

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería**



**“INMOVILIZACIÓN DE MICROALGAS PARA SU APROVECHAMIENTO EN LA BIORREMEDIACIÓN”**

**T E S I S**

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA

OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**MARÍA SOLEDAD SALINAS WHITTAKER**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. AGOSTO 2020

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**

**“INMOVILIZACIÓN DE MICROALGAS PARA SU APROVECHAMIENTO EN  
LA BIORREMEDIACIÓN”**

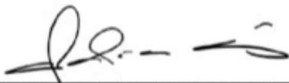
**TESIS**

Que para obtener el grado de Doctorado en Ciencias presenta:

Presenta

**MARÍA SOLEDAD SALINAS WHITTAKER**

Aprobada por:



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez  
Director de tesis



Dra. Graciela Guerra Rivas  
Co-Director de tesis



Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
Sinodal



Dr. Priscy Alfredo Luque Morales  
Sinodal



Dr. Rubén Cesar Villarreal Sánchez  
Sinodal

Ensenada Baja California, México. Agosto, 2020.

## RESUMEN

Aprobado por:

  
Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez  
Director

  
Dra. Graciela Guerra Rivas  
Co-Director

Los derrames de petróleo constituyen una de las principales amenazas para los ecosistemas marinos a nivel mundial. Para mitigar el daño, ocasionado por el petróleo y sus derivados en caso de derrame, se recurre a la limpieza mecánica y al uso de dispersantes de manchas de petróleo, sin embargo, la fracción hidrosoluble queda suspendida en el agua de mar, actuando como un reservorio de estos componentes químicos. El propósito de este trabajo fue explorar una alternativa que contribuya a remediar el problema que constituye la fracción del petróleo crudo disuelta en el agua de mar (WSF, por sus siglas en inglés, Water Soluble Fraction). Este trabajo aporta una alternativa que complementa los métodos tradicionales de mitigación para la remoción de petróleo, utilizando microalgas en la biorremediación de la fracción hidrosoluble. Por ser una microalga marina catalogada como resistente, en este trabajo se propone el uso de *Dunaliella tertiolecta* para remover componentes de la WSF del combustóleo/diesel. Para evaluar el uso de esta microalga como herramienta en la biorremediación se realizaron ensayos de remoción de la WSF en condiciones de laboratorio. El objetivo se centró en estudiar la respuesta de *D. tertiolecta* expuesta a la WSF de la mezcla combustóleo/diesel.

La microalga *D. tertiolecta* se obtuvo del cepario del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). En un primer cultivo se evaluó el contenido de pigmentos y fenoles de *D. tertiolecta* en sus diferentes fases de crecimiento durante 14 días. Las microalgas se cultivaron en medio f/2, en condiciones controladas. El cambio en la biomasa se midió con recuentos celulares, densidad óptica y peso seco (total y orgánico). El contenido fenólico se cuantificó con el método modificado de Folin-Ciocalteu. Se observaron diferencias en el contenido de pigmentos entre las fases de crecimiento. La clorofila *a* tendió a disminuir a través del tiempo. El pigmento  $\beta$ -caroteno solo se observó en la fase logarítmica. En las fases de crecimiento lento y estacionaria se encontró una alta correlación entre la luteína y la clorofila *a*. Por otra parte, se observó una alta correlación entre el pH del cultivo y el contenido fenólico en las células de *D. tertiolecta*, lo que sugiere que el pH es un factor que podría desencadenar la acumulación de los fenoles.

Para una evaluación inicial de la respuesta de la microalga a la WSF, se realizó una prueba de exposición preliminar de *D. tertiolecta* a dos concentraciones de WSF (12.5 % y 50 %), en paralelo a un grupo control. Este bioensayo preliminar también tuvo el objetivo de encontrar la concentración de WSF que afectara a la microalga, pero permitiera su crecimiento. Se utilizaron conteos celulares para evaluar el crecimiento de la microalga y la WSF se monitoreó mediante espectrofotometría en el intervalo de luz ultravioleta. Se utilizó la espectroscopía de infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) para determinar los grupos funcionales de las microalgas en las diferentes fases

de crecimiento, tanto para *D. tertiolecta* expuesta a la WSF como para el control. No hubo diferencias significativas en el crecimiento entre el control y el grupo expuesto a la WSF al 12.5 %. Para el grupo expuesto al 50 % de la WSF, la densidad celular entre los días 3 y 7 de cultivo fue significativamente más alta comparada con los valores del control. Mediante FTIR se identificaron las bandas de lípidos, proteínas y carbohidratos en los espectros de *D. tertiolecta*. Al comparar con el control, se observó una variación en la absorbancia y resolución de las bandas de lípidos en los espectros de las microalgas expuestas a la WSF al 50 %. Mediante el monitoreo de la WSF se estimó que la remoción de estos compuestos por *D. tertiolecta* fue de un 68 % después de 15 días de exposición.

Con base en los datos obtenidos en el ensayo preliminar, se realizó una prueba definitiva utilizando solamente la concentración de WSF al 50 %. En este ensayo se amplió la evaluación de la respuesta de *D. tertiolecta* a la WSF al 50 % mediante la cuantificación de clorofila *a*, luteína y  $\beta$ -caroteno, además de proteínas, lípidos, ácidos grasos y fenoles. Adicionalmente, se determinaron las transiciones biomoleculares de los lípidos y su acumulación con FTIR. La WSF se evaluó, al inicio y final del estudio, mediante cromatografía de gases (GC). Los resultados obtenidos indican que *D. tertiolecta* desencadenó una respuesta fisiológica y bioquímica con cambios en la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), pigmentos, fenoles, lípidos totales y proteínas de la microalga, aunque el perfil de ácidos grasos no se alteró. Para todos los parámetros bioquímicos estudiados hubo diferencias significativas con respecto al control, excluyendo el perfil de ácidos grasos, durante el crecimiento de la microalga. La disminución en el contenido de fenoles y clorofila *a*, y el aumento de  $\beta$ -caroteno observados en la microalga expuesta, indican una respuesta antioxidante integrada al estrés causado por la WSF. Al final del ensayo, *D. tertiolecta* expuesta a la WSF presentó valores similares a los obtenidos en el control, para todos los compuestos analizados, con excepción de los lípidos totales. En el grupo expuesto los lípidos totales sobrepasaban en un 40% a los del grupo control, diferencia que puede relacionarse con la presencia de la WSF en las microalgas. Conjuntamente, el exceso de lípidos y las señales aumentadas de las cadenas insaturadas en FTIR en el grupo expuesto, sugieren una incorporación de hidrocarburos de la WSF por las microalgas. La remoción de los hidrocarburos de la WSF por *D. tertiolecta*, evaluada por GC, fue de un 25 % después de 15 días de exposición.

Se evaluó el crecimiento de *D. tertiolecta* inmovilizada en perlas de alginato de calcio, cultivadas en medio *f/2* durante 21 días. El crecimiento se monitoreó mediante recuentos celulares, *D. tertiolecta* presentó sus fases de crecimiento características, con un máximo de  $1.17 \times 10^6$  cél-perla<sup>-1</sup>. En el día ocho se observó una disrupción en las perlas de alginato y crecimiento de microalgas libres en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la incorporación de hidrocarburos por parte de *D. tertiolecta* puede ser una respuesta al estrés impuesto por los hidrocarburos solubles de la mezcla combustóleo/diesel. A pesar de que se afecta por la WSF, la microalga tiene la capacidad de incorporar los hidrocarburos del

medio, removiendo un 25% de la WSF, lo que la hace una buena candidata para la biorremediación. La potenciación del crecimiento de las microalgas por la inmovilización en alginato y las características de este polisacárido, hace que *D. tertiolecta* inmovilizada sea una herramienta biotecnológica aprovechable.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios, por guiar mis pasos e iluminar mi camino.

Agradezco a mis directoras de tesis, la Dra. Claudia Gómez y Dra. Graciela Guerra, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. A la Dra. Claudia, por su apoyo y dedicación para guiar este trabajo, por su aporte invaluable, no solo en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como científica. A la Dra. Graciela, por toda la paciencia y el apoyo incondicional que me dio durante la realización del doctorado, por su búsqueda incansable de hacerme una mejor profesional y por la amistad que me ha dado durante todos estos años. A la Dra. Beatriz Cordero, que no solo compartió sus conocimientos, sino que siempre tuvo tiempo para dedicarme y guiarme durante el doctorado. También agradezco al Dr. Priscy Luque y al Dr. Rubén Villareal por sus sugerencias y aportaciones al presente trabajo, que facilitaron de gran manera la realización de mi tesis. A todos ellos, muchas gracias por su dedicación, tiempo, y en especial, por compartir su conocimiento y experiencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, por haberme otorgado una beca para realizar estudios de Doctorado en Ciencias e Ingeniería. A la Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño, de la Universidad Autónoma de Baja California, por haberme permitido realizar los estudios experimentales en sus instalaciones. Un agradecimiento especial al equipo del Laboratorio de Microalgas de CICESE por el apoyo y motivación. A la Dra. Tatiana Olivares, del IIO, por permitirme utilizar su laboratorio de bioensayos para la experimentación.

A mi hermosa familia, son mi inspiración para superarme y crecer en lo personal y profesional. Gracias a mi marido, Polo, y a mis hijos por su paciencia, comprensión y solidaridad durante este tiempo. Sin su apoyo no podría haber realizado este trabajo, fueron muchas veces mi motor para avanzar cuando sentí que ya no podía. A mi familia chilena, en especial a mis papas y hermanos, que desde Chile me estuvieron apoyando y alentando a terminar esta etapa de la mejor manera.

A mis grandes amigos y compañeros con los que he tenido la suerte de coincidir en mi camino, en especial a mis amigas por su apoyo, porras y sacarme mil veces de apuros durante el transcurso del doctorado.

Y, por último, quiero dedicar esta tesis a mis hijos, Emilio y Camila, ustedes son el mejor regalo y título que he logrado en la vida.

## ÍNDICE

Resumen .....	III
Agradecimientos.....	VI
Índice.....	VII
Lista de tablas .....	XI
Lista de figuras .....	XII
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	4
3. Hipótesis .....	10
4. Objetivos .....	10
4.1 Objetivo general .....	10
4.2 Objetivos particulares.....	10
5. Métodos .....	11
5.1 Optimización del método de cultivo de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> y escalamiento.....	11
5.1.1 Obtención de la cepa de <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	11
5.1.2 Cultivo y escalamiento.....	12
5.1.3 Monitoreo del cultivo.....	12
5.1.3.1 Recuento celular .....	12

5.1.3.2	Peso seco total (PST) y orgánico (PO)	13
5.1.3.3	Medición de pH	14
5.1.3.4	Pigmentos	14
5.1.3.5	Fenoles	15
5.1.4	Análisis estadístico	16
5.2	Bioensayo preliminar - Exposición de <i>Dunaliella tertiolecta</i> a la WSF de combustóleo/diesel.	17
5.2.1	Prueba de exposición	17
5.2.2	Monitoreo del cultivo	18
5.2.2.1	Recuento celular	18
5.2.2.2	Identificación de grupos funcionales por FTIR	18
5.2.2.3	Monitoreo de la WSF por UV	19
5.2.3	Análisis estadístico	20
5.3	Bioensayo definitivo. Evaluación de efectos de la WSF en <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	20
5.3.1	Condiciones de cultivo	20
5.3.2	Prueba de toxicidad	21
5.3.3	Monitoreo del cultivo	22
5.3.3.1	Recuento celular	22

5.3.3.2	Peso seco.....	23
5.3.3.3	Pigmentos .....	23
5.3.3.4	Fenoles .....	23
5.3.3.5	Proteínas.....	24
5.3.3.6	Lípidos totales .....	24
5.3.3.7	Perfil de ácidos grasos .....	25
5.3.3.8	Caracterización de lípidos por FTIR.....	26
5.3.4	Cuantificación de la WSF .....	27
5.3.5	Análisis estadístico .....	28
5.4	Inmovilización de <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	28
5.4.1	Monitoreo de cultivos de microalgas en perlas de alginato. ....	29
5.4.1.1	Recuento celular .....	29
6.	Resultados .....	30
6.1	Optimización del método de cultivo de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> ...	30
6.1.1	Monitoreo del cultivo.....	30
6.1.1.1	Pigmentos .....	33
6.1.1.2	Medición de pH .....	35
6.1.1.3	Fenoles .....	36

6.2 Bioensayo Preliminar - Exposición de <i>Dunaliella tertiolecta</i> a la WSF de combustóleo/diesel.....	36
6.2.1 Caracterización de la fracción hidrosoluble de la mezcla de combustóleo/diesel .....	36
6.2.2 Monitoreo de cultivo.....	37
6.2.2.1 Identificación de grupos funcionales por FTIR .....	39
6.2.2.2 Monitoreo de la WSF por UV.....	43
6.3 Bioensayo Definitivo. Evaluación de efectos de la WSF en <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	44
6.3.1 Monitoreo del cultivo.....	44
6.3.1.1 Pigmentos .....	45
6.3.1.2 Fenoles .....	49
6.3.1.3 Proteínas.....	50
6.3.1.1 Lípidos totales .....	50
6.3.1.2 Contenido de ácidos grasos (FAME).....	52
6.3.1.3 Caracterización de lípidos por FTIR .....	52
6.3.2 Cuantificación de la WSF por GC .....	57
6.4 Inmovilización de <i>Dunaliella tertiolecta</i> .....	59
6.4.1 Monitoreo de cultivos de microalgas inmovilizadas .....	59
7. Discusión.....	61

7.1	Optimización del método de cultivo de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> ...	61
7.2	Bioensayo Preliminar - Exposición de <i>Dunaliella tertiolecta</i> a la WSF de combustóleo/diesel. ....	66
7.3	Bioensayo Definitivo. Evaluación de efectos de la WSF en <i>Dunaliella tertiolecta</i> . ....	68
7.4	Inmovilización de <i>Dunaliella tertiolecta</i> en perlas de alginato de calcio. ....	76
8.	Conclusiones.....	79
9.	Bibliografía .....	80
10.	Anexo fotográfico .....	98
11.	Anexo. Hojas seguridad .....	105
11.1	Combustóleo PEMEX .....	105
11.2	Diesel PEMEX .....	116

#### LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Gradiente de dilución de la fase móvil en el análisis de pigmentos por HPLC. A: acetona, B: metanol y C: agua.....	15
Tabla II.	Peso seco total (PST), peso seco orgánico (PSO) y fenoles en <i>D. tertiolecta</i> en las diferentes fases de crecimiento.....	33

Tabla III. Contenido de pigmentos (pg cél <sup>-1</sup> ) en <i>D. tertiolecta</i> a través de diferentes fases de crecimiento. ....	34
Tabla IV. Análisis de variancia con análisis de regresión múltiple: contenido de fenoles vs. el pH y tiempo (p=0.05). ....	36
Tabla V. Análisis de varianza de dos vías para el crecimiento de <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a una concentración de 12.5 % y 50 % de WSF, y el control. ....	39
Tabla VI. Asignación posible de las señales observadas en los espectros de FT-IR de <i>D. tertiolecta</i> . ....	39
Tabla VII. Comparación de porcentajes del contenido total de lípidos por peso seco total en <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a WSF al 50 % y control, analizados por dos métodos, cromatografía de gases (GC) y por sulfo-fosfo-vanillina (SPV) (media ± DE, n=3) en el día 15. (*) Indica diferencia significativa (p <0.05) entre los métodos de análisis. ....	52
Tabla VIII. Características de las perlas de alginato con <i>Dunaliella tertiolecta</i> inmovilizada.....	59

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro de absorción de FTIR de una microalga, indicando la absorción de algunas biomoléculas (Fuente: modificado de Grace et al. 2020).....	10
Figura 2. Diagrama de separación por centrifugación, sobrenadante de agua de mar y pellet de <i>Dunaliella tertiolecta</i> una vez expuesta a la WSF.....	19

Figura 3. Estrategia de trabajo para el ensayo de toxicidad de <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a la WSF de combustóleo/diesel. ....	22
Figura 4. Curva de crecimiento para <i>Dunaliella tertiolecta</i> . Fases: (1) Lag, (2) logarítmica, (3) crecimiento lento y (4) estacionaria. Los puntos muestran resultados promedio (n=3). Las barras de error indican SD. ....	31
Figura 5. Correlación lineal entre la densidad óptica (DO) de las suspensiones celulares y el recuento celular de <i>D. tertiolecta</i> . DO en unidades de absorbancia y recuento de cél·mL <sup>-1</sup> . Símbolos: (●) regresión lineal con datos de la FL, pendiente de 0.1204 y coeficiente de correlación de 0.99; (□) regresión lineal con los datos de toda la curva de crecimiento de las microalgas, pendiente de 0.1956 y coeficiente de correlación de 0.98. Los símbolos de la FL se superponen con los de la primera parte de toda la curva de crecimiento.....	32
Figura 6. Correlación entre la luteína y la clorofila <i>a</i> en las células de <i>D. tertiolecta</i> (los datos se muestran en la Tabla III). Datos obtenidos a partir de muestras de los tres lotes estudiados en las fases de crecimiento lento y estacionaria. Coeficiente de correlación: 0.96, pendiente de 0.0839. ....	34
Figura 7. Valor de pH del cultivo y contenido de luteína por células determinadas en los diferentes puntos de la curva de crecimiento de <i>D. tertiolecta</i> . Símbolos: Las barras y los cuadrados sólidos representan el contenido de luteína por célula y los valores de pH, respectivamente; n=3. Las barras de error indican SD.....	35
Figura 8. (a) Espectro de absorción UV de la fracción hidrosoluble del combustóleo en hexano, a tres concentraciones diferentes y (b) espectro UV indicado con flecha roja	

de la fracción hidrosoluble del combustóleo en hexano obtenido por Neff & Anderson (1975)..... 37

Figura 9. Curva de crecimiento para *Dunaliella tertiolecta*, expuesta a la WSF en dos concentraciones (12.5 % y 50 %) y el control. Las barras de error representan el error estándar, n = 3. (\*) Indica una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )..... 38

Figura 10. Espectro de FTIR de *D. tertiolecta* durante la fase logarítmica, de crecimiento lento y estacionaria, indicando las bandas de absorción de las biomoléculas. .... 40

Figura 11. Espectro de FTIR de la microalga *D. tertiolecta* en los diferentes días de muestreo. (a) Grupo control (b) Grupo expuesto a WSF al 12.5 % y (c) Grupo expuesto a WSF al 50 %. .... 42

Figura 12. Espectro de UV de las fracciones obtenidas por extracción con hexano del agua de mar libre del paquete celular, para el control (C), tratamiento WSF al 50 % (B) y control no-biológico (WSF). .... 43

Figura 13. (a) Curva de crecimiento para *Dunaliella tertiolecta*. (b) Tasa de crecimiento  $\mu$  ( $\text{div} \cdot \text{día}^{-1}$ ) de *D. tertiolecta*. Las barras de error representan el error estándar, n = 3. (\*) Indica una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )..... 45

Figura 14. Pigmentos en *Dunaliella tertiolecta* expuestos al 50 % de WSF y grupo control, en medio f/2. (a) Clorofila a, (b) Luteína y (c)  $\beta$ -caroteno expresado en miligramos por gramo de peso seco ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  PST). Las barras de error representan el

error estándar, n = 3. (\*) Indica una diferencia significativa entre los grupos (p <0.05).....47

Figura 15. Correlación entre la luteína y la clorofila a en *Dunaliella tertiolecta* (n=3). R=0.561, pendiente=0.1219 y R=0.915, pendiente=0.2108, para el grupo expuesto (50 % WSF) y el control, respectivamente..... 48

Figura 16. Contenido fenólico total (mg de GAE g<sup>-1</sup> peso seco) en *Dunaliella tertiolecta*, para control y expuesto a WSF al 50 %. Las barras de error representan el error estándar, n=3. (\*) Indica una diferencia estadística significativa (p <0.05) entre grupos. .... 50

Figura 17. (a) Contenido de proteínas (mg g<sup>-1</sup> PST) y (b) Lípidos totales (mg g<sup>-1</sup> PST) en *Dunaliella tertiolecta*, para el control y expuestos a WSF al 50 %. Las barras de error representan el error estándar, n=3. (\*) Indica una diferencia estadística significativa (p <0.05) entre grupos. .... 51

Figura 18. Análisis FTIR de la banda lipídica (3050-2800 cm<sup>-1</sup>) en células de *Dunaliella tertiolecta* los días 3, 9 y 15 durante el ensayo de toxicidad. Espectros de absorción de (a) grupo expuesto y (b) control. Espectro de la segunda derivada de la absorbancia (SDA) de la banda de lípidos para el (c) grupo expuesto y (d) control (3050-2800 cm<sup>-1</sup>)..... 53

Figura 19. Análisis FTIR de los tramos de carbonilo en banda éster (1760-1710 cm<sup>-1</sup>) en células de *Dunaliella tertiolecta* los días 3, 9 y 15 durante la prueba de toxicidad. Espectros de absorción de (a) grupo expuesto y (b) control. Derivada de

segundo orden de la absorbancia (SDA) de la banda de éster (1760-1710 cm <sup>-1</sup> ) de (c) grupo expuesto y (d) control.....	55
Figura 20. Porcentajes de (a) triacilgliceroles (TAG) y (b) ácidos grasos insaturados (UFA) en <i>D. tertiolecta</i> calculados por el análisis de la segunda derivada de absorbancia de los grupos expuestos y control.....	56
Figura 21. Porcentaje de ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) en <i>D. tertiolecta</i> , en el día 15 de crecimiento para el grupo control y expuesto (WSF). N/I=No identificado. Análisis realizado por cromatografía de gases.....	57
Figura 22. (a) Cromatograma de GC de la fracción hidrosoluble de la mezcla combustóleo/diesel (WSF) a tiempo 0 días, 15 días y 15 días tratada con <i>D. tertiolecta</i> . (b) Acercamiento del cromatograma entre el minuto 1 al minuto 4.5. ....	58
Figura 23. Curva de crecimiento de <i>Dunaliella tertiolecta</i> inmovilizada por perlas de alginato de calcio, cultivada en medio f/2 durante 21 días. Fases: (1) lag, (2) logarítmica, (3) crecimiento lento y (4) estacionaria. Los puntos representan el promedio de la medición de tres muestras (n=3). Las barras de error indican SD.	60

## **1. INTRODUCCIÓN**

La intensa actividad de la industria petrolera que incluye la exploración, producción, transporte, operaciones de embarque y almacenamiento, rupturas de los oleoductos, accidentes de buques-tanque, derrames y explosiones de plataformas, conlleva la posibilidad de impactos de contaminación por petróleo y sus derivados en el ambiente marino (National Research Council, 2003). Además, los hidrocarburos también pueden ingresar al mar por otras vías, como las descargas industriales y municipales, deposiciones atmosféricas, emanaciones crónicas y discretas provenientes de afloramientos naturales marinos (García-Cuellar et al., 2004). Lo anterior, ha ocasionado que en las últimas décadas, la contaminación por derrames petroleros en los océanos sea peligrosa para los ecosistemas marinos a nivel mundial (Parab et al., 2008).

En el caso de los buques de servicio marítimo, el combustible utilizado de preferencia es el combustóleo, el cual debe combinarse con otros componentes, como el diésel, para cumplir con una especificación aceptable que sea adecuada para motores más grandes (Draffin, 2008). La mezcla combustóleo/diésel puede ser una fuente de contaminación, sobre todo por los componentes moderadamente solubles en agua. Estos compuestos son conocidos como la fracción hidrosoluble del petróleo (WSF, por sus siglas en inglés, Water Soluble Fraction), fácilmente incorporables al ambiente marino y como consecuencia a la cadena trófica. Existe evidencia de que estos compuestos ocasionan efectos deletéreos en la biota marina (Pasquevich et al., 2013;

Vanzella et al., 2007), especialmente a los microorganismos planctónicos, como las microalgas, ya que su crecimiento y desarrollo dependen estrictamente de la calidad del agua (Morales-Loo & Goutx, 1990; Parab et al., 2008). Además, la fracción soluble del diesel, WSF, se ha reportado como tóxica para el desarrollo de varias microalgas, efecto que ha sido relacionado en especial con los hidrocarburos aromáticos pesados contenidos en la WSF (Gusmão et al., 2012). En caso de un derrame de petróleo, la fracción hidrosoluble se queda suspendida en el agua de mar y actuará como un reservorio de componentes químicos que serán liberados lentamente hacia el medio que lo rodea. Estos compuestos permanecen disueltos en ocasiones por largos períodos, y son incorporados por las diversas especies cuyo hábitat ha sido contaminado (National Research Council, 2003; Yuewen & Adzibli, 2018).

Para mitigar el impacto de esta problemática se recurre a la limpieza mecánica y al uso de dispersantes de manchas de petróleo, procedimientos que deben ser realizados con rapidez e inmediatamente después de ocurrido el derrame para lograr el menor daño posible. Sin embargo, estas medidas no son totalmente eficientes ya que, dependiendo de la celeridad y la eficiencia del proceso de remoción, el petróleo y sus derivados residuales o solubles en agua de mar, pueden ocasionar daños a los ecosistemas marinos (Silos-Rodríguez, 2008).

Por lo antes mencionado, es necesaria la búsqueda de alternativas que complementen y hagan más eficientes e integrales los mecanismos de remoción del petróleo, dando solución a la problemática que representa el petróleo y en especial la fracción hidrosoluble. Una alternativa para solucionar esta problemática es la biorremediación,

la cual se basa en la biotransformación de compuestos considerados contaminantes haciendo uso de microorganismos o partes de estos. Si bien la biorremediación se ha utilizado desde hace más de 60 años, recientemente se han desarrollado nuevos procesos tomando en cuenta las características fisiológicas de los organismos involucrados, las rutas metabólicas asociadas y las características abióticas de los ambientes contaminados (Mohanta et al., 2015). El tomar en cuenta estos factores y su integración en un proceso completo, ha hecho posible que la biorremediación pueda ser una opción alterna o complementaria a los métodos de remoción físicos.

Uno de los factores que se consideran punto clave para la biorremediación, es la identificación y estudio de especies de microorganismos con capacidades metabólicas que faciliten la mineralización de los agentes contaminantes. Estos organismos usualmente se identifican en ambientes contaminados o se evalúa su capacidad en función de sus características fisiológicas. El fitoplancton, en específico, es un candidato idóneo para estudios de biorremediación (Ghasemi et al., 2011).

Las microalgas marinas son los organismos más abundantes en ambientes acuáticos y pueden desarrollar una variedad de mecanismos para reducir la toxicidad de los hidrocarburos del petróleo (Torres et al., 2008). Se ha demostrado que las microalgas responden de manera diferente a la contaminación por hidrocarburos, dependiendo de la especie de microalga, así como del tipo y concentración del petróleo y sus derivados (Kadiri & Eboigbodín, 2012). *Dunaliella tertiolecta* es una microalga marina, conocida como una especie tolerante a los compuestos del petróleo en comparación a otras microalgas (Bretherton et al., 2020; Okumura et al., 2003; Siron et al., 1991). Esta

capacidad está relacionada con la aclimatación fisiológica y cambios bioquímicos en la microalga para contrarrestar los efectos de la WSF (D. Carrera-Martinez et al., 2010; Morales-Loo & Goutx, 1990; Romero-Lopez et al., 2012). Si bien existe información sobre *Dunaliella tertiolecta*, la respuesta de esta microalga a la toxicidad de los derivados del petróleo crudo no se ha estudiado ampliamente (Bretherton et al., 2018); para complementar la información actual se hace necesario investigar los mecanismos de respuesta de *D. tertiolecta* a la toxicidad de la WSF y su capacidad de aclimatación a estos compuestos.

Por ser una microalga marina catalogada como resistente y capaz de crecer expuesta a la WSF, este trabajo propone el uso de *Dunaliella tertiolecta* para remover componentes de la WSF del combustóleo/diesel. La utilización de esta microalga se plantea como una herramienta biotecnológica complementaria para resolver problemas ambientales que conlleva los derrames de petróleo.

## **2. ANTECEDENTES**

Dentro de la literatura actual se reporta la toxicidad del petróleo crudo que, al ser una mezcla compleja de hidrocarburos, puede ocasionar efectos de corto y mediano plazo en los ecosistemas acuáticos. El petróleo presenta una amenaza a todas las formas de vida, ya que los efectos tóxicos pueden trascender a través de las cadenas tróficas (Perhar & Arhonditsis, 2014). La respuesta del fitoplancton al petróleo y los dispersantes es muy variable y puede explicarse por el hecho de que diferentes especies poseen variadas características como, tamaño celular, movilidad, pared

celular, etc., que contribuyen de manera diferente a la forma en que las microalgas responden a los hidrocarburos. Para las microalgas, se ha reportado que existe variabilidad en la resistencia de las especies a los compuestos de la WSF (Daniel Carrera-Martinez et al., 2011). En algunas microalgas la WSF causa estrés oxidativo (Jiang et al., 2010; Ramadass et al., 2015), afectando membranas celulares, la síntesis de proteínas, y un descenso en el contenido de clorofila *a*, entre otros efectos nocivos (Jiang et al., 2010). En condiciones de estrés ambiental, como la exposición a la WSF, las microalgas modifican las concentraciones de múltiples compuestos bioactivos dentro de la célula, como pigmentos, fenoles y lípidos como respuesta fisiológica (Fazeli et al., 2006; B. Wang & Jia, 2020).

Dentro de los pigmentos que se han estudiado en microalgas, los carotenoides son los encargados de proteger el aparato fotosintético, al disipar el exceso de energía lumínica y por actuar como antioxidantes (Jahns & Holzwarth, 2012). Estos pigmentos cumplen un importante rol al amortiguar las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante la fotosíntesis, contribuyendo significativamente a la capacidad antioxidante total de las microalgas (Goiris et al., 2012; Jahns & Holzwarth, 2012). Por otro lado, estudios han demostrado que los compuestos fenólicos actúan como un mecanismo protector contra una amplia gama de estresores, generando una variación en el contenido de fenoles en las microalgas (López et al., 2015). Este comportamiento se ha informado para *D. tertiolecta*, al presentar una variación significativa en el contenido de compuestos fenólicos bajo estrés por metales y diferentes intensidades de luz (Gomez et al., 2016; López et al., 2015).

Por otra parte, para muchas especies de microalgas, la producción de lípidos y proteínas se modifica en respuesta a diversas condiciones de estrés tales como el cambio de la salinidad (Tammam et al., 2013), la limitación de nutrientes (Rukminasari, 2013), o la exposición a hidrocarburos y sus derivados (El-Sheekh et al., 2000; Morales-Loo & Goutx, 1990). Parab et al. (2008) reportaron que, a altas concentraciones de WSF, la tasa de crecimiento y la biosíntesis de proteínas de la microalga *Thalassiosira* sp. se afectaron negativamente, sugiriendo que la biosíntesis de proteínas podría considerarse un posible blanco de la toxicidad de los hidrocarburos. Para los lípidos, la WSF del petróleo crudo causó variaciones en el contenido de las diferentes clases de lípidos en *D. tertiolecta*, ocasionando una acumulación de hidrocarburos y esteroides en la fase logarítmica (Morales-Loo & Goutx, 1990). Por otro lado, Shishlyannikov et al. (2017) reportaron que los hidrocarburos, por sus características fisicoquímicas, pueden incorporarse a la membrana y luego internalizarlos dentro de la célula, lo que conduce a una acumulación de hidrocarburos en los cuerpos lipídicos de las microalgas.

Una característica de *Dunaliella tertiolecta* es que puede adaptarse a exposiciones intermitentes de petróleo (Romero-López et al., 2012), capacidad aprovechable en la biorremediación como lo indican diversos autores (Hatanaka et al., 1999; Hosseini Tafreshi & Shariati, 2009; Quesnel et al., 2011). Bretherton et al. (2018) ubica a esta microalga dentro del grupo de especies "resistentes" al petróleo crudo y/o a dispersantes de derrames de petróleo, reportando que el crecimiento de este grupo no se afecta por la presencia del petróleo y/o dispersantes de derrames de petróleo.

Shiu et al. (2020) observaron una disminución en la cantidad de ADN de *D. tertiolecta* a concentraciones bajas de WSF. Por el contrario, a concentraciones más altas de WSF la disminución de la cantidad de ADN fue menor, al igual que el resto de las microalgas estudiadas. Estos autores indicaron en su estudio un efecto nocivo en el crecimiento de *D. tertiolecta*. Estos resultados difieren con los hallazgos reportados por Bretherton et al. (2018), quienes agruparon a *D. tertiolecta* como una especie resistente a la WSF. Además de la variación entre especies se ha observado en las microalgas una variabilidad intraespecífica en la respuesta al petróleo (Bretherton et al., 2020).

Los resultados obtenidos por Shiu et al. (2020) proporcionan evidencia de que *D. tertiolecta* tiene la capacidad de liberar sustancias poliméricas extracelulares y variar la composición química de éstas, en respuesta al estrés ambiental causado por la WSF. Los resultados de este estudio pueden ofrecer información esencial para el modelado del transporte y disposición final del petróleo y de sus dispersantes en caso de derrame.

Desde la década de los setentas se han utilizado las microalgas con fines de biorremediación de aguas contaminadas por hidrocarburos. En 1975, Walker y colaboradores, utilizaron microalgas para la remoción de petróleo crudo y aceite de motor, y observaron que la eficiencia de degradación de hidrocarburos era variable dependiendo del tipo de petróleo. Costas Costas et al. (2012) patentaron un clon mejorado de la cepa *Scenedesmus obtusus* para su uso en la biorremediación y degradación de hidrocarburos, utilizado libre o inmovilizado en medios contaminados;

ellos mencionan que las microalgas inmovilizadas, consideradas como una herramienta biotecnológica, pueden ser de gran interés comercial para su aplicación en la biorremediación de aguas residuales provenientes de la industria. Las microalgas no sólo se usan para la remoción de hidrocarburos, sino también para la biorremediación de metales, nutrientes y colorantes, entre otros. Wu et al. (2020) utilizaron a la microalga de agua dulce *Chlorella sp* inmovilizada en alginato para biorremediar aguas residuales de la industria textil, disminuyendo la demanda química de oxígeno (DQO), amonio y el color de las aguas residuales textiles, después de 7 días de cultivo.

La inmovilización ha sido utilizada para estabilizar a las células, mejorar sus capacidades y prolongar su tiempo de vida. Existen diferentes procesos de inmovilización, entre los que se cuentan la encapsulación y el enlazamiento a soportes poliméricos (de-Bashan & Bashan, 2010); pero estos sistemas no han sido orientados para la biorremediación del medio marino contaminados por la fracción del petróleo soluble. Algunas de las desventajas de la inmovilización celular consisten en la ruptura de la membrana, pérdida de viabilidad celular y la disminución del crecimiento (Mallick, 2002; Moreno-Garrido, 2008), lo que podría ocasionar una reducción de la capacidad propia de la especie de remover contaminantes del medio circundante.

Cuando se utilizan organismos para la biorremediación, es importante dar seguimiento a su desarrollo, para asegurar óptimas condiciones fisiológicas. Durante la exposición de las microalgas a un contaminante como la WSF, el desarrollo de los organismos se puede evaluar mediante un indicador. Un buen indicador es cualquier parámetro

biológico susceptible de ser modificado cuando exista un daño en un organismo ocasionado por la exposición a contaminantes ambientales, es decir, en el monitoreo celular debe utilizarse un biomarcador como variable que indique la calidad del proceso (Guerra, 2003), como algunos metabolitos de las microalgas.

Para dar seguimiento a los cambios metabólicos en las microalgas, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) se ha catalogado como una herramienta poderosa pero subutilizada para muchos aspectos en la investigación sobre las microalgas. Con esta herramienta es posible el estudio de las huellas metabólicas dentro de una misma especie de microalga cultivada en diferentes condiciones (Driver et al., 2015), o la presencia de un contaminante como la WSF. Del análisis por espectroscopía FTIR de las células de microalgas se obtienen espectros detallados, los que pueden proporcionar información bioquímica importante sobre carbohidratos, lípidos y proteínas que se encuentran dentro de una muestra (Figura 1) (Driver et al., 2015; Rürger et al., 2016). También, esta herramienta permite el monitoreo de las transiciones biomoleculares y la acumulación de lípidos mientras se usa una pequeña cantidad de biomasa y sin destruir las muestras (Grace et al., 2020). Recientemente Grace et al. (2020) indicó que el uso de la derivada de segundo orden de los espectros de absorción de FTIR permite la separación de las bandas superpuestas de los espectros sin procesar, facilitando la identificación de las señales de las biomoléculas de interés.

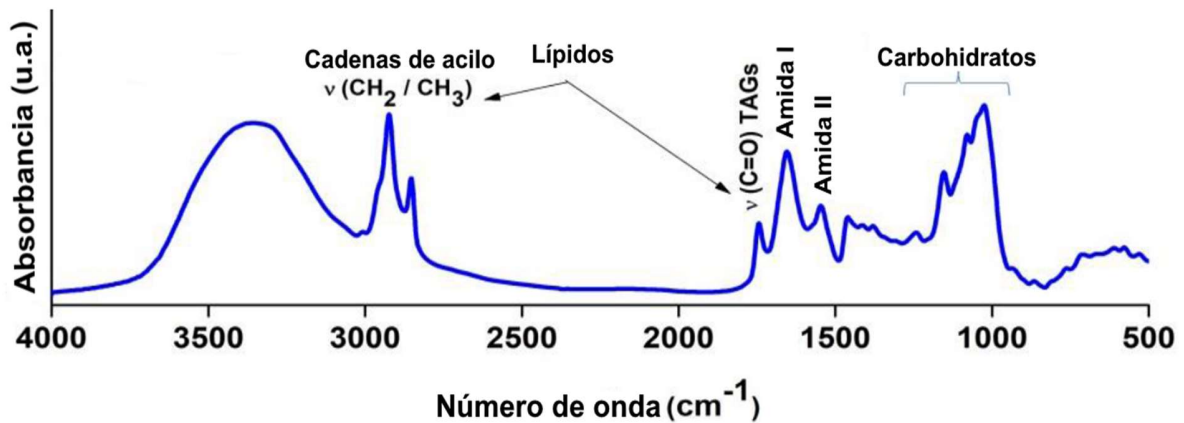


Figura 1. Espectro de absorción de FTIR de una microalga, indicando la absorción de algunas biomoléculas (Fuente: modificado de Grace et al. 2020).

### 3. HIPÓTESIS

La microalga *Dunaliella tertiolecta* tiene la capacidad de remover la fracción hidrosoluble de derivados del petróleo en agua de mar.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de *Dunaliella tertiolecta* de remover la fracción hidrosoluble de derivados del petróleo en agua de mar

#### 4.2 Objetivos particulares

- Optimizar el método de cultivo de la microalga *Dunaliella tertiolecta*
- Realizar estudios de exposición a la fracción hidrosoluble de la mezcla combustóleo/diesel para *Dunaliella tertiolecta*

- Evaluar la capacidad de *Dunaliella tertiolecta* para remover la fracción hidrosoluble de la mezcla combustóleo/diesel
- Identificar los grupos funcionales y las bandas de absorción de las biomoléculas de *Dunaliella tertiolecta*
- Inmovilizar células de *Dunaliella tertiolecta* a un biomaterial de origen marino

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Optimización del método de cultivo de la microalga *Dunaliella tertiolecta* y escalamiento

#### 5.1.1 Obtención de la cepa de *Dunaliella tertiolecta*

La microalga *Dunaliella tertiolecta* se obtuvo de la colección de cepas de microalgas del Departamento de Acuicultura (DA), del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México (Foto 1, Anexo). Se mantuvo un stock de microalgas en el laboratorio húmedo del DA, con el propósito de conservar la cepa en condiciones óptimas. Se cultivaron en matraces estériles de 125 mL, en medio de cultivo f/2 (Guillard & Ryther, 1962) temperatura de  $20\pm 1$  °C, salinidad de 34 PSU, provisto de luz continua. Para el mantenimiento de la cepa se realizaron trasposos cada 21 días.

Previo al escalamiento, la cepa de microalga *D. tertiolecta* se cultivó en volúmenes crecientes desde 100 mL hasta 2 L. El agua de mar utilizada para los cultivos fue

previamente esterilizada en autoclave a 120 °C, y posteriormente se le agregó el medio de cultivo f/2 (Guillard & Ryther, 1962). Las condiciones de cultivo que se establecieron fueron: luz continua ( $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), temperatura de  $19 \pm 1$  °C y salinidad de 34 PSU. Se realizaron conteos celulares diariamente para los cultivos en matraz Fernbach (2 L) y el inóculo inicial fue de  $60 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Foto 2, Anexo).

### 5.1.2 *Cultivo y escalamiento*

Para obtener la biomasa suficiente para el análisis de los pigmentos, el peso seco y los fenoles totales de *D. tertiolecta*, se realizó el escalamiento a botellón de 20 L (con un volumen útil de 15 L), se partió de los cultivos en matraz Fernbach. El inóculo inicial fue de  $100 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ , por triplicado (Foto 3, Anexo). Las condiciones de cultivo fueron: medio f/2, luz continua ( $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), temperatura de  $19 \pm 1$  °C, salinidad de 34 PSU y con aireación continua. Para identificar las fases de crecimiento se realizaron recuentos celulares diarios y para los análisis se realizaron muestreos los días 3, 5, 7, 9 y 11 de cultivo. El agua de mar utilizada en este nivel se esterilizó siguiendo las indicaciones de Hemerick (1973).

### 5.1.3 *Monitoreo del cultivo*

#### 5.1.3.1 Recuento celular

Se evaluó la densidad del cultivo mediante recuentos celulares, utilizando una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad y un microscopio Primo Star, Carl Zeiss. A su vez, se midió la densidad óptica del cultivo, a 678 nm con un espectrofotómetro HACH DR6000.

La tasa de crecimiento ( $\mu$ :div·día<sup>-1</sup>) se calculó de acuerdo con la ecuación (1) descrita por (Vonshak & Maske, 1982) :

$$\mu = \frac{\text{Ln}(X_2/X_1)/\text{Ln}(2)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

Dónde:  $\mu$  = Tasa de crecimiento;  
 $X_2$  = Número de células en el tiempo  $t_2$   
 $X_1$  = Número de células en el tiempo  $t_1$   
 $t_2$  = Tiempo final en días  
 $t_1$  = Tiempo inicial en días

#### 5.1.3.2 Peso seco total (PST) y orgánico (PO)

La biomasa producida también se cuantificó gravimétricamente como peso seco total (PST) y orgánico (PO). Alícuotas de volumen conocido, de cada una de las repeticiones de los cultivos, se tomaron los días 3, 7, 9, 11 y 14; las muestras se filtraron en filtros Whatman GF/C, de 47 mm de diámetro y para eliminar las sales se enjuagaron con formiato de amonio al 3%. Los filtros fueron lavados previamente, incinerados a 490 °C en una mufla y pesados. Los filtros con microalgas se colocaron en un horno (Termolyne, modelo: serie de hornos 9000) a 65 °C hasta obtener el peso seco constante (PST). Para obtener el contenido de cenizas (PC), los filtros con microalgas se incineraron consecutivamente en una mufla a 500 °C durante 12 h y se pesaron. El peso seco orgánico (PSO) se calculó como la diferencia entre PST y el PC (Sorokin, 1973).

#### 5.1.3.3 Medición de pH

El pH del cultivo se midió al momento de tomar las muestras en los días 3, 5, 7, 9 y 11, mediante un potenciómetro HANNA checker.

#### 5.1.3.4 Pigmentos

De cada una de las repeticiones de los cultivos de microalgas se recolectaron muestras (15 mL) los días 3, 5, 7, 9 y 11. Las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm por 15 min y 10 °C (Thermo Scientific Heraeus, Megafuge 16R); los sobrenadantes se descartaron y los pellets de microalgas se almacenaron a -20 °C, hasta su análisis. Para el procedimiento de extracción, los pellets se descongelaron, se resuspendieron en 1.5 mL de metanol al 100% y se sonicaron durante 5 min (Foto 4, Anexo). Las mezclas se almacenaron en la oscuridad durante 1 h a 4 °C y luego se centrifugaron. Los sobrenadantes se recuperaron y filtraron (0.2 µm) para analizarlos por HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución), Agilent Technologies®, modelo 1260 INFINITY, equipado con una columna Zorbax C8 de 4.36 x 150 mm y un tamaño de partícula de 5 µm. La identificación y cuantificación de los pigmentos se realizó según lo descrito por Orosa et al. (2005). El tiempo de elución fue de 29 min con un flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Se utilizaron 3 solventes para la fase móvil: acetona, metanol y agua, siguiendo el gradiente de elución indicado en la Tabla I.

Tabla I. Gradiente de dilución de la fase móvil en el análisis de pigmentos por HPLC. A: acetona, B: metanol y C: agua.

Tiempo (min)	Gradiente de dilución de solventes (%)		
	A	B	C
0	15	76	9
9	50	45	5
15	58	38	4
17	70	27	3
22	70	27	3
25	100	0	0

Las longitudes de onda de detección para la integración fueron 436, 450 y 476 nm. Se realizaron curvas de calibración con estándares de los pigmentos: clorofila a,  $\beta$ -caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina y luteína (DHI, Dinamarca). El cálculo de contenido de pigmentos se realizó con base en el peso seco total de las microalgas ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

#### 5.1.3.5 Fenoles

Los compuestos fenólicos totales en *D. tertiolecta* se extrajeron usando una modificación del método descrito por Goiris et al. (2012). Las microalgas se cosecharon por centrifugación (Centrífuga Allegra 64R, Beckman Coulter) a 4,800 rpm durante 15 min y 10 °C y se liofilizaron. La extracción se realizó en 50 mg de biomasa liofilizada con 1.5 mL de mezcla de etanol/agua al 75 % (v/v) durante 4 h, durante este periodo, cada hora, se homogeneizó por ultrasonido durante 3 min. La mezcla se centrifugó a 4,500 rpm durante 15 min y los sobrenadantes obtenidos se almacenaron a -20 °C hasta ser analizados. Las extracciones se realizaron en la

oscuridad a temperatura ambiente. El contenido fenólico de *D. tertiolecta* en los extractos se determinó utilizando el método Folin-Ciocalteu modificado y descrito por Goiris et al. (2012). Del extracto se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  y se mezcló con 1.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido diez veces con agua destilada y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron a la mezcla 1.5 mL de solución de bicarbonato sódico ( $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) y se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente y enseguida se midió la absorbancia de cada muestra a 765 nm. Los fenoles y polifenoles se cuantificaron utilizando ácido gálico como estándar para la curva de calibración y los resultados se expresan en miligramos de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de biomasa.

#### 5.1.4 *Análisis estadístico*

Para los resultados de conteo celular, pigmentos y fenoles fueron analizados para normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Una vez comprobada la distribución normal, se realizó un análisis de varianza de una vía con réplicas (ANOVA) con prueba de Levene para homogeneidad de varianzas, seguido de una prueba de comparación de medias de Tukey, para evaluar diferencias significativas entre los datos de los días muestreados ( $p < 0.05$ ). Para los valores de fenoles vs. el pH y tiempo del cultivo, se realizó una ANOVA con análisis de regresión múltiple. Para el análisis estadístico se utilizó el software Minitab Statistical Software (versión 17.3.1). Todos los resultados se presentan con desviación estándar (SD).

## 5.2 Bioensayo preliminar - Exposición de *Dunaliella tertiolecta* a la WSF de combustóleo/diesel.

Preparación de la solución stock de la WSF de combustóleo/diesel El combustóleo fue provisto por la Capitán Norma Hernández de la Segunda Región Naval, Ensenada, Baja California, México. El diesel fue comprado directamente de una estación de servicio PEMEX en la misma ciudad. El combustóleo se mezcló con diésel en una relación 85:15, a partir de la cual se preparó una solución stock de WSF agregando agua de mar, en relación 9:1 (agua de mar: mezcla combustóleo/ diesel) (Siron et al., 1991). Esta mezcla se dejó en obscuridad durante 96 h, agitando suavemente cada 12 h, sin alterar la interfaz de aceite/agua. El agua de mar natural utilizada fue previamente filtrada a 0.45  $\mu\text{m}$ , pasada por luz UV, y esterilizada en autoclave.

### 5.2.1 Prueba de exposición

Las concentraciones de WSF utilizadas para la exposición de *D. tertiolecta* fueron 12.5 y 50 % y un control (microalgas en medio f/2), con 5 tubos para cada uno con el fin de contar con una muestra para cada día de monitoreo (días 3, 6, 9, 12 y 15). Además, se utilizaron tres tubos como controles no-biológicos (blanco) para la cuantificación de la WSF de la mezcla combustóleo/diésel (50 %). Todos los tubos se manejaron por triplicado, dando un total de 48 tubos por experimento (Foto 5, Anexo). Los tubos de ensayo utilizados con capacidad de 100 mL fueron previamente lavados con acetona, y con etanol absoluto. A cada tubo se le agregó un inóculo de  $100 \times 10^3 \text{ cél} \cdot \text{ml}^{-1}$  de *D. tertiolecta*, en un volumen final de 80 mL. La solución stock de WSF se diluyó en el medio de crecimiento estéril en proporciones determinadas para el ensayo. Los tubos

se mantuvieron con iluminación continua ( $67.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a  $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  y sin aireación, durante 15 días.

## 5.2.2 *Monitoreo del cultivo*

### 5.2.2.1 Recuento celular

La densidad del cultivo se estimó por recuento celular usando una cámara Neubauer de 0.1 mm de profundidad, con ayuda de un microscopio compuesto (Zeiss, Primo Star). La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) se calculó de acuerdo con Vonshak y Maske (1982) (ver inciso 5.1.3.1).

### 5.2.2.2 Identificación de grupos funcionales por FTIR

Para la caracterización por FTIR, se tomó una alícuota del cultivo de microalgas los días 3, 6, 9, 12 y 15. Se separó la biomasa del medio de cultivo por centrifugación, durante 10 min a 4,800 rpm y  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 2). Después de centrifugar, se guardó el sobrenadante en tubos Falcon y el pellet celular se transfirió a un tubo Eppendorf y se congeló. Una vez finalizado el ensayo, se liofilizaron los pellets por 24 h. Al quedar totalmente secos, los tubos se sellaron y refrigeraron (Foto 6, Anexo). Posteriormente, con un FTIR Perkin-Elmer modelo Spectrum two, se midió la absorbancia de los pellets completos de microalgas, y con los espectros obtenidos se identificaron los grupos funcionales con base en la bibliografía disponible para FTIR en microalgas (Adhiya et al., 2002; Chen et al., 2011; Driver et al., 2015; Geun Goo et al., 2013; Grace et al., 2020; Mecozzi et al., 2007; Shuping et al., 2010; Stuart, 2004; Xi & Chen, 2014; Zou et al., 2009).

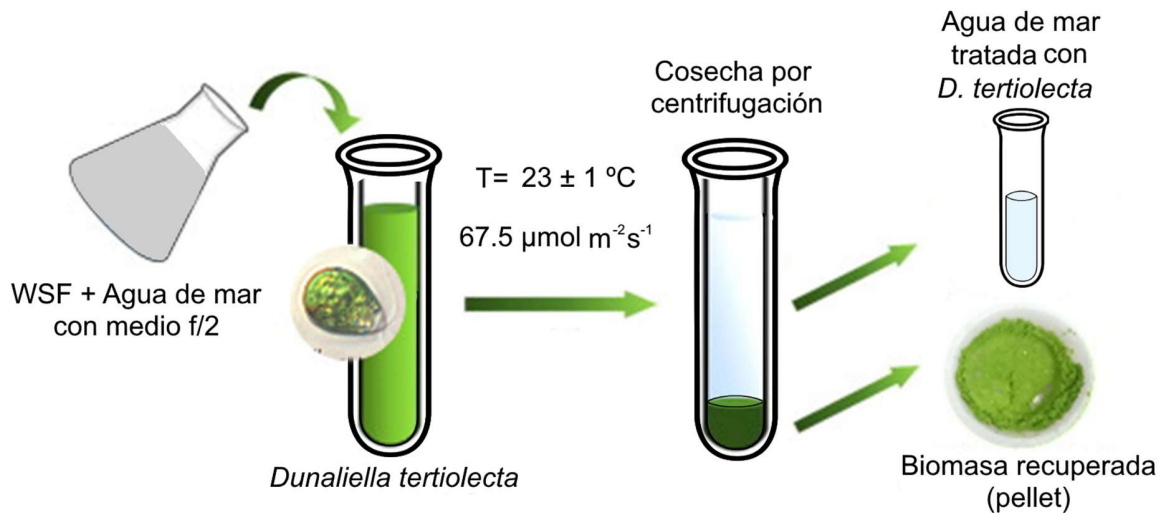


Figura 2. Diagrama de separación por centrifugación, sobrenadante de agua de mar y pellet de *Dunaliella tertiolecta* una vez expuesta a la WSF.

#### 5.2.2.3 Monitoreo de la WSF por UV

Los hidrocarburos en la WSF se extrajeron utilizando n-hexano, previa remoción de las microalgas por centrifugación (Figura 2). Para extraer la fase orgánica, que contiene la WSF, se tomó una alícuota de 45 mL del sobrenadante, se transfirió a un frasco de vidrio ámbar hermético de 100 mL y se le añadieron 5 mL de n-hexano. Después, la muestra se agitó vigorosamente para que el n-hexano arrastrara la mayor cantidad de hidrocarburos del agua de mar y se dejó reposar hasta que se separaron completamente las fases y se extrajo la fase orgánica. La extracción se realizó por triplicado y a este extracto se le realizó un barrido en el intervalo de luz ultravioleta con un espectrofotómetro Perkin-Elmer. Este análisis se realizó antes y después del bioensayo para observar cambios en la absorción por la WSF.

### 5.2.3 *Análisis estadístico*

Los resultados del recuento celular se analizaron mediante una ANOVA de dos vías con réplicas y las medias se compararon utilizando la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó con Minitab Statistical Software (versión 17.3.1). Todos los resultados se presentan con desviación estándar (SD).

### 5.3 **Bioensayo definitivo. Evaluación de efectos de la WSF en *Dunaliella tertiolecta*.**

Para investigar los efectos de WSF sobre *D. tertiolecta* se realizó un experimento en tres pasos. En el primer paso, las microalgas fueron expuestas a la WSF al 50 % durante 15 días, y el crecimiento fue monitoreado por el recuento celular. El segundo paso fue cuantificar tres pigmentos (clorofila *a*, luteína y  $\beta$ -caroteno), así como cuatro metabolitos: proteínas, lípidos, ácidos grasos y fenoles. Por último, realizó la caracterización por FTIR de los lípidos en la microalga.

#### 5.3.1 *Condiciones de cultivo*

Las microalgas para este bioensayo se tomaron del cultivo stock (inciso 5.1.1). Antes de la prueba de toxicidad, las microalgas se aclimataron, por 4 días, a condiciones de laboratorio: temperatura de  $19 \pm 1$  °C, salinidad de 34 ups, con luz continua ( $67.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). El cultivo se mantuvo en un volumen de 1 L, con medio f/2 (Guillard y Ryther 1962).

### 5.3.2 Prueba de toxicidad

La prueba de toxicidad se realizó con microalgas que se encontraban en la fase logarítmica. De acuerdo a los resultados obtenidos en el bioensayo preliminar (inciso 5.2) se seleccionó una concentración de 50 % de WSF para el bioensayo, considerando esta concentración lo suficientemente alta como para causar un efecto en *D. tertiolecta*. El bioensayo se realizó en botellas de vidrio de 1 L, con un volumen útil de 900 mL, el inóculo inicial de microalgas fue de  $100 \times 10^3$  cél·mL<sup>-1</sup> (105 mL), y se agregó la concentración del 50 % de WSF (Foto 7, Anexo). Al grupo control, se le añadió el inóculo inicial de microalgas y se mezcló con agua de mar. Las botellas de control y de prueba se hicieron por triplicado. Las condiciones de laboratorio fueron:  $T=19 \pm 1$  °C, aireación y luz continua ( $67.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), en medio f/2 durante 15 días (Figura 3).

Para dar seguimiento a las variaciones de los metabolitos estudiados durante la prueba de toxicidad, se realizaron muestreos cada tres días (días 3, 6, 9, 12 y 15), tomando una alícuota de 100 mL de cada una de las botellas de los tratamientos.

Los controles no-biológicos, denominados “background” se mantuvieron bajo las mismas condiciones de laboratorio, estos controles solo contenían solución de WSF al 50 % (WSF en agua de mar y nutrientes para medio f/2) y fueron de utilidad para cuantificar la WSF, así como la adsorción de estos compuestos en las superficies de la botella y la pérdidas por volatilización durante los 15 días de la prueba (n=3).

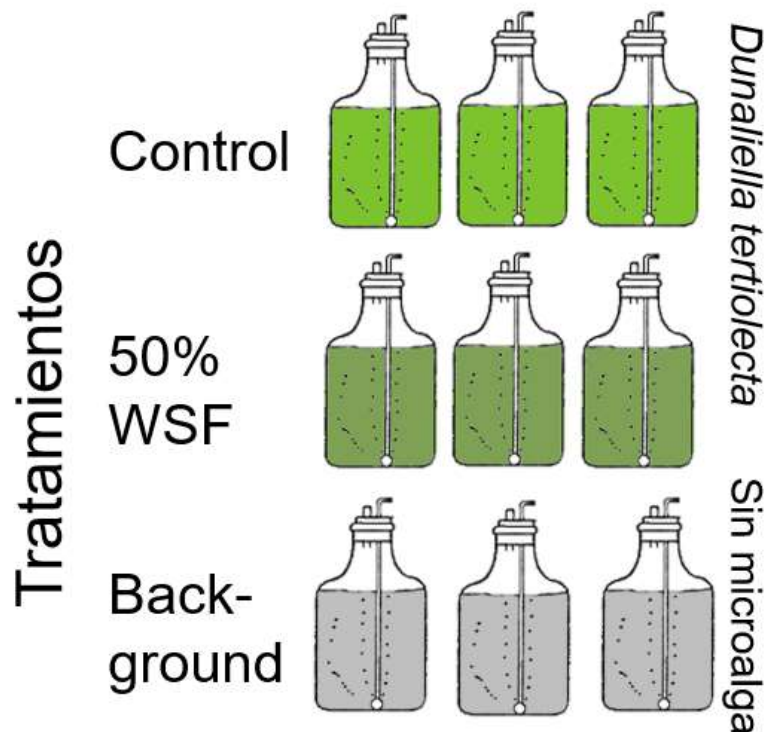


Figura 3. Estrategia de trabajo para el ensayo de toxicidad de *Dunaliella tertiolecta* expuesta a la WSF de combustóleo/diesel.

### 5.3.3 Monitoreo del cultivo

#### 5.3.3.1 Recuento celular

Se evaluó la densidad del cultivo mediante recuentos celulares, utilizando una cámara Neubauer y la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) se calculó de acuerdo con Vonshak y Maske (1982) (ver inciso 5.1.3.1) (Foto 8, Anexo).

#### 5.3.3.2 Peso seco

La biomasa producida se determinó en función del peso seco total (PS). Se recolectaron muestras de 50 mL de los cultivos y se centrifugaron. Después de la centrifugación, el pellet se enjuagó con formiato de amonio al 3% y luego se liofilizó. El PS de la biomasa se determinó utilizando una balanza analítica (Explorer Pro EP114C, OHAUS, Suiza).

#### 5.3.3.3 Pigmentos

Se colectaron muestras del cultivo de microalgas (15 mL) los días 3, 6, 9, 12 y 15, se centrifugaron a 4,800 rpm durante 15 min en una centrífuga refrigerada (Centrífuga Allegra 64R, Beckman Coulter). Los sobrenadantes se descartaron y los pellets de microalgas se almacenaron a -20 °C en atmosfera de nitrógeno hasta su posterior análisis. La extracción y cuantificación de pigmentos se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el inciso 5.1.3.4.

#### 5.3.3.4 Fenoles

Un alícuota de 15 mL de cultivo de cada una de las botellas se centrifugó a 4,800 rpm durante 15 min en una centrífuga refrigerada (Centrífuga Allegra 64R, Beckman Coulter) y se liofilizaron. El contenido fenólico de *D. tertiolecta* en los extractos se determinó utilizando el método Folin-Ciocalteu modificado y descrito por Goiris et al. (2012) (inciso 5.1.3.5).

#### 5.3.3.5 Proteínas

El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry et al. (1951). Se cosecharon 15 mL del cultivo de microalgas y se centrifugaron a 4,500 rpm durante 15 min, a 4 ° C y se conservó a -80 ° C en atmósfera de nitrógeno para su conservación. Posteriormente, se determinó la concentración por el método de Lowry y el intervalo de la curva de calibración fue de 25–500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer) a una longitud de onda de 750 nm.

#### 5.3.3.6 Lípidos totales

La cuantificación de lípidos totales se realizó mediante el ensayo de sulfo-fosfo-vanilina (SPV), descrito por (Mishra et al., 2014). La biomasa de *D. tertiolecta* se obtuvo mediante centrifugación de una muestra (5 - 10 mL de cultivo) a 4000 rpm durante 10 min. El reactivo de fosfo-vanilina se preparó disolviendo 0.6 g de vainillina en 10 mL de etanol absoluto, luego se le adicionó 90 mL de agua desionizada, agitando constantemente. Posteriormente, se añadieron 400 mL de ácido fosfórico concentrado. El reactivo de fosfo-vainillina se preparó poco antes de cada cuantificación para garantizar una alta actividad. Para la cuantificación de lípidos, se añadieron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%) a la muestra y se calentó durante 10 min a 100°C, luego se enfrió durante 5 min en un baño de hielo. Posteriormente, se añadieron 5 mL de reactivo de fosfo-vainillina y la muestra se incubó durante 15 min a 37°C. Posteriormente se leyó la absorbancia a 530 nm. Se usó aceite de canola (Sigma-Aldrich) como estándar para la curva de calibración en el intervalo 25–2000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

#### 5.3.3.7 Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos se extrajeron de la biomasa liofilizada, cosechada en el día 15 (50 mg), con la mezcla de diclorometano:metanol (2:1) por triplicado (Folch, et al., 1957, modificado y citado por Badillo Zapata et al. 2016). Al extracto obtenido se le añadió el antioxidante BHT al 0.01 %. Se recuperó la fase orgánica del extracto y se le adicionó 1 mL de agua y 50  $\mu$ L de HCl al 0.6N, se agitó y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4 °C. Se descartó la fase acuosa y el solvente se evaporó con flujo de nitrógeno. El extracto obtenido se saponificó con una solución metanólica al 90 % en KOH 0.3 N y se dejó en baño maría a 60 °C por 30 min. Se enfrió a temperatura ambiente y luego se le agregó un volumen de 600  $\mu$ L de agua destilada y 400  $\mu$ L de hexano. La mezcla fue agitada vigorosamente para realizar la extracción. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4 °C, descartando la capa de hexano. Este proceso se repitió y se le adicionó 100  $\mu$ L de HCl 6N antes de centrifugar. Se recuperó la fase orgánica (hexano) y evaporó el solvente con flujo de nitrógeno, y en la muestra quedaron los lípidos saponificados. Para formar los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), se añadió un volumen de 500  $\mu$ L de una solución de trifloruro de boro al 14 % en metanol. Se calentó la mezcla a 60 °C durante 15 min, luego se le agregaron 200  $\mu$ L de agua y 300  $\mu$ L de hexano y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min a 4 °C. La capa de hexano, que contiene los FAME, se recuperó y evaporó bajo flujo de nitrógeno. Las muestras se almacenaron a 4 °C, en viales sellados herméticamente hasta su posterior análisis. El total de FAME se pesó y se suspendió en hexano para obtener una concentración final de 100 mg mL<sup>-1</sup> (Badillo Zapata et al., 2016). Las muestras se analizaron en un

cromatógrafo de gases Agilent GC 6850, equipado con un inyector dividido / sin divisor, un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar (Agilent, DB-FFAP; Agilent J&W, columnas GC; 30 m x 0.320 mm, espesor de película 0.25  $\mu\text{m}$ ). El gas portador utilizado fue nitrógeno. Los picos FAME se identificaron y cuantificaron utilizando como estándar una mezcla de 37 componentes (FAME, Supelco / Sigma-Aldrich). El contenido total de lípidos se calculó sumando todos los picos, excepto el pico de disolvente (Mishra et al. 2014).

#### 5.3.3.8 Caracterización de lípidos por FTIR

*D. tertiolecta* se cosechó cada tercer día por centrifugación durante 15 min a 4000 rpm y 4 °C. Posteriormente, el pellet se transfirió a un tubo Eppendorf y se congeló a -20 °C con atmósfera de nitrógeno. Los pellets se liofilizaron durante 24 h y se almacenaron a -20 °C. Los grupos funcionales en la biomasa se caracterizaron usando un Perkin-Elmer FTIR Spectrum Two. Los espectros fueron normalizados por la banda Amida I a  $\sim 1,650\text{ cm}^{-1}$ , y luego suavizados por el método Savitzky-Golay usando el software Origin Pro 8.0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA). Las absorbancias de los espectros FTIR se usaron para calcular la derivada de segundo orden, y se obtuvo un pico negativo para cada banda y hombro en los espectros de absorción original (Stuart, 2004). Las derivadas de segundo orden de la absorbancia se expresaron como SDA. Posteriormente se calculó el área de los picos negativos de las bandas lipídicas para obtener el contenido total de lípidos de las microalgas, utilizando la ecuación (2):

$$(A_{Total\ lipids}) = (A_{UFA}) + (A_{TAGs}) \quad (2)$$

Dónde:

$(A_{UFA})$  = Suma total de áreas de bandas de ácidos grasos insaturados

$$= (A_{1290\ cm^{-1}}) + (A_{3010\ cm^{-1}})$$

$(A_{1290\ cm^{-1}})$  = Área del pico negativo debido a la vibración de =C-H

$(A_{3010\ cm^{-1}})$  = Área del pico negativo debido a la vibración en enlaces CH = CH

$(A_{TAGs})$  = Área total de los triacilglicéridos =  $(A_{1740\ cm^{-1}})$

$(A_{1740\ cm^{-1}})$  = Área del pico negativo debido a la vibración del carbonilo vC=O

A partir de los resultados en la ecuación (2), se evaluaron y monitorearon las transiciones biomoleculares de los lípidos.  $A_{TAG}$  y  $A_{UFA}$  fueron calculados como un porcentaje de los lípidos totales.

#### 5.3.4 Cuantificación de la WSF

Los hidrocarburos en la WSF se extrajeron utilizando n-hexano, en el tiempo cero y para el día 15 en las botellas de controles no biológicos (background) y a las botellas con WSF y *Dunaliella tertiolecta* (WSF tratada). En el presente trabajo la “WSF tratada” se refiere al agua que ha sido sometida a un proceso de descontaminación por parte de las microalgas. La extracción de la WSF para su cuantificación se realizó según lo descrito en el inciso 5.2.2.3. El extracto obtenido se filtró a través de una columna de sílice y el solvente se evaporó bajo campana. El residuo se suspendió en 700  $\mu$ L de hexano y se analizó por cromatografía de gases (Technologies 7890B GC System; columna capilar HP-5 Agilent de 30 m).

### 5.3.5 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante una ANOVA de dos vías con réplicas y las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey para la variación de los datos a través del tiempo ( $p < 0.05$ ), así como la prueba t para la comparación de las muestras por día ( $p < 0.05$ ). Para el análisis estadístico se utilizó el software Minitab Statistical Software (versión 17.3.1). Todos los resultados se presentan con desviación estándar (SD).

### 5.4 Inmovilización de *Dunaliella tertiolecta*

Para la inmovilización de las microalgas se preparó una solución de alginato de sodio al 2.6 % y NaCl al 3.4 % en agua destilada, agitando vigorosamente. Una vez disuelto el alginato y el cloruro de sodio, se esterilizó la solución. El cloruro de sodio se añadió para simular la salinidad del agua de mar utilizada en los cultivos y no dañar a la microalga al momento de mezclar la solución de alginato con el cultivo. Para gelificar el alginato se preparó una solución de  $\text{CaCl}_2$  a 0.1M y NaCl al 3.4 %, la cual también se esterilizó. Previo a la esterilización de las soluciones se ajustó el pH a 8. Para la formación de las perlas de alginato, se añadió un volumen conocido de medio de cultivo con microalgas hasta obtener una concentración final de alginato al 2 %. Se transfirió la mezcla alginato + *D. tertiolecta* a una bureta, previamente esterilizada, adicionando gota a gota la mezcla a la solución de cloruro de calcio, agitando manualmente con movimientos circulares suaves. Las perlas de alginato de calcio con *D. tertiolecta* se recolectaron y se lavaron con agua de mar estéril, utilizando 60 perlas para su caracterización. Se midió el diámetro de las esferas y el volumen de agua

desplazado por cada perla (n=20) (Foto 9, Anexo). Con base en el volumen calculado de la esfera y el volumen de agua desplazada por perla se calculó el porcentaje de retención de agua, de acuerdo con la ecuación (3).

$$\% \text{ Retención de agua} = 100 - \left( \frac{\text{Volumen desplazado}}{\text{Volumen calculado}} * 100 \right) \quad (3)$$

Para evaluar el crecimiento de las microalgas en perlas de alginato se cultivó *D. tertiolecta* inmovilizada en matraces de 125 mL (n=3). En una probeta estéril se midió un volumen de 90 mL de medio de cultivo f/2 y se adicionaron las perlas de alginato hasta aforar a 110 mL (aprox. 500 perlas). Posteriormente, se transfirieron a los matraces, donde se mantuvieron durante 21 días a una temperatura de  $19 \pm 2$  °C, provisto de luz continua ( $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

#### 5.4.1 Monitoreo de cultivos de microalgas en perlas de alginato.

La superficie y el interior de las perlas se observaron bajo el microscopio óptico los días de muestreo (días 2, 4, 6, 8, 14 y 21). Las esferas fueron cortadas transversalmente para su observación.

##### 5.4.1.1 Recuento celular

Para los recuentos celulares se tomaron 10 perlas de cada matraz y se disolvieron en 10 mL de buffer de fosfatos 2 M y una gota de Lugol para fijar las microalgas. Una vez disueltas las perlas se determinó la densidad del cultivo mediante recuentos celulares, utilizando una cámara Neubauer. La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) se calculó de acuerdo con Vonshak y Maske (1982) (ver inciso 5.1.3.1).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Optimización del método de cultivo de la microalga *Dunaliella tertiolecta*

#### 6.1.1 Monitoreo del cultivo

La curva de crecimiento observada en el cultivo es típica de un cultivo por lotes de algas; presenta cuatro fases definidas: lag (1), logarítmica (2), crecimiento lento (3) y estacionaria (4) (Figura 4). La sucesión de fases en el crecimiento de un cultivo de microalgas se caracteriza por variaciones en la tasa de crecimiento, y esta es una concepción clásica, pero las diferentes fases no siempre se han definido de la misma manera (Monod, 1949). Las fases se definieron para este trabajo como: (1) Fase lag: tasa de crecimiento nulo ( $\mu=0$ ), (2) Fase logarítmica: aumento de la tasa de crecimiento ( $\mu \geq 0.5$ ), (3) Fase de crecimiento lento: la tasa de crecimiento disminuye ( $0 > \mu < 0.5$ ) y (4). Fase estacionaria: tasa de crecimiento nulo ( $\mu=0$ ). La fase lag duró un día, la fase logarítmica (FL) en todos los cultivos duró cuatro días, seguido de una fase de crecimiento lento (FCL) que duró cinco días y luego una fase estacionaria (FE) hasta el final del cultivo el día 14. Las tasas máximas de crecimiento ( $\mu$ ) fueron de 1.5 y 1.4, observadas en el segundo y tercer día, respectivamente.

En las condiciones experimentales, la densidad celular alcanzó una producción de aproximadamente  $3 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> desde el día 10 hasta el día 14.

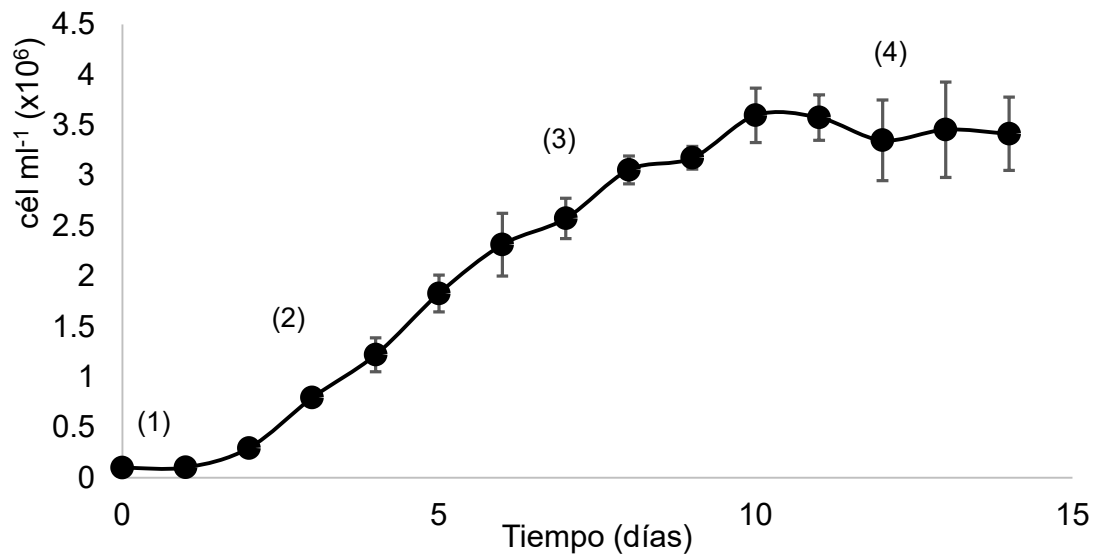


Figura 4. Curva de crecimiento para *Dunaliella tertiolecta*. Fases: (1) Lag, (2) logarítmica, (3) crecimiento lento y (4) estacionaria. Los puntos muestran resultados promedio (n=3). Las barras de error indican SD.

Existe una relación lineal entre la densidad óptica y los recuentos celulares, como se muestra en la Figura 5. Se realizaron dos curvas de correlación, una para la FL y otra para toda la curva, para las que se obtuvieron valores de R=0.99 y R=0.98, respectivamente.

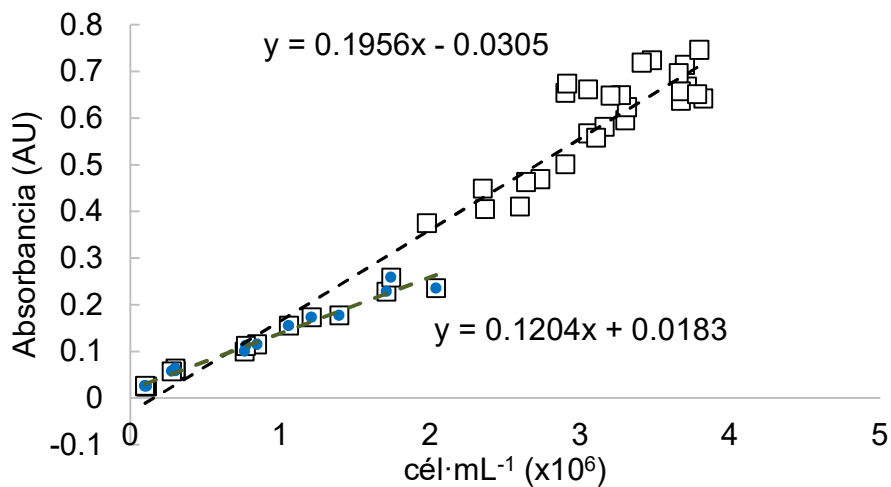


Figura 5. Correlación lineal entre la densidad óptica (DO) de las suspensiones celulares y el recuento celular de *D. tertiolecta*. DO en unidades de absorbancia y recuento de  $\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Símbolos: (●) regresión lineal con datos de la FL, pendiente de 0.1204 y coeficiente de correlación de 0.99; (□) regresión lineal con los datos de toda la curva de crecimiento de las microalgas, pendiente de 0.1956 y coeficiente de correlación de 0.98. Los símbolos de la FL se superponen con los de la primera parte de toda la curva de crecimiento.

El peso seco celular tendió a disminuir en la FL, que oscilaba entre 230 y 129  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$  (Tabla II). Por el contrario, se observó que el peso seco aumentó durante las FCL y FE de 162 a 236  $\text{pg}\cdot\text{cél}^{-1}$ .

Los pesos celulares orgánicos fueron similares entre las FL y FCL. En la FE (día 14); los pesos orgánicos fueron significativamente más altos que en la FL y de FCL temprano.

Tabla II. Peso seco total (PST), peso seco orgánico (PSO) y fenoles en *D. tertiolecta* en las diferentes fases de crecimiento.

Parámetros	Tiempo (días)						
	3	4	5	7	9	11	14
PST (pg cél <sup>-1</sup> )	230.82± 13.80ab	156.70± 38.98cd	129.77± 22.34d	166.77± 30.34bcd	162.76± 5.46bcd	204.55± 24.43abc	236.46± 32.40a
PSO (pg cél <sup>-1</sup> )	117.49± 8.61ab	111.82± 28.95ab	96.14± 9.12c	111.99± 17.38bc	143.70± 5.63ab	144.77± 3.16ab	169.40± 17.99a
Fenoles (GAE) (pg cél <sup>-1</sup> )	0.30± 0.03c	0.29± 0.09c	0.29± 0.03c	0.53± 0.10b	0.60± 0.04ab	0.76± 0.06a	0.75± 0.04a
(mg g <sup>-1</sup> )	2.45± 0.32c	2.58± 0.16c	3.02± 0.05c	4.73± 0.13ab	4.14± 0.35b	5.26± 0.30a	4.44± 0.51ab

Valores expresados como promedio  $\pm$  SD, n=3. Diferentes letras superpuestas en la misma columna indican una diferencia estadística significativa (Prueba de Tukey  $p < 0.05$ ).

#### 6.1.1.1 Pigmentos

En la FL de crecimiento, el contenido de la clorofila *a* se mantuvo constante, el contrario a lo observado a partir de la FCL, durante la cual la clorofila *a* tendió a disminuir a medida que el cultivo iba envejeciendo. Por otra parte, el contenido de luteína incrementó desde la FL a la FCL. Los máximos valores se presentaron en la FCL temprana, seguido de una disminución en la FE. Para las FL y FCL, los carotenoides fueron dominados por luteína, que representó entre el 0.70 a 0.75 mg·g<sup>-1</sup> de PST de microalgas. Respecto al  $\beta$ -caroteno, éste solo se detectó en la FL, en bajas concentraciones (Tabla III). En este estudio no se detectaron los pigmentos licopeno, astaxantina, y cantaxantina en *D. tertiolecta*.

Tabla III. Contenido de pigmentos (pg cél<sup>-1</sup>) en *D. tertiolecta* a través de diferentes fases de crecimiento.

Pigmentos		Tiempo (días)				
		3	5	7	9	11
Clorofila a	(pg cél <sup>-1</sup> )	1.59±0.53a	1.32±0.35ab	0.82±0.52abc	0.32±0.32bc	0.09±0.03c
	(mg g <sup>-1</sup> )	7.02±2.78a	10.23±2.31a	5.44±4.43ab	1.75±2.12b	0.46±0.20b
Luteína	(pg cél <sup>-1</sup> )	0.09±0.02ab	0.10±0.03ab	0.11±0.02a	0.06±0.03ab	0.04±0.01b
	(mg g <sup>-1</sup> )	0.40±0.08ab	0.75±0.40a	0.70±0.28a	0.36±0.22ab	0.19±0.09b
β-caroteno	(pg cél <sup>-1</sup> )	0.005±0.000	0.003±0.003	n.d.	n.d.	n.d.
	(mg g <sup>-1</sup> )	0.021±0.003	0.025±0.003	n.d.	n.d.	n.d.

Valores expresados como promedio ± SD; n=3. Diferentes letras superpuestas en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) n.d.: no detectado.

Se observó una correlación lineal entre las concentraciones de clorofila y luteína, en las fases FCL hasta FE, la concentración de clorofila disminuyó proporcionalmente al contenido de luteína con un coeficiente de correlación del 96% (Figura 6).

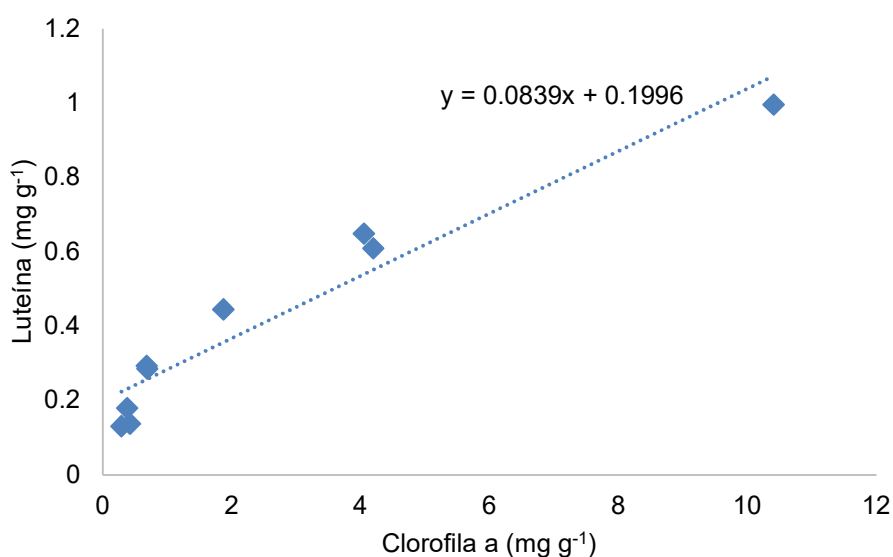


Figura 6. Correlación entre la luteína y la clorofila a en las células de *D. tertiolecta* (los datos se muestran en la Tabla III). Datos obtenidos a partir de muestras de los tres lotes estudiados en las fases de crecimiento lento y estacionaria. Coeficiente de correlación: 0.96, pendiente de 0.0839.

### 6.1.1.2 Medición de pH

En el momento de la toma de muestra se midió el pH para las tres réplicas. Los valores de pH fueron significativamente mayores en los días cinco y siete (pH 9.5 y 9.1, respectivamente), luego disminuyó el día nueve (pH 8.6), llegando finalmente al mínimo en el día 11 (Figura 7). Se relacionó la variación de luteína por célula con los valores de pH en el cultivo al momento de la toma de la muestra. Los valores más bajo de luteína ( $0.04 \pm 0.01$  pg cél<sup>-1</sup>) coinciden con el mínimo de pH (día 11).

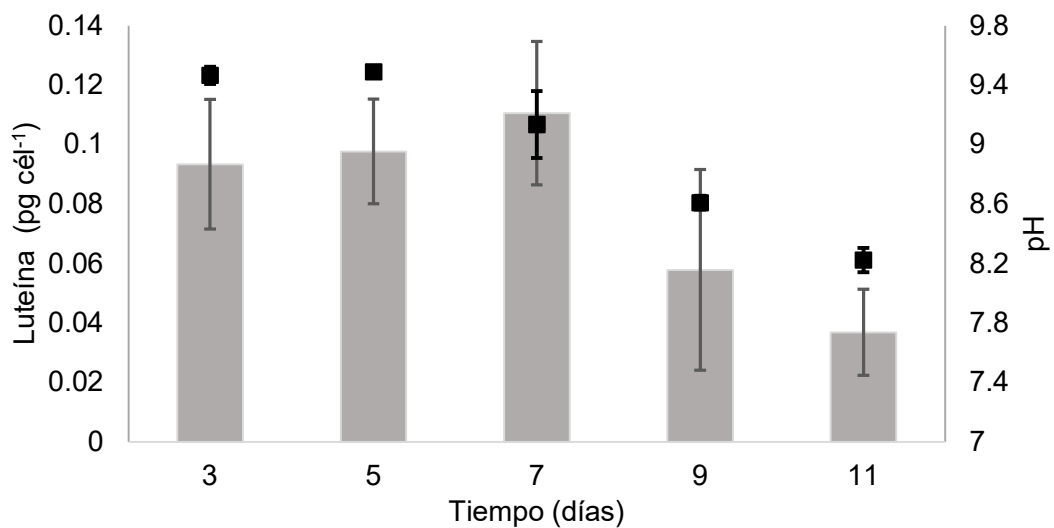


Figura 7. Valor de pH del cultivo y contenido de luteína por células determinadas en los diferentes puntos de la curva de crecimiento de *D. tertiolecta*. Símbolos: Las barras y los cuadrados sólidos representan el contenido de luteína por célula y los valores de pH, respectivamente; n=3. Las barras de error indican SD.

### 6.1.1.3 Fenoles

El contenido fenólico osciló entre 0.28 y 0.78 pg de GAE por célula, con diferencias significativas entre las fases de crecimiento (Tabla II). El contenido máximo de fenoles se encontró en la fase estacionaria. En el análisis de regresión múltiple, realizado para el contenido de fenoles versus el pH y el tiempo de cultivo, se obtuvo una  $R^2 = 0.8948$  (Tabla IV). La prueba indicó solo una pequeña contribución (1.66 %) para el tiempo de crecimiento, pero una gran contribución (87.81 %) para el pH del cultivo.

Tabla IV. Análisis de variancia con análisis de regresión múltiple: contenido de fenoles vs. el pH y tiempo ( $p=0.05$ ).

Análisis de regresión: Fenoles vs. pH, Tiempo							
Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	2	0.632472	89.48%	0.632472	0.316236	63.78	0.000
pH	1	0.620713	87.81%	0.049306	0.049306	9.94	0.007
Tiempo	1	0.011759	1.66%	0.011759	0.011759	2.37	0.144
Error	15	0.074378	10.52%	0.074378	0.004959		

3

## 6.2 Bioensayo Preliminar - Exposición de *Dunaliella tertiolecta* a la WSF de combustóleo/diesel.

### 6.2.1 Caracterización de la fracción hidrosoluble de la mezcla de combustóleo/diesel

La descripción del combustóleo en su hoja de seguridad (ver en anexo) establece que es un residuo de la destilación del petróleo crudo, en su mayoría conformado por compuestos de más de 20 átomos de carbonos, entre ellos alcanos, alquenos y aromáticos, de color negro, de alta viscosidad e insolubles en agua. La fracción

hidrosoluble del combustóleo se extrajo con hexano y el extracto obtenido se exploró por espectrofotometría de absorción UV. El espectro resultante se comparó con lo encontrado en la literatura (Figura 8). La densidad del combustóleo es difícil de medir debido a su alta viscosidad, por lo que se hizo una dilución de combustóleo:diesel (85:15), obteniendo una densidad de  $860.3 \text{ kg m}^{-3}$  para la mezcla de combustibles.

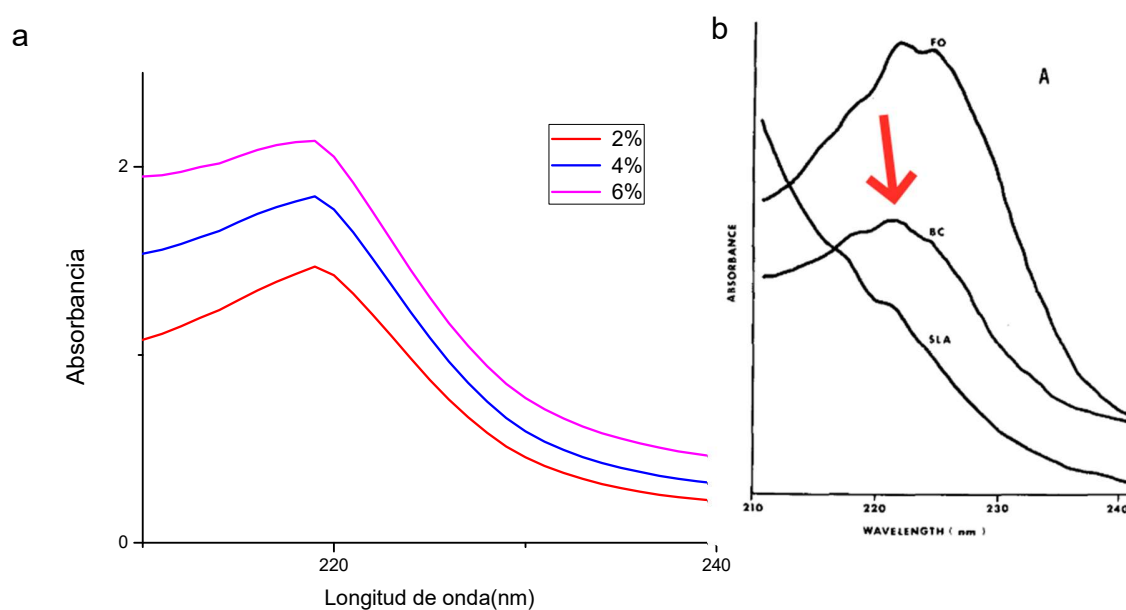


Figura 8. (a) Espectro de absorción UV de la fracción hidrosoluble del combustóleo en hexano, a tres concentraciones diferentes y (b) espectro UV indicado con flecha roja de la fracción hidrosoluble del combustóleo en hexano obtenido por Neff & Anderson (1975).

### 6.2.2 Monitoreo de cultivo

Para ningún cultivo se presentó una fase lag, iniciando directamente a la fase logarítmica (FL), con tasas de crecimiento sobre 0.5. Se observó diferencias en los

conteos durante las FL y fase de crecimiento lento (FCL), pero los cultivos se estabilizaron obteniendo valores similares para la fase estacionaria (FE), alcanzando más de  $2 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> (Figura 9).

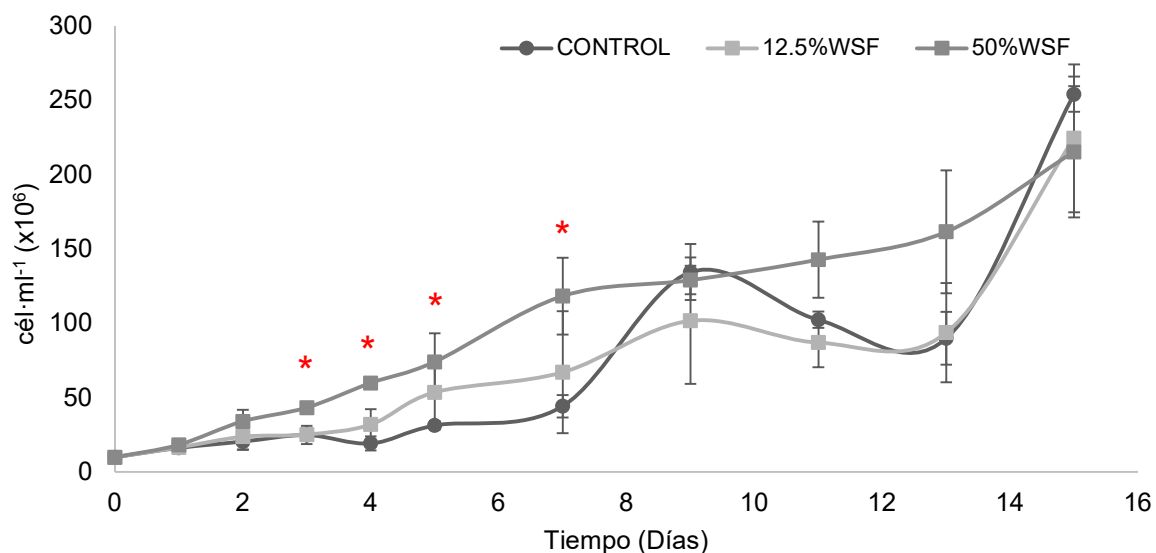


Figura 9. Curva de crecimiento para *Dunaliella tertiolecta*, expuesta a la WSF en dos concentraciones (12.5 % y 50 %) y el control. Las barras de error representan el error estándar, n = 3. (\*) Indica una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Para la densidad celular se observaron diferencias significativas entre tratamientos, por lo que se aplicó una prueba comparativa de Tukey (Tabla V). No hubo diferencias significativas en el número de cél·mL<sup>-1</sup> entre el grupo control y el grupo expuesto a WSF al 12.5 %. Por el contrario, para el grupo expuesto WSF al 50 % en los días 3 al 7 de cultivo los conteos celulares fueron significativamente más altos comparados con los valores del control. Estas diferencias observadas corresponden a la FL y FCL temprana.

Tabla V. Análisis de varianza de dos vías para el crecimiento de *Dunaliella tertiolecta* expuesta a una concentración de 12.5 % y 50 % de WSF, y el control.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tiempo	3.477E+13	9	3.8633E+12	79.958	4.828E-30	2.040
Tratamientos	1.416E+12	2	7.082E+11	14.657	6.561E-06	3.150
Interacción	1.986E+12	18	1.104E+11	2.284	0.009	1.778
Dentro del grupo	2.899E+12	60	4.832E+10			
Total	4.1071E+13	89				

#### 6.2.2.1 Identificación de grupos funcionales por FTIR

Se realizaron las asignaciones de grupos funcionales en los espectros de FTIR de *D. tertiolecta* para cada tratamiento (Tabla VI). Se identificaron las bandas de absorción de las biomoléculas más importantes del espectro de las microalgas (Figura 10).

Tabla VI. Asignación posible de las señales observadas en los espectros de FT-IR de *D. tertiolecta*.

N. de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	
3288	OH	Agua, alcohol y fenoles
3014	C-H de C=CH-	Cadenas de lípidos insaturados
2958	CH <sub>3</sub>	Vibraciones de ácidos grasos
2925	CH <sub>2</sub>	Alcanos, ácidos grasos
2877	CH <sub>3</sub>	Ácidos grasos
2854	OH	Carboxilos, ácidos grasos
2825	CH <sub>2</sub>	Vibraciones de ácidos grasos
1740	C-O-C	Esteres de ac. Grasos
1655	C-O	Amidas I, amidas de proteínas

N. de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	
1595	-CH	Anillos aromáticos
1545	N-H	Amidas I, amidas de proteínas
1452	CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub>	Anillos aromáticos, lípidos y proteínas
1386	C-O	Grupos carboxílicos
1290	=C-H	Vibraciones de lípidos insaturados
1140	C-O-C	Polisacáridos
1107	C-O-C	Polisacáridos
1078	C-O	Carbohidratos
1042	C-O	Carbohidratos
1019	P=O	Fosfolípidos y ácidos nucleicos
998	C-O	Carbohidratos
923	C-O	Carbohidratos
861	C=N	Clorofila y nucleótidos
574	P	Vibraciones del fosfato

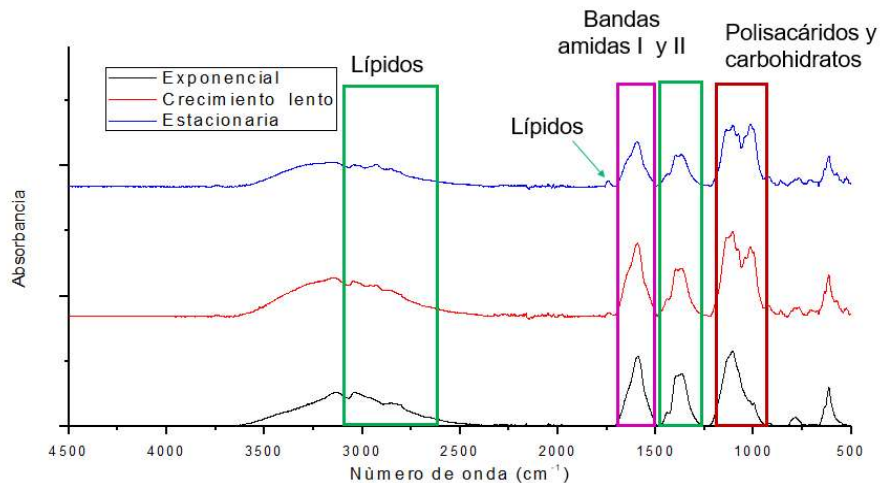
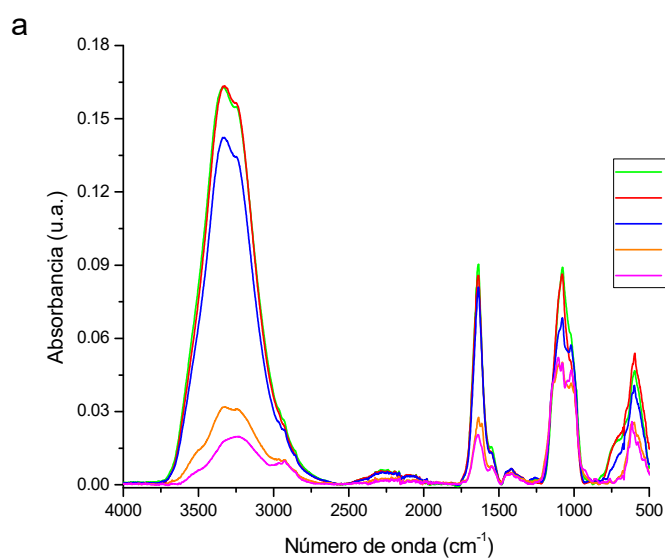


Figura 10. Espectro de FTIR de *D. tertiolecta* durante la fase logarítmica, de crecimiento lento y estacionaria, indicando las bandas de absorción de las biomoléculas.

En los espectros de FTIR de *D. tertiolecta* se identificaron bandas típicas de absorción para los grupos control y expuestos a la WSF, pero se observaron diferencias en las intensidades (intervalo 4500-500  $\text{cm}^{-1}$ ) (Figura 11 a, b y c). En la banda de los lípidos entre 3050 - 2800  $\text{cm}^{-1}$ , la señal de  $\text{CH}_3$  prácticamente desaparece en el tratamiento con WSF al 50 %, a diferencia del control y del tratamiento con WSF al 12.5 %, en los que se observa en todos los días de muestreo. La señal de  $\text{CH}_2$  se observa más definida para las microalgas expuestas a la WSF, cuando se compara con el control. La señal característica de los ésteres (1770 - 1710  $\text{cm}^{-1}$ ) no se observa en las primeras fases de crecimiento, solo es visible hasta la fase estacionaria.

Las bandas amida I y amida II, correspondiente a las proteínas, se muestran definidas en los tres tratamientos, en las muestras de todos los días. Las señales características de los polisacáridos y carbohidratos se mantuvieron presentes pero traslapadas en los tres tratamientos variando la intensidad en la absorbancia.



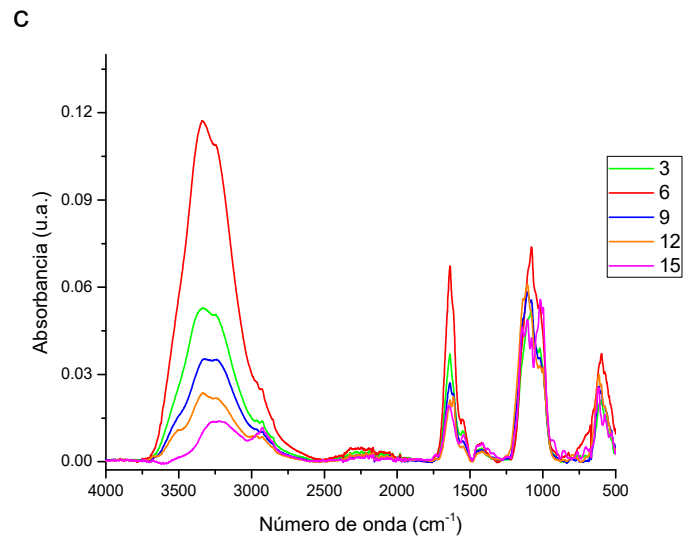
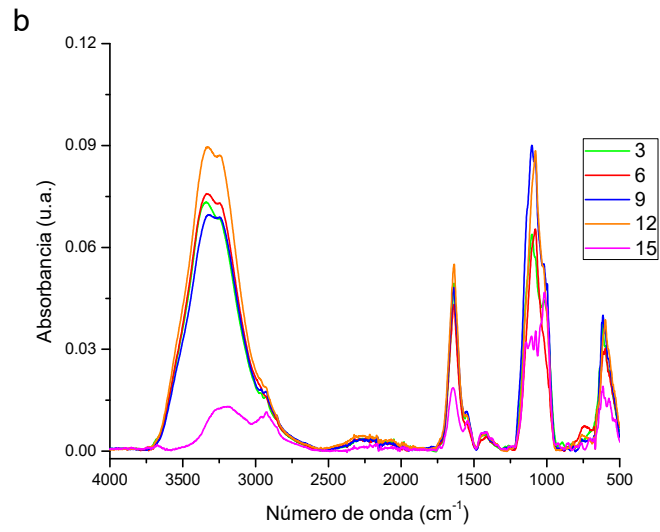


Figura 11. Espectro de FTIR de la microalga *D. tertiolecta* en los diferentes días de muestreo. (a) Grupo control (b) Grupo expuesto a WSF al 12.5 % y (c) Grupo expuesto a WSF al 50 %.

### 6.2.2.2 Monitoreo de la WSF por UV

En los espectros de UV de la WSF de los tratamientos se observa una disminución en la absorbancia del pico máximo (224 nm), a través del tiempo. Para el grupo expuesto a la WSF al 50 %, después de 15 días de exposición, se obtuvo una disminución de un 76% en la absorbancia a 224 nm, comparada con el valor medido para la WSF al 50 % en el tiempo cero (Figura 12). El tratamiento con microalgas para la remoción de la WSF al 50 %, después de 15 días se le denominó como agua tratada. Por otra parte, se observó una disminución del 8% en la absorbancia a 224 nm, a lo largo del experimento desde t= 0 hasta t= 15 d para control no-biológico.

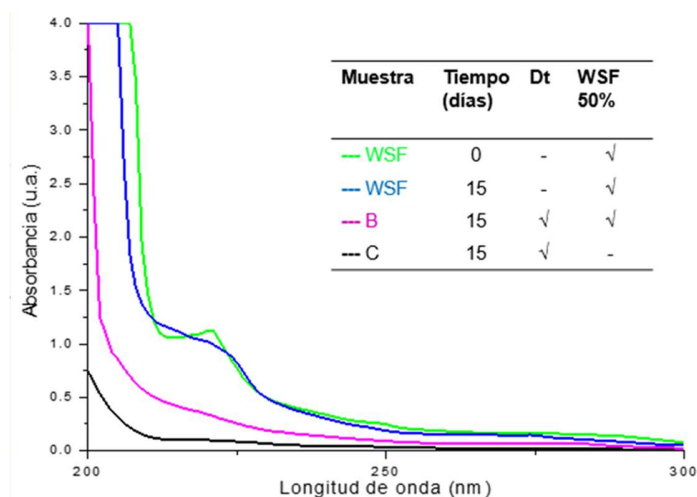
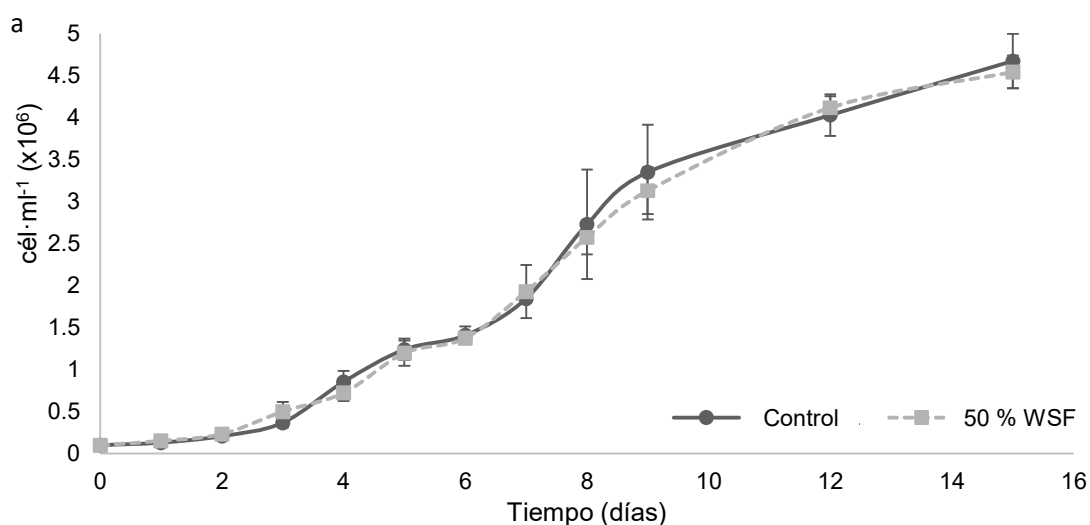


Figura 12. Espectro de UV de las fracciones obtenidas por extracción con hexano del agua de mar libre del paquete celular, para el control (C), tratamiento WSF al 50 % (B) y control no-biológico (WSF).

### 6.3 Bioensayo Definitivo. Evaluación de efectos de la WSF en *Dunaliella tertiolecta*.

#### 6.3.1 Monitoreo del cultivo

No se observó fase lag en las curvas de crecimiento de *D. tertiolecta* cultivada con WSF al 50 % ni en el control (Figura 13a). La fase logarítmica (FL) en todos los medios de cultivo duró cinco días, seguida de una fase de crecimiento lento (FCL) que duró siete días. Posteriormente, se observó una fase estacionaria (FE) hasta el final del cultivo en el día 15. En esta etapa, la densidad máxima de microalgas del grupo expuesto al WSF ( $4.54 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>) no tuvo diferencias significativas con el grupo de control ( $4.67 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>). Las tasas de crecimiento máximas ( $\mu$ ) fueron 1.08 div·día<sup>-1</sup> en el día tres y 1.21 div·día<sup>-1</sup> en el día cuatro para el grupo expuesto y el grupo control, respectivamente (Figura 13b). Se encontró una disminución en la tasa de crecimiento en el día 4 en el grupo expuesto, con una diferencia significativa en comparación con el grupo control.



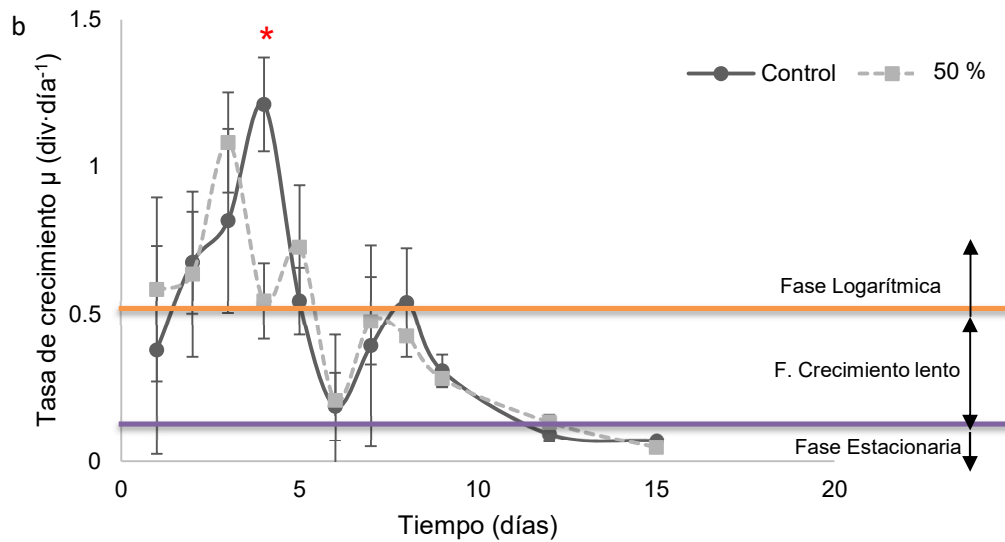
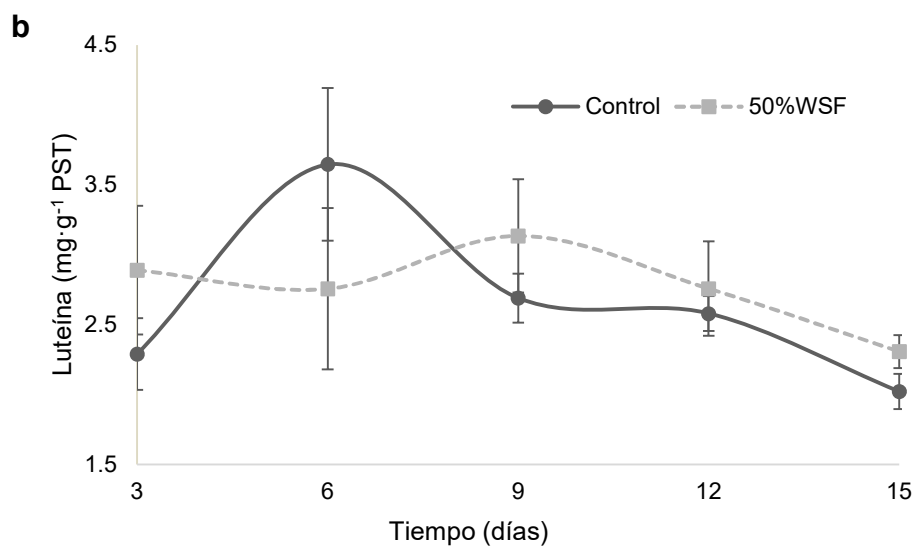
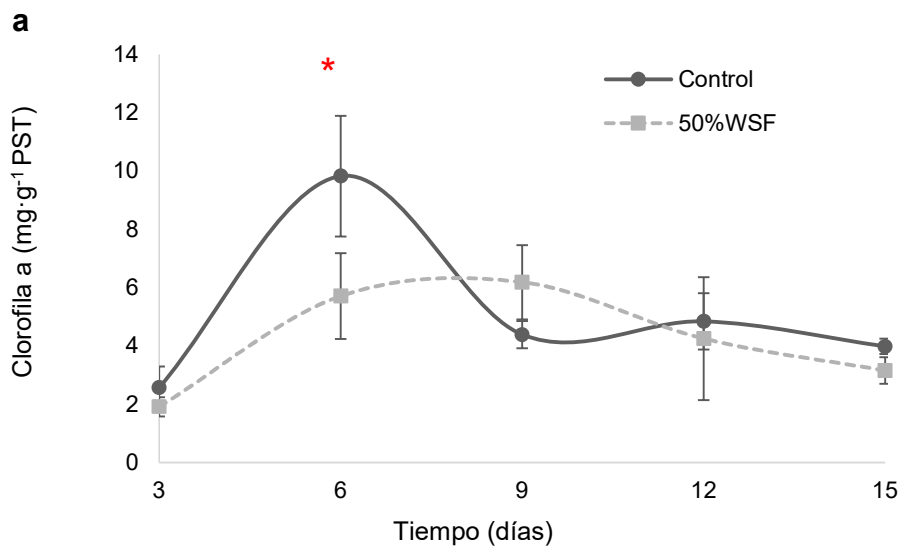


Figura 13. (a) Curva de crecimiento para *Dunaliella tertiolecta*. (b) Tasa de crecimiento  $\mu$  (div·día<sup>-1</sup>) de *D. tertiolecta*. Las barras de error representan el error estándar,  $n = 3$ . (\*) Indica una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

### 6.3.1.1 Pigmentos

El contenido más alto de clorofila *a* se determinó en el grupo control con  $9.83 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  en la FCL temprana (día 6). En el grupo expuesto a la WSF, se observó un aumento en el contenido de clorofila *a* entre el día 3 ( $1.91 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y el día 6 ( $5.71 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), alcanzando un nivel que se mantuvo hasta el final de la prueba (Figura 14a). Se observó una diferencia significativa en el contenido de clorofila *a* entre el control y el grupo expuesto en el día 6, donde el valor de este pigmento en el grupo expuesto fue 42% más bajo que la clorofila *a* en el control.



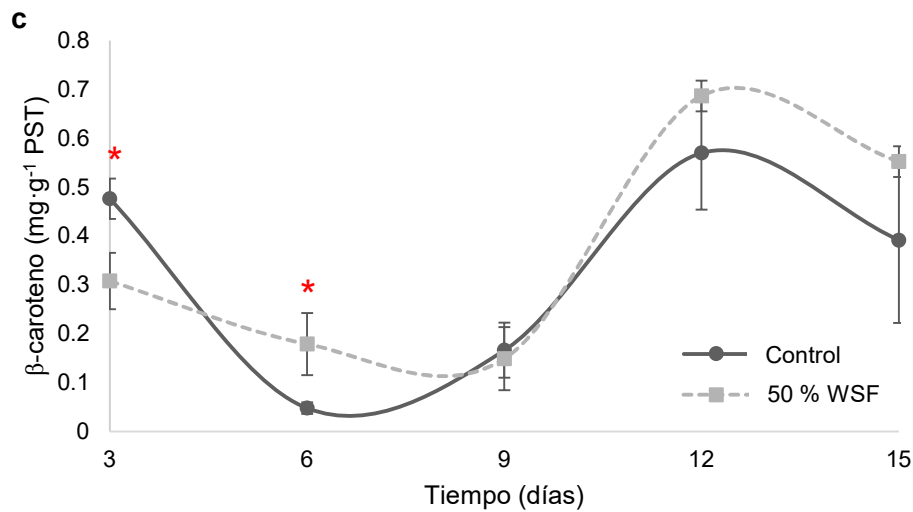


Figura 14. Pigmentos en *Dunaliella tertiolecta* expuestos al 50 % de WSF y grupo control, en medio f/2. (a) Clorofila a, (b) Luteína y (c) β-caroteno expresado en miligramos por gramo de peso seco (mg·g<sup>-1</sup> PST). Las barras de error representan el error estándar, n = 3. (\*) Indica una diferencia significativa entre los grupos (p <0.05).

En la productividad de luteína, no hubo diferencia entre los grupos. El contenido máximo de luteína se encontró en el día 6 para el control con 3.65 mg·g<sup>-1</sup> (Figura 14b). Después de 15 días de exposición a la WSF, la cantidad de luteína detectada fue de 2.31 mg·g<sup>-1</sup>, valor comparable con la concentración encontrada en el grupo control (2.02 mg·g<sup>-1</sup>). La concentración de luteína presentó diferencias significativas entre las diferentes fases de crecimiento en el control (p <0.05). En la FCL, el contenido de luteína fue mayor que en la FL (día 3) y la FE, con una tendencia a disminuir cuando el cultivo envejeció. Este comportamiento no se observó en el grupo

expuesto de *D. tertiolecta*, ya que no se observaron diferencias significativas entre las fases.

El contenido de luteína en el grupo de control presentó una alta correlación (coeficiente de Pearson,  $R=0.915$ ) con el nivel de clorofila *a* en *D. tertiolecta* (Figura 15); por el contrario, para el grupo WSF esta correlación fue baja ( $R=0.561$ ). Para el grupo expuesto, la proporción de un gramo de luteína por gramo de clorofila *a* fue mayor en la FL ( $1.55 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en comparación con el control en la misma fase ( $0.91 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ( $p < 0.1$ ). La proporción luteína:clorofila *a* fue similar a partir de la FCL comparada con la proporción calculada para el grupo de control, con excepción del día 15. La diferencia observada al final del ensayo fue mayor en las microalgas expuestas (0.73) que en las del control (0.5), con un aumento del 43 %.

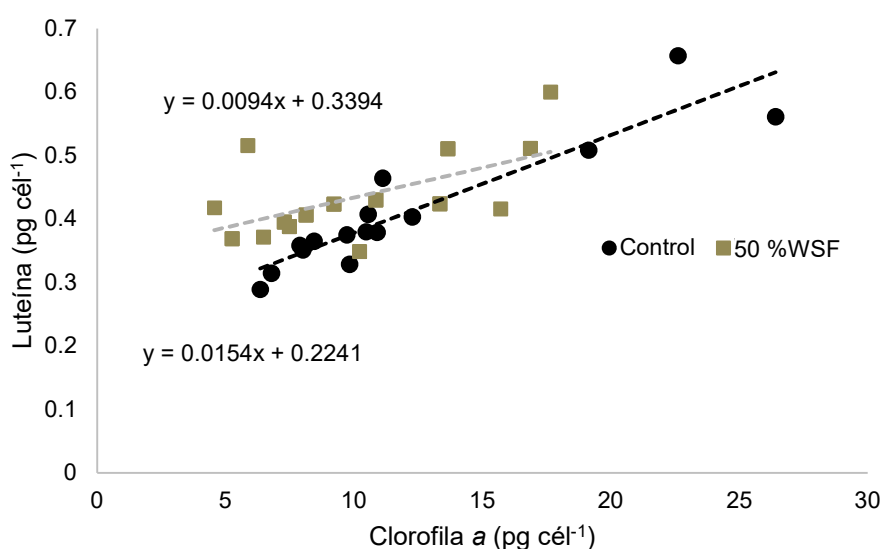


Figura 15. Correlación entre la luteína y la clorofila *a* en *Dunaliella tertiolecta* ( $n=3$ ).  $R=0.561$ , pendiente= $0.1219$  y  $R=0.915$ ,

pendiente=0.2108, para el grupo expuesto (50 % WSF) y el control, respectivamente.

*D. tertiolecta* expuesta a la WSF presentó variaciones en el contenido de  $\beta$ -caroteno. En el día 3, el contenido de  $\beta$ -caroteno en la microalga expuesta a la WSF fue significativamente menor que el valor en el grupo control (Figura 14c). Por otro lado, en el día 6, este pigmento en el grupo expuesto era casi cuatro veces el valor para el control. Se observó un aumento a través de la curva de crecimiento en el contenido de  $\beta$ -caroteno en el cultivo expuesto, alcanzando un contenido máximo en la FE. La proporción de un gramo de  $\beta$ -caroteno por gramo de clorofila *a* para el grupo expuesto ( $0.032 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) fue más de seis veces la proporción encontrada en el grupo de control ( $0.005 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), a principios de FCL. En la FE, no hubo diferencias significativas en la relación  $\beta$ -caroteno:clorofila *a* entre ambos grupos.

#### 6.3.1.2 Fenoles

El contenido fenólico varió de 4.50 a 7.50 mg de GAE  $\text{g}^{-1}$  en *D. tertiolecta* expuesta a la WSF. En este grupo, el máximo de fenoles observado en el día 3 fue mayor que en el control. Sin embargo, en la FE (día 12), la cantidad de fenol para el grupo expuesto fue menor que el valor del grupo control (Figura 16). Los fenoles en *D. tertiolecta* expuestos al WSF presentaron una tendencia a disminuir con el tiempo, mostrando diferencias significativas entre las fases de crecimiento. Esta tendencia no se observó en el grupo control.

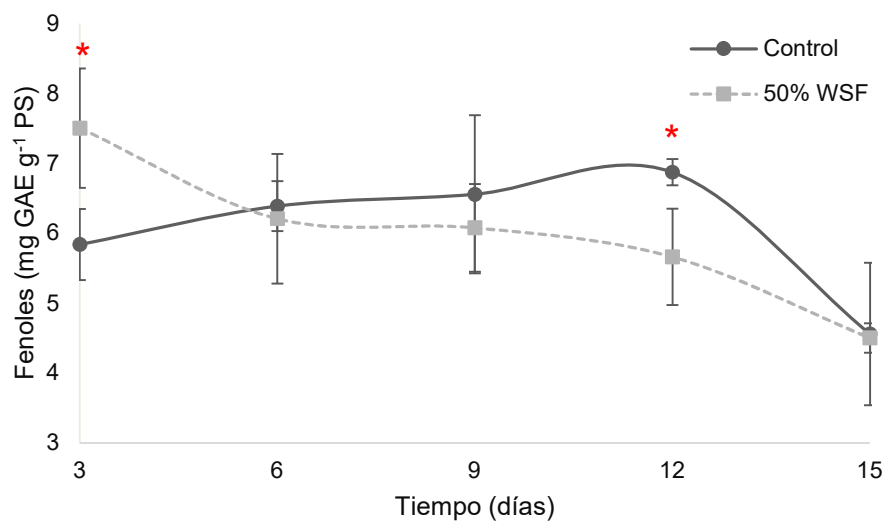


Figura 16. Contenido fenólico total (mg de GAE g<sup>-1</sup> peso seco) en *Dunaliella tertiolecta*, para control y expuesto a WSF al 50 %. Las barras de error representan el error estándar, n=3. (\*) Indica una diferencia estadística significativa (p < 0.05) entre grupos.

### 6.3.1.3 Proteínas

Se observó un máximo de proteína en la FCL temprana (día 6) en el grupo control (Figura 17a); por el contrario, el contenido de proteína en el grupo expuesto no se observaron diferencias significativas a través de la curva de crecimiento. El contenido máximo de proteínas del grupo control, encontrado en el día seis, fue 33% mayor que el valor observado en las microalgas expuestas a WSF.

### 6.3.1.1 Lípidos totales

En las FL y FCL, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en el contenido de lípidos por análisis de sulfo-fosfo-vanilina (SPV) (Figura 17b). Para los

días 12 y 15 del estudio se observó una diferencia de más del 40 % para el grupo expuesto comparado con el control. *D. tertiolecta* bajo estrés aumentó el contenido de lípidos a través del crecimiento. El porcentaje de lípidos totales en las microalgas en el día 15 por análisis SPV se muestran en la tabla VII.

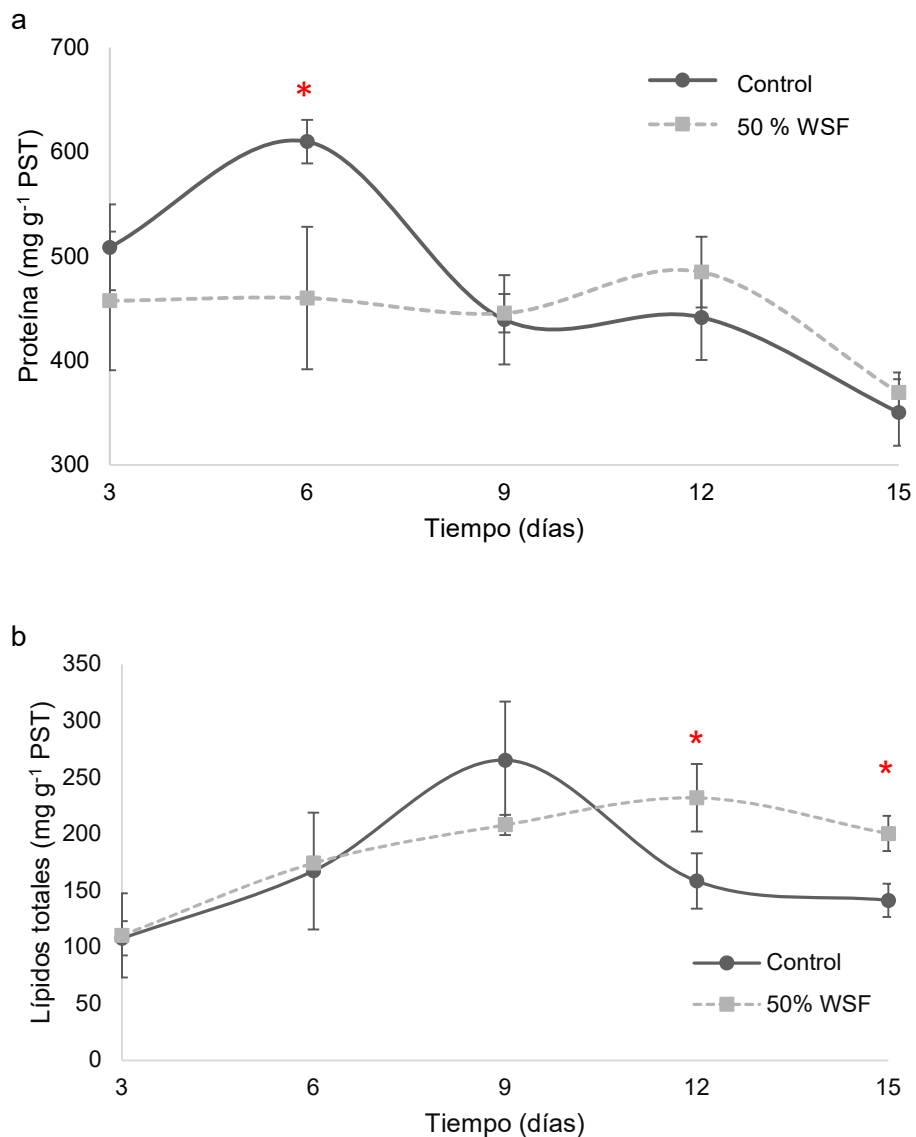


Figura 17. (a) Contenido de proteínas (mg g<sup>-1</sup> PST) y (b) Lípidos totales (mg g<sup>-1</sup> PST) en *Dunaliella tertiolecta*, para el control y expuestos a WSF al 50

% Las barras de error representan el error estándar, n=3. (\*) Indica una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

### 6.3.1.2 Contenido de ácidos grasos (FAME)

No se encontraron variaciones significativas del contenido de FAME de *D. tertiolecta* entre el control y el grupo expuesto, en el día 15. Para ambos, los principales ácidos grasos de *D. tertiolecta* fueron el 16:0 (18 % del total de ácidos grasos) el 18:3 (37 % del total de grasas ácidos). En ambos grupos se identificaron el 80% del total de ácidos grasos. Tanto para el control como para el grupo expuesto, los principales ácidos grasos fueron C18:3, C:16:0, C18:2, C17:0 y C18:1 (37, 18, 10, 5, 6 y 3.5 % del total de ácidos grasos, respectivamente). La cantidad total de lípidos basada en los datos obtenidos del análisis de GC no se observaron diferencias significativas entre los grupos expuestos y de control (Tabla VII).

Tabla VII. Comparación de porcentajes del contenido total de lípidos por peso seco total en *Dunaliella tertiolecta* expuesta a WSF al 50 % y control, analizados por dos métodos, cromatografía de gases (GC) y por sulfofosfo-vanillina (SPV) (media  $\pm$  DE, n=3) en el día 15. (\*) Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los métodos de análisis.

	Contenido de lípidos (GC)	Contenido de lípidos (SPV)	Variación (%)
<b>50 % WSF</b>	11.46 $\pm$ 0,6	20.04 $\pm$ 1.5	42.82*
<b>Control</b>	12.54 $\pm$ 0.9	14.13 $\pm$ 1.4	11.23

### 6.3.1.3 Caracterización de lípidos por FTIR

Se realizó la asignación de las bandas representativas de los espectros FTIR de *D. tertiolecta* para los grupos control y expuestos en el intervalo 4500-450  $\text{cm}^{-1}$ . En ambos grupos se identificaron las bandas lipídicas características: las bandas entre

3050-2800  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 18a, b), 1770-1710  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 19 a, b), y el pico  $\sim 1290 \text{ cm}^{-1}$ , pero se observaron diferencias en las intensidades. Cabe mencionar que para las bandas de lípidos se observan los picos traslapados en los intervalos estudiados. Las bandas se asignaron a grupos funcionales específicos basados en trabajos publicados (Stuart 2004; Laurens y Wolfrum 2011; Grace et al. 2020).

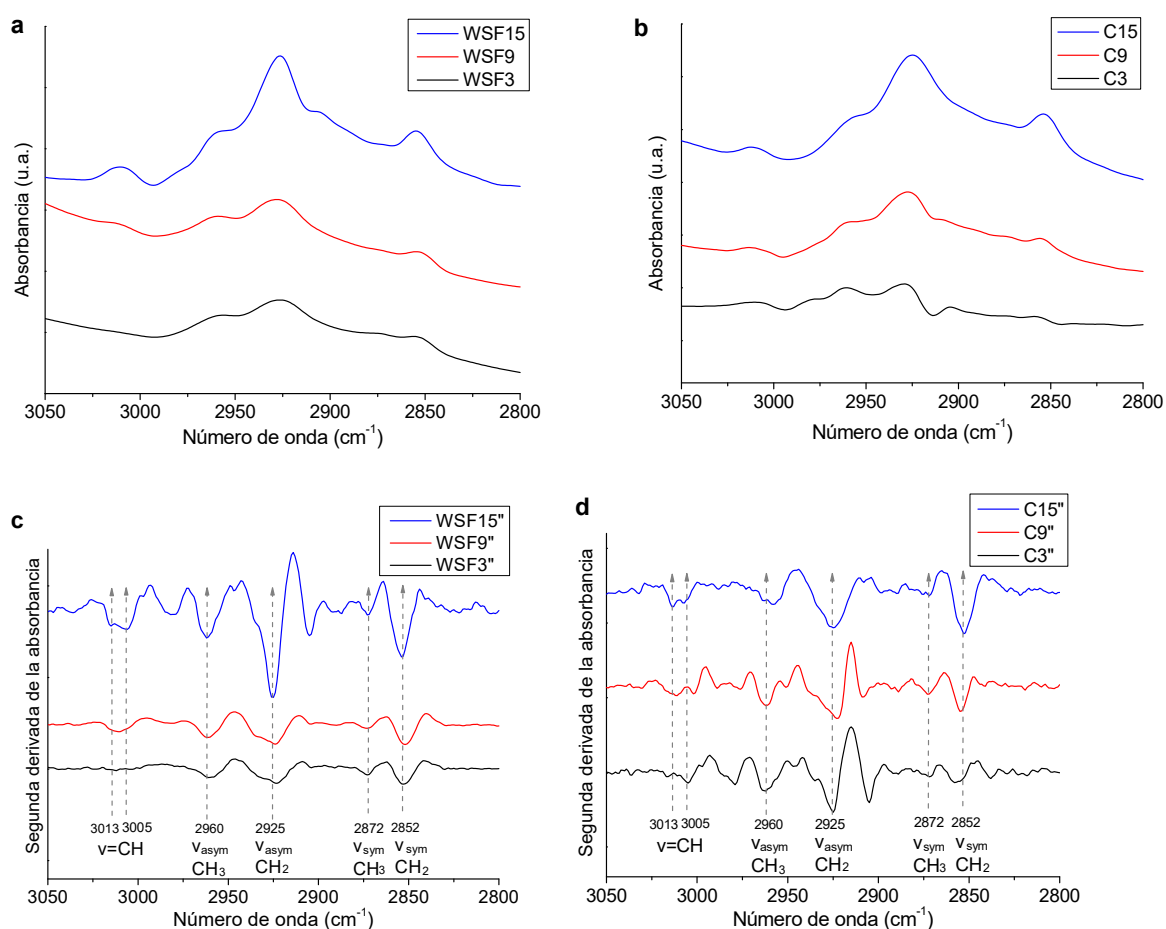


Figura 18. Análisis FTIR de la banda lipídica (3050-2800  $\text{cm}^{-1}$ ) en células de *Dunaliella tertiolecta* los días 3, 9 y 15 durante el ensayo de toxicidad. Espectros de absorción de (a) grupo expuesto y (b) control. Espectro de la segunda derivada de la absorbancia (SDA) de

la banda de lípidos para el (c) grupo expuesto y (d) control (3050-2800  $\text{cm}^{-1}$ ).

El análisis SDA de la banda de vibraciones de estiramiento CH (3050 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ ) de lípidos en *D. tertiolecta* presentó diferencias entre los espectros de las microalgas después de 3, 9 y 15 días de exposición al WSF. En el día tres, la vibración en los enlaces CH=CH exhibe una pequeña señal alrededor de 3010  $\text{cm}^{-1}$ , que se divide en el día 15 en dos picos a  $\sim 3013 \text{ cm}^{-1}$  y  $\sim 3005 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 18c). Se encontró un pico débil a 2925  $\text{cm}^{-1}$  el día tres y nueve. En el día 15 se observó un pico fuerte en el mismo número de onda. Para el grupo control, la intensidad de la banda de  $\text{CH}_2$  a 2925  $\text{cm}^{-1}$  fue similar para todos los espectros (Figura 18d).

Para el intervalo de 1710-1770  $\text{cm}^{-1}$  se encontraron espectros similares para los grupos expuestos y control durante la prueba de toxicidad (Figura 19). En los días 3 y 9, el análisis SDA presentó picos de intensidad pequeños alrededor de  $\sim 1740 \text{ cm}^{-1}$  (estiramientos de carbonilo,  $\nu\text{C}=\text{O}$ ) para los dos grupos. Sin embargo, el día 15, se observó una señal más fuerte en esta banda para ambas condiciones, expuesta, y control (Figura 7c, d). El análisis SDA también reveló un pico débil a 1290  $\text{cm}^{-1}$  en todos los espectros, con un pequeño aumento en la intensidad del día 3 al día 15 para el grupo expuesto. Para el grupo control, el cambio en la intensidad fue inverso al observado al grupo expuesto.

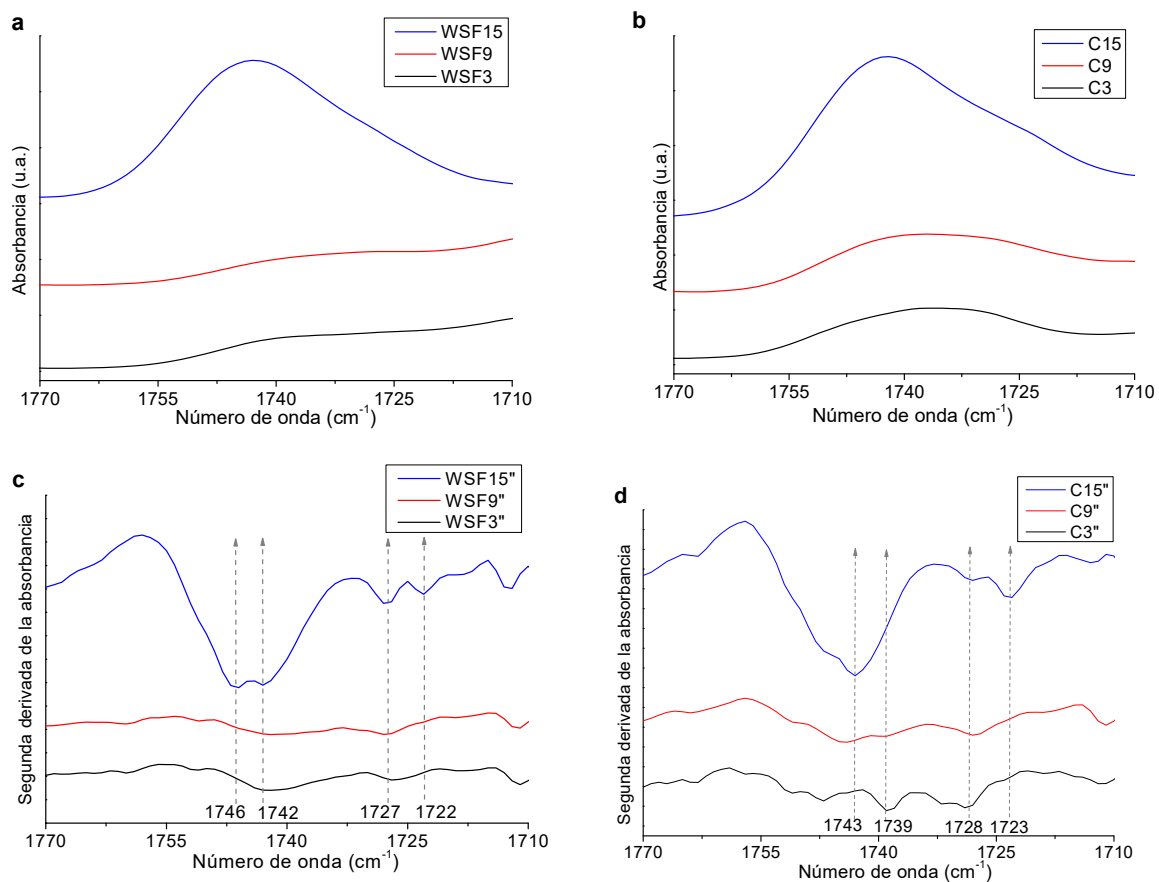


Figura 19. Análisis FTIR de los tramos de carbonilo en banda éster (1760-1710  $\text{cm}^{-1}$ ) en células de *Dunaliella tertiolecta* los días 3, 9 y 15 durante la prueba de toxicidad. Espectros de absorción de (a) grupo expuesto y (b) control. Derivada de segundo orden de la absorbancia (SDA) de la banda de éster (1760-1710  $\text{cm}^{-1}$ ) de (c) grupo expuesto y (d) control.

Según la ecuación (2) y el análisis de SDA, el porcentaje calculado de TAG en el día tres fue casi el 82% del total de lípidos para el grupo expuesto. Se observó un valor más bajo de TAG en el grupo de control, siendo solo el 30% del total de lípidos (Figura 20). El porcentaje de UFA representó 18% y 70% para los grupos expuestos y de control, respectivamente. En el día 9, se observó un porcentaje mínimo de TAG (36%)

para el grupo expuesto, seguido de un aumento al final del experimento en el día 15. Para el grupo control se observa un aumento notable en los TAG en el día 15. El porcentaje de UFA del grupo expuesto fue del 63% y 32% en los días 9 y 15, respectivamente. Una disminución en los porcentajes de UFA del 54% (día 9) al 20% (día 15) se observó en el grupo control.

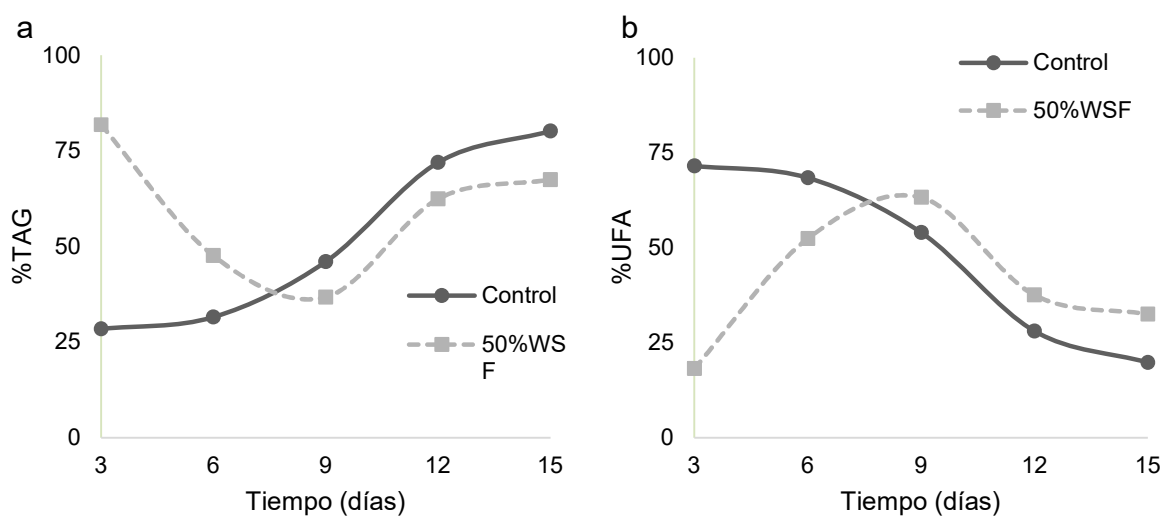


Figura 20. Porcentajes de (a) triacilgliceroles (TAG) y (b) ácidos grasos insaturados (UFA) en *D. tertiolecta* calculados por el análisis de la segunda derivada de absorbancia de los grupos expuestos y control.

La relación TAG: UFA en el grupo expuesto en el día tres fue mayor que la relación encontrada en el grupo control. Para los días 9 y 15, la relación TAG:UFA en el grupo expuesto fue menor que la relación en el grupo de control. Los TAG calculados por el análisis SDA comprendían los ácidos grasos saturados (SFA) y los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). El porcentaje de TAG calculado con el análisis SDA fue del 25% (grupo expuesto) y del 40% (control) más que el porcentaje de SFA + MUFA por el análisis GC (Figura 21).

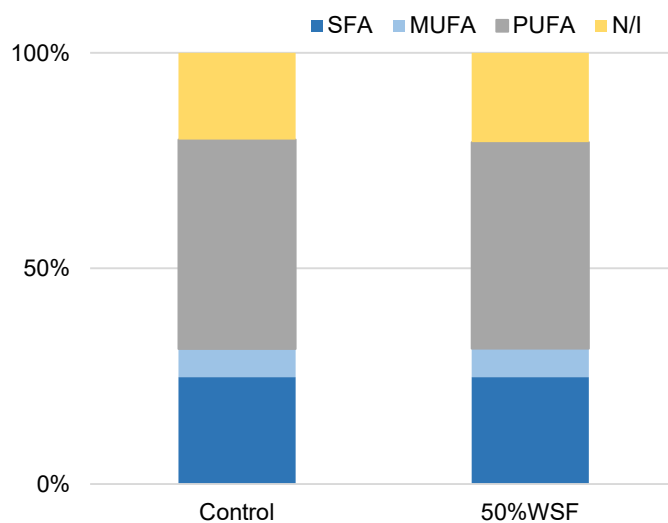


Figura 21. Porcentaje de ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) en *D. tertiolecta*, en el día 15 de crecimiento para el grupo control y expuesto (WSF). N/I=No identificado. Análisis realizado por cromatografía de gases.

### 6.3.2 Cuantificación de la WSF por GC

En los cromatogramas que se obtuvieron del análisis de la WSF de los controles no-biológicos se observa una mayor abundancia de hidrocarburos pesados, superiores a 17 átomos de carbono (tiempo de retención 8 min) (Figura. 22). Para el tiempo 0 de la WSF el cromatograma obtenido es comparable con el cromatograma para el tiempo 15 días. Por otra parte, para la WSF tratada con microalgas se observa una disminución en los compuestos de más de 17 átomos de carbonos. En lo que respecta al área total calculada de los cromatogramas, para los controles no-biológicos en el tiempo cero fue de 40.1, valor similar al área calculada para la WSF día 15 (38.5) con una diferencia de un 4%. Para la WSF tratada, el valor de área total calculado fue de

28.4 para el día 15. Comparando este valor con el control no-biológico en el tiempo cero, se observa una diferencia de un 29 %.

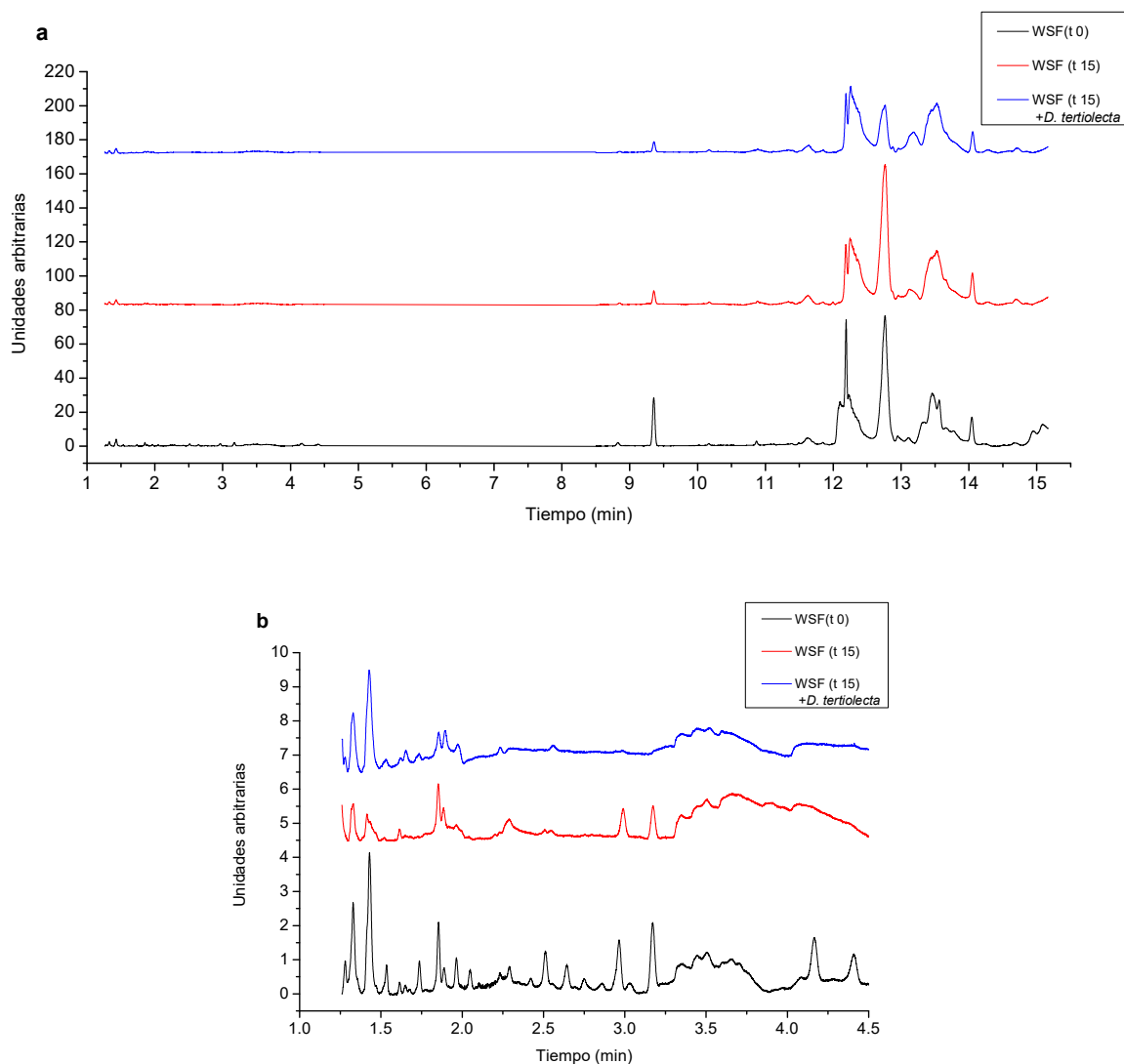


Figura 22. (a) Cromatograma de GC de la fracción hidrosoluble de la mezcla combustóleo/diesel (WSF) a tiempo 0 días, 15 días y 15 días tratada con *D. tertiolecta*. (b) Acercamiento del cromatograma entre el minuto 1 al minuto 4.5.

#### 6.4 Inmovilización de *Dunaliella tertiolecta*

Las perlas de alginato obtenidas tenían forma esférica y eran translúcidas (Tabla VIII). Con el microscopio óptico se observaron diferentes capas de la esfera al variar el enfoque; las microalgas se distribuían uniformemente dentro de la perla. Además, las microalgas no sufrieron cambios morfológicos, todas presentaron color verde característico y forma elíptica propia de *D. tertiolecta* (Foto 10, Anexo).

Tabla VIII. Características de las perlas de alginato con *Dunaliella tertiolecta* inmovilizada.

<b>Características</b>	
<b>Color</b>	Blanco translúcido
<b>Superficie</b>	Lisa
<b>Forma</b>	Esférica
<b>Diámetro (mm)</b>	$5 \pm 0.2$ (n=20)
<b>Densidad inicial (cél-perla<sup>-1</sup>)</b>	17,500
<b>Densidad máxima (cél-perla<sup>-1</sup>)</b>	$1,175,000 \pm 68,053$
<b>Volumen desplazado por perla en agua (μL)</b>	$39 \pm 0.1$ (n=20)
<b>Volumen calculado por perla (μL)</b>	65
<b>Retención de agua (%)</b>	40.0

##### 6.4.1 Monitoreo de cultivos de microalgas inmovilizadas

El crecimiento de la microalga en el medio de cultivo f/2 inmovilizada en alginato de calcio fue eficiente para la obtención de biomasa algal (Foto 11, Anexo). La curva de crecimiento observada en el cultivo es típica de un cultivo por lotes de algas; no presentó fase lag, solo tres fases definidas como logarítmica (2), crecimiento lento (3)

y estacionaria (4) (Figura 23). La fase logarítmica (FL) duró 6 días donde las tasas de crecimiento más altas fueron encontradas para el día 4 ( $0.9 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$ ). Para el día 14 de cultivo se registró el valor de  $1,175 \times 10^3 \text{ cél}\cdot\text{perla}^{-1}$  de alginato en la fase estacionaria (FE). La relación entre número máximo de  $\text{cél}\cdot\text{perla}^{-1}$  (día 14) y el conteo inicial indica que hubo un aumento en la biomasa de 67 veces.

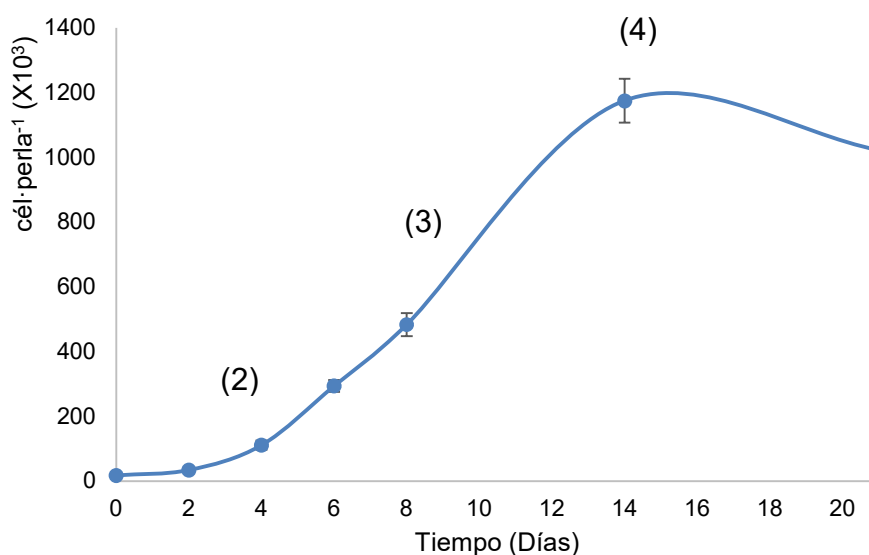


Figura 23. Curva de crecimiento de *Dunaliella tertiolecta* inmovilizada por perlas de alginato de calcio, cultivada en medio f/2 durante 21 días. Fases: (1) lag, (2) logarítmica, (3) crecimiento lento y (4) estacionaria. Los puntos representan el promedio de la medición de tres muestras (n=3). Las barras de error indican SD.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Optimización del método de cultivo de la microalga *Dunaliella tertiolecta*

Las tasas de crecimiento observadas para *D. tertiolecta* en la fase logarítmica (FL), son similares a las reportadas por Fabregas et al. (1986) en cultivos con una concentración de nutrientes comparable en un medio f/2. Por otra parte, Kim et al. (2017) en una cepa tipo silvestre de *D. tertiolecta*, obtuvo una densidad más alta ( $6 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup>) cultivando en matraces de 500 mL, con una intensidad lumínica menor que la utilizada en este ensayo. Por lo anterior, podría decirse que, en los cultivos analizados en el presente trabajo, el uso de un recipiente de mayor volumen (15 L) pudo influir en la menor densidad celular observada. Es decir, el mayor diámetro del recipiente de cultivo y el aumento de la biomasa en la fase estacionaria causarían que la penetración de la luz no sea uniforme, produciéndose autosombreado entre las células, impactando el crecimiento celular.

En el presente trabajo *D. tertiolecta* presentó una variación en el contenido de pigmentos durante sus diferentes fases de crecimiento. De acuerdo con Griffiths et al. (2011), el aumento en el contenido de pigmentos por célula puede afectar las lecturas de densidad óptica, por ende, causar una sobreestimación de la biomasa de las microalgas monitoreada por esta magnitud física. Para resolver esta problemática, estos autores recomiendan la generación de una curva estándar a lo largo de todo el crecimiento o una curva para cada fase de desarrollo de la microalga. A pesar de la variación observada en el contenido de pigmentos entre las fases de crecimiento en *D. tertiolecta*, se observa una alta correlación entre el conteo celular y la densidad

óptica. Para la fase logarítmica exclusivamente, el valor de coeficiente (R) fue de 99%, valor similar al coeficiente de la curva de crecimiento completa (R = 98%), lo que indica que ambas formas de medir son confiables para monitorear el crecimiento de esta microalga.

En la fase logarítmica (FL) del crecimiento no se observó una acumulación de los pigmentos en las microalgas, hecho que puede estar asociado a que el cambio neto en el contenido de pigmentos está en equilibrio entre la acumulación por síntesis y dilución mediante división celular ( $\mu > 0.5$ ). Este comportamiento ha sido reportado por Lee & Ding (1994) y Seyfabadi et al. (2011) quienes mencionan que los pigmentos no se acumulaban por célula como consecuencia de las altas tasas de crecimiento observadas. Griffiths et al. (2011) indican que, en general, el contenido de pigmentos varía con la edad de cultivo y las condiciones ambientales de los cultivos de microalga. Por otra parte, es recomendable que la comparación del contenido de pigmentos se lleve a cabo con cautela, ya que se ha reportado que el contenido y la composición de los carotenoides pueden ser también influenciados por las condiciones de cultivo (disponibilidad de nutrientes, pH, intensidad de la luz, entre otros) (Goiris et al., 2012; Richmond & Hu, 2013).

Para la clorofila *a* el valor reportado en la fase logarítmica fue similar al contenido de este pigmento en el estudio de Geider et al. (1998) para *D. tertiolecta*. Por el contrario, Abalde et al. (1991) reportaron un contenido de clorofila *a* inferior al obtenido en el presente estudio ( $4.63 \text{ pg} \cdot \text{cél}^{-1}$ ), al final de la FL. Por otra parte, los valores de luteína reportados por Kim et al. (2013) fueron significativamente más altos que los

encontrados en este estudio para la FL y para la FE, con valores entre 7.7-16.5 mg de luteína por gramo de biomasa. Ahmed et al. (2014) obtuvieron, para *D. tertiolecta*, 0.207 mg de luteína por gramo de biomasa en la fase logarítmica, un valor similar al encontrado en el presente estudio durante la misma fase de crecimiento (0.29 mg·g<sup>-1</sup>).

Se ha reportado que la acumulación de luteína se activa como una adaptación impulsada por el estrés, dada su función fotoprotectora en las microalgas (Fu et al., 2014; Jahns & Holzwarth, 2012). Un factor estresante para *D. tertiolecta* en este estudio pudo ser el aumento en los valores de pH en el medio de cultivo, ya que sobrepasaba el intervalo de 7.6-9.4 de pH, establecido para el crecimiento de esta microalga (Goldman et al., 1982). Por el contrario, cuando el pH del cultivo estaba en el intervalo óptimo para el crecimiento de *D. tertiolecta*, la luteína disminuía, lo cual ocurrió en la fase estacionaria. Esto sugiere que este pigmento está cumpliendo su papel fotoprotector en valores alcalinos (pH>9). Los resultados de este experimento permiten visualizar la importancia del pH en el cultivo, para optimizar el crecimiento para *D. tertiolecta*, considerando también la variación en el contenido de luteína como un indicador de las condiciones de esta microalga.

En las fases de crecimiento lento y estacionaria, la alta correlación (96%) encontrada entre el contenido de clorofila *a* y luteína, sugiere que la síntesis de luteína en *D. tertiolecta* fue regulada de la misma manera que la síntesis de clorofila *a*. Según Jahns y Holzwarth (2012), esto podría explicarse porque la luteína tiene un papel crucial en

la desactivación del triplete excitado de la clorofila *a*, por lo que un alto nivel de luteína asegura la fotoprotección de la clorofila *a*.

Se sabe que la mayoría de las especies de *Dunaliella* contienen una cantidad menor de  $\beta$ -caroteno que *D. bardawil* y *D. salina*, aproximadamente el 0.3 % de su peso seco (Jiménez & Pick, 1994). Para *D. tertiolecta*, el  $\beta$ -caroteno solo se observó en la FL, en concentraciones bajas. Ahmed et al. (2014) reportaron valores de 18% de  $\beta$ -caroteno de peso seco total en la fase de crecimiento exponencial tardío. Estos valores fueron superiores a los valores encontrados en este estudio en esta fase. El  $\beta$ -caroteno tiene un papel fotoprotector y antioxidante en las microalgas (Geider et al., 1998; Phadwal & Singh, 2003), por lo que la ausencia de  $\beta$ -caroteno en la fase de crecimiento lento y estacionaria sugiere que este pigmento accesorio ya no era necesario para la célula, ya que es coincidente con la disminución de la clorofila *a* y valores de pH cercanos al óptimo de *D. tertiolecta*.

La variación en el contenido de fenoles ha sido reportada como una respuesta o mecanismo de defensa contra el exceso de oxígeno producido durante el proceso de fotosíntesis (Gomez et al., 2016). Para la FCL, Gómez et al. (2016) reportaron 1.54 mg de GAE g<sup>-1</sup> de peso seco en *D. tertiolecta*, valor fuera del intervalo de 3.01 a 3.35 mg de GAE g<sup>-1</sup> de peso seco encontrado en el presente trabajo. Por otra parte, Ahmed et al. (2014) observaron que al usar acetato de etilo como disolvente de extracción para *D. tertiolecta*, el contenido fenólico era doce veces menor que el obtenido en este estudio. Las diferencias en el contenido de fenoles se relacionan con los métodos de extracción (Goiris et al., 2012). Gomez et al. (2016) utilizaron etanol absoluto como

disolvente de extracción, lo que difiere con lo recomendado por Goiris et al. (2012), de utilizar una mezcla de etanol:agua (3/1 v/v), técnica utilizada en el presente trabajo. En conjunto, esto sugiere que la utilización de la mezcla de etanol:agua (3/1 v/v), es más eficiente ya que posee una polaridad adecuada para la extracción de los compuestos fenólicos de *D. tertiolecta*.

El incremento del contenido fenólico en *D. tertiolecta* en el presente estudio podría estar relacionado con el envejecimiento de la microalga, ya que se observó la tendencia a un aumento constante en el contenido fenólico por célula a través del tiempo. Sin embargo, varios factores deben de tomarse en cuenta al comparar con otros autores, ya que los compuestos antioxidantes están influenciados por las condiciones de crecimiento de las microalgas, como la disponibilidad de nutrientes y la temperatura, entre otros (Maadane et al., 2015). El análisis estadístico indica que el 89.48% de la varianza del contenido fenólico podría explicarse conjuntamente por el pH y el crecimiento. La regresión múltiple con análisis de varianza indicó una pequeña contribución (1.66%) correspondía de tiempo de crecimiento, pero una gran contribución (87.81%) del pH del cultivo, lo que confirma que la acumulación de fenoles está más relacionada con el pH del cultivo que con las fases de crecimiento. Esto concuerda con lo establecido por Goldman et al. (1982), quienes describen a *D. tertiolecta* como una microalga sensible al pH. Ismaiel et al. (2016) informaron que el mayor contenido de fenoles se produce en el pH óptimo para el crecimiento de otras especies de algas verdes. El pH óptimo para el crecimiento de *D. tertiolecta* se ha reportado entre 7.6 y 9.4 (Goldman et al., 1982). Estas dos afirmaciones concuerdan

con lo encontrado en este experimento, ya que el contenido fenólico más alto se encontró en la fase estacionaria donde los valores de pH estaban en el intervalo óptimo. Este hecho sugiere que el pH está actuando como un estresante y *D. tertiolecta* excreta fenoles al medio como un mecanismo de protección. Este comportamiento ha sido reportado por López et al. (2015), para *D. tertiolecta* bajo estrés por metales, los autores señalan que la microalga excreta fenoles al medio, en lugar de acumularlos dentro de la célula.

## 7.2 Bioensayo Preliminar - Exposición de *Dunaliella tertiolecta* a la WSF de combustóleo/diesel.

Existe evidencia de que el petróleo crudo, que es una mezcla compleja de hidrocarburos, es tóxico para las microalgas (Pereira et al., 2012). En este bioensayo se observó que la *D. tertiolecta* expuesta a la WSF al 50 % aumentó su biomasa en la fase logarítmica (FL) y en la fase de crecimiento lento (FCL) demostrando así, la capacidad de sobrevivir y la estimulación del crecimiento de la microalga expuesta a la WSF al 50 %. Esto ha sido reportado para *D. tertiolecta* expuesta a la WSF del petróleo crudo en la FL (Siron et al., 1991). Por otra parte, la concentración de WSF al 12.5 % no tuvo efecto sobre el crecimiento de las microalgas. Esto concuerda con lo reportado para *D. tertiolecta* por Bretherton et al. (2018) quienes observaron que el crecimiento no se afectó cuando la microalga fue expuesta a la WSF del petróleo y sus derivados.

En los espectros de FTIR de la biomasa de *D. tertiolecta* se observaron diferencias entre los tres tratamientos, como la variación en las intensidades de absorbancia,

según la edad del cultivo y la presencia de WSF. A su vez, la definición de los picos encontrados varió, llegando a presentarse como hombros. Dentro de estas variaciones se destacaron los cambios observados en las bandas de lípidos. Esto concuerda con lo reportado por Morales-Loo et al. (1990) sobre la acumulación lípidos por *D. tertiolecta* al ser expuesta a la WSF, indicando que esta especie acumula esteroides e hidrocarburos. El FTIR como método de detección rápida es útil para investigar las modificaciones moleculares específicas en organismos causados por contaminantes como lo reportaron los autores Mecozzi & Oteri (2011) para *D. tertiolecta* expuesta a arsénico. Por lo que, el uso del FTIR puede permitir dar seguimiento a los lípidos en *D. tertiolecta* expuesta a la WSF, siendo una herramienta para comprender mejor la respuesta de esta microalga ante la WSF.

Con el monitoreo de la WSF por UV, a pesar de la moderada solubilidad del combustóleo, se pudo observar la señal característica de los hidrocarburos. Al compararlos con la literatura, se encontró que los espectros obtenidos coinciden en el pico de máxima absorción con los espectros presentados por otros autores para el combustóleo (Levy, 1972; Neff & Anderson, 1975). En la mezcla de combustóleo y diesel preparada para simular la mezcla de combustible usada en buques oceánicos (Draffin, 2008), también se observaron señales por UV. Por ser ambos derivados del petróleo, son sustancias muy poco polares (García-Cruz & Aguirre-Macedo, 2014) altamente miscibles entre sí. La densidad de esta mezcla de combustibles ( $860.3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) fue menor que la densidad del agua de mar ( $1027 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ), lo que permitió una

separación de las fases aceite y agua durante la solubilización de los compuestos moderadamente solubles.

El seguimiento de la WSF por UV permitió dar un estimado inicial de la remoción de la WSF a los 15 días de exponer a la microalga al contaminante. El porcentaje de hidrocarburos remanentes fue de 24 %, es decir, que un 76 % de los compuestos se pierden del medio durante el experimento, lo que sugiere que la microalga incorpora la WSF. En los controles no-biológicos el porcentaje de pérdida de la WSF fue de un 8 %, lo que indica una pérdida por adsorción en las superficies de los tubos y por volatilización de la WSF durante el experimento. Por lo anterior, se infiere que la remoción de la WSF por *D. tertiolecta* fue de un 68 % después de 15 días de exposición.

### **7.3 Bioensayo Definitivo. Evaluación de efectos de la WSF en *Dunaliella tertiolecta*.**

Se ha reportado que la WSF puede afectar el crecimiento de las microalgas marinas. Morales-Loo y Goutx (1990) describieron una disminución en la tasa de crecimiento de *D. tertiolecta* al ser expuesta a la WSF. Los datos del presente trabajo concuerdan con lo observado por estos autores, ya que en el grupo expuesto a la WSF la tasa de crecimiento disminuyó (día 4), indicando que *D. tertiolecta* se afectó por WSF en la fase logarítmica. Por el contrario, Bretherton et al. (2018) no reportaron variaciones en la tasa de crecimiento por la presencia de la fracción hidrosoluble del petróleo. Bretherton et al. (2020) clasifican a *D. tertiolecta* como "resistente" entre 15 especies fitoplanctónicas basadas en la nula variación de la tasa de crecimiento y por

la respuesta de los parámetros fotosintéticos a la WSF. Los datos de crecimiento indican una respuesta de *D. tertiolecta* a la WSF en una primera etapa (disminución de  $\mu$  en el día 4) y la capacidad de recuperación, alcanzando más de  $4 \times 10^6$  cél·mL<sup>-1</sup> en la fase estacionaria, un valor similar al del grupo de control.

Un efecto nocivo de la WSF del petróleo y sus derivados es la disminución del contenido de clorofila *a* en varias microalgas (Morales-Loo & Goutx, 1990). De acuerdo con estos autores, en el presente trabajo se observó en el día 6 una disminución de la clorofila *a* en *D. tertiolecta* expuesta a la WSF, cuando se compara con el control. En el grupo control, desde el día 3 hasta el día 6, se observó un incremento (282 %) en el contenido de clorofila *a*, mientras que las microalgas expuestas, este aumento fue solo de un 198 % en esta fase. Desde el día 9 de crecimiento, *D. tertiolecta*, en presencia de la WSF, mantuvo los niveles de clorofila sin diferencias significativas con respecto al control. De la misma manera que para la tasa de crecimiento, la variación en la clorofila *a* indicó una respuesta inicial adversa para luego recuperarse en el tiempo.

Bretherton et al. (2018) reportan a *D. tertiolecta* como una microalga resistente al petróleo considerando la duración de la fase lag, las tasas de crecimiento, las variaciones en la clorofila *a*, y los parámetros fotosintéticos. En estudios previos, realizados con *D. tertiolecta*, se reporta que la WSF ocasiona una posible interrupción de los mecanismos de biosíntesis necesarios para un aparato fotosintético funcional (Morales-Loo & Goutx, 1990; Siron et al., 1991). Como consecuencia, se ha observado una disminución en la eficiencia fotosintética en *D. tertiolecta* después de una hora de exposición a diluciones de petróleo (Carrera-Martinez et al. 2010). Si se

visualiza la respuesta de la microalga como un conjunto de eventos metabólicos con el objetivo de enfrentar a la WSF, un efecto beneficioso podría ser la disminución de la clorofila *a* para ralentizar la fotosíntesis y así, minimizar el estrés oxidativo.

Con respecto a los pigmentos accesorios, la disminución de clorofila *a* en las microalgas en el día seis fue simultánea a un aumento en  $\beta$ -caroteno. En el día 3, el contenido de  $\beta$ -caroteno en *D. tertiolecta* expuesta era bajo comparado con el valor del control. Por el contrario, el día 6, el grupo expuesto superó el grupo de control. Después del día 9, el contenido de  $\beta$ -caroteno aumentó hacia el último día del ensayo (día 15) para ambos grupos. Comparando la relación  $\beta$ -caroteno:clorofila *a*, en el sexto día vemos que en el grupo expuesto la relación (0.031) fue 553 % mayor que el control (0.004). Este aumento da al grupo expuesto ventajas sobre el control en la desactivación del oxígeno singlete generado en la fotosíntesis, para así proteger a la célula (Tammam et al., 2013). En cuanto a la luteína, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos durante los días de muestreo. El papel de la luteína en *Dunaliella* no se ha explicado por completo, pero las funciones de este pigmento en plantas superiores han sido señaladas como la estabilización estructural de las proteínas del complejo antena, la recolección de luz y como desactivadora del triplete de clorofila (Jahns & Holzwarth, 2012). Cabe destacar el aumento limitado de la luteína en comparación con el  $\beta$ -caroteno en las microalgas expuestas. La luteína y el  $\beta$ -caroteno tienen como precursor al licopeno, pigmento encontrado en bajas concentraciones, la síntesis de éste puede derivar en  $\beta$ -caroteno o en  $\alpha$ -caroteno, el precursor de la luteína (Takaichi, 2011). Si la síntesis se inclina hacia la producción de

$\beta$ -caroteno, se ralentizaría la producción de luteína. En el control, hubo una variación en el contenido de luteína alcanzando un máximo en el día 6, lo que no se observó para las microalgas expuestas. Esto en conjunto con el aumento de  $\beta$ -caroteno en el día 6, sugiere que la WSF está ocasionando una mayor producción de  $\beta$ -caroteno a expensas de la síntesis de luteína. Por otro lado, se encontró una alta correlación (91.5 %) entre la luteína y la clorofila en el grupo control, mostrando que en *D. tertiolecta* en condiciones normales, la luteína cambia de la misma manera que la clorofila *a*. Contrariamente, para la microalga expuesta a la WSF se encontró una correlación baja (56.1 %), lo que sugiere que pierden la sincronización en los mecanismos de regulación de la producción de clorofila y luteína.

Por otra parte, el contenido máximo de fenoles en *D. tertiolecta* expuesta, se encontró al tercer día, con un 29 % más que los fenoles del grupo de control. A partir del sexto día se observó una disminución constante en el crecimiento del cultivo. Por otro lado, las células del control presentaron el valor más alto de fenoles en el día 12 ( $p < 0.05$ ), en comparación con el grupo expuesto. Cabe destacar que el contenido máximo de fenoles en *D. tertiolecta* expuesta ocurrió antes que el incremento de  $\beta$ -caroteno y la disminución de la clorofila *a* en el día 6. Sobre esta base, se puede señalar el incremento de los fenoles como una respuesta coordinada con la variación del  $\beta$ -caroteno en *D. tertiolecta* para protegerse del estrés oxidativo causado por la WSF. De esta manera, los fenoles estarían en una primera línea de defensa contra las especies reactivas del oxígeno (ROS), seguido por el  $\beta$ -caroteno, que contribuye a disipar el exceso de energía generada por la fotosíntesis. La disminución de los fenoles en el

grupo expuesto desde el tercer día hasta el día 12 sugiere una posible excreción de los fenoles al medio por parte de *D. tertiolecta*. Considerando esta capacidad de la microalga como una herramienta de defensa (López et al. 2015), los cambios bioquímicos en *D. tertiolecta* expuesta podrían indicar una estrategia de autoprotección a la WSF, en los primeros 12 días. De lo contrario, *D. tertiolecta* tendría que sufrir transformaciones genómicas para adaptarse al entorno contaminado, como observaron Carrera-Martinez et al. (2010) y Romero-Lopez et al. (2012).

Coincidente con la disminución de la clorofila *a*, el contenido de proteínas en las microalgas expuestas fue bajo en comparación con el valor del control. A partir del día nueve no hubo diferencia significativa entre el control y el grupo expuesto. La disminución en las proteínas puede estar asociado a la hidrólisis proteica, ya que se ha relacionado a los productos de la hidrolisis como antioxidantes contra la peroxidación de lípidos o ácidos grasos (Kang et al. 2011). De acuerdo con Kang et al. (2011), la diferencia en la proteína entre los grupos puede explicarse como el refuerzo de la actividad antioxidante que necesita *D. tertiolecta* para enfrentar los efectos de la WSF. Si ocurriera la hidrólisis de proteína, los aminoácidos y los péptidos en conjunto con los fenoles y el  $\beta$ -caroteno, estarían neutralizando las ROS generadas por la WSF.

Por otra parte, el bajo contenido de proteínas en las células expuestas también se puede explicar como consecuencia del deterioro de la biosíntesis de proteínas. Esta vía metabólica se ha reportado como un posible blanco de la toxicidad de la WSF (El-Sheekh et al., 2000; Parab et al., 2008). Young y Beardall (2003) reportaron para *D. tertiolecta*, bajo privación de nutrientes, que la inhibición de la síntesis de proteínas fue

simultánea a la disminución de la clorofila *a*, lo que sugiere que ambos efectos son paralelos, ya que la disminución de la síntesis proteica afecta directamente la producción de la clorofila.

Marwood et al. (2001) reportaron como efecto de la exposición a la WSF de creosota, un derivado del petróleo, la destrucción de la clorofila, lo que puede preceder al daño de las proteínas del aparato fotosintético. La disminución simultánea de la clorofila y la proteína en las células expuestas, en el día 6, concuerdan con lo reportado previamente, lo que podría indicar que el efecto de la WSF sobre la síntesis proteica origina una disminución en la producción de la clorofila en *D. tertiolecta*. Después de nueve días de exposición hasta al final del estudio, los valores de las proteínas y los pigmentos se igualan a los valores del control, sugiriendo que *D. tertiolecta* expuesta a la WSF tiene la capacidad de aclimatarse y recuperarse del efecto adverso causado por la WSF.

Otra respuesta de las microalgas, originada por la exposición a la WSF, fue la acumulación de lípidos. En los días 12 y 15, los lípidos totales en las células expuestas eran más del 40 % que los lípidos en el control. La acumulación de lípidos ha sido relacionada con una respuesta ante el estrés oxidativo originado por un incremento en las ROS en algunas microalgas (Chu et al., 2020; Yilancioglu et al., 2014). Para *D. tertiolecta*, Yilancioglu et al. (2014) reportaron que al inducir el estrés oxidativo en las células utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las ROS se acumularon y el contenido de lípidos aumentó en la microalga. De acuerdo con lo establecido por estos autores, si la WSF provocara

estrés oxidativo en la microalga y, por ende, una acumulación de ROS, esto podría causar la acumulación de lípidos observada los días 12 y 15 en *D. tertiolecta*.

Además de los lípidos totales, se examinó el perfil de ácidos grasos en *D. tertiolecta* al final del ensayo (día 15), determinando que el perfil y el contenido de ácido grasos no presentó diferencias entre ambos grupos. Varios autores reportaron perfiles similares de ácidos grasos para *D. tertiolecta* (S. Y. Lee et al., 2014; Volkman et al., 1989). Los resultados obtenidos coinciden con los hallazgos de Siron et al. (1986) quienes reportaron que la composición de ácidos grasos en esta microalga no se afectó por la WSF del petróleo. El porcentaje de ácidos grasos representó el 89 % del total de lípidos en el grupo control, mientras que para el grupo expuesto los ácidos grasos de *D. tertiolecta* solo eran el 57 % del total de lípidos. Esto indica que los ácidos grasos no explican el exceso de lípidos en el grupo expuesto, sino que otros compuestos lipídicos pueden ser los contribuyentes al incremento observado, estos podrían ser esteroides, hidrocarburos, triacilglicéridos y lípidos neutros, compuestos que han sido reportados como acumulables por *D. tertiolecta* (Morales-Loo & Goutx, 1990; Solovchenko, 2012).

Por otro lado, el exceso de lípidos encontrado en las microalgas expuesta puede deberse al método de cuantificación, ya que la SPV reacciona con los dobles enlaces de carbono de las cadenas insaturadas (Anschau et al., 2017). Es decir, que las cadenas insaturadas de los hidrocarburos del petróleo también darían señal de lípidos, llevando a una sobreestimación. Se sabe que algunas microalgas pueden acumular hidrocarburos del petróleo (Jiang et al., 2010; Shishlyannikov et al., 2017), por lo que

si *D. tertiolecta* está incorporando los hidrocarburos de la WSF, esto puede causar una sobreestimación de los lípidos cuantificados por el método SPV.

Por otro lado, el aumento de la señal =C-H revelada por el análisis de SDA, y TAG:UFA para el grupo expuesto en el día 15, puede ser la base para confirmar el efecto WSF sobre los lípidos en *D. tertiolecta*. Las señales aumentadas pueden atribuirse a la absorción de las cadenas de acilo de los hidrocarburos del petróleo y la sobreestimación de los lípidos por SPV reafirman que la microalga incorporó los hidrocarburos de la WSF. La capacidad de las microalgas para incorporar hidrocarburos durante la exposición al petróleo crudo y sus derivados ha sido reportada por varios autores, lo que es congruente con los hallazgos del presente estudio (Morales-Loo & Goutx, 1990; Shishlyannikov et al., 2017; X. Wang et al., 2002; Wolfe et al., 1998).

Utilizando el análisis SDA, en el día 3, se observó una diferencia entre los grupos en TAG donde el grupo expuesto presentaba el doble de TAG que el control. Para los días 9 y 12 no hubo diferencia para los valores de TAG y UFA entre los grupos. En el día 15, el nivel de TAG del grupo de control superaba al de las microalgas expuestas. En el tercer día, las células expuestas presentaron el nivel más bajo de UFA, seguido de un aumento progresivo en los días 6 y 9, superando el control. Estos cambios observados, sugieren que hubo ajustes del contenido TAG y UFA a través del crecimiento. El perfil de ácidos grasos solo se realizó el día 15; por lo tanto, no fue posible determinar cambios los cambios UFA y TAG como parte de la respuesta inicial a WSF. Se ha reportado para *D. tertiolecta* un aumento de TAG relacionado con la

disminución la tasa de asimilación del carbono fotosintético (Pick & Avidan, 2017), lo que podría ocurrir en las microalgas expuesta en los días 3 y 6 donde se observa un porcentaje elevado de TAG.

Mediante monitoreo de la WSF por GC, se observó una disminución del 29 % de los compuestos, es decir, que el porcentaje de hidrocarburos remanentes fue de 71 %, confirmando que la microalga incorpora la WSF del medio durante el experimento. En los controles no-biológicos la disminución de la WSF fue de un 4 %, lo que indica una pérdida por factores abióticos, como la adsorción en la superficie de las botellas y la volatilización de los hidrocarburos durante el experimento. Por lo anterior, se infiere que la remoción de la WSF por *D. tertiolecta* fue de un 25 % después de 15 días de exposición. Benítez-Echegoyen et al. (2004), mencionan que, dependiendo de las características del agua a tratar, tales como la temperatura, el pH y la concentración de materia orgánica, entre otros, varía la eficiencia de remoción de los compuestos por parte de las microalgas. Es por esto que, se deben realizar estudios futuros que complementen la información obtenida en el presente trabajo.

#### **7.4 Inmovilización de *Dunaliella tertiolecta* en perlas de alginato de calcio.**

Mediante el microscopio óptico se observó que no hubo cambios morfológicos en las microalgas y que mantuvieron las características de coloración y forma propias de la especie, sugiriendo un buen estado físico de las células (Foto 10, Anexo). El crecimiento observado en las microalgas inmovilizadas fue similar a lo descrito para las microalgas en forma libre. Las fases de crecimiento logarítmico, crecimiento lento y estacionaria se observaron en todos los experimentos realizados para *D. tertiolecta*

libre e inmovilizada. Aunque se encontraron las tres fases, el aumento en la biomasa fue mayor para las microalgas inmovilizadas que para las microalgas libres. La biomasa de las primeras aumentó 67 veces; por el contrario, la biomasa de las microalgas libres solo se incrementó 35 veces en la optimización del cultivo (inciso 6.1). El aumento de la biomasa puede estar relacionado con la inmovilización, ya que las microalgas no gastan energía en trasladarse en el medio, lo que implica un ahorro energético, canalizado a la división celular. Por otro lado, la inmovilización de microalgas en alginato ha sido utilizada para la remoción de nutrientes, por la afinidad química de estos compuestos con el alginato (Banerjee et al., 2019; Sole & Matamoros, 2016), propiedad que aumentaría la disponibilidad de nutrientes para *D. tertiolecta*. Además, el alginato por ser un material fototransparente permitió el paso de la luz necesaria para el crecimiento de la microalga, que aunado con la capacidad de retención de biomasa y resistencia al medio de cultivo hacen del alginato un material apropiado para la inmovilización. Las características del alginato fueron descritas por Mallick (2002), quien señala estas propiedades como esenciales para una inmovilización funcional para microalgas. A pesar de ser considerado un material resistente a la disrupción por el crecimiento celular (Moreno-Garrido, 2008), en algunas de las perlas se observó la formación de burbujas al cuarto día (Foto 12, Anexo), cuando la biomasa era más de 6 veces la inicial. Al octavo día se observó crecimiento de microalgas libres en el medio de cultivo, indicando una ruptura de las perlas. En el cultivo de las microalgas inmovilizadas, la baja concentración del ion  $\text{Ca}^{2+}$  pudo propiciar la disrupción de las perlas, como lo estableció Grizeau y Navarro (1986), quienes indican que el adicionar  $\text{CaCl}_2$  20 mM al medio de cultivo, confiere mayor

estabilidad a la perla de alginato, previniendo la liberación de células al medio. Por otra parte, Soo et al. (2017) observaron que las perlas de alginato preparadas con alginato al 6 % y gelificadas en  $\text{CaCl}_2$  al 2 % eran más estables en agua de mar. Tanto el porcentaje de alginato como el de cloruro de calcio utilizados en el presente estudio fueron menores, por lo que pudieron influir en la estabilidad y por consecuencia ocasionar la disrupción de las perlas. En una investigación reciente, Banerjee et al. (2019) examinaron la liberación de células al medio durante 15 días y observaron que las perlas de alginato al 2 % perdieron su integridad en el día 11, lo que difiere del presente estudio, donde se observó crecimiento de microalgas libres en el día 8 del experimento. Banerjee et al. (2019), concluyen que la mejor concentración de alginato para la inmovilización fue del 3 % para evitar la disrupción de la perla, por otro lado, Grizeau y Navarro (1986) indican que la concentración de alginato al 4 % y  $\text{CaCl}_2$  20 mM en el medio previene la liberación de las células; en cambio Soo et al. (2017), para este mismo fin, recomiendan alginato al 6 %. Debido a que no existe un consenso entre los diversos autores, el porcentaje de alginato utilizado para la inmovilización debe establecerse dependiendo de las características del medio, la especie de microalgas y la aplicación.

## 8. CONCLUSIONES

- La acumulación de fenoles en *D. tertiolecta* está altamente correlacionada con el pH del medio cultivo.
- Existe una alta correlación entre el contenido de clorofila a y de luteína en *D. tertiolecta*.
- *Dunaliella tertiolecta* expuesta a la WSF al 12.5 % tiene la capacidad de crecer sin diferencias con el control.
- *Dunaliella tertiolecta* expuesta a la WSF al 50 %:
  - Tiene la capacidad de crecer.
  - Disminuye la clorofila como una respuesta para ralentizar la fotosíntesis y disminuir el estrés oxidativo
  - Disminuye la correlación entre el contenido de clorofila a y de luteína.
  - Enfrenta el estrés oxidativo con antioxidantes, como el  $\beta$ -caroteno, los fenoles y los productos de la hidrólisis de proteínas.
  - No altera el perfil de ácidos grasos.
  - Ajusta el contenido de TAG y UFA a través del crecimiento.
- *D. tertiolecta* tiene la capacidad de recuperarse y aclimatarse a la WSF al 50 %.
- *D. tertiolecta* remueve el 25 % de los hidrocarburos presentes en la WSF durante los 15 días de exposición al contaminante.
- La utilización del FTIR y el posterior análisis de la segunda derivada confirma la incorporación de los compuestos de la WSF por *D. tertiolecta*.
- La inmovilización promueve el crecimiento de *D. tertiolecta*.
- *D. tertiolecta* inmovilizada alcanza una concentración de  $1.17 \times 10^3$  cél·perla<sup>-1</sup>, superando el incremento de biomasa observado en las microalgas libres.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., Fabregas, J., & Herrero, C. (1991).  $\beta$ -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 38(2–3), 121–125. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90142-7](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90142-7)
- Adhiya, J., Cai, X., Sayre, R. T., & Traina, S. J. (2002). Binding of aqueous cadmium by the lyophilized biomass of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 210(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00041-9)
- Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., & Schenk, P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry*, 165(22), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.107>
- Anschau, A., Caruso, C. S., Kuhn, R. C., & Franco, T. T. (2017). Validation of the sulphophovanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(1), 19–27. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170341s20140222>
- Badillo Zapata, D., Lazo, J. P., Herzka, S. Z., & Viana, M. T. (2016). The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. *Aquaculture Research*, 47(6), 1778–1789. <https://doi.org/10.1111/are.12636>

Banerjee, S., Tiwade, P. B., Sambhav, K., Banerjee, C., & Bhaumik, S. K. (2019). Effect of alginate concentration in wastewater nutrient removal using alginate-immobilized microalgae beads: Uptake kinetics and adsorption studies. *Biochemical Engineering Journal*, 149(January), 107241. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107241>

Benítez-Echegoyen, F., Pellon-Arrechea, A., Sánchez-Hernández, E., & Travieso-Cordoba, L. (2004). *Equipo y Método para la Remoción de Metales Pesados y Nutrientes Mediante Microalgas Inmovilizadas* (Patent No. CU22948A1). LATIPAT. [http://lp.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=lp.espacenet.com&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=es\\_LP&FT=D&date=20040413&CC=CU&NR=22948A1&KC=A1](http://lp.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=lp.espacenet.com&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=es_LP&FT=D&date=20040413&CC=CU&NR=22948A1&KC=A1)

Bretherton, L., Hillhouse, J., Kamalanathan, M., Finkel, Z. V., Irwin, A. J., & Quigg, A. (2020). Trait-dependent variability of the response of marine phytoplankton to oil and dispersant exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 153(January), 110906. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.110906>

Bretherton, L., Williams, A., Genzer, J., Hillhouse, J., Kamalanathan, M., Finkel, Z. V., & Quigg, A. (2018). Physiological response of 10 phytoplankton species exposed to macondo oil and the dispersant, Corexit. *Journal of Phycology*, 54(3), 317–328. <https://doi.org/10.1111/jpy.12625>

Carrera-Martinez, D., Mateos-Sanz, A., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2010).

- Microalgae response to petroleum spill: An experimental model analysing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicology*, 97(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.016>
- Carrera-Martinez, Daniel, Mateos-Sanz, A., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2011). Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination. *Aquatic Toxicology*, 101(2), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.11.009>
- Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T. C., Ng, K. Y. S., & Salley, S. O. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102(2), 1649–1655. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.062>
- Chu, H., Ren, L., Yang, L., Chen, J., Zhou, X., & Zhang, Y. (2020). Metabolomics reveals a lipid accumulation mechanism involving carbon allocation in *Scenedesmus obliquus* under norfloxacin stress. *Renewable Energy*, 157, 585–592. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.051>
- Costas Costas, E., Lopez Rodas, V., Carrera Martinez, D., Mateos Sanz, M. A., & Salgado Vela, E. M. (2012). *Degradación de hidrocarburos procedentes de petróleo mediante Scenedesmus obtusus*. (Patent No. ES2356950B1).
- de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611–1627.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>

Draffin, N. (2008). *An Introduction to Bunkering (Spanish)* (First Edit). Petrosport Limited.

Driver, T., Bajhaiya, A. K., Allwood, J. W., Goodacre, R., Pittman, J. K., & Dean, A. P. (2015). Metabolic responses of eukaryotic microalgae to environmental stress limit the ability of FT-IR spectroscopy for species identification. *Algal Research*, *11*, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.009>

El-Sheekh, M. M., El-Naggar, A. H., Osman, M. E. H., & Haieder, A. (2000). Comparative studies on the green algae *Chlorella homosphaera* and *Chlorella vulgaris* with respect to oil pollution in the river Nile. *Water, Air, and Soil Pollution*, *124*(1–4), 187–204. <https://doi.org/10.1023/A:1005268615405>

Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J., Liaño, R., & Cabezas, B. (1986). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, *53*(3–4), 187–199. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90350-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90350-9)

Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N., & Jamalifar, H. (2006). Effects of salinity on beta-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, *97*(18), 2453–2456. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.037>

García-Cruz, N. U., & Aguirre-Macedo, M. L. (2014). Biodegradación de petróleo por

- bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. In *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias* (Issue August, pp. 651–662). <https://www.researchgate.net/publication/273002971>
- García-Cuellar, J. A., Arreguin-Sánchez, F., Vázquez, S. H., & Lluch-Cota, D. B. (2004). Impacto ecológico de la industria petrolera en la sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: Una revisión. *Interciencia*, 29(6), 311–319.
- Geider, R., Macintyre, Graziano, L., & McKay, R. M. (1998). Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *European Journal of Phycology*, 33(4), 315–332. <https://doi.org/10.1080/09670269810001736813>
- Geun Goo, B., Baek, G., Jin Choi, D., Il Park, Y., Synytsya, A., Bleha, R., Ho Seong, D., Lee, C. G., & Kweon Park, J. (2013). Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 129, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.077>
- Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., & Fotooh-Abadi, E. (2011). THE BIOTRANSFORMATION, BIODEGRADATION, AND BIOREMEDIATION OF ORGANIC COMPOUNDS BY MICROALGAE1. *Journal of Phycology*, 47(5), 969–980. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01051.x>
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and

- carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477–1486.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Goldman, J. C., Azov, Y., Riley, C. B., & Dennett, M. R. (1982). The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 57(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(82\)90140-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90140-X)
- Gomez, A. L., Lopez, J. A., Rodriguez, A., Fortiz, J., Martinez, L. R., Apolinar, A., & Enriquez, L. F. (2016). Production of phenolic compounds by four species of marine microalgae under different light conditions (Spanish). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(1), 137–143. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue1-fulltext-14>
- Grace, C. E. E., Lakshmi, P. K., Meenakshi, S., Vaidyanathan, S., Srisudha, S., & M. Briget Mary. (2020). Biomolecular transitions and lipid accumulation in green microalgae monitored by FTIR and Raman analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 224, 117382. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117382>
- Grizeau, D., & Navarro, J. M. (1986). Glycerol production by *Dunaliella tertiolecta* immobilized within Ca-alginate beads. *Biotechnology Letters*, 8(4), 261–264. <https://doi.org/10.1007/BF01030509>
- Guerra, G. (2003). *Biocatalizadores y biomarcadores moleculares*. Tesis Doctoral. Centro De Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana hustedt*, and *Detonula confervacea (cleve)* Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Gusmão, E. P., Rodrigues, R. V., Moreira, C. B., Romano, L. A., Sampaio, L. A., & Miranda-Filho, K. C. (2012). Growth and Histopathological Effects of Chronic Exposition of Marine Pejerrey *Odontesthes argentinensis* Larvae to Petroleum Water-Soluble Fraction (WSF). *AMBIO*, 41(5), 456–466. <https://doi.org/10.1007/s13280-012-0259-4>
- Hatanaka, Y., Kudo, T., Miyataka, M., Kobayashi, O., Higashihara, M., & Hiyama, K. (1999). Asymmetric reduction of hydroxyacetone to propanediol in immobilized halotolerant microalga *Dunaliella parva*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(3), 281–286. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80010-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80010-9)
- Hemerick, G. (1973). Mass culture. *Handbook of Phycological Methods*, 255–273.
- Hosseini Tafreshi, A., & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 14–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>
- Ismail, M. M. S., El-Ayouty, Y. M., & Piercey-Normore, M. (2016). Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.003>
- Jahns, P., & Holzwarth, A. R. (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in

- photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(1), 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2011.04.012>
- Jiang, Z., Huang, Y., Xu, X., Liao, Y., Shou, L., Liu, J., Chen, Q., & Zeng, J. (2010). Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. *Acta Ecologica Sinica*, 30(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2009.12.002>
- Kadiri, M., & Eboigbodin, A. (2012). Phytotoxicity assessment of water soluble fractions of refined petroleum products using microalgae. *Acta Botanica Hungarica*, 54(3–4), 301–311. <https://doi.org/10.1556/ABot.54.2012.3-4.9>
- Kim, M., Ahn, J., Jeon, H., Jin, E. S., Cutignano, A., & Romano, G. (2017). Development of a *Dunaliella tertiolecta* strain with increased zeaxanthin content using random mutagenesis. *Marine Drugs*, 15(6). <https://doi.org/10.3390/md15060189>
- Kim, S.-H., Liu, K.-H., Lee, S.-Y., Hong, S.-J., Cho, B.-K., Lee, H., Lee, C.-G., & Choi, H.-K. (2013). Effects of Light Intensity and Nitrogen Starvation on Glycerolipid, Glycerophospholipid, and Carotenoid Composition in *Dunaliella tertiolecta* Culture. *PLoS ONE*, 8(9), e72415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072415>
- Lee, S. Y., Kim, S. H., Hyun, S. H., Suh, H. W., Hong, S. J., Cho, B. K., Lee, C. G., Lee, H., & Choi, H. K. (2014). Fatty acids and global metabolites profiling of *Dunaliella tertiolecta* by shifting culture conditions to nitrate deficiency and high light at different growth phases. *Process Biochemistry*, 49(6), 996–1004. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.022>

- Lee, Y.-K., & Ding, S.-Y. (1994). Cell Cycle and Accumulation of Astaxanthin in *Haematococcus Lacustris* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 30(3), 445–449. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00445.x>
- Levy, E. . (1972). The identification of petroleum products in the marine environment by absorption spectrophotometry. *Water Research*, 6(1), 57–69. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(72\)90173-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(72)90173-X)
- López, A., Rico, M., Santana-Casiano, J. M., González, A. G., & González-Dávila, M. (2015). Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 14820–14828. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4717-y>
- Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., El Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., Bakri, Y., & Wahby, I. (2015). Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology*, 215, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400>
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals*, 15(4), 377–390. <https://doi.org/10.1023/A:1020238520948>
- Marwood, C. A., Solomon, K. R., & Greenberg, B. M. (2001). Chlorophyll fluorescence as a bioindicator of effects on growth in aquatic macrophytes from mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(4), 890–898. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200425>

- Mecozzi, M., & Oteri, F. (2011). Effects of arsenic alone and in combination with other pollutants in *Dunaliella tertiolecta*. *Chemistry and Ecology*, 27(sup1), 53–65.  
<https://doi.org/10.1080/02757540.2010.536154>
- Mecozzi, M., Pietroletti, M., & Di Mento, R. (2007). Application of FTIR spectroscopy in ecotoxicological studies supported by multivariate analysis and 2D correlation spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 44(2), 228–235.  
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.11.006>
- Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M. S., & Yang, J. W. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155, 330–333.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.077>
- Mohanta, T. K., Mohanta, Y. K., & Mohanta, N. (2015). *Role of Biotechnology in Bioremediation* (pp. 399–432). <https://doi.org/10.4018/978-1-4666-8682-3.ch016>
- Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3(1), 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
- Morales-Loo, M. R., & Goutx, M. (1990). Effects of water-soluble fraction of the Mexican crude oil “Isthmus Cactus” on growth, cellular content of chlorophyll a, and lipid composition of planktonic microalgae. *Marine Biology*, 104(3), 503–509.  
<https://doi.org/10.1007/BF01314357>
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses.

*Bioresource Technology*, 99(10), 3949–3964.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>

National Research Council. (2003). *Oil in the Sea III: inputs, fates, and effects*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10388>

Neff, J. M., & Anderson, J. W. (1975). An ultraviolet spectrophotometric method for the determination of naphthalene and alkylnaphthalenes in the tissues of oil-contaminated marine animals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 14(1), 122–128. <https://doi.org/10.1007/BF01685610>

Okumura, Y., Koayama, J., & Uno, S. (2003). The relationship between logPow and molecular weight of polycyclic aromatic hydrocarbons and EC50 values of marine microalgae. *La Mer*, 41(4), 182–191.

Parab, S. R., Pandit, R. A., Kadam, A. N., & Indap, M. M. (2008). Effect of Bombay high crude oil and its water-soluble fraction on growth and metabolism of diatom *Thalassiosira sp.* *Indian Journal of Marine Sciences*, 37(3), 251–255.

Pasquevich, M. Y., Dreon, M. S., Gutierrez Rivera, J. N., Vázquez Boucard, C., & Heras, H. (2013). Effect of crude oil petroleum hydrocarbons on protein expression of the prawn *Macrobrachium borellii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 157(4), 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.03.006>

Pereira, S. A., Araújo, V. Q., Reboucas, M. V., Vieira, F. S. V., De Almeida, M. V. A.,

- Chinalia, F. A., & Nascimento, I. A. (2012). Toxicity of biodiesel, diesel and biodiesel/diesel blends: Comparative sub-lethal effects of water-soluble fractions to microalgae species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *88*(2), 234–238. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0430-9>
- Perhar, G., & Arhonditsis, G. B. (2014). Aquatic ecosystem dynamics following petroleum hydrocarbon perturbations: A review of the current state of knowledge. *Journal of Great Lakes Research*, *40*(S3), 56–72. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.05.013>
- Phadwal, K., & Singh, P. . (2003). Effect of nutrient depletion on  $\beta$ -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Bioresource Technology*, *90*(1), 55–58. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00090-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00090-7)
- Pick, U., & Avidan, O. (2017). Triacylglycerol is produced from starch and polar lipids in the green alga *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Experimental Botany*, *68*(17), 4939–4950. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx280>
- Quesnel, D. M., Bhaskar, I. M., Gieg, L. M., & Chua, G. (2011). Naphthenic acid biodegradation by the unicellular alga *Dunaliella tertiolecta*. *Chemosphere*, *84*(4), 504–511. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.012>
- Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2015). Toxicity and oxidative stress induced by used and unused motor oil on freshwater microalga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(12), 8890–8901. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3403-9>

- Richmond, A., & Hu, Q. (2013). Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch18>
- Romero-Lopez, J., Lopez-Rodas, V., & Costas, E. (2012). Estimating the capability of microalgae to physiological acclimatization and genetic adaptation to petroleum and diesel oil contamination. *Aquatic Toxicology*, 124–125, 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.001>
- Rüger, J., Unger, N., Schie, I. W., Brunner, E., Popp, J., & Krafft, C. (2016). Assessment of growth phases of the diatom *Ditylum brightwellii* by FT-IR and Raman spectroscopy. *Algal Research*, 19, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.007>
- Rukminasari, N. (2013). Effect of Temperature and Nutrient Limitation on the Growth and Lipid Content of Three Selected Microalgae (*Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis sp.* and *Scenedesmus sp.*) for Biodiesel Production. *International Journal of Marine Science*, April 2013. <https://doi.org/10.5376/ijms.2013.03.0017>
- Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., & Khoeyi, Z. A. (2011). Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*, 23(4), 721–726. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9569-8>
- Shishlyannikov, S. M., Nikonova, A. A., Klimenkov, I. V., & Gorshkov, A. G. (2017). Accumulation of petroleum hydrocarbons in intracellular lipid bodies of the freshwater diatom *Synedra acus* subsp. *radians*. *Environmental Science and*

*Pollution Research*, 24(1), 275–283. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7782-y>

Shiu, R.-F., Chiu, M.-H., Vazquez, C. I., Tsai, Y.-Y., Le, A., Kagiri, A., Xu, C., Kamalanathan, M., Bacosa, H. P., Doyle, S. M., Sylvan, J. B., Santschi, P. H., Quigg, A., & Chin, W.-C. (2020). Protein to carbohydrate (P/C) ratio changes in microbial extracellular polymeric substances induced by oil and Corexit. *Marine Chemistry*, 223(March), 103789. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2020.103789>

Shuping, Z., Yulong, W., Mingde, Y., Kaleem, I., Chun, L., & Tong, J. (2010). Production and characterization of bio-oil from hydrothermal liquefaction of microalgae *Dunaliella tertiolecta* cake. *Energy*, 35(12), 5406–5411. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.07.013>

Silos-Rodríguez, J. M. (2008). Manual de la lucha contra la contaminación por hidrocarburos. In S. de publicación U. de C. UCA (Ed.), *Manual de la lucha contra la contaminación por hidrocarburos*.

Siron, R., Carles, D., Rontani, J.-F., Morales, R., Berland, B., & Giusti, G. (1986). Effects of Water Soluble Petroleum Compounds on the Fatty Acids Composition of Phytoplankton. In *Strategies and Advanced Techniques for Marine Pollution Studies* (Vol. 198, pp. 463–464). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-70871-8\\_27](https://doi.org/10.1007/978-3-642-70871-8_27)

Siron, R., Giusti, G., Berland, B., Morales-Loo, R., & Pelletier, E. (1991). Water-soluble petroleum compounds: chemical aspects and effects on the growth of microalgae. *The Science of the Total Environment*, 104(3), 211–227.

[https://doi.org/10.1016/0048-9697\(91\)90073-N](https://doi.org/10.1016/0048-9697(91)90073-N)

Sole, A., & Matamoros, V. (2016). Removal of endocrine disrupting compounds from wastewater by microalgae co-immobilized in alginate beads. *Chemosphere*, *164*, 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.047>

Solovchenko, A. E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, *59*(2), 167–176. <https://doi.org/10.1134/s1021443712020161>

Soo, C. L., Chen, C. A., Bojo, O., & Hii, Y. S. (2017). Feasibility of Marine Microalgae Immobilization in Alginate Bead for Marine Water Treatment: Bead Stability, Cell Growth, and Ammonia Removal. *International Journal of Polymer Science*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6951212>

Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, 321–343.

Stuart, B. (2004). Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. In *Book Series: Analytical Techniques in the Sciences*. John Wiley and Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470011149>

Takaichi, S. (2011). Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs*, *9*(6), 1101–1118. <https://doi.org/10.3390/md9061101>

Tammam, A., Fakhry, E., & El-Sheekh, M. (2013). Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and

- Dunaliella tertiolecta*. *African Journal of Biotechnology*, 10(19), 3795–3808.  
<https://doi.org/10.5897/AJB10.2392>
- Torres, M. A., Barros, M. P., Campos, S. C. G., Pinto, E., Rajamani, S., Sayre, R. T., & Colepicolo, P. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 1–15.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.009>
- Vanzella, T. P., Martinez, C. B. R., & Cólus, I. M. S. (2007). Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*, 631(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.004>
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I., & Garland, C. D. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128(3), 219–240.  
[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(89)90029-4)
- Vonshak, A., & Maske, H. (1982). Algae: growth techniques and biomass production. *Techniques in Bioproduction and Photosynthesis*.
- Walker, J. D., Colwell, R. R., & Petrakis, L. (1975). Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Applied Microbiology*, 30(1), 79–81.
- Wang, B., & Jia, J. (2020). Photoprotection mechanisms of *Nannochloropsis oceanica* in response to light stress. *Algal Research*, 46(December 2019).  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101784>

- Wang, X., Zhang, J., Shi, X., Zhu, C., An, Y., Jun, S., Li, R., Zhu, M., & Chen, S. (2002). Determination of toxicokinetic parameters for bioconcentration of water-soluble fraction of petroleum hydrocarbon associated with No. 0 Diesel in Changjiang estuary and Jiaozhou Bay: Model versus mesocosm experiments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(3), 272–279. <https://doi.org/10.1007/s00244-001-0025-2>
- Wolfe, M. F., Schlosser, J. A., Singaram, S., Mielbrecht, E. E., Tjeerdema, R. S., Sowby, M. L., Schwartz, G. J. B., Singaram, S., Mielbrecht, E. E., Tjeerdema, R. S., & Sowby, M. L. (1998). Influence of dispersants on the bioavailability and trophic transfer of petroleum hydrocarbons to primary levels of a marine food chain. *Aquatic Toxicology*, 42(3), 211–227. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(97\)00096-9](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(97)00096-9)
- Wu, J.-Y., Lay, C.-H., Chen, C.-C., Wu, S.-Y., Zhou, D., & Mohamed Abdula, P. (2020). Textile wastewater bioremediation using immobilized *Chlorella sp.* Wu-G23 with continuous culture. *Clean Technologies and Environmental Policy*. <https://doi.org/10.1007/s10098-020-01847-6>
- Xi, Z., & Chen, B. (2014). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution by raw and modified plant residue materials as biosorbents. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 26(4), 737–748. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(13\)60501-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(13)60501-X)
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., & Cetiner, S. (2014). Oxidative

Stress Is a Mediator for Increased Lipid Accumulation in a Newly Isolated *Dunaliella salina* Strain. *PLoS ONE*, 9(3), e91957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091957>

Young, E. B., & Beardall, J. (2003). Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *Journal of Phycology*, 39(5), 897–905. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.03042.x>

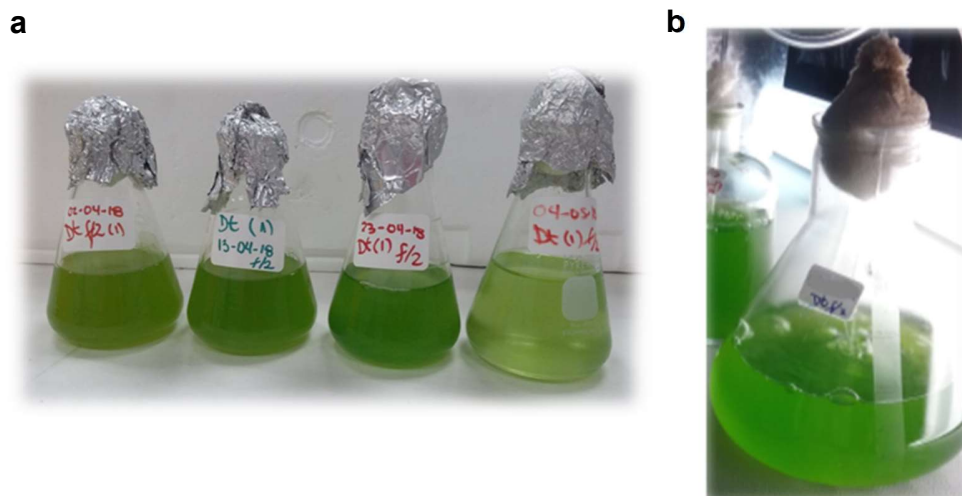
Yuewen, D., & Adzibli, L. (2018). Assessing the Impact of Oil Spills on Marine Organisms. *Journal of Oceanography and Marine Research*, 06(01), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2572-3103.1000179>

Zou, S., Wu, Y., Yang, M., Li, C., & Tong, J. (2009). Thermochemical Catalytic Liquefaction of the Marine Microalgae *Dunaliella tertiolecta* and Characterization of Bio-oils. *Energy & Fuels*, 23(7), 3753–3758. <https://doi.org/10.1021/ef9000105>

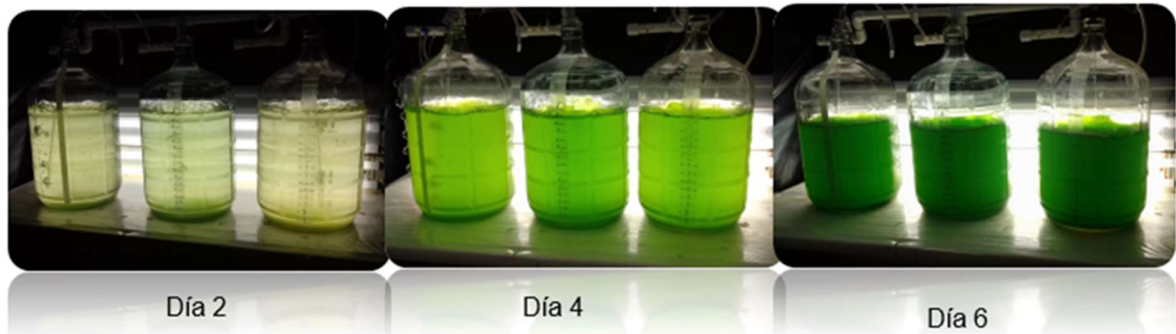
## 10. ANEXO FOTOGRÁFICO



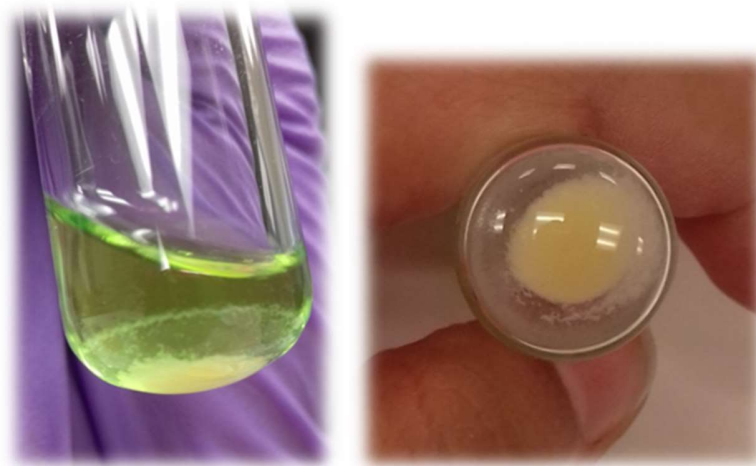
Fotografía 1. *Dunaliella tertiolecta* proveniente del cepario de CICESE.



Fotografía 2. Cultivo stock de *D. tertiolecta* en matraces de 125 mL (a) y escalamiento de cultivo estático en matraz Fernbach (1.5 L) (b).



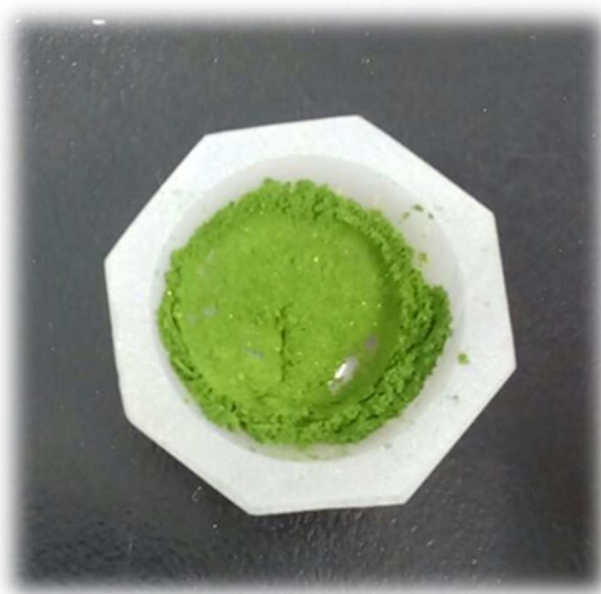
Fotografía 3. Cultivo de *D. tertiolecta* en botellón (15 L), medio f/2 (inciso 5.1).



Fotografía 4. Extracción de pigmentos con metanol.



Fotografía 5. Cultivos estáticos sin aireación de *D. tertiolecta* en tubos de ensayo (80 mL) para la exposición a la WSF (inciso 5.2).



Fotografía 6. Biomasa de *Dunaliella tertiolecta* liofilizada.

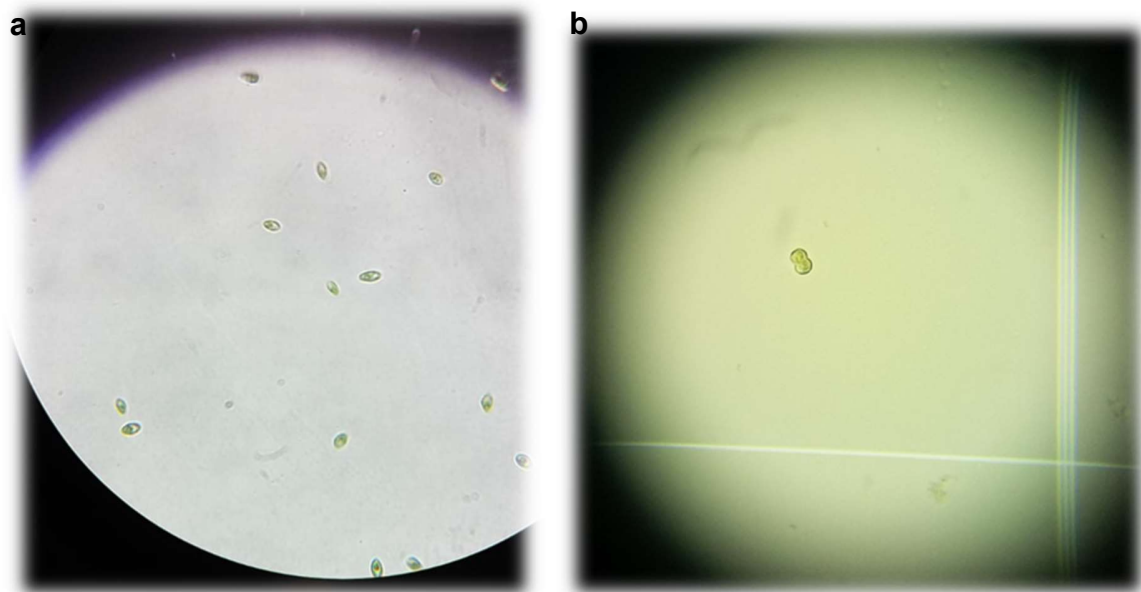
a



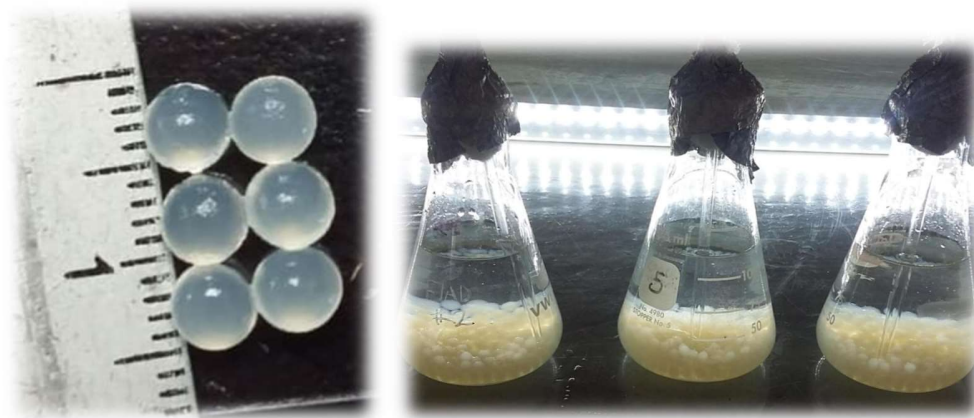
b



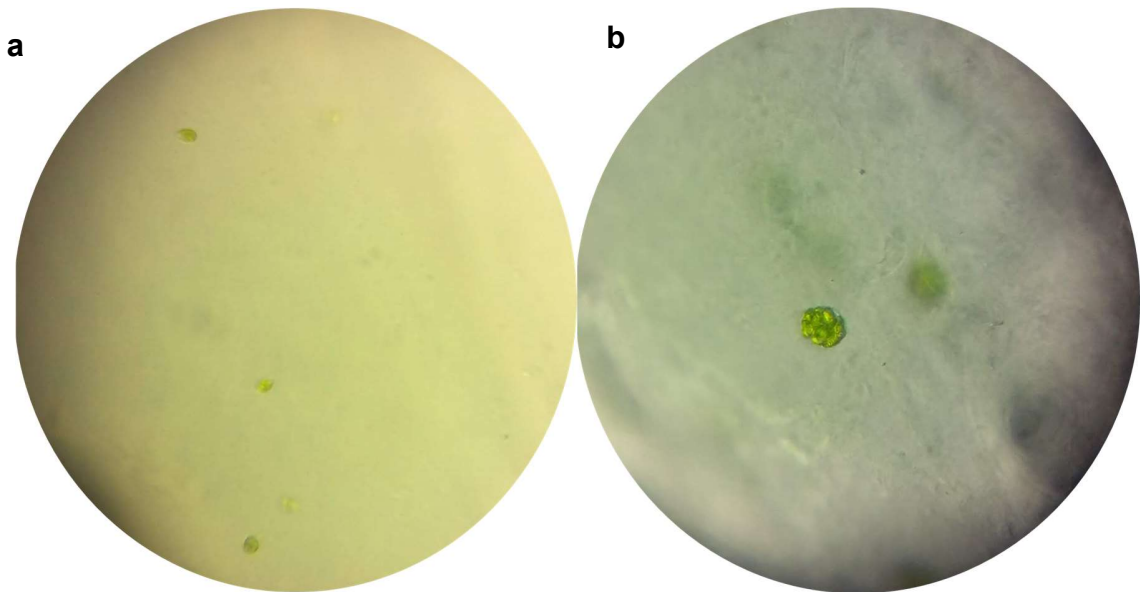
Fotografía 7. Botellas de cultivo de *Dunaliella tertiolecta* expuesta a la WSF, día 1 (a.)  
y día 6 (b) (inciso 5.3).



Fotografía 8. Revisión bajo microscopio (40X) de la microalga expuesta a la WSF (a) y conteo celular (b) (inciso 5.3).



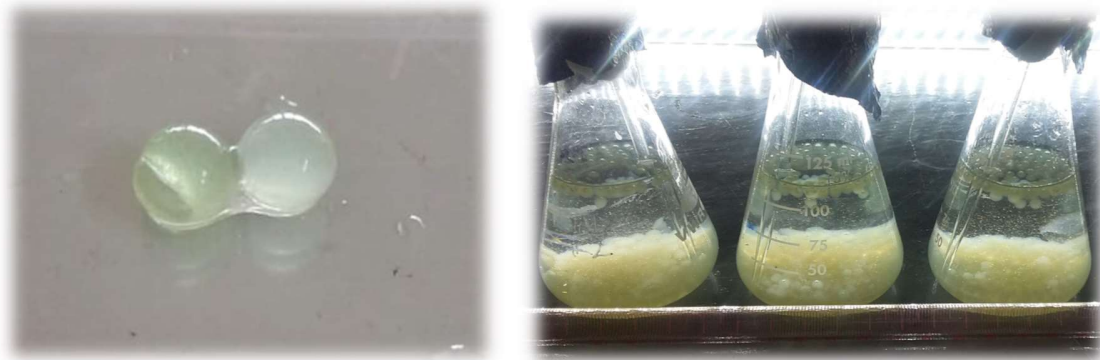
Fotografía 9. Inmovilización y cultivo de *Dunaliella tertiolecta* en perlas de alginato de calcio (inciso 5.4).



Fotografía 10. Corte transversal de una perla en el día 0 (a) y día 8 (b) de cultivo (40x)  
(inciso 5.4).



Fotografía 11. Perlas de alginato de calcio con *Dunaliella tertiolecta* a los 21 días de cultivo (inciso 5.4).



Fotografía 12. Formación de burbujas en las perlas de alginato durante el cultivo de *Dunaliella tertiolecta* inmovilizada.

## 11. ANEXO. HOJAS SEGURIDAD

### 11.1 Combustóleo PEMEX



**COMBUSTÓLEO PESADO**  
 Núm. Versión : 4  
 NOM-018-STPS-2000

#### Hoja de Datos de Seguridad

#### SECCIÓN I. DATOS GENERALES

HDSS: PR-405/2010

COMBUSTÓLEO PESADO



No. ONU<sup>1</sup>: 1993

No. CAS<sup>2</sup>: ND

FECHA ELAB: 28/12/1998

REVISIÓN: 4

FECHA REV: 17/11/2011

FABRICANTE	EN CASO DE EMERGENCIA LLAMAR:
<b>PEMEX:</b> Av. Marina Nacional No. 329, colonia Petróleos Mexicanos, Delegación Miguel Hidalgo, México, D. F. C. P. 11311. Teléfonos: (0155) - 19449365 y 19448895 (Horario de oficina).  <b>ASISTENCIA TÉCNICA:</b> Teléfonos: (0155) – 19448164 (Horario de oficina).  <b>CONSULTA HOJAS DE DATOS DE SEGURIDAD:</b> Teléfonos: (0155) – 19448628 y 19448041 (Horario de oficina).	<b>SETIQ<sup>3</sup>:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 01800 – 0021400, sin costo las 24 horas.</li> <li>▪ (0155) – 55591588, Cd. de México, las 24 horas.</li> </ul>
	<b>CENACOM<sup>4</sup>:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 01800 – 0041300, sin costo las 24 horas.</li> <li>▪ (0155) – 51280000, ext. 11470 a 11476, Cd. de México, las 24 horas.</li> </ul>
	<b>COATEA<sup>5</sup>:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 01800 – 7104943, sin costo las 24 horas.</li> <li>▪ (0155) – 54496391 y 26152045 Cd. de México, las 24 horas.</li> </ul>
	<b>CCAE<sup>6</sup>:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 49166 (número único nacional, las 24 horas).</li> <li>▪ (0155) - 19442500, extensión 49166 Cd. de México, las 24 horas.</li> <li>▪ Correo electrónico: <a href="mailto:ccae@pemex.com">ccae@pemex.com</a></li> </ul>

#### SECCIÓN II. DATOS GENERALES DEL PRODUCTO

Nombre químico: ND	Estado físico: Líquido
Nombre comercial: Combustóleo Pesado	Clase de Riesgo de transporte SCT <sup>7</sup> : Clase 3, "Líquidos inflamables"
Familia química: ND	No. Guía de Respuesta GRE <sup>8</sup> : 128
Sinónimos: Combustóleo Pesado	
Descripción general del producto: ND	

**Hoja de Datos de Seguridad**
**SECCIÓN III. IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES**

COMPONENTE	% VOL.	NÚMERO ONU <sup>1</sup>	NÚMERO CAS <sup>2</sup>	PPT <sup>9</sup> (ppm)	CT <sup>10</sup> (ppm)	P <sup>11</sup> (ppm)	IPVS <sup>12</sup> (ppm)	GRADO DE RIESGO NFPA <sup>13</sup>			
								S <sup>14</sup>	I <sup>15</sup>	R <sup>16</sup>	E <sup>17</sup>
Combustóleo	100	1993	ND	ND	ND	ND	ND	0	2	0	ND
Azufre	4% peso	1350	7704-34-9	ND	ND	ND	ND	1	1	0	ND

**SECCIÓN IV. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Temperatura de ebullición (°C): ND	Color: Líquido viscoso oscuro
Temperatura de fusión (°C): NA	Olor: Característico a hidrocarburo
Temperatura de inflamación (°C): 66 (mínimo) (ASTM-D 93) <sup>A</sup>	Velocidad de evaporación: ND
Temperatura de auto ignición (°C): ND	Solubilidad en agua: Insoluble
Temperatura de escurrimiento: +15 (máximo) <sup>A</sup>	Presión de vapor (kPa): ND
Viscosidad cinemática @ 50°C: 636 – 1166 mm <sup>2</sup> /s <sup>A</sup>	% de volatilidad: NA
Poder Calorífico Neto (MJ/kg): 40 (mínimo) <sup>A</sup>	Límites de explosividad inferior-superior: ND
Estado físico: Líquido	Gravedad específica 20/4 °C: 1.000 (máximo) <sup>A</sup>

**SECCIÓN V. RIESGOS DE FUEGO Y EXPLOSIÓN**

<p><b>Medio de extinción:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fuegos pequeños: Utilizar agua en forma de rocío o niebla, polvo químico seco, Bióxido de Carbono o espuma química.</li> <li>▪ Fuegos grandes: Utilizar agua en forma de rocío o niebla, no usar chorro de agua directa, usar espuma química.</li> </ul> <p><b>Equipo de protección personal para el combate de incendios:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ El personal que combate incendios de esta sustancia en espacios confinados, debe emplear equipo de respiración autónomo y traje para bombero profesional completo; el uso de este último proporciona solamente protección limitada.</li> </ul> <p><b>Procedimiento y precauciones especiales durante el combate de incendios:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ NO INTRODUCIR AGUA A LOS CONTENEDORES, YA QUE PUEDE SOBRECALENTARSE Y PROVOCAR LA EXPULSIÓN SÚBITA DEL PRODUCTO INCENDIADO (BOIL OVER).</li> </ul>
--

**Hoja de Datos de Seguridad**

- Utilizar agua en forma de rocío para enfriar contenedores y estructuras expuestas y para proteger al personal que intenta eliminar la fuga.
- Continuar el enfriamiento con agua de los contenedores, aún después de que el fuego haya sido extinguido.
- Eliminar la fuente de fuga si es posible hacerlo sin riesgo; de no ser posible y en función de las condiciones del incendio, permitir que el fuego arda de manera controlada o proceder a su extinción.
- Utilizar agua como medio de lavado para retirar los derrames de las fuentes de ignición. Debe evitarse la introducción de este producto a vías pluviales, alcantarillas, sótanos o espacios confinados.
- En incendio masivo, utilice soportes fijos para mangueras o chiflones reguladores; si no es posible, retírese del área y deje que arda.
- Aislar el área de peligro, mantener alejadas a las personas innecesarias y evitar situarse en las zonas bajas.
- Tratar de cubrir el líquido derramado con espuma, evitando introducir agua directamente dentro del contenedor.
- Retírese de inmediato en caso de que aumente el sonido de los dispositivos de alivio de presión, o cuando el contenedor empiece a decolorarse.
- Manténgase siempre alejado de los extremos de los tanques.

**Condiciones que conducen a otros riesgos especiales:**

- Sus vapores pueden formar mezclas explosivas con el aire. Pueden viajar a una fuente de ignición y regresar con flama.
- Esta sustancia puede almacenar cargas electrostáticas debidas al flujo del movimiento.
- Puede encenderse por calor, flama o chispas. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan.

**Productos de la combustión nocivos para la salud:**

- La combustión de esta sustancia genera Monóxido de Carbono y Bióxido de Carbono.

**SECCIÓN VI. RIESGOS DE REACTIVIDAD**

**Estabilidad (condiciones a evitar):** Esta sustancia es estable.

**Incompatibilidad (sustancias a evitar):** Evitar el contacto con oxidantes fuertes, como Cloro líquido y Oxígeno.

**Descomposición en componentes o productos peligrosos:**

Esta sustancia no se descompone a temperatura ambiente. Su combustión genera Monóxido de Carbono, Bióxido de Carbono y otros gases asfixiantes, irritantes y corrosivos.

**Polimerización espontánea (condiciones a evitar):**

Esta sustancia no presenta polimerización.

**Otras condiciones a evitar para prevenir que reaccione:**

No se tiene información.

**Hoja de Datos de Seguridad****SECCIÓN VII. RIESGOS A LA SALUD Y PRIMEROS AUXILIOS****EFFECTOS POR EXPOSICIÓN AGUDA:****Ingestión:**

- Esta sustancia no es tóxica.
- Su ingestión puede causar trastornos gastrointestinales; en este caso, los síntomas incluyen: ardor de esófago y estómago, náuseas, vómito y diarrea.
- En caso de presentarse vómito severo existe peligro de aspiración hacia bronquios y pulmones, lo que puede causar inflamación y riesgo de infección.

**Inhalación:**

- A temperatura ambiente no existe riesgo por inhalación.
- A temperaturas elevadas o por acción mecánica puede formar vapores o nieblas; las cuales, pueden ser irritantes para los bronquios y pulmones.

**Piel (contacto):**

- Irritante de la piel que produce sensación de ardor con enrojecimiento e inflamación. Si la exposición es a producto caliente se generará quemadura de grado variable.

**Contacto con los ojos:**

- El contacto de esta sustancia con los ojos puede causar irritación de la conjuntiva.
- El contacto con aceite caliente puede causar quemaduras en córnea y/o conjuntiva.

**EFFECTOS POR EXPOSICIÓN CRÓNICA:**

- El contacto repetido o prolongado de esta sustancia con la piel puede causar enrojecimiento, inflamación, resequedad, comezón, formación de grietas y riesgo de infección secundaria.

Sustancia carcinogénica: Sustancia mutagénica: Sustancia teratogénica: Otras (especifique): **NOTAS:**

- La Norma Oficial Mexicana NOM-010-STPS-1999, "Condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se manejen, transporten, procesen o almacenen sustancias químicas capaces de generar contaminación en el medio ambiente laboral", no incluye a este producto en la relación de sustancias cancerígenas.

**Hoja de Datos de Seguridad**

<b>INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA:</b>  CL <sub>50</sub> <sup>18</sup> : ND  DL <sub>50</sub> <sup>19</sup> : ND  Otra información: ND
--

<b>PROCEDIMIENTO DE EMERGENCIA Y PRIMEROS AUXILIOS:</b>  <b>Procedimientos para la aplicación de primeros auxilios para las diferentes vías de entrada al organismo:</b>  <b>Ingestión:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ En caso de que cantidades pequeñas de esta sustancia entren a la boca, debe enjuagarse con agua hasta eliminar los residuos del producto.</li><li>▪ Si la víctima está consciente, dar a beber líquidos e inducir el vómito observando en todo momento para evitar que se aspire esta sustancia hacia los bronquios y pulmones.</li><li>▪ Si la víctima está inconsciente no debe inducirse el vómito, ya que puede aspirar el producto hacia los bronquios y pulmones, y provocar la inflamación severa de éstos, así como riesgo de infecciones.</li><li>▪ Solicitar atención médica inmediata.</li></ul> <b>Inhalación:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ El personal médico que atienda las emergencias debe tomar en cuenta las características de los materiales involucrados, así como las recomendaciones dispuestas en esta Hoja de Seguridad para protegerse a sí mismo.</li><li>▪ <b>En caso de exposición a vapores y/o nieblas de esta sustancia:</b><ul style="list-style-type: none"><li>• Retirar a la víctima a un lugar bien ventilado y donde se respire aire fresco.</li><li>• Si la víctima no respira, aplicar la respiración artificial.</li><li>• ¡CUIDADO! El método de respiración artificial de boca a boca puede ser peligroso para la persona que lo aplica, ya que ésta puede inhalar materiales tóxicos.</li><li>• Mantenga a la víctima abrigada y en reposo.</li><li>• Solicitar atención médica inmediata.</li></ul></li></ul> <b>Contacto con la piel:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Retirar inmediatamente y confinar la ropa y el calzado contaminados.</li><li>▪ Lavar la parte afectada con abundante agua, hasta que se eliminen los residuos del producto.</li><li>▪ Lavar la ropa y calzado antes de utilizarlos nuevamente.</li><li>▪ Mantener la víctima en reposo y abrigada para proporcionar una temperatura corporal normal.</li><li>▪ En caso de que la víctima presente algún síntoma anormal o si la irritación persiste después del lavado,</li></ul>
---

**Hoja de Datos de Seguridad**

obtener atención médica inmediata.

- Las quemaduras requieren atención médica especializada en forma inmediata.

**Contacto con los ojos:**

- En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con abundante agua por lo menos durante 15 minutos o hasta que se eliminen los residuos del producto.
- Sostener los párpados de manera que se garantice una adecuada limpieza con abundante agua en el globo ocular.
- Si la irritación persiste aún después del lavado, solicitar atención médica inmediata.
- Las quemaduras en conjuntiva y córnea requieren atención médica especializada en forma inmediata.

**OTROS RIESGOS O EFECTOS A LA SALUD:**

- No se tiene información.

**ANTÍDOTO (DOSIS EN CASO DE EXISTIR):**

- No se tiene información.

**OTRA INFORMACIÓN PARA LA ATENCIÓN MÉDICA PRIMARIA Y LAS CONTRAINDICACIONES PERTINENTES:**

- La aspiración de esta sustancia hacia los pulmones puede causar inflamación y riesgo de infección de bronquios y pulmones, por lo que no debe inducirse el vómito a las víctimas inconscientes.

**SECCIÓN VIII. INDICACIONES EN CASO DE FUGA O DERRAME****Procedimiento y precauciones inmediatas:****Primeramente llamar al número telefónico de respuesta en caso de emergencia.**

- Eliminar las fuentes de ignición cercanas (no fumar, no usar bengalas, chispas o llama abierta en el área de riesgo).
- No tocar ni caminar sobre el producto derramado.
- Mantener alejado al personal que no participa directamente en las acciones de control; aislar el área de riesgo y prohibir el acceso.
- Permanecer fuera de las zonas bajas y en un sitio donde el viento sople a favor.
- Debe evitarse la introducción de este producto a vías pluviales, alcantarillas, sótanos o espacios confinados.
- En caso de fugas o derrames pequeños, cubrir con arena u otro material absorbente no combustible.
- Cuando se trate de derrames mayores, se debe represar a distancia, recoger el producto y colocarlo en tambores para su disposición posterior.
- Utilizar herramientas antichispas para recoger el material derramado, y conectar eléctricamente a tierra el equipo utilizado.

**Hoja de Datos de Seguridad**

- Ventile los espacios cerrados antes de entrar.
- El agua en forma de rocío puede reducir los vapores, pero no puede prevenir su ignición en espacios cerrados.
- Todo el equipo que se use para el manejo de esta sustancia, debe estar conectado eléctricamente a tierra.
- Debe trabajarse en áreas bien ventiladas.
- Debe proveerse ventilación mecánica a prueba de explosión, cuando se maneje esta sustancia en espacios confinados.

**Métodos de mitigación para controlar la sustancia:**

- En caso de emplear equipos de bombeo para recuperar el producto derramado, éste debe ser a prueba de explosión.
- Detener la fuga en caso de poder hacerlo sin riesgo.
- De ser posible, los recipientes que lleguen a fugar deben ser trasladados a un sitio bien ventilado y alejado del resto de las instalaciones y de fuentes de ignición; el producto, deberá trasegarse a otros recipientes que se encuentren en buenas condiciones, observando los procedimientos establecidos para esta actividad.

**Recomendaciones para evacuación:**


- En caso de un derrame grande, considere la evacuación inicial de por lo menos 300 metros a favor del viento u 800 metros a la redonda.
- En caso de que un tanque, carrotanque o autotanque que contenga este producto esté involucrado en un incendio, debe aislarse 800 metros a la redonda.
- Considerar también la evacuación inicial de 800 metros a la redonda.

**SECCIÓN IX. PROTECCIÓN ESPECIAL EN SITUACIONES DE EMERGENCIA****Equipo de protección personal específico:**

- La selección del equipo de protección personal varía dependiendo de las condiciones de uso.
- Se recomienda utilizar guantes de hule cuando el contacto prolongado con la piel no puede evitarse.
- La concentración de vapores en el aire determina el tipo de protección respiratoria que es necesaria.
- En caso de fuga o derrame, emplear equipo de protección personal incluyendo: botas, guantes y delantal de hule.
- Cuando la fuga o derrame genera vapores o neblinas de esta sustancia, debe emplearse equipo de respiración autocontenido.
- Deben emplearse anteojos de seguridad con protección lateral o careta facial cuando se efectúen labores de atención a fugas o derrames.
- No debe usarse lentes de contacto cuando se maneja esta sustancia.

**Hoja de Datos de Seguridad**

<ul style="list-style-type: none"> <li>En las instalaciones donde se maneja esta sustancia, deben colocarse estaciones de regadera-lavaojos en sitios estratégicos, los cuales deben estar accesibles, operables en todo momento y bien identificadas.</li> <li>El personal que combate incendios de esta sustancia en espacios confinados, debe emplear equipo de respiración autónomo y traje para bombero profesional completo; el uso de este último proporciona solamente protección limitada.</li> </ul>
<b>SECCIÓN X. INFORMACIÓN SOBRE TRANSPORTACIÓN</b>

Número ONU: 1993		
Clase de riesgo de transporte: Clase 3 Líquidos inflamables		
Guía de Respuesta en caso de Emergencia: Guía número 128		
Colocar el cartel que identifica el contenido y riesgo del producto transportado, cumpliendo con el color, dimensiones, colocación, etc., dispuestos en la NOM-004-SCT-2008 y empleando cualquiera de los dos modelos que se muestran en el recuadro de la derecha.		
<b>Recomendaciones del Reglamento para el Transporte Terrestre de Materiales y Residuos Peligrosos:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>Las unidades que transporten materiales y residuos peligrosos deberán estar en óptimas condiciones de operación, físicas y mecánicas, verificando el transportista que la unidad reúna tales condiciones antes de proceder a cargar los materiales y residuos peligrosos.</li> <li>Los operadores de vehículos se abstendrán a realizar paradas no justificadas, que no estén contempladas en la operación del servicio, así como circular por áreas centrales de ciudades y poblados. Al efecto, utilizarán los libramientos periféricos cuando éstos existan.</li> <li>Ninguna unidad que traslade materiales o residuos peligrosos deberá transportar personas no relacionadas con las operaciones de la unidad.</li> <li>Demás información, contenida en el Reglamento para el Transporte Terrestre de Materiales y Residuos Peligrosos.</li> </ol>		

<b>SECCIÓN XI. INFORMACIÓN SOBRE ECOLOGÍA</b>
---

<b>Comportamiento de la sustancia química peligrosa cuando se libera al aire, agua o suelo y sus efectos en la flora o fauna:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Disponer apropiadamente de los productos y materiales contaminados usados en las maniobras de limpieza de fugas o derrames.</li> <li>El suelo y los materiales afectados por el derrame y por los trabajos de limpieza, deberán recibir el tratamiento y/o disposición correspondiente, de acuerdo a lo establecido en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), el Reglamento de la Ley General para la Prevención</li> </ul>
--

**Hoja de Datos de Seguridad**

y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) y la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

- Cuando el derrame No exceda de 1 m<sup>3</sup>, se deberán aplicar de manera inmediata acciones para minimizar o limitar su dispersión o recogerlos y realizar la limpieza del sitio y anotarlos en la bitácora. Estas acciones deberán estar contempladas en sus respectivos programas de prevención y atención a contingencias o emergencias ambientales o accidentes.
- Cuando el derrame exceda de 1 m<sup>3</sup>, se deberán ejecutar las medidas inmediatas para contener los materiales liberados, minimizar o limitar su dispersión o recogerlos y realizar limpieza del sitio. Asimismo, se deberá:
  - Avisar de inmediato a la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) y a las autoridades competentes, que ocurrió el derrame, infiltración, descarga o vertido del material peligroso.
  - Ejecutar las medidas que les hubieren impuesto las autoridades competentes conforme a lo previsto en el Art. 72 de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR).
  - Iniciar los trabajos de Caracterización del sitio contaminado y realizar las acciones de Remediación correspondientes.
  - El aviso del derrame se deberá formalizar dentro de los tres días hábiles siguientes al día en que hayan ocurrido los hechos y deberá contener lo indicado en el Art. 131 del Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR).

**SECCIÓN XII. INFORMACIÓN SOBRE MANEJO Y ALMACENAMIENTO****Para el manejo, transporte y almacenamiento:**

- El personal no debe ingerir alimentos, beber o fumar durante el manejo de esta sustancia.
- El personal no debe emplear lentes de contacto cuando se manipula este producto.
- Deben evitarse temperaturas extremas en el almacenamiento de esta sustancia; almacenar en contenedores resistentes, cerrados, fríos, secos, aislados, en áreas bien ventiladas y alejados del calor, fuentes de ignición y productos incompatibles.
- Almacenar en contenedores con etiquetas; los recipientes que contengan esta sustancia, deben almacenarse separados de los vacíos y de los parcialmente vacíos.
- El almacenamiento de pequeñas cantidades de este producto, debe hacerse en contenedores resistentes y apropiados.
- Los equipos empleados para el manejo de esta sustancia, deben estar debidamente aterrizados.

**Otras precauciones:**

- La ropa y trapos contaminados, deben estar libres de este producto antes de almacenarlos o utilizarlos nuevamente.
- No utilizar presión para vaciar los contenedores.
- Los recipientes que hayan almacenado este producto pueden contener residuos de él, por lo que no

**Hoja de Datos de Seguridad**

deben presurizarse, calentarse, cortarse, soldarse o exponerse a flamas u otras fuentes de ignición.

**SECCIÓN XIII. INFORMACIÓN ADICIONAL**
**FUENTES DE INFORMACIÓN Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

- NOM-018-STPS-2000 "Sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo".
- NOM-010-STPS-1999 "Condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se manejen, transporten, procesen o almacenen sustancias químicas capaces de generar contaminación en el medio ambiente laboral".
- "Reglamento de transporte terrestre de materiales y residuos peligrosos".
- NOM-004-SCT-2008 "Sistema de identificación de unidades destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos".
- Especificación No. 405/2010 "COMBUSTÓLEO PESADO".
- NIOSH: "Pocket Guide to Chemical Hazards", "Occupational Health Guideline for Mineral Oil Mist", "IDLH Documentation".
- NFPA 400 "Hazardous Materials Code", 2010 Edition.
- Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
- Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
- NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 "Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación.

**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

<sup>1</sup> <b>ONU:</b> Número asignado por la Organización de las Naciones Unidas.	<sup>11</sup> <b>P:</b> Límite Máximo Permissible de Exposición Pico.
<sup>2</sup> <b>CAS:</b> Número asignado por la Chemical Abstracts Service.	<sup>12</sup> <b>IPVS:</b> Inmediatamente Peligroso para la Vida y la Salud. (IDLH, siglas en inglés).
<sup>3</sup> <b>SETIQ:</b> Sistema de Emergencias en el Transporte para la Industria Química.	<sup>13</sup> <b>NFPA:</b> National Fire Protection Association.
<sup>4</sup> <b>CENACOM:</b> Centro Nacional de Comunicación. (Protección Civil).	<sup>14</sup> <b>S:</b> Grado de riesgo a la Salud.
<sup>5</sup> <b>COATEA:</b> Centro de Orientación para la Atención de Emergencias Ambientales.	<sup>15</sup> <b>I:</b> Grado de riesgo de Inflamabilidad.
<sup>6</sup> <b>CCAE:</b> Centro de Coordinación y Apoyo a Emergencias.	<sup>16</sup> <b>R:</b> Grado de riesgo de Reactividad.
<sup>7</sup> <b>SCT:</b> Secretaría de Comunicaciones y Transportes.	<sup>17</sup> <b>E:</b> Grado de riesgo Especial.
	<sup>18</sup> <b>CL<sub>50</sub>:</b> Concentración Letal Media.
	<sup>19</sup> <b>DL<sub>50</sub>:</b> Dosis Letal Media.

**Hoja de Datos de Seguridad**

<p>* <b>GRE:</b> Guía de Respuesta a Emergencia.</p> <p>* <b>LMPE-PPT:</b> Límite Máximo Permissible de Exposición Promedio Ponderada en el Tiempo (TWA, siglas en inglés).</p> <p><sup>10</sup> <b>LMPE-CT:</b> Límite Máximo Permissible de Exposición de Corto Tiempo (STEL, en inglés).</p>	<p><b>NA:</b> No Aplica.</p> <p><b>ND:</b> No Disponible.</p>
---	---

NIVEL DE RIESGO					
MODELO ROMBO		S = SALUD (Rombo Azul)	I = INFLAMABILIDAD (Rombo Rojo)	R = REACTIVIDAD (Rombo Amarillo)	E = ESPECIAL (Rombo Blanco)
	4	Fatal.	Extremadamente inflamable.	Puede detonar.	Oxidante (OXI)
	3	Extremadamente peligroso.	Inflamable.	Puede detonar, requiere fuente de inicio.	Ácido (ACID)
	2	Ligeramente peligroso.	Combustible.	Cambio químico violento.	Alcalino (ALC)
	1	Riesgoso.	Combustible si se calienta.	Inestable si se calienta.	Corrosivo (CORR)
	0	Material normal.	No se quema.	Estable.	No use agua (W)
					Material radiactivo (☣)


CONTROL DE REVISIONES		
REVISIÓN	FECHA	MOTIVO
4	17/11/2011	Actualización de la especificación No. 405/2010.

**Declaración:**

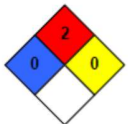
Es responsabilidad del comprador juzgar si la información aquí contenida es adecuada para sus propósitos. Pemex no asume ninguna responsabilidad por cualquier daño resultante del uso incorrecto del producto o de cualquier peligro inherente a la naturaleza del mismo.

## 11.2 Diesel PEMEX

HDSS: PR-301/04 PEMEX DIESEL

	SUBDIRECCIÓN DE AUDITORÍA EN SEGURIDAD INDUSTRIAL Y PROTECCIÓN AMBIENTAL GERENCIA DE SEGURIDAD INDUSTRIAL HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD DE SUBSTANCIAS
---	---

### SECCIÓN I. DATOS GENERALES

<b>HDSS:</b> PR-301/04	<b>PEMEX DIESEL</b>	 <p>VER DESCRIPCIÓN DE RIESGOS EN SECCIÓN XIII (PÁGINA 7)</p>	GRADO DE RIESGO NFPA <sup>3</sup> 4 SEVERO 3 SERIO 2 MODERADO 1 LIGERO 0 MÍNIMO
<b>No. ONU</b> <sup>1</sup> : 1202	<b>No. CAS</b> <sup>2</sup> : 68334-30-5		
<b>FECHA ELAB:</b> 30/10/98	<b>REV:</b> 3		<b>FECHA REV:</b> 17/05/04

ANTES DE MANEJAR, TRANSPORTAR O ALMACENAR ESTE PRODUCTO, DEBE LEERSE Y COMPRENDERSE LO DISPUESTO EN EL PRESENTE DOCUMENTO.

<b>FABRICANTE:</b> PEMEX REFINACIÓN. Subdirección de Producción. Av. Marina Nacional No. 329, Colonia Huasteca. Delegación Cuauhtémoc, México, D. F., C. P. 11311 Teléfonos: (01-55) 1944 - 9365 (horario oficina de lunes a viernes)	<b>ASISTENCIA TÉCNICA:</b> Gerencia de Control de Producción. Teléfonos: (01-55) 1944 - 8164 (horario oficina de lunes a viernes) <b>CONSULTA HOJAS DE DATOS DE SEGURIDAD:</b> Gerencia de Seguridad Industrial. Teléfonos: (01-55) 1944 - 8628 y (01-55) 1944 - 8041 (horario oficina de lunes a viernes)
<b>EN CASO DE EMERGENCIA LLAMAR A SETIQ</b> <sup>4</sup> : (las 24 Hrs.) En el interior de la República: 01-800-00-214-00. En el Distrito Federal: 5559 - 1588. Para llamadas originadas en cualquier otra parte, llame a: (011-52) 5559 - 1588.	<b>EN CASO DE EMERGENCIA LLAMAR A CENACOMF</b> <sup>5</sup> : (las 24 Hrs.) En el interior de la República: 01-800-00-413-00. En el Distrito Federal: 5550 - 1496, (4885, 1552, 1485). Para llamadas originadas en cualquier otra parte, llame a: (011-52) 5550 - 1496, (4885, 1552, 1485).

### SECCIÓN II. DATOS GENERALES DEL PRODUCTO

Familia química:	ND	Estado físico:	Líquido.
Nombre químico:	ND	Clase de riesgo de transporte SCT <sup>6</sup> :	Clase 3 líquidos inflamables.
Nombre común:	Diesel automotriz.	No. de Guía de Respuesta GRE <sup>7</sup> :	128
Sinónimos:	Aceite combustible, Diesel.		

Descripción general del producto: Mezcla de hidrocarburos parafínicos, olefínicos, y aromáticos, derivados del procesamiento del petróleo crudo. Se emplea como combustible automotriz.

### SECCIÓN III. IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES

COMPONENTE	% vol./peso	NÚMERO ONU <sup>1</sup>	NÚMERO CAS <sup>2</sup>	PPT <sup>8</sup> (mg/m <sup>3</sup> )	CT <sup>9</sup> (mg/m <sup>3</sup> )	IPVS <sup>10</sup> (mg/m <sup>3</sup> )	p <sup>11</sup> (ppm)	GRADO DE RIESGO NFPA <sup>3</sup>			
								S <sup>12</sup>	H <sup>13</sup>	R <sup>14</sup>	E <sup>15</sup>
Diesel	100 vol.	1202	68334-30-5	ND	ND	ND	ND	0	2	0	NA
Aromáticos	30 vol. Max.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA



**SECCIÓN IV. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS**

Peso Molecular	ND	Color (ASTM D-1500-98)	2.5 Máx.
Temperatura de ebullición (°C)	ND	Olor	Característico a petróleo.
Temperatura de fusión (°C)	ND	Velocidad de evaporación	ND
Temperatura de inflamación (°C)	45 Min.	Solubilidad en agua	Insoluble
Temperatura de auto ignición (°C)	ND	% de volatilidad	NA
Presión de vapor (kPa)	ND	Límites de explosividad inferior - superior	ND
Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	ND	Viscosidad Cinemática a 40°C (D445- 01) (m <sup>2</sup> /s)	1.9 x 10 <sup>-6</sup> / 4.1 x 10 <sup>-6</sup>
pH	NA	Temperatura de escurrimiento (°C) (D97-02)	0 / -5 Max.

**SECCIÓN V. RIESGOS DE FUEGO Y EXPLOSIÓN****Medio de extinción:**

Fuegos pequeños: Utilizar agua en forma de rocío o niebla, polvo químico seco, Bióxido de Carbono o espuma química.

Fuegos grandes: Utilizar agua en forma de rocío o niebla, o espuma química. No usar chorro de agua directa,

**Equipo de protección personal para el combate de incendios:**

El personal que combate incendios de esta sustancia en espacios confinados, debe emplear equipo de respiración autónomo y el traje para bombero profesional completo, el uso de este último proporciona solamente protección limitada.

**Procedimiento y precauciones especiales durante el combate de incendios:**

Utilizar agua en forma de rocío para enfriar contenedores y estructuras expuestas, y para proteger al personal que intenta eliminar la fuga.

Continuar el enfriamiento con agua de los contenedores, aún después de que el fuego haya sido extinguido.

Eliminar la fuente de fuga si es posible hacerlo sin riesgo; de no ser posible, en función de las condiciones del incendio, permitir que el fuego arda de manera controlada o proceder a su extinción.

Utilizar agua como medio de lavado para retirar los derrames de las fuentes de ignición. Debe evitarse la introducción de este producto a vías pluviales, alcantarillas, sótanos o espacios confinados.

En incendio masivo, utilice soportes fijos para mangueras o chiflones reguladores; si no es posible, retírese del área y deje que arda.

Aislar el área de peligro, mantener alejadas a las personas innecesarias y evitar situarse en las zonas bajas.

Tratar de cubrir el producto derramado con espuma, evitando introducir agua directamente dentro del contenedor.

Retírese de inmediato en caso de que aumente el sonido de los dispositivos de alivio de presión, o cuando el contenedor empiece a decolorarse. Manténgase siempre alejado de los extremos de los tanques.

**Condiciones que conducen a otros riesgos especiales:**

Sus vapores pueden formar mezclas explosivas con el aire. Pueden viajar a una fuente de ignición y regresar con flama.

Esta sustancia puede almacenar cargas electrostáticas debidas al flujo o movimiento.

Los contenedores pueden explotar cuando se calientan.

**Productos de la combustión nocivos para la salud:**

La combustión de esta sustancia genera Monóxido de Carbono y Bióxido de Carbono y otros gases asfixiantes, irritantes y corrosivos.

**SECCIÓN VI. RIESGOS DE REACTIVIDAD****Estabilidad (condiciones a evitar):**

Esta sustancia es estable a temperatura ambiente.

**Incompatibilidad (sustancias a evitar):**

Evitar el contacto con oxidantes fuertes, como Cloro líquido y Oxígeno.

**Descomposición en componentes o productos peligrosos:**

Esta sustancia no se descompone a temperatura ambiente.

**Polimerización espontánea / condiciones a evitar:**

Esta sustancia no presenta polimerización.

**SECCIÓN VII. RIESGOS A LA SALUD****EFFECTOS POR EXPOSICIÓN AGUDA:****Ingestión:**

Produce inflamación y ardor, irritación de la mucosa de la garganta, esófago y estómago.

En caso de presentarse vómito severo puede haber aspiración hacia los bronquios y pulmones, lo que puede causar inflamación y riesgo de infección.

**Inhalación:**

La exposición a concentraciones elevadas de vapores causan irritación a los ojos, nariz, garganta, bronquios y pulmones; puede causar dolor de cabeza y mareos; puede ser anestésico y puede causar otros efectos al sistema nervioso central.

**Piel (contacto):**

El contacto frecuente puede causar ardor con enrojecimiento e inflamación.

**Contacto con los ojos:**

El contacto de esta sustancia con los ojos causa irritación, así como inflamación de los párpados.

**EFFECTOS POR EXPOSICIÓN CRÓNICA:**

En la piel el contacto prolongado puede causar inflamación, resequeidad, comezón, formación de grietas y riesgo de infección secundaria.

**CONSIDERACIONES ESPECIALES:**

Substancia carcinogénica:   
 Substancia mutagénica:   
 Substancia teratogénica:  \* Especifique:  
 Otras \* :

**NOTAS:**

La NOM-010-STPS-1999, "Condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se manejen, transporten, procesen o almacenen sustancias químicas capaces de generar contaminación en el medio ambiente laboral", no incluye al Diesel.

La American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) clasifica al Diesel como una sustancia "cancerígena en animales" (clasificación A3), puntualizando que: "El agente es cancerígeno en animales de experimentación a dosis relativamente alta, por vías de administración en órganos, tejidos o por mecanismos que no son considerados relevantes para el trabajador expuesto. Los estudios epidemiológicos disponibles no confirman un aumento en el riesgo de cáncer en humanos expuestos. La evidencia sugiere que no es probable que el agente cause cáncer en humanos excepto bajo vías o niveles de exposición poco comunes e improbables. Para los A3 se debe controlar cuidadosamente la exposición de los trabajadores por todas las vías de ingreso para mantener esta exposición lo más abajo posible de dicho límite".

**INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA:**

CL<sub>50</sub><sup>16</sup> = ND DL<sub>50</sub><sup>17</sup> = ND

**Otra información:**

ND

**PROCEDIMIENTO DE EMERGENCIA Y PRIMEROS AUXILIOS:**

El personal médico que atienda las emergencias debe tener en cuenta las características de las sustancias involucradas y tomar sus precauciones para protegerse a sí mismo.

**Inhalación:**

En situaciones de emergencia, utilice equipo de protección respiratoria de aire autónomo de presión positiva para retirar inmediatamente a la víctima afectada por la exposición.

Si la víctima respira con dificultad, administrar Oxígeno.

Si la víctima no respira, aplicar respiración artificial.

¡CUIDADO! el método de respiración artificial de boca a boca puede ser peligroso para la persona que lo aplica, ya que ésta puede inhalar materiales tóxicos.

Mantenga a la víctima abrigada y en reposo.

Las personas expuestas a atmósferas con altas concentraciones de vapores o atomizaciones de diesel, deben trasladarse a una área libre de contaminantes donde respire aire fresco.

Solicitar atención médica.

**Ingestión:**

Mantener a la víctima abrigada y en reposo.

Mantener a la víctima acostada de lado, de esta manera disminuirá la posibilidad de aspiración de diesel a los bronquios y pulmones en caso de vómito.

No provocar vómito por ser peligrosa la aspiración del líquido a los pulmones.

Si espontáneamente se presenta el vómito, observar si existe dificultad para respirar.

Solicitar atención médica inmediatamente.

**Contacto con la piel:**

Retirar inmediatamente y confinar la ropa y el calzado contaminados.

Lavar ropa y calzado contaminados antes de utilizarlos nuevamente.

Lavar la parte afectada con abundante agua, hasta que se eliminen los residuos del producto.

Mantener a la víctima en reposo y abrigada para proporcionar una temperatura corporal normal.

En caso de que la víctima presente algún síntoma anormal o si la irritación persiste después del lavado, obtener atención médica inmediata.

Las quemaduras requieren atención médica especializada en forma inmediata.

**Contacto con los ojos:**

En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente con agua abundante por lo menos durante 15 minutos, o hasta que la irritación disminuya.

Sostener los párpados de manera que se garantice una adecuada limpieza con agua abundante en el globo ocular.

Si la irritación persiste obtenga atención médica inmediatamente.

**OTROS RIESGOS O EFECTOS A LA SALUD:**

Las emanaciones de Diesel son irritantes leves para los ojos, nariz y garganta.

La exposición crónica puede resultar en dermatitis crónica.

**DATOS PARA EL MÉDICO:**

El personal médico debe tener conocimiento de la identidad y características de esta sustancia.

Si la cantidad de diesel ingerida es considerable, el Médico debe practicar un lavado del estómago.

En tanto se aplica el lavado estomacal, debe colocarse a la víctima acostado de lado para que en caso de presentarse vómito, disminuya la posibilidad de aspiración de diesel hacia los bronquios y pulmones.

Cuando la aspiración de vapores de diesel causa paro respiratorio, procédase de inmediato a proporcionar respiración artificial hasta que la respiración se restablezca.

**ANTÍDOTO (DOSIS, EN CASO DE EXISTIR):**

No se tiene información.

## SECCIÓN VIII. INDICACIONES EN CASO DE FUGA O DERRAME

Procedimiento, precauciones y métodos de mitigación en caso de fuga o derrame:

*Llamar primeramente al número telefónico de respuesta en caso de emergencia.*

Eliminar todo tipo de fuentes de ignición cercana a la emergencia.

No tocar ni caminar sobre el producto derramado.

Detener la salida de producto (fuga) en caso de poder hacerlo sin riesgo.

De ser posible, los recipientes que lleguen a derramarse (fugar) deben ser trasladados a un área bien ventilada y alejada del resto de las instalaciones y de fuentes de ignición; el producto debe trasegarse a otros recipientes que se encuentren en buenas condiciones, observando los procedimientos establecidos para esta actividad.

Mantener alejado al personal que no participa directamente en las acciones de control; aislar el área de riesgo y prohibir el acceso al área de la emergencia.

Permanecer fuera de las zonas bajas donde pueda acumularse el producto y ubicarse en un sitio donde el viento sople a favor.

Debe evitarse la introducción de este producto a vías pluviales, alcantarillas, sótanos o espacios confinados.

En caso de fugas o derrames pequeños, cubrir con arena u otro material absorbente especializado.

En caso de ocurrir una fuga o derrame, aislar inmediatamente un área de por lo menos 50 metros a la redonda.

Cuando se trate de un derrame mayor, tratar de confinarlo, recoger el producto para su disposición posterior. En caso de emplear equipos de bombeo para recuperar el producto derramado, deben ser a prueba de explosión.

Ventile los espacios cerrados antes de entrar.

Todo el equipo que se use para el manejo del producto, debe estar conectado eléctricamente a tierra.

Los materiales contaminados por fugas o derrames, deben considerarse como residuos peligrosos, si por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas, representan un peligro para el equilibrio ecológico o al ambiente.

**Recomendaciones para evacuación:**

Cuando se trate de un derrame grande, considere una evacuación inicial a favor del viento de por lo menos 300 metros.

En caso de que un tanque, carro tanque o auto tanque esté involucrado en un incendio, considere un aislamiento y evacuación inicial de 800 metros a la redonda.

## SECCIÓN IX. PROTECCIÓN ESPECIAL EN SITUACIONES DE EMERGENCIA

La selección del equipo de protección personal a utilizar dependerá de las condiciones que presente la emergencia.

Donde es probable el contacto con los ojos repetido o prolongado, utilice gafas de seguridad con protección lateral.

Si es probable el contacto con brazos, antebrazos y manos, es necesario utilizar mangas largas y guantes resistentes a productos químicos.

Donde la concentración en el aire puede exceder los Límites Máximos Permisibles indicados en la sección III, y donde la ingeniería, las prácticas de trabajo u otros medios para reducir la exposición no son adecuados, puede ser necesario el empleo de equipos de protección respiratoria de aire autónomo de presión positiva aprobados para prevenir la sobre exposición por inhalación.

No utilizar lentes de contacto cuando se trabaje con esta substancia.


En las instalaciones donde se maneja esta substancia, deben colocarse estaciones de regadera-lavaojos en sitios estratégicos, las cuales deben estar accesibles, operables en todo momento y bien identificadas.

**Ventilación.-**

Debe trabajarse en áreas bien ventiladas.

Debe proveerse ventilación mecánica a prueba de explosión cuando se trate de espacios confinados.

**SECCIÓN X. INFORMACIÓN SOBRE TRANSPORTACIÓN**

Número ONU :	1202	
Clase de riesgo de transporte :	Clase 3, líquidos inflamables	
Guía de Respuesta en caso de Emergencia:	Guía número 128	
Colocar el cartel que identifica el contenido y riesgo del producto transportado, cumpliendo con el color, dimensiones, colocación, etc., dispuestos en la NOM-004-SCT/2000 y empleando cualquiera de los dos modelos que se muestran en el recuadro de la derecha.		
<p>1.-Las unidades de arrastre de autotransporte y ferroviarias empleadas en el transporte de sustancias peligrosas, deben cumplir lo dispuesto en las Normas Oficiales Mexicanas aplicables, emitidas por la Secretaría de Comunicaciones y Transportes.</p> <p>2.-Las unidades de autotransporte y ferroviarias empleadas en el transporte de sustancias peligrosas, deben usar carteles de identificación; y deben portar el número con el que las Naciones Unidas clasifica al producto que se transporta. Estas indicaciones deben apegarse a los modelos que se indican en la NOM-004-SCT-2000.</p> <p>Los carteles deben estar elaborados de acuerdo a las siguientes características:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Deben tener forma de rombo con fondo en color rojo con dimensiones mínimas de 250mm x 250mm, por lado, debiendo llevar una línea de color blanco trazada a 12.5mm del borde exterior y paralela a éste.</li> <li>➤ En el vértice superior se colocará, en color blanco el símbolo internacional de la sustancia o material que se transporte, de acuerdo a la clasificación de riesgo, en el vértice inferior el número correspondiente a su clase o división de riesgo en color blanco; en su parte media, en un rectángulo con fondo en color blanco se colocará el número de identificación de la sustancia o material peligroso, asignado por la Organización de las Naciones Unidas, en color negro.</li> <li>➤ Cuando no se ponga el número de identificación en el rectángulo central del cartel y en su lugar se indique con palabras el riesgo, deberá colocarse una placa rectangular de color naranja de 120mm de altura y 300mm de ancho como mínimo, con un borde negro de 10mm inmediatamente al lado del cartel con el número de la Organización de las Naciones Unidas en color negro.</li> </ul> <p>3.-Antes de iniciar las operaciones de llenado, debe verificarse que el contenedor esté vacío, limpio, seco y en condiciones apropiadas para la recepción del producto.</p> <p>4.-Todos los envases y embalajes; así como las unidades destinadas al transporte terrestre de productos peligrosos, deben inspeccionarse periódicamente para garantizar sus condiciones óptimas. Para fines de esta inspección, deben emplearse como referencia las Normas Oficiales Mexicanas aplicables de la Secretaría de Comunicaciones y Transportes, entre las que se puede citar la NOM-006-SCT2-2000.</p> <p>5.-Esta Hoja de Datos de Seguridad de Sustancias, debe portarse siempre en la unidad de arrastre.</p>		

**SECCIÓN XI. INFORMACIÓN SOBRE ECOLOGÍA**

Cuando se trate de un derrame mayor, tratar de confinarlo, recoger el producto y colocarlo en tambores para su disposición posterior.

El producto residual y material contaminado, debe considerarse residuo peligroso si su temperatura de inflamación es menor que 60° C y por tanto requerirá su disposición en una instalación aprobada para residuo peligroso.

El suelo afectado por fugas o derrames, así como los materiales contaminados por los trabajos de limpieza, requerirán tratamiento y/o disposición de acuerdo a lo establecido en la Norma de Restauración de Suelos y en el Reglamento de Residuos Peligrosos de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.

**SECCIÓN XII. INFORMACIÓN SOBRE MANEJO Y ALMACENAMIENTO**

El personal no debe ingerir alimentos, beber o fumar durante el manejo de esta sustancia.

El personal no debe emplear lentes de contacto cuando se manipula este producto.

Deben evitarse temperaturas extremas en el almacenamiento de esta sustancia; almacenar en contenedores resistentes, cerrados, fijos, secos, aislados, en áreas bien ventiladas y alejados del calor, fuentes de ignición y productos incompatibles.

No almacenar en contenedores sin etiquetas; los recipientes que contengan esta sustancia, deben almacenarse separados de los vacíos y de los parcialmente vacíos.

El almacenamiento de pequeñas cantidades de este producto, debe hacerse en contenedores resistentes y apropiados.

La ropa y trapos contaminados, deben estar libres de este producto antes de almacenarlos o utilizarlos nuevamente.

Trabajar a favor del viento durante la limpieza de derrames.

Los equipos empleados para el manejo de esta sustancia, deben estar debidamente aterrizados.

No utilizar presión para vaciar los contenedores.

Los recipientes que hayan almacenado este producto pueden contener residuos de él, por lo que no deben presurizarse, calentarse, cortarse, soldarse o exponerse a flamas u otras fuentes de ignición.

**SECCIÓN XIII. INFORMACIÓN ADICIONAL**

**FUENTES DE INFORMACIÓN Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

NOM-018-STPS-2000 "Sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo".  
 NOM-010-STPS-1999, "Condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se manejen, transporten, procesen o almacenen sustancias químicas capaces de generar contaminación en el medio ambiente laboral".  
 NOM-004-SCT-2000 "Sistema de identificación de unidades destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos".  
 NOM-006-SCT-2000 "Aspectos básicos para la revisión ocular diaria de la unidad destinada al autotransporte de materiales y residuos peligrosos".  
 "Reglamento de transporte terrestre de materiales y residuos peligrosos".  
 Especificación No. 301/2004 "Pemex Diesel", publicado por la Gerencia de Coordinación Comercial, dependiente de la Subdirección de Producción de PEMEX Refinación.

**ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

- |  |  |
|--|--|
| <p><sup>1</sup> <b>ONU</b>: Número asignado por la Organización de las Naciones Unidas.<br/> <sup>2</sup> <b>CAS</b>: Número asignado por la Chemical Abstracts Service.<br/> <sup>3</sup> <b>NFPA</b>: National Fire Protection Association.<br/> <sup>4</sup> <b>SETIQ</b>: Sistema de Emergencias en el Transporte para la Industria Química.<br/> <sup>5</sup> <b>CENACOM</b>: Centro Nacional de Comunicación.(Protección Civil)<br/> <sup>6</sup> <b>SCT</b>: Secretaría de Comunicaciones y Transportes.<br/> <sup>7</sup> <b>GRE</b>: Guía de Respuesta a Emergencia.<br/> <sup>8</sup> <b>LMPE-PPT</b>: Límite Máximo Permisible de Exposición Promedio Ponderada en el Tiempo (TWA, siglas en ingles).<br/> <sup>9</sup> <b>LMPE-CT</b>: Límite Máximo Permisible de Exposición de Corto Tiempo (STEL, en ingles).<br/> <sup>10</sup> <b>IPVS</b>: Inmediatamente Peligroso para la Vida y la Salud. (IDLH, siglas en ingles).</p> | <p><sup>11</sup> <b>P</b>: Límite Máximo Permisible de Exposición Pico.<br/> <sup>12</sup> <b>S</b>: Grado de riesgo a la Salud.<br/> <sup>13</sup> <b>I</b>: Grado de riesgo de Inflamabilidad.<br/> <sup>14</sup> <b>R</b>: Grado de riesgo de Reactividad.<br/> <sup>15</sup> <b>E</b>: Grado de riesgo Especial.<br/> <sup>16</sup> <b>CL<sub>50</sub></b>: Concentración Letal Media.<br/> <sup>17</sup> <b>DL<sub>50</sub></b>: Dosis Letal Media.<br/> <b>NA</b>: No Aplica.<br/> <b>ND</b>: No Disponible.</p> |
|--|--|

**NIVEL DE RIESGO**



(S) RIESGO A LA SALUD (Fondo color azul)		(I) RIESGO DE INFLAMABILIDAD (Fondo color rojo)		(R) RIESGO DE REACTIVIDAD (Fondo color amarillo)		(E) RIESGO ESPECIAL (Fondo color blanco)	
4	Fatal.	4	Extremadamente inflamable.	4	Puede detonar.	OXY	Oxidante.
3	Extremadamente Riesgoso.	3	Inflamable.	3	Puede detonar pero requiere fuente de inicio.	ACID	Ácido.
2	Ligeramente Riesgoso.	2	Combustible.	2	Cambio químico violento.	ALC	Alcalino.
1	Riesgoso.	1	Combustible si se calienta.	1	Inestable si se calienta.	CORR	Corrosivo.
0	Material Normal.	0	No se quema.	0	Estable.	W	No use agua.
						☢	Material Radiactivo.

**CONTROL DE REVISIONES**

REVISIÓN	FECHA	MOTIVO
2	30/10/98	Elaboración revisión 2.
3	17/05/04	Actualización Hoja Técnica de Especificaciones y modificación de la NOM-018-STPS-2000.

**Declaración:**

Es responsabilidad del comprador juzgar si la información aquí contenida es adecuada para sus propósitos. PEMEX Refinación no asume ninguna responsabilidad por cualquier daño resultante del uso incorrecto del producto o de cualquier peligro inherente a la naturaleza del mismo.