradar al BaP. También Olmos, 2013, detectó la presencia de los metabolitos de BaP en medio de cultivo después de que la microalga fue expuesta a este compuesto; Beltrán, 2014 y Díaz, 2013 encontraron la presencia de BaP en la biomasa, y que éste iba disminuyendo con el paso del tiempo. Takacova et al., 2014 observó por microscopia de fluorescencia la presencia de BaP dentro de la microalga *Chlorella kessleri* y que su degradación se llevó a cabo después de 144 h, sugiriendo que esta microalga remueve primero BaP por adsorción y posteriormente lo internaliza y lo degrada.

Como se mencionó en la sección 3.5.1 la cantidad de BaP recuperada en la biomasa de los ensayos con *S. capricornutum* inmovilizada es muy baja, esto es una diferencia relevante con respecto a lo ocurrido cuando las microalgas libres son expuestas a BaP, en la figura 3.13. se presenta una comparación del %BaP total recuperado después de 6 h para las algas inmovilizadas y libres.

En la figura 3.13. también se observa que el %BaP total recuperado después de 6 h es igual para las microalgas libres (Beltrán, 2014) y las inmovilizadas. Sin embargo, en las microalgas libres se recuperó mayor cantidad de BaP en el medio que la que se encontró en la biomasa que fue inmovilizada. En el %removido se consideró que el BaP faltante en el medio después de cada tiempo de exposición había sido degradado por la microalga y que el BaP que se encontró en la biomasa representa la cantidad adsorbida por las microalgas. La cantidad inicial de BaP menos la cantidad encontrada en el medio. Dado que las microalgas libres muestran tendencia a adsorber el BaP es importante notar que parte del %removido por éstas, se debe a la adsorción, por ejemplo después de 6 h el %removido es más del 90% pero de este porcentaje 23% se encuentra adsorbido a las microalgas, en cambio para las microalgas inmovilizadas después de 6h se ha removido el 76% y de éste solo 5% se encuentra en la biomasa. Al parecer la cantidad de BaP que llega a las microalgas inmovilizadas parece estar dosificado y siendo inmediatamente degradado.

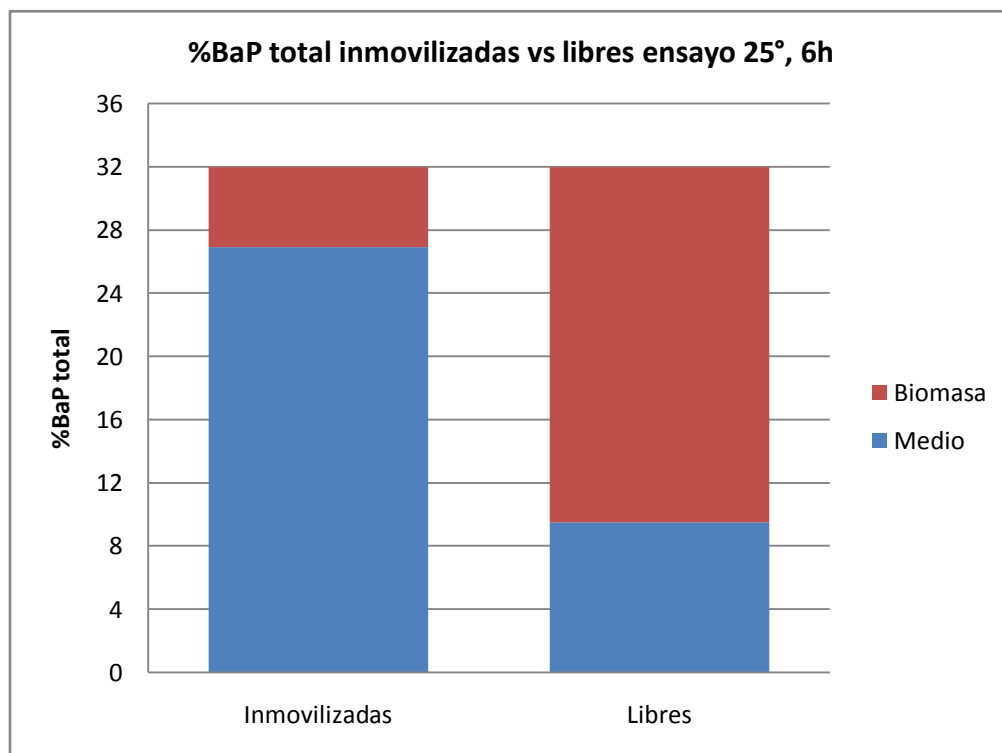


Figura 3.13. %BaP total recuperado después de 6 h, microalgas inmobilizadas y libres

El % degradado representa el %BaP removido por las microalgas por degradación y no por adsorción a la superficie celular y se calcula por la resta de la cantidad de BaP inicial menos la cantidad de BaP total, este último es la suma de la cantidad de BaP encontrada en el medio más la cantidad de BaP encontrada en la biomasa. El porcentaje degradado por *S. capricornutum* en medio libre e inmobilizada se presenta en la figura 3.14., en ésta puede observarse que el %BaP degradado por las microalgas libres en las primeras 3 h es mayor que el %degradado por las microalgas inmobilizadas. A partir de las 4 h el %BaP degradado es muy parecido para ambas y después de 6 h las microalgas inmobilizadas degradan cerca del 70% de BaP al igual que las microalgas libres.

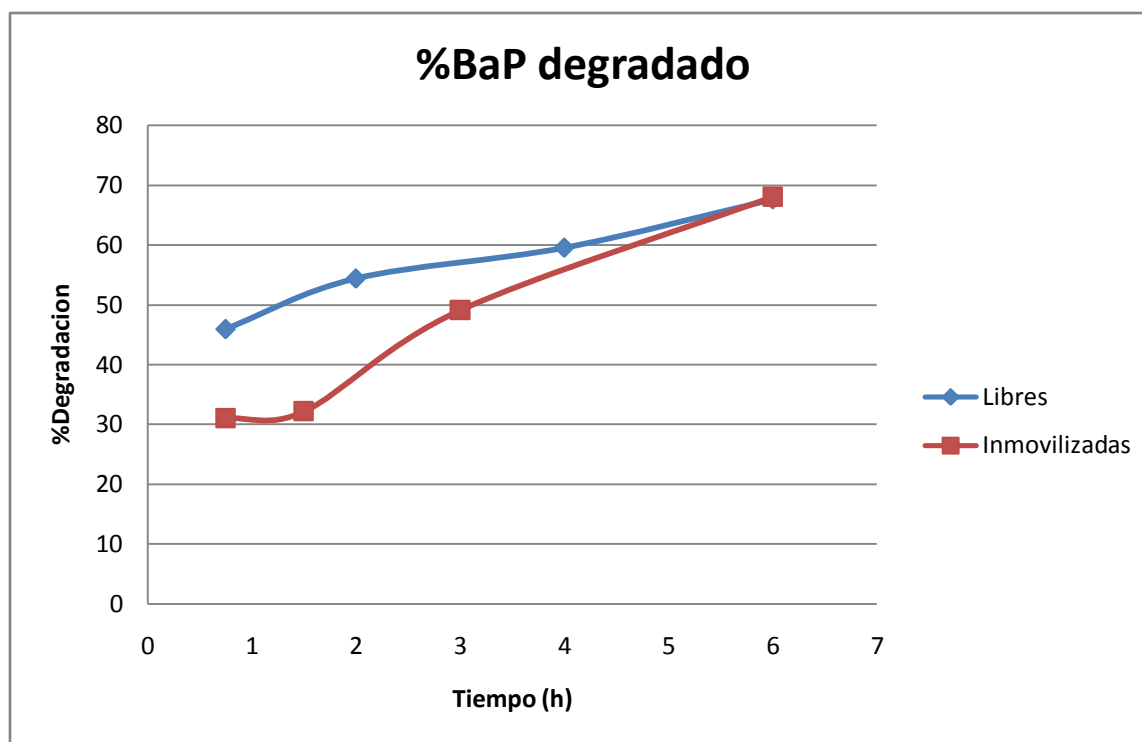


Figura 3.14. %BaP degradado por las microalgas inmovilizadas y libres.

Beltrán, 2014 encontró que la remoción de BaP realizada por *S. capricornutum* era mayor cuando ésta era realizada a 30° que la realizada por las microalgas a 25 C°. En la sección 3.5.2 se encuentran los resultados de evaluar la remoción de BaP a 30 C° realizada por la microalgas inmovilizadas, que indican que se remueve un mayor %BaP del medio a 30 C°. A continuación se compara la remoción llevada a cabo por las microalgas inmovilizadas y libres a 30 °C.

En la figura 3.15. se observa que para las microalgas libres se recupera un menor %BaP en el medio de cultivo esto indica que la remoción de las algas libres a 30° es mayor que la realizada por las microalgas inmovilizadas a esta misma temperatura. Sin embargo el %degradado que descarta el BaP en la biomasa es similar, las microalgas inmovilizadas degradan 76% y las libres 79%.

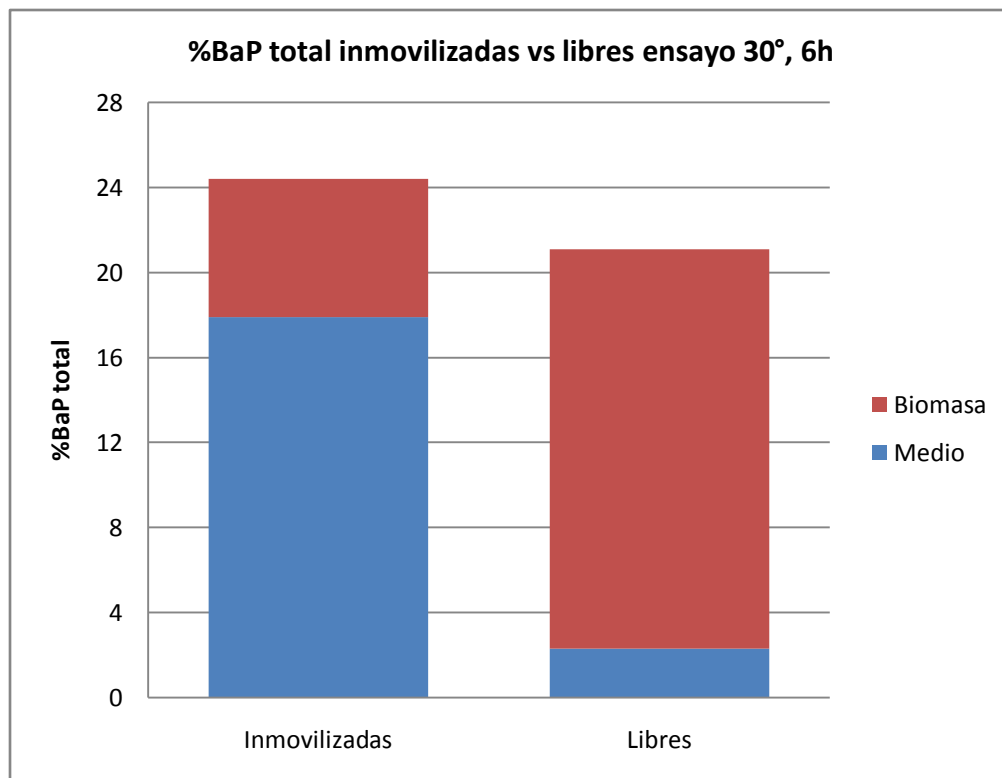


Figura 3.15. %BaP total a 30°, microalgas inmovilizadas y libres

CAPITULO 4.

CONCLUSIONES

Se logró inmovilizar a la microalga *Selenastrum capricornutum* en cuentas de alginato, las concentraciones de alginato de sodio 2% y CaCl_2 1% lo que, garantizo la viabilidad celular por un período de tiempo mínimo de 24 h.

Se modificó y optimizó la metodología de EFS para su aplicación a la extracción de BaP del medio de cultivo con microalgas inmovilizadas en cuentas de alginato.

Las metodologías basadas en la EFS y DMFS utilizadas en este trabajo para extraer BaP del medio de cultivo y de la biomasa respectivamente junto con la cromatografía de líquidos de alta resolución y detección UV para el análisis de los extractos, fueron lineales en el intervalo de concentraciones estudiadas, eficientes y reproducibles.

Se demostró la capacidad de *S. capricornutum* inmovilizada en alginato para remover BaP del medio de cultivo y se encontró que la remoción de BaP es más lenta en comparación con la remoción realizada por esta microalga en medio libre y que *S. capricornutum* inmovilizada remueve casi en su totalidad al BaP después de 15 h.

Se encontró que de manera similar a cuando *S. capricornutum* se encuentra libre, el aumento en la temperatura tiene un efecto positivo en la remoción de BaP llevada a cabo por *S. capricornutum* inmovilizada, en un tiempo de exposición de 6 h, esto indica que la temperatura es una variable a controlar en el proceso de remoción de BaP por *S. capricornutum* inmovilizada.

Igualmente, la variación en el número de cuentas en las que se encuentran distribuidas las microalgas, indica que una mayor densidad de células por cuenta tiene un efecto negativo en la remoción de BaP posiblemente por la disminución en la difusión de sustratos y oxígeno.

La inmovilización de *S. capricornutum* en alginato podría tener aplicación en la biorremediación de aguas contaminadas con BaP y de esta manera eliminar los obstáculos en el tratamiento de agua contaminada con microalgas en medio libre tales como costos y tiempos de centrifugación y filtración para recolectar o eliminar la biomasa del agua después del tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Rub F.A.A., El-Naas, M.H., Benyahia F., Ashour I., 2004. Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. *Process Biochemistry* 39, 1767–1773.

Aksu Z., 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry* 40, 997–1026.

Barker S. A. 2007. Review Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal Biochemical Biophysics Methods* 70, 151–162.

Barranco A., Alonso-Salces R., Bakkali A., Berrueta L., Gallo B., Vicente F. 2003. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *Journal of Chromatography A* 988, 33–40

Beltrán E. 2014. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por microalgas verdes bajo diferentes temperaturas. Tesis, Facultad de Química UNAM.

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

Buelna G., Bhattarai K., De la Noue J., Taiganides E. 1990. Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass grown on pig-waste. *Biological Waters* 31, 211-222.

Busetti F., Heitz A., Cuomo M., Baoder S., Traverso P. 2006. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography A* 1102, 104–115.

Camel V. 2003. Review. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B* 58, 1177–1233.

Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T. 1996. Environmental application of immobilized cells: a review. *Journal Industry Microbiology* 16, 79–100.

Castillo G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IDRC, Canada. IMTA, México. 80.

Cerniglia C.E. 1993 Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 4, 331–338.

Cohen Y. 2001. Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology* 77, 257–274.

Da Costa A.C.A., Leite S.G.F., 1991. Metals biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorella homosphaera* cells. *Biotechnology Letters* 13, 559–562.

De-Bashan L.E., Bashan Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101, 1611-1627.

- Díaz G. 2013. Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por la microalga *Selenastrum capricornutum* mediante metodología de extracción en fase sólida y dispersión de matriz en fase sólida acoplada a CLAR-UV. Tesis, Facultad de Química UNAM.
- Fidalgo-Used N., Blanco-Gonzales E., Sanz-Medel A. 2007. Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Analytica Chimica Acta* 590, 1–16.
- Fry I., Mehlhorn R. 1994. Polyurethane and alginate-immobilized algal biomass for the removal of aqueous toxic metals. *Emerging Technology for Bioremediation of Metals* 130-134
- Garnham G.W., Codd G.A., Gadd G.M., 1992a. Accumulation of cobalt, zinc and manganese by the estuarine green microalga *Chlorella salina* immobilized in alginate microbeads. *Environment Science and Technolgy* 26, 1764–1770.
- Grant G., Morris E., Rees D., Smith P., Thorn D., 1973. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* 32(I), 195-198.
- Greenberg A., Darack F. 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons in new jersey: a comparison of winter and summer concentrations over a two- year period. *Atmospheric Environment* 19, 1325-1339.
- Haritash A.K, Kaushik C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* 169, 1–15.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) 2012 Chemical Agents and Related Occupations. Monograph Benzo(a)pyrene 100F, 111-144
- Juhasz A.L., Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45, 57–88.
- Kazeuroni N., Sinha R., Hsu C., Greenberg A., Rothman N. 2001. Analysis of 200 foods items for benzo(a)pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology* 39, 423-436.
- Ke L., Luo L., Wang P., Luan T., Tamb N. F-Y. 2010. Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*, *Bioresource Technology* 101, 6950-6961.
- Kim K. H., Jahan Sh.A., Kabir E., Brown R.J.C. 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International* 60, 71–80.
- Kristenson E. M., Ramos L., Brinkman U. A. T. 2006. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends in Analytical Chemistry* 25, 96-111.
- Kourkoutas Y., Bekatorous A., Banat I.M., Marchant R., Koutinas A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review *Food Microbiology* 21, 377–397.

- Leenen E.J.T.M., Dos Santos V.A.P., Grolle K.C.F., Tramper J., Wijfels R.H. 1996. Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Research* 30, 2985-2996.
- Lei A., Hu Z., Wong Y., Tam N. 2007. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource Technology* 98, 273-280.
- Lijinsky W. 1991. The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutation Research* 259, 251-261.
- Liu Kai, Li Jian, QiaoHongjin, Lin Apeng, Wang Guangce, 2012. Immobilization of *Chlorella sorokiniana* GXNN 01 in alginate for removal of N and P from synthetic wastewater, *Bioresource Technology* 114, 26–32.
- Ma J., Xiao R., Li J., Yu J., Zhang Y., Chen L. 2010. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 5462–5469.
- Mallick N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *BioMetals* 15, 377–390.
- Marcé M., Borrull F. 2000. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *Journal of Chromatography A* 885, 273–290
- Mersch-Sundermann V., Mochayed S., Kevekordes S. 1992. Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutation Research* 278, 1-9.
- Moreno-Garrido I. 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology* 99, 3949–3964
- Moreno-Garrido I., Campana O., Lubian L.M., Blasco J. 2005. Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Marine Pollution Bulletin* 51, 823–929.
- Olmos Espejel J.J., Garcia de Llasera M.P., Velasco-Cruz M. 2012. Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo(a)pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1262, 138– 147
- Olmos Espejel J.J. 2013. Metodologías cromatográficas en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microorganismos. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Parelo L. 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials* 177, 81–89.
- Pratt M., Kaarthik J., MacLean A.B. 2011. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Exposure and DNA Adduct *Semi*-Quantitation in Archived Human Tissues. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8, 2675-2691.

Pena M., Casais M., Mejuto M., Cela R. 2007. Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 1165, 32–38.

Pena M., Casais M., Mejuto M., Cela R. 2008. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. *Analytica chimica acta* 626, 155–165

Pena M., Casais M., Mejuto M., Cela R. 2010. Development of a sample preparation procedure of sewage sludge samples for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on selective pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* 1217, 425–435.

Rubio-Clemente A., Torres-Palma R., Peñuela G. 2014. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review. *Science of the Total Environment* 478, 201–225.

Ruiz-Marin A., Mendoza-Espinosa G., Sánchez-Saavedra M. 2011. Características fotosintéticas y crecimiento de *Scenedesmus obliquus* inmovilizada en alginato. *Agrociencia* 45, 303-313.

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

Seki H., Suzuki A. 2002. Adsorption of heavy metal ions to floc-type biosorbents. *Journal of Colloid and Interface Science* 249, 295–300.

Siddhesh N. Pawar, Kevin J. Edgar. 2012. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications *Biomaterials* 33, 3279–3305.

Sikorski P., Mo F., Skjåk-Bræk G., Stokke B.T. 2007 Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium-Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction. *Biomacromolecules* 8, 2098–2103.

Skupinska K., Misiewicz I., Kasprzycka-Guttman T. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 61, 233– 240.

Smidsrød O., Skjak-Braek G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Tibtech* 8, 71–78.

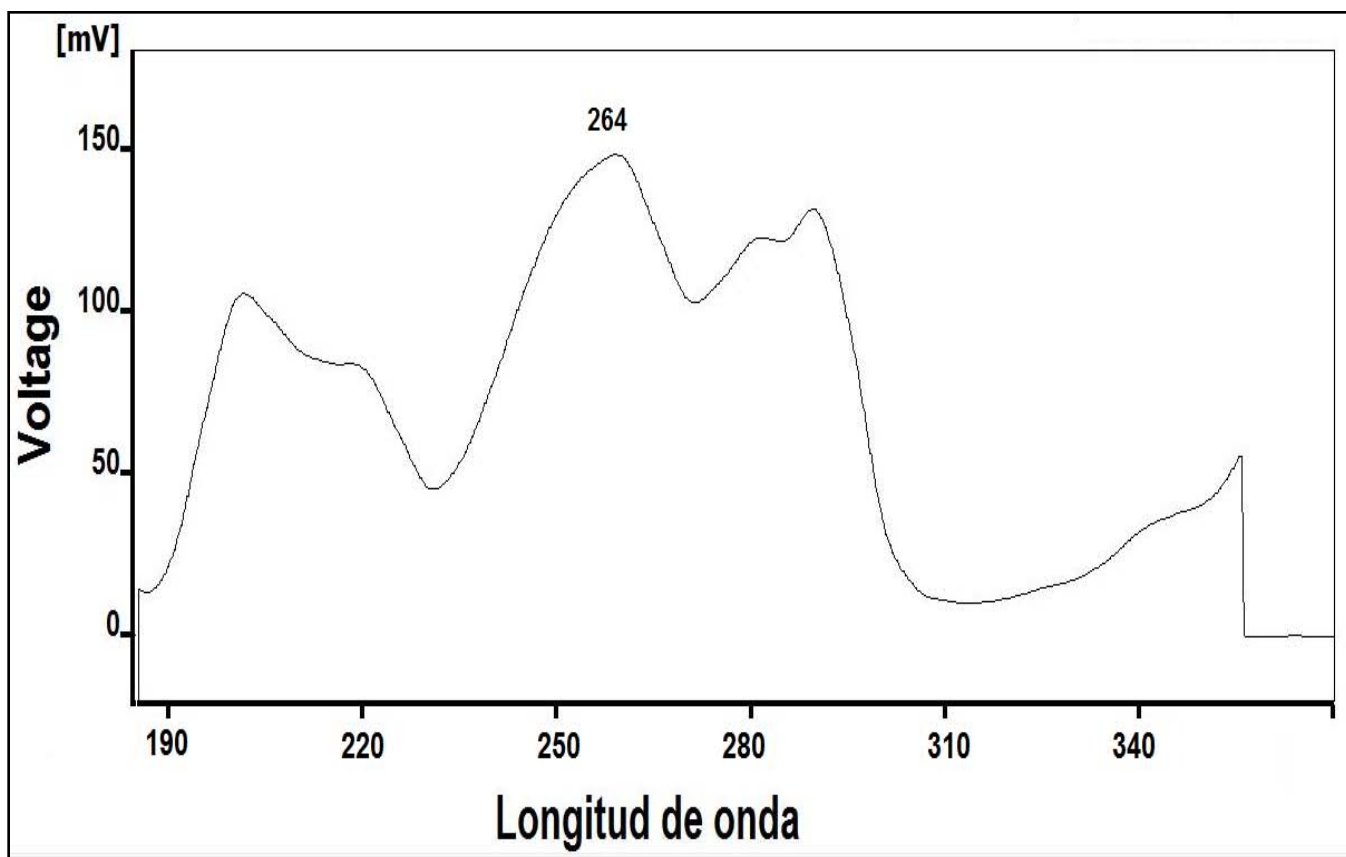
Sudip K.S., Om V.S., Rakesh K.J. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnology* 20, 243–248.

Tam N.F.Y., Wong Y.S., Simpson C.G., 1998. Repeatedly removal of copper by alginate beads and the enhancement by microalgae. *Biotechnology Techniques* 12, 187–190.

- Thakur A., Kumar H.D., 1999a. Nitrate, ammonium, and phosphate uptake by the immobilized cells of *Dunaliella salina*. *Environmental Contamination and Toxicology* 62, 70–78.
- Urrutia I., Serra J., Llama M. 1995. Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams. *Enzyme Microbiology Technology* 17, 200-205
- Velasco M. 2011. Metodología Analítica Cromatográfica para la determinación de metabolitos de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Yamaguchi T., Ishida M., Suzuki T. 1999. An immobilized cell system in polyurethane foam for the lipophilic micro-alga *Prototheca zopfii*. *Process Biochemistry* 34, 167-171.
- Zwir-Ferenc A., Biziuk M. 2006. Review Solid Phase Extraction Technique–Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies* 15, 677-690.

Anexo I

Espectro de absorción de BaP de 190 a 360 nm, disolución estándar de BaP 1 µg/mL. Donde se observa que la máxima respuesta se obtiene a 264 nm .



Anexo II

Cromatogramas de BaP extraído del medio de cultivo por EFS a los diferentes tiempos de exposición. Condiciones: columna analítica C18, tamaño de partícula 5 μ , fase móvil 100% MeOH, flujo 1 mL/min, detección UV 264 nm.

