



## Estudio de biodegradación por *Chlorella vulgaris* de aminas alifáticas usadas como agentes de flotación

\*López Hernández Leiny Karla<sup>1</sup>, López Santiago Norma Ruth<sup>1</sup>, Gutiérrez Ruiz Margarita E.<sup>1</sup>, Ceniceros-Gómez Agueda Elena<sup>1</sup>, Martínez Jardines Luis Gerardo<sup>2</sup>, Morales Zamudio Enrique<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Laboratorio de Biogeoquímica Ambiental Av. Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 04510, México

<sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Geología. Av. Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 04510, México

<sup>3</sup>LEACSA. Alfonso Esparza Oteo 63, Guadalupe Inn, Álvaro Obregón, Ciudad de México, C.P. 01020, México

\*Autor para correspondencia: leiny.lopez04@gmail.com

### Recibido:

20/mayo/2016

### Aceptado:

05/agosto/2016

### Palabras clave

Biodegradación, Aminas, *C. vulgaris*

### Keywords

Biodegradation, Amine, *C. Vulgaris*

### RESUMEN

El estudio presenta la capacidad de biodegradación por *Chlorella vulgaris* de tres aminas alifáticas comúnmente usadas como agentes de flotación. Las aminas son añadidas como acetatos a cultivos líquidos de *Chlorella* y posteriormente cuantificadas mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento acoplado a un detector UV. Los resultados muestran un cambio importante en la concentración de las sales de dodecil y tetradecilamina, con una disminución mayor al 50%, en las primeras horas de exposición, contrario a lo observado con la amina de ocho carbonos, consecuencia asociada al alto nivel de toxicidad y baja hidrofobicidad de la amina. Por su parte, el estudio a uno y dos niveles de concentración sugiere una dependencia de la velocidad de degradación con la concentración inicial de reactivo y la proporción de nitrógeno y carbono en el medio. La caracterización de los productos de degradación por IR y MS-ESI no señalan una identidad contundente, sin embargo, señala la posible mineralización de las aminas y la generación de aminoácidos.

### ABSTRACT

The study examines the feasibility of degradation, by *Chlorella vulgaris*, of three aliphatic amines commonly used as flotation agents. The amines are added as acetates to liquid cultures of *Chlorella* and subsequently quantified by CLAR-UV. The results show a significant change in the concentration of the amine salts of twelve and fourteen carbons, with a decrease of 50% in the first few hours of exposure, contrary to what was observed with the amine of eight carbons, a result associated with high toxicity and low hydrophobicity of the amine. Additionally, the study at one and two levels of dodecylamine acetate suggests degradation rate dependence with initial concentration and the ratio of nitrogen and carbon in the medium. The characterization by IR and MS-ESI isn't conclusive as to the identity of the degradation product, however, indicates the possible mineralization of amines and amino acids generation.

## Introducción

La flotación es el principal proceso para la concentración de especies minerales útiles en una mena (Chockalingam et al., 2003). Este método involucra el uso de agentes de flotación, generalmente orgánicos, para alterar selectivamente las partículas indeseables de manera que sean apropiadas para la separación.

De los agentes de flotación comercialmente disponibles, la industria minera del hierro emplea para la eliminación de silicio un sistema de flotación a base de aminas alifáticas. Éstas se obtienen principalmente de productos naturales, por lo que comúnmente contienen una mezcla con longitudes de entre 6 y 18 carbonos. Sobre esto, el análisis reciente de un agente de flotación muestra un contenido mayoritario de los isómeros de dodecilamina (85.57%), seguido de la amina de diez (8.18%), ocho (3.00%) y catorce carbonos (2.55) (Sosa, 2014).

Si bien los agentes son agregados en una pequeña cantidad, 250 g/Ton de mineral (Sosa, 2014), el exceso termina en los efluentes de la planta, donde, debido a su baja concentración e incapacidad para ser degradados por métodos convencionales, representan un problema en el control y tratamiento de este tipo de residuos.

Históricamente se han empleado procedimientos como oxigenación, ozonación, cloración y oxidación con peróxido o permanganato (Chockalingam et al., 2003) para el tratamiento de agentes de flotación. No obstante, en los últimos años se ha optado por el uso de técnicas de biodegradación que comparadas con los métodos tradicionales son versátiles y de bajo costo. Microorganismos como *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus rettgeri* son capaces de oxidar algunos agentes de flotación (Deo y Natarajan, 2008), especialmente la bacteria *Bacillus polymyxa* ha demostrado su capacidad en la degradación acetato de dodecilamina, reactivo común en colectores de la industria minera del hierro (Chockalingam et al., 2003).

Por su parte, aunque no se tienen estudios avanzados sobre de la biodegradación de agentes de flotación por microalgas, la especie *Chlorella vulgaris*, ha demostrado una alta eficiencia en la degradación de compuestos orgánicos como *p*-nitrofenol, *p*-clorofenol, pentaclorofenol, bifenoles incluso petróleo crudo (El-Sheekh, et al. 2009; Tikko, et al. 1997; Ghasemi, et al. 2011). Además de la degradación de más de 30 compuestos azoicos para dar lugar una amina aromática más simple (Yan & Pan, 2004).

Adicionalmente, la reproducción asexual de este organismo, permite un rápido aumento de la densidad poblacional cuando el contenido de sales minerales y las condiciones ambientales son adecuadas, por lo que su biomasa ha sido empleada como suplemento nutricional (Morris et al., 1999; Syed et al., 2015), biocombustible (Suali y Sarbatly, 2012) e incluso materia prima en la remoción de metales pesados y organometalicos (Tahri et al., 2013; Tsang et al., 1999).

Por su parte, comparado con otros microorganismos como hongos y bacterias, el cultivo a gran escala de las micoralgas es más sencillo y económico debido al empleo de una fuente barata, abundante y renovable de energía: la luz solar (El-Sheekh et al., 2013).

Este trabajo tiene como objetivo estudiar la biodegradación por *Chlorella vulgaris* de tres de las sales comúnmente empleadas en agentes de flotación; acetato de octil, dodecil y tetradecilamina en ensayos simples y mixtos. Asimismo busca establecer el potencial del uso de *Chlorella vulgaris* como tratamiento y/o alternativa de remediación de sitios mineros que emplean agentes de flotación y caracterizar el producto de degradación de las sales de aminas alifáticas por acción de la microalga.

## Metodología

### Reactivos y disolventes

Se emplearon las sales de amonio de las aminas de ocho, doce y catorce carbonos preparadas a partir de ácido acético glacial de la casa comercial J.T. Baker con una pureza del 99.7% y los estándares de aminas alifáticas correspondientes Sigma Aldrich con una pureza igual o mayor a 98%. La reacción de derivatización de la amina se realizó con 4-cloro-7-nitrobenzofurazan Sigma Aldrich con una pureza del 98% (Cloro-NBD) y Tetraborato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) comercial, mientras que en el análisis cromatográfico se emplearon los disolventes metanol (MetOH) J.T. Baker grado cromatográfico, acetonitrilo (ACN) J.T. Baker grado cromatográfico y agua nanopura (tipo I) con una resistividad de 18 M $\Omega$ .

### Cepa

La especie *Chlorella vulgaris* empleada en el estudio se obtuvo del laboratorio de Algas continentales de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

### Condiciones de cultivo

El crecimiento de *Chlorella vulgaris* y los bioensayos (cultivos sujetos a experimentación) se desarrollaron en un medio de cultivo Bristol modificado con las sales indicadas en la Tabla 1. Las sustancias empleadas provienen de la marca comercial J.T. Baker y poseen una pureza mayor al 90%.

Tabla 1. Sales medio Bristol modificado

Sal	Masa (g)
NaNO <sub>3</sub>	6.26
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.63
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	1.87
NaCl	0.62
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.87
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.37

Todos los cultivos y ensayos, se mantienen a temperatura ambiente y bajo iluminación artificial (luz fría) en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. El crecimiento del cultivo es monitoreado mediante la determinación de biomasa por análisis gravimétrico en función del tiempo.

### Estudios de biodegradación

Previo a los estudios de degradación se construyeron las curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* en ausencia de proteosa peptona, una fuente importante de carbono y nitrógeno. El análisis de las etapas de crecimiento permitió seleccionar a la fase estacionaria como la más apta para realizar los ensayos, periodo donde el número de células en el cultivo permanece constante en función del tiempo.

### Bioensayos de exposición a acetados de aminas

Las sales de amonio fueron añadidas como un sustituto de peptosa petona en ensayos simples (una amina) y mixtos (mezcla de aminas).

La Tabla presenta la relación de concentraciones y el tiempo de exposición para los acetatos de aminas en ensayos simples y mixtos. En los primeros, el volumen de alícuota del cultivo de partida fue de 1.5 mL, mientras que en los mixtos se partió de un volumen de 1 mL, en ambos el volumen final de bioensayo fueron 10 mL

Para cada concentración y tiempo de exposición se establecen los experimentos presentados en la siguiente sección.

- **Blanco microalgas:** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* en condiciones de crecimiento normales (luz fría y temperatura ambiente)..
- **Blanco de acetato de amina.** Disolución de acetato de amina preparada en el momento del análisis.
- **Testigo de acetato de amina.** Medio de cultivo estéril y acetato de amina sometido a condiciones de luz fría y temperatura ambiente
- **Testigo de ácido acético.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y ácido acético en la misma concentración que el bioensayo.
- **Bioensayo.** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y acetato de amina
- **Duplicado (bioensayo).** Cultivo líquido de *Chlorella vulgaris* y acetato de amina.

Tabla 2. Relación de concentraciones y tiempo de exposición en los ensayos de exposición (\*concentración por amina).

Ensayos simples		
Amina	Concentración (mg/L)	Tiempo (horas)
A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	1, 2, 3, 4
A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	5,10, 15, 20, 25, 30
	5.0	6, 12, 24, 36, 48
A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub>	2.1	5,10, 15, 20, 25, 30
Ensayos mixtos		
Mezcla de aminas	Concentración (mg/L)	Tiempo (horas)
A-C <sub>8</sub> NH <sub>2</sub> - A-C <sub>12</sub> NH <sub>2</sub>	2.1*	2, 4, 6, 8
AC <sub>12</sub> NH <sub>2</sub> - A-C <sub>14</sub> NH <sub>2</sub>	2.1*	3, 6, 9, 12

### Análisis por cromatografía de líquidos de alto rendimiento

Posterior al tiempo de exposición, cada uno de los experimentos fue centrifugado en un equipo Hettich Zentrifugen Universal 30 F a 220 rpm por 10 minutos. El sobrenadante es derivatizado con 4-cloro-7-nitrobenzofurazan a un pH=9 y temperatura de 70°C por espacio de una hora en un calentador multi-bloques Barnstead International modelo 2052, método propuesto por Hao y colaboradores y modificado para fines de la presente investigación (Hao et al., 2004; Sosa, 2014).

El producto de la derivatización fue analizado por cromatografía de líquidos de alto rendimiento bajo condiciones isocráticas en una Columna Hypersil Gold C18 de 150x4.6 mm y un sistema de bombeo Waters 410 con un controlador Water Automated Gradient Controller. Se detectó a 470 nm en un detector Ultravioleta-Visible, Spectra Focus de Thermo Separation Products. La composición de la fase móvil es una mezcla ACN-H<sub>2</sub>O en proporción 85:15 a un pH=4.5 (buffer de acetatos). Se inyectó un volumen de 200µL

### **Caracterización del producto de degradación**

El producto de degradación y los estándares de aminas, sin derivatizar, fueron caracterizados mediante espectroscopia infrarroja, en un equipo con transformada de Fourier (FT-IR) de Thermo-Nicolet Modelo 1510. La muestra fue analizada por película sobre celda de ATR.

### **Caracterización mediante espectrometría de masas por inducción directa**

Los espectros de masas de los productos de degradación y los estándares se obtuvieron en un equipo Advion Expression S, por introducción directa a una fuente de ionización ESI con un Ffujo de disolvente (metanol) de 0.2 mL/min.

## **Resultados y discusión**

### **Crecimiento de *Chlorella vulgaris***

La fase estacionaria de *Chlorella vulgaris* en un cultivo en ausencia de proteosa se establece a los 32 días tras las inoculaciones. Etapa donde las sales de amonio son añadidos.

La evaluación del control de microalgas muestra un valor constante de biomasa durante el tiempo de experimentación. De manera análoga el crecimiento del testigo se mantiene invariable.

### **Estudios de biodegradación**

#### **Estabilidad del acetato de amina en el medio de cultivo**

El análisis del blanco de acetato de amina (preparado en el momento del análisis cromatográfico), frente a la concentración obtenida en el testigo de acetato (sometido a condiciones de luz fría y temperatura ambiente), muestra que la concentración las sales de amonio se mantiene relativamente constante a lo largo del ensayo. con un porcentaje de recobro del 93.4 % del acetato de dodecilamina, similar al encontrado para las sales de C<sub>8</sub> y C<sub>12</sub>. Por lo que se descartan efectos de adsorción degradación fotoquímica.

Por su parte, el análisis cromatográfico del testigo de ácido acético no presenta señales que puedan atribuirse a un falso positivo en la detección de las aminas.

#### **Bioensayos simples con acetatos de aminas**

En análisis cromatográfico de los bioensayos revela un cambio en la concentración de las sales de amonio en función del tiempo. Los derivados con cuantificados a un

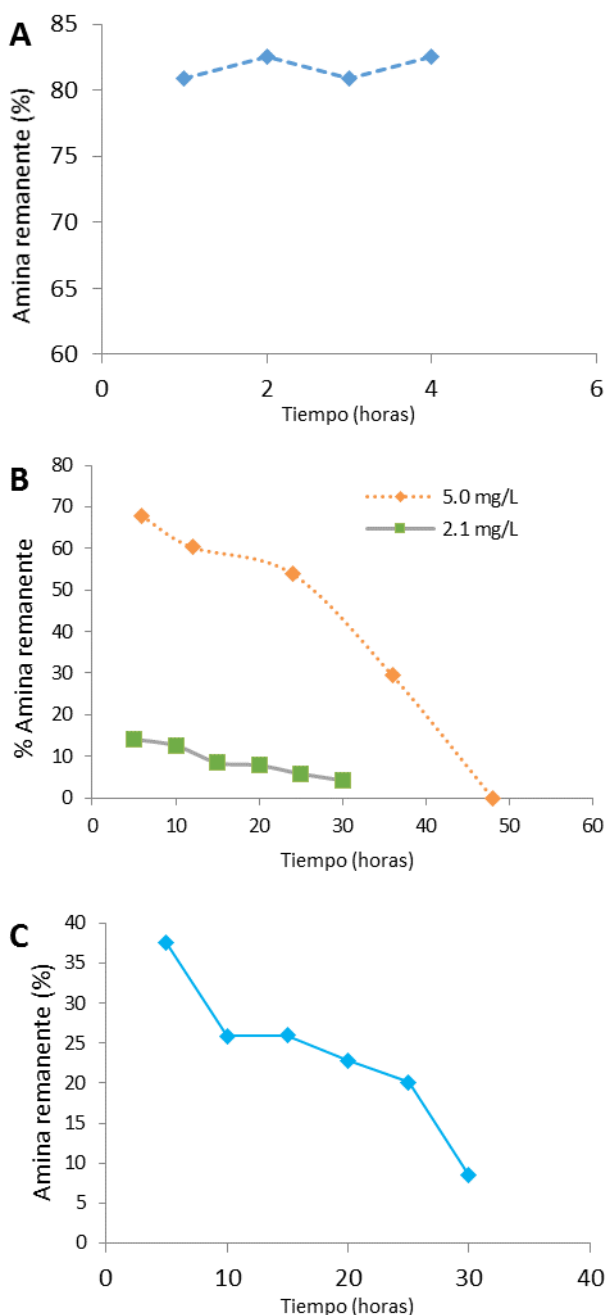
tiempo de retención de 5, 7 y 14 minutos para los derivados de octil, dodecil y tetradecilamina respectivamente. Cada muestra es inyectada por triplicado con un coeficiente de variación del 2%.

La Figura 1 muestra el cambio en la concentración de A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub>, A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> en los ensayos analizados. Los datos presentados son el promedio del bioensayo y su duplicado. A excepción del ensayo con acetato de octilamina, los bioensayos expuestos a dodecil y tetradecilamina muestran una disminución drástica del agente (mayor al 50%) durante las primeras cinco horas de exposición, efecto al que sigue un cambio gradual en la concentración hasta un valor cercano al 2% de remanente. Este comportamiento sugiere en primer momento la adsorción inmediata de la amina en la pared celular de la microalga (Tsang et al., 1999), seguido por un proceso de intercambio iónico y probable puente hidrógeno (Wong, 1992).

Diversos tipos de microalgas, entre ellas *Chlorella vulgaris*, han mostrado su eficacia en la degradación de compuestos nitrogenados, especialmente colorantes azóicos (El-Sheekh et al. 2009). Algunas de estas algas son capaces de eliminarlos de una solución mediante bioacumulación o biotransformación (Lei et al., 2002). Procesos que aunados a la limitación de los nutrientes en el medio en fase estacionaria aluden al aprovechamiento de la amina como fuente de carbono y nitrógeno, además de su probable adsorción en la pared celular de la microalga.

Adicionalmente, los resultados a dos niveles de concentración de acetato de dodecilamina muestran una dependencia entre la cantidad de amina agregada y la velocidad de degradación en las primeras horas de exposición, siendo menor ésta última cuando la cantidad de agente en el medio aumenta. Esto sugiere que una cantidad grande amina requiere un periodo prolongado de adaptación inicial de las células antes de comenzar la remoción del agente externo, comportamiento que también ha sido observado en los estudios de biodegradación de acetato de dodecilamina con la bacteria *Bacillus polymixa* (Deo y Natarajan, 1998).

Por su parte, el ensayo con acetato de octilamina no presenta variaciones importantes en la concentración, como consecuencia del corto tiempo de exposición (establecido de acuerdo al alto nivel de toxicidad y baja concentración de la amina en el agente de flotación), sin embargo, comparado con el comportamiento de *Chlorella vulgaris* frente a las aminas de doce y catorce carbonos, el cambio nulo indica la incapacidad de la microalga para asimilarla.



**Figura 1.** Cambio en la concentración de A. A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/LB. A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 y 5 mg/L C. A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/L

### Bioensayos mixtos con acetatos de aminas

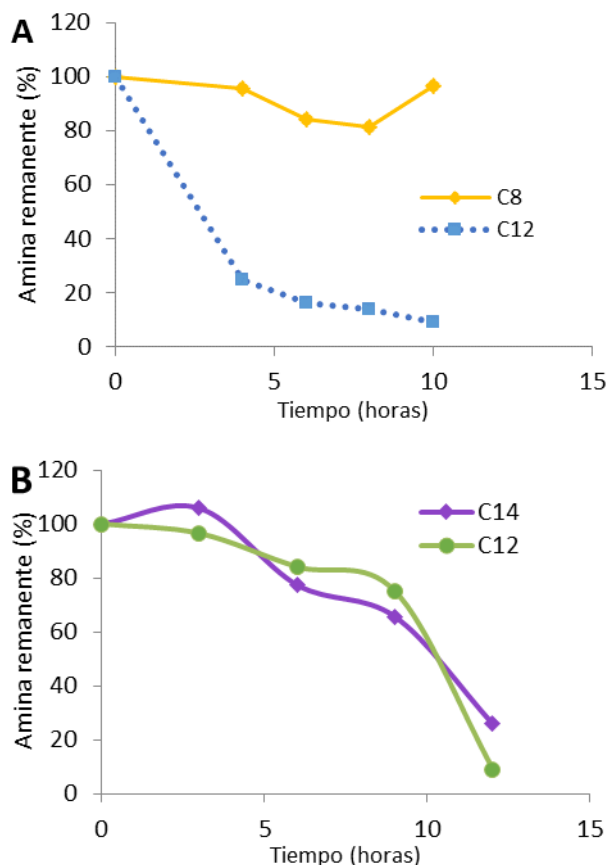
Los ensayos simples muestran la capacidad de *Chlorella vulgaris* para consumir las sales de aminas de doce y catorce, sin embargo, algunos estudios sugieren que las mezclas de aminas pueden ser más tóxicas que los ensayos individuales (Blanck, 1985). Ante esto, se plantearon bioensayos mixtos A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub>- A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> y A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>- A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>, con la finalidad de evaluar el cambio de la concentración cuando existen dos sales de amonio en el medio. Los resultados obtenidos del análisis cromatográfico se muestran en la Figura 2. Dada la toxicidad de la amina de ocho carbonos, el ensayo mixto con dodecilamina se realizó a un corto periodo de tiempo de exposición. La concentración inicial para cada amina es de 2.1 mg/L.

Los valores obtenidos exponen la poca desviación de la concentración de la sal de amonio de ocho carbonos, contrario a lo observado en la sal de dodecilamina con una disminución importante de cerca del 80% apenas a las primeras cuatro horas de exposición.

El comportamiento observado se explica en términos del logaritmo del coeficiente octanol-agua (logP<sub>ow</sub>), medida de la hidrofobicidad de los compuestos y directamente relacionado con la facilidad con que éstos pueden acumularse o ser asimilados por la pared celular de los microorganismos. Sobre esto, Geyer, Politziki y Freitag desarrollaron un modelo de predicción ecotoxicológico donde se establece una correlación lineal entre el logP<sub>ow</sub> y el factor de bioacumulación de compuestos orgánicos en un alga de la especie *Chlorella* (Geyer et al., 1984). Relación que establece un mayor efecto de bioacumulación (o asimilación, para fines de este estudio) en la pared celular del alga cuando el logP<sub>ow</sub> de los compuestos es mayor a 4.

Para las aminas de ocho y doce carbonos el valor de logP<sub>ow</sub>es de 3.094 y 5.132 respectivamente (Thewalim et al., 2011), por lo que, basado en estos valores y la relación trazada por Geyer y colaboradores, *Chlorella vulgaris* selecciona a la sal de amina de doce carbonos sobre la de ocho.

Por su parte, los valores de logP<sub>ow</sub> de dodecil y tetradecilamina son 5.132 y 6.151 respectivamente (Thewalim et al., 2011), datos que aunado a lo presentado en el ensayo mixto, exponen la capacidad de la microalga para asimilar ambas aminas a una velocidad similar.



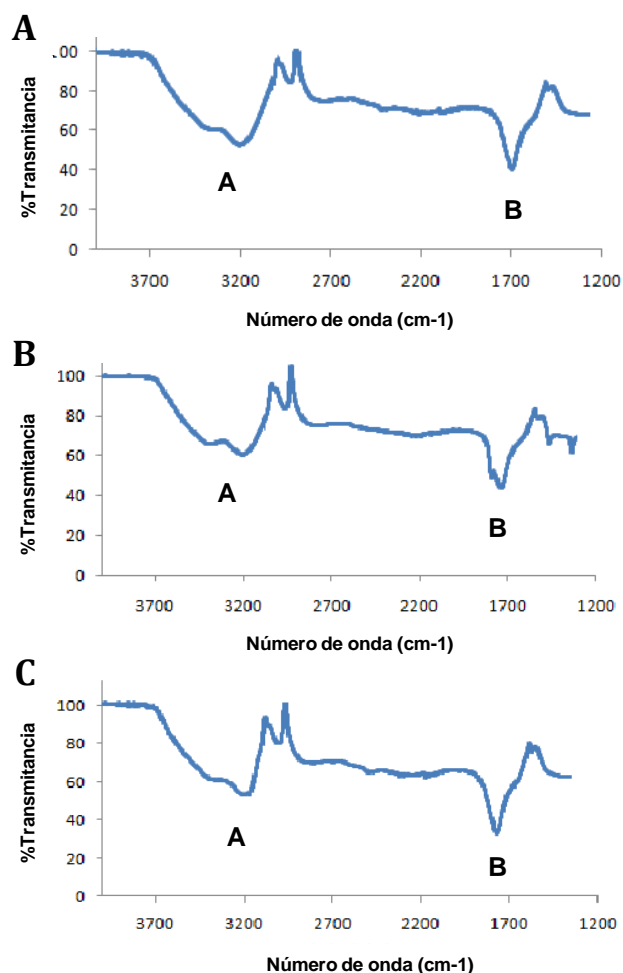
**Figura 2.** Cambio en la concentración de **A.** A-C<sub>8</sub>NH<sub>2</sub> - A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> 2.1 mg/L y **B.** A-C<sub>12</sub>NH<sub>2</sub>- A-C<sub>14</sub>NH<sub>2</sub>2.1mg/L

Adicionalmente, en los ensayos simples se observó que el acetato de tetradecilamina presentaba una reducción ligeramente más lenta comparada con la del acetato de dodecilamina a la misma concentración, efecto no observado en el ensayo mixto ya que ambas aminas presentan una disminución similar, lo anterior indica que la velocidad de degradación está limitada únicamente por la cantidad de biomasa depositada en el bioensayo, única diferencia entre el ensayo simple y mixto. Por lo que la cantidad de biomasa es considerada un factor importante en la asimilación e incluso podría modificar la sensibilidad de las algas hacia las aminas.

### Caracterización del producto de degradación

#### Análisis por espectroscopia infrarroja

Algunos microorganismos son capaces de transformar aminas, mediante reacciones oxidativas, en aldehídos o compuestos nitro (Araujo et al., 2010; Sosa, 2014). Con base en esto, se obtuvieron los espectros infrarrojo de los productos de degradación a 48 horas de exposición mostrados en la Figura 3.



**Figura 3.** Espectros infrarrojos de los productos de degradación a 48 horas de exposición de **A.** Acetato de octilamina **B.** Acetato de dodecilamina **C.** Acetato de tetradecilamina.

En el espectro existen dos conjuntos de señales importantes (presentadas como A y B), las primeras en 3200-3500 cm<sup>-1</sup> indican la presencia de agua en el medio, así como la existencia del grupo amino debida al estiramiento asimétrico del enlace N-H. Mientras que la banda en 1660 cm<sup>-1</sup> que sugiere la suma de dos señales denota la presencia de más de una funcionalidad, siendo el carbonilo una de ellas.

En relación a lo observado, en estudios biológicos con proteínas se han obtenido señales cercanas a 3300 cm<sup>-1</sup> debido a la tensión del enlace N-H, así como un desplazamiento del carbonilo a un número de onda de 1660 y 1630 cm<sup>-1</sup> por la tensión del enlace C-O (Barraza et al., 2013), estos valores plantean, sin llegar a ser contundente, la presencia de proteínas en el bioensayo.

### Análisis por espectrometría de masas

Por su parte, diversas investigaciones de degradación con bacterias de agentes de flotación, muestran la capacidad de los microorganismos para suplir sus requerimientos de nitrógeno y carbono con este tipo de compuestos, premisa que también es aplicada a este estudio. Durante este proceso de aprovechamiento ocurren diferentes reacciones secuenciales que incluyen la descarboxilación, desaminación, hidrólisis y finalmente la oxidación de las aminas. Y si bien, el paso esencial es la generación de un aminoácido y otras reacciones metabólicas típicas de los productos formados a partir del mismo (Deo y Natarajan, 1998), no se descarta la presencia de derivados nitro o aldehídos en el bioensayo. Por lo que, se obtienen los espectros de masas (por inducción directa) de octil, dodecil y tetradecilamina y los bioensayos con acetato de dodecilamina a 24 y 48 horas de exposición. Tanto los estándares como los ensayos se analizan por ionización química con metanol (ESI), técnica que únicamente permite observar iones moleculares, aductos y ocasionalmente algunos fragmentos. El espectro de masas de las aminas, se presenta en la Figura 4.

En el caso de las aminas primarias analizadas por ESI, se generan dos señales importantes, la primera corresponde al ión  $[R-NH_3]^+$  (pico base) como consecuencia de la adición de un protón a cada molécula de amina, mientras que la segunda indica la existencia del ión  $[M+H+CH_3OH]^+$ , donde M es la amina, cuya formación se debe al acoplamiento de una molécula de disolvente al compuesto protonado (Nova, 2015). Para cada uno de los espectros anteriores, la tabla 3, muestra la relación de señales para los iones antes descritos.

Adicionalmente, en los espectros de la amina de ocho y doce carbonos se observan señales débiles en 227, 298.6 y 226.7 m/z, que pertenecen a los clusters de metanol formados al contacto con la fuente de ionización, puesto que no existe una separación previa de los mismos.

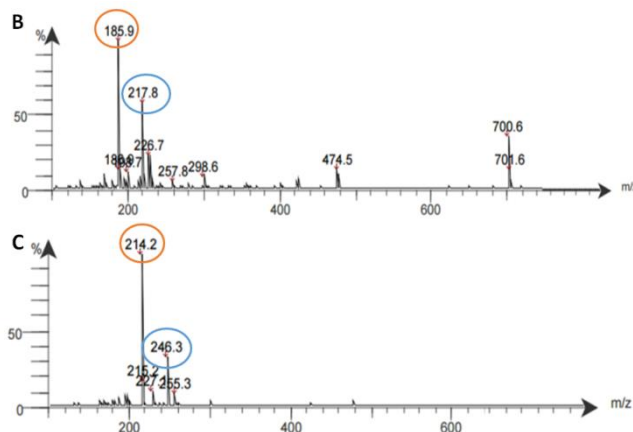
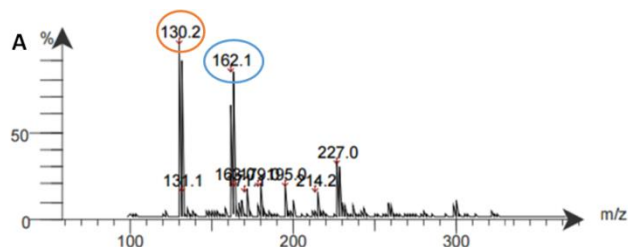


Figura 4. Espectros de masas por ESI de A. Octilamina B. Dodecilamina y C. Tetradecilamina

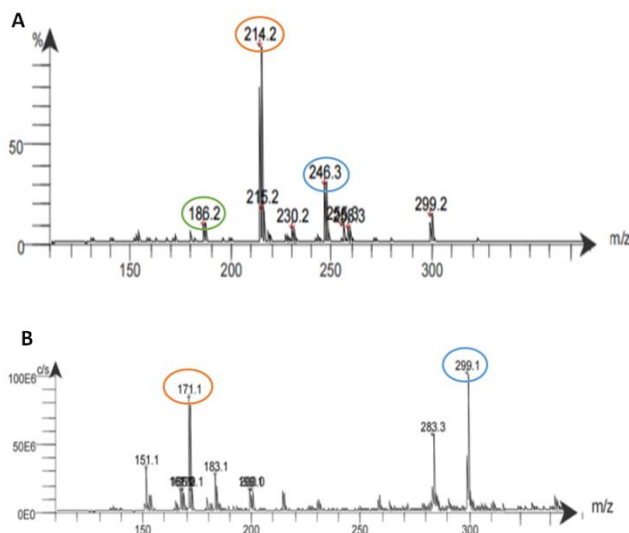
Tabla 3. Relación de las señales con los iones formados

Amina	Masa molecular (uma)	Iones formados	
		$[R-NH_3]^+$	$[M+H+CH_3OH]^+$
Octil	129.5	130.2 m/z	162.1 m/z
Dodecil	185.4	185.9 m/z	217.8 m/z
Tetradecil	213.4	214.2 m/z	246.3 m/z

Por su parte, el espectro de los ensayos de acetato de dodecilamina a 24 horas y 48 horas de exposición se presentan en la Figura 5. Después de un día de exposición, el espectro presenta un pico base en una relación carga/masa de 214.2 que corresponde al ión M+H, donde M es el probable compuesto de degradación con una masa molecular de 213 uma, valor que indica la presencia de un átomo de nitrógeno en la molécula, que no pertenecen a los aminoácidos dada la relación m/z, ya que estos se presentan a valor mucho más altos.

Además, se observa la señal de un aducto causado por la adición del disolvente al compuesto protonado en una m/z de 246.3, así como un remanente de la amina agregada en un valor de 186.2 m/z.

Por su parte el espectro a 48 horas de exposición ya no muestra la señal característica de la amina ni la asignada al producto de degradación, en su lugar se observa un pico base en 299.1 m/z seguido por una señal en 171 m/z, ambos asociados a los clusters del metanol. Ante esto, se establecen dos posibilidades, la sugiere una conversión directa a la mineralización de la amina que posteriormente es aprovechada en la síntesis de aminoácidos. Mientras que la segunda, y más viable, expone que el producto de degradación es también asimilado por la especie.



**Figura 5.** Espectro de masa por ESI del bioensayo con acetato de dodecilamina a **A.** 24 horas y **B.** 48 horas de exposición

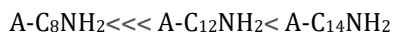
### Conclusiones

Los resultados obtenidos en el estudio demuestran la capacidad de *Chlorella vulgaris* para degradar dos de las sales de amino tres aminas comúnmente utilizadas en agentes de flotación.

Los ensayos simples de los acetatos de dodecil y tetrdecilamina revelan la reducción drástica de la concentración inicial cuando son añadidos a un cultivo líquido de *Chlorella vulgaris*, a diferencia de la amina de ocho carbonos que no puede ser asimilada por la especie.

Por su parte, el estudio a dos niveles de concentración sugiere una dependencia de la velocidad de degradación en función de la concentración inicial de la sal de amina. Efecto que alude al tiempo de adaptación que requiere la microalga antes de la remoción del agente.

Asimismo, existe una relación entre el número de carbonos y la capacidad de absorción de la microalga, ligado a su vez con la hidrofobicidad de los compuestos. Un mayor carácter apolar en la molécula permite una afinidad superior con la pared celular en la microalga y en consecuencia es mejor asimilada. De esta manera, el orden de asimilación/degradación de las aminas empleados en el ensayo es:



Disposición también dictada por la toxicidad de las aminas siendo la primera más tóxica que sus pares.

Por su parte, la caracterización del producto de degradación no establece de manera contundente la identidad del mismo. Mientras el análisis por infrarrojo sugiere la existencia de aminoácidos en el medio como consecuencia del aprovechamiento de la fuente nitrógeno que representan las sales de aminas, la espectrometría de masa por inducción directa presenta un probable nitrocompuesto (descartando aminoácidos por relación m/z). Lo anterior sugiere una degradación extensiva de la amina hasta la mineralización o bien en el aprovechamiento por la microalga del producto como fuente de carbono y nitrógeno.

Como último punto, dado que la mineralización de la sal de amina sugiere una conversión a amoníaco y nitratos, un seguimiento de la concentración de nitrógeno total durante los ensayos revelaría las posibles pérdidas o en su caso confirmaría la conversión total de la amina al nitrocompuesto o aminoácido. Además, se sugiere el análisis de la biomasa de la microalga mediante técnicas de extracción en fase sólida con la finalidad de identificar la posible adsorción de la amina e incluso del producto de degradación.

### Agradecimientos

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química de la UNAM y a la sección 024 de la AAPAUNAM por el apoyo otorgado a través de la Cátedra Fernando Orozco en el periodo de abril a septiembre de 2015.

Al Dr. Mario Villalobos por su apoyo en el uso de sus instalaciones de su laboratorio para fines de este proyecto.

### Referencias

Araujo D., Yoshida M., Takashi J., Carvalho C., Stapelfeldt, F. (2010). Biodegradation studies on fatty amines used for reverse flotation of iron ore. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 64: 151-155.

Barraza G., De la Rosa L., Martínez A., Castillo H., Cotte M., Álvarez E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de sistemas biológicos. *Rev. Latinoam. Quím.*, 41(3), 125-148.

Chockalingam E., Subramanian S., Natarajan K. (2003). Studies on biodegradation of organic flotation collectors using *Bacillus polymyxa*. *Hydrometallurgy*, 71: 249-256.

Deo N., & Natarajan K. (2008). Biodegradation of some organic flotation reagents by *Bacillus polymyxa*. *Bioremediat. J.*, 2: 205-214.





- El-Sheekh M., Gharieb M., &Abou-El-Souod G. (2009). Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria.*Int. Biodeterior. Biodegradation*, 82: 699-704.
- El-Sheekh M., Hamouda R., &Nizam A. (2013). Biodegradation of crude oil by *Scenedesmusobliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions.*Int. Biodeterior. Biodegradation*, 82: 67-72.
- Geyer H., Politziki G., &FreitagD. (1984). Prediction of ecotoxicologicalbehaviour of chemicals: relationship between n-octanol/water partition coefficient and bioaccumulation of organic chemicals by alga *Chlorella*. *Chemosphere*, 13: 269-284.
- Ghasemi Y., Rasoul S., &Fotooh E. (2011). The biotransformation, biodegradation and bioremediation of organic compounds by microalgae.*J. Phycol.*, 47: 969-980.
- Hao F., Lwin T., Buckard J., & Woodcock J. T. (2004). Determination of aliphatic amines in mineral flotation liquors and reagents by high-performance liquid chromatography after derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan.*J. Chromatogr. A*, 1055: 77-85.
- Lei A., Wong Y., Tam N. (2002). Removal of pyrene by different microalgal species. *Water Sci. Technol.*, 46, 195-201.
- Morris H., Quintana M., Almareles, Á., & Hernández, L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Rev Cubana AlimentNutr.*, 13: 123-128.
- Nova C. (2015). HPLC-Masas: Instrumentación, ionización y mantenimiento. (págs. 1-31). Madrid: Instituto Tecnológico La Marañosa.
- Sosa I. (2014). Evaluación ambiental del uso de aminas en procesos de flotación. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Suali E., Sarbatly R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renew. Sust.Energ. Rev.*, 16: 4316-4342.
- Syed S., Ashok A., Indhumathi P. (2015). The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which caters the Vitamins, Minerals in General. *J. BioSci.Biotechnol.*,7(1), 185-190.
- Tahri N., Wifak B., Hanane S., El ghachtouli N., (2013). Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms, Biodegradation - *Life of Science, In Tech*. p. 378.
- Thewalim Y., Bruno O., Colmsjo A. (2011). Study of the gas chromatographic behavior of selected alcohols and amines. *Anal.Bioanal. Chem.*, 399: 2335-1345.
- Tsang K., Lau S., Tam Y., & Wong S. (1999). Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species. *Environ. Pollut.*, 105: 289-297.
- Wong B., Oberholser K., (1992). Amine-Algae Interactions: Cation Exchange and Possible Hydrogen Bonding. *Environ. Sci. Technol*, 26: 1523-1526.
- Yan H., Pan G. (2004). Increase in biodegradation of dimethyl phthalate by *Closteriumlunula* using inorganic carbon. *Chemosphere*, 55: 1281-1285.