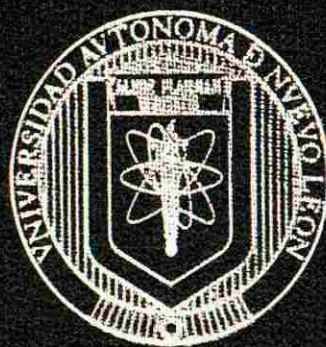


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO Y EVALUACION DE UN PROCEDIMIENTO
DE MICROEXTRACCION EN FASE SOLIDA PARA LA
DETERMINACION DE HIDROCARBUROS AROMATICOS
POLICICLICOS EN AGUA POTABLE

Por

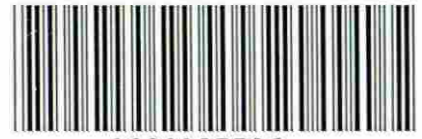
Q.C.B. JUAN RICARDO LUCIO GUTIERREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación
Terminal en Química Biomédica

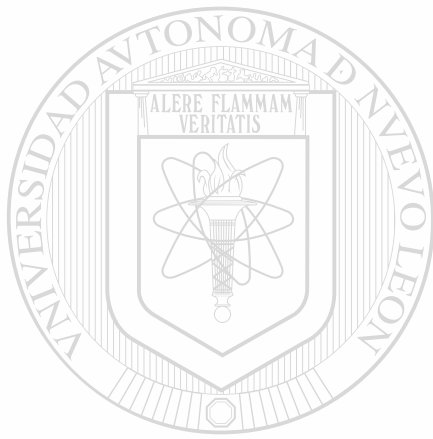
AGOSTO, 2005

TM
QD341
.H9
L8
2005
c.1

Q.C.B. JUAN RICARDO LUCIO GUTIERREZ



1080127596

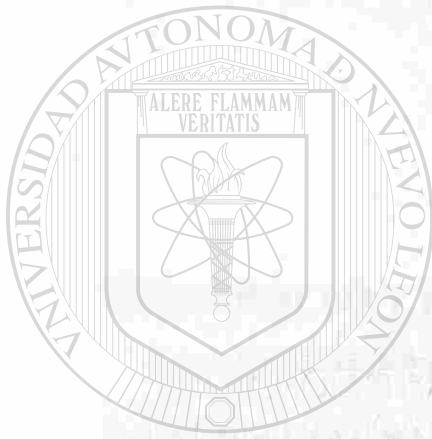


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

D.G.B. JUAN TRUJANO LLIBRE, GUERRERO

Como requisito parcial para obtener el título de

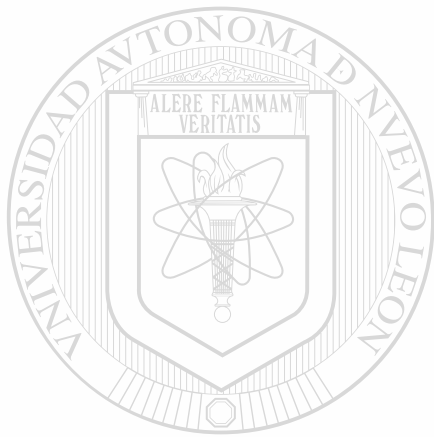
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN

Terminal en Gestión Bibliotecaria

AGOSTO 2015



TM
QD341
-H9
L8
2005



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

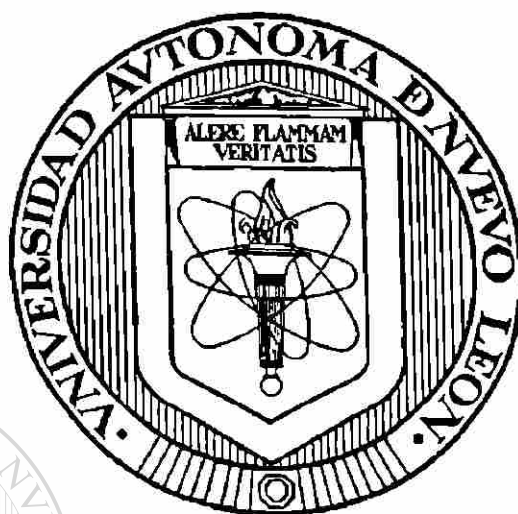
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO
DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA
DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS**

POLICÍCLICOS EN AGUA POTABLE

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por

Q.C.B. JUAN RICARDO LUCIO GUTIÉRREZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación
Terminal en Química Biomédica**

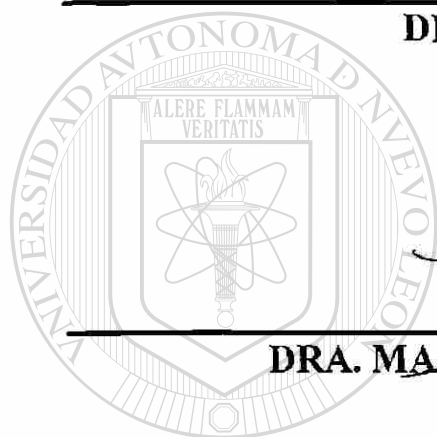
Agosto, 2005

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO
DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA
DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS EN AGUA POTABLE**

Aprobación de Tesis:



DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS
Director de Tesis



DRA. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Co-Director de Tesis



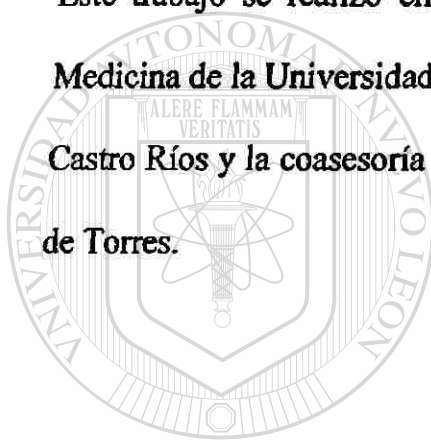
DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE
MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN AGUA POTABLE

Presentado por:

Q.C.B. JUAN RICARDO LUCIO GUTIÉRREZ

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Rocío Castro Ríos y la coasesoría de la Dra. Ma. de la Luz Salazar y la Dra. Noemí Waksman de Torres.



U A N L
FIRMAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DIRECTOR

CO DIRECTOR

®

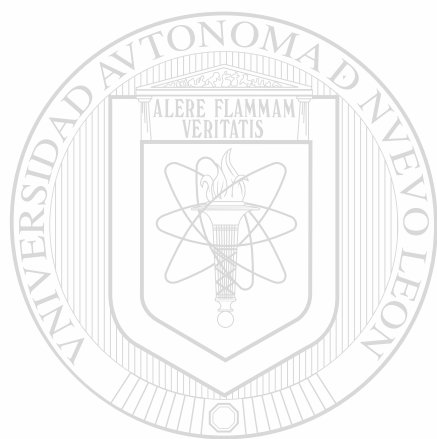
Dra. Rocío Castro Ríos

Dra. Noemí Waksman de Torres

CO DIRECTOR

Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos

A mi familia, mi madre Oralia Gutiérrez,
mi padre Juan Lucio (†), mis hermanos
Pedro y Silvia, y a todos los que creyeron
en mí alentándome a seguir por el camino
del aprendizaje.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las cosas simples son las más extraordinarias,

y sólo los sabios consiguen verlas.

El Alquimista
Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

A Dios quién me da fuerza para enfrentar los retos que surgen en el cumplimiento de mi Leyenda Personal y seguir por el sendero de la vida cada día.

A mi familia por su apoyo y comprensión.

A mis asesores: la Dra. Rocío Castro Ríos, la Dra. Ma. de la Luz Salazar y a la Dra. Noemí Waksman de Torres, por su tiempo, esfuerzo y por la formación que me dejaron.

A la Dra. Ma. de la Luz Salazar por su apreciable amistad y por enseñarme que las cosas más complicadas pueden ser resueltas si se analizan con calma, fe y optimismo. Gracias por contagiarme cada día de su alegría y por haberme presentado el fascinante mundo de la investigación, cuyos límites radican en uno mismo y cuya explotación yace en la curiosidad y la creatividad.

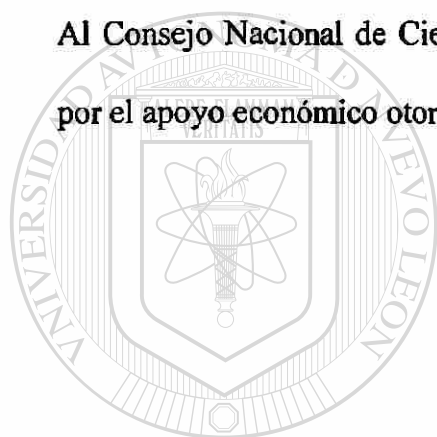
A la Dra. Noemí Waksman de Torres, por sus enseñanzas académicas y ser un ejemplo de liderazgo. Por darme la oportunidad de ser miembro del Departamento a su digno cargo.

A mis amigos Anabel, Bricehidy, Blanca y Jonathan, por su compañerismo, por darme ánimos y por aguantare en los momentos más difíciles que pasé.

A mis maestros de Licenciatura, por compartir sus enseñanzas y experiencia profesional conmigo. A todos y cada uno de los maestros de la formación básica, media y media superior, por haber contribuido a despertar en mí el interés por las ciencias naturales y darme la formación necesaria para llegar a donde estoy.

A las Técnicas Marivel, Ivonne y Graciela por su buena disposición y por que sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Fundación Telmex por el apoyo económico otorgado.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

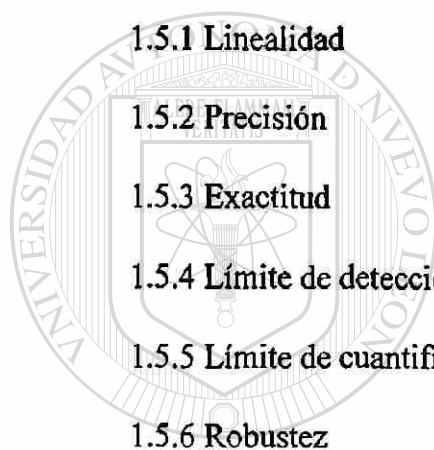


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El agua	1
1.1.1 Generalidades y clasificaciones	1
1.1.2 Características del agua	3
1.1.3 Tipos de contaminantes y sus propiedades	4
1.1.4 Tratamiento del agua	5
1.1.4.1 Decoloración	6
1.2 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs)	7
1.2.1 Generalidades de los PAHs	7
1.2.2 Clasificaciones y estructuras	8
1.2.3 Propiedades químicas y físicas generales	10
1.2.4 Toxicidad	11
1.2.5 Normatividad nacional e.internacional	13
1.3 Métodos Analíticos	15
1.3.1 Cromatografía de líquidos	16
1.3.2 Cromatografía de gases	17
1.3.3 Electroforesis capilar	19

1.4 Tratamiento de muestra	19
1.4.1 Extracción líquido – líquido	20
1.4.2 Extracción en fase sólida	21
1.4.3 Microextracción en fase sólida (SPME)	21
1.4.3.1 Descripción del dispositivo para la SPME	24
1.4.3.2 Procedimiento de la SPME	26
1.4.3.3 Estudio de PAHs en agua por SPME	27
1.5 Validación	28
1.5.1 Linealidad	28
1.5.2 Precisión	29
1.5.3 Exactitud	29
1.5.4 Límite de detección	29
1.5.5 Límite de cuantificación	30
1.5.6 Robustez	31
1.6 Diseño experimental	31
1.6.1 Diseño factorial	32
1.6.2 Diseño simplex	34
1.7 Justificación	37
1.8 Objetivos	37
1.8.1 Objetivo general	37
1.8.2 Objetivos específicos	38



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

2. MATERIAL Y MÉTODOS	39
2.1 Equipo, material y reactivos	39
2.1.1 Equipo	39
2.1.2 Material	40
2.1.3 Reactivos	41
2.2 Preparación de soluciones	42
2.2.1 Soluciones para la selección de fibra y la optimización	42
2.2.2 Preparación de estándares	43
2.3 Análisis cromatográfico de PAHs	44
2.4 Microextracción en fase sólida	46
2.4.1 Metodología general de la microextracción	46
2.4.2 Acondicionamiento de fibras	47
2.4.3 Extracción	48
2.4.4 Desorción	49
2.4.5 Limpieza de la fibra	49
2.5 Selección de fibra	50
2.6 Optimización del procedimiento de microextracción	51
2.6.1 Optimización de la extracción	52
2.6.2 Optimización de la desorción	53
2.7 Validación	53
2.7.1 Linealidad	54
2.7.2 Precisión	56
2.7.3 Exactitud	56
2.7.4 Límite de detección	57

2.7.5 Límite de cuantificación	59
2.7.6 Robustez	60
2.8 Aplicabilidad del método a muestras reales	61
3. RESULTADOS	63
3.1 Selección de fibra	63
3.2 Optimización del procedimiento de microextracción	66
3.2.1 Optimización de la extracción	66
3.2.2 Optimización de la desorción	70
3.3 Validación	73
3.3.1 Linealidad	73
3.3.2 Precisión y exactitud	77
3.3.3 Límites de detección y cuantificación	81
3.3.4 Robustez	83
3.4 Análisis de muestras reales	86
4. DISCUSIÓN	92
4.1 Análisis cromatográfico	92
4.2 Microextracción en fase sólida	94
4.2.1 Procedimiento de la SPME	94
4.2.2 Selección de fibra	95
4.2.3 Optimización de la SPME	97

4.3 Validación	99
4.3.1 Linealidad	99
4.3.2 Precisión	101
4.3.3 Exactitud	102
4.3.4 Límites de detección y cuantificación	103
4.3.5 Robustez	104
4.4 Análisis de muestras reales	105
4.5 Costos	107

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	109
---------------------------------------	------------

5.1 Conclusiones	109
------------------	-----

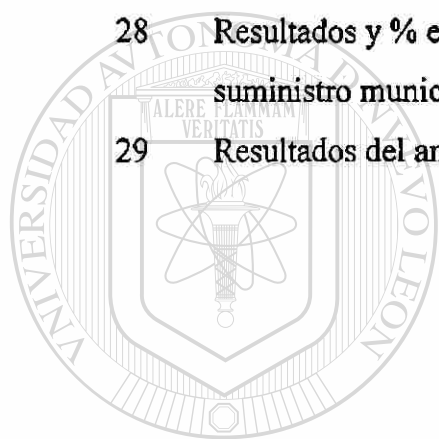
5.2 Perspectivas	110
------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	112
---------------------	------------

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Límites permisibles de PAHs en agua potable	14
2	Diseño factorial para cuatro variables	33
3	Diseño simplex para cuatro variables	35
4	Concentraciones de PAHs en la solución stock	43
5	Niveles de concentración de la curva de calibración	44
6	Programa del gradiente de la fase móvil	45
7	Programa del detector de fluorescencia	46
8	Condiciones para el acondicionamiento de fibras de SPME	47
9	Diseño inicial de experimentos para la extracción	52
10	Diseño inicial de experimentos para la desorción	53
11	Diseño factorial para la evaluación de la robustez de la extracción	60
12	Evaluación de la robustez del sistema cromatográfico	61
13	Porcentajes de RSD obtenidos en la selección de fibra	65
14	Evolución del diseño simplex para la extracción	67
15	Comparación entre los experimentos 3 y 10	69
16	Evolución del diseño simplex para la desorción	70
17	Resultados de linealidad para el sistema	74
18	Resultados de linealidad para el método	75
19	Prueba t para coeficientes de correlación de curvas de calibración del sistema	76

20	Prueba t para coeficientes de correlación de curvas de calibración del método	77
21	Resultados de precisión y exactitud para el sistema	78
22	Resultados de precisión y exactitud para el método	79
23	Resultados del estudio de efecto de matriz	80
24	Límites de detección y cuantificación para el sistema	81
25	Límites de detección y cuantificación para el método	82
26	Resultados de la evaluación de la robustez de la microextracción	83
27	Resultados y % error obtenidos para el agua GYM y el agua de río	89
28	Resultados y % error obtenidos para el agua de la red de suministro municipal de Monterrey y San Nicolás	90
29	Resultados del análisis fisicoquímico de las muestras	91



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación del proceso de potabilización del agua	6
2	Estructura de los PAHs	9
3	Perfiles típicos de microextracción	23
4	Dispositivo para la SPME	25
5	Configuración del sistema de extracción	48
6	Gráfica de las áreas de los analitos para la selección de fibra	64
7	Gráfica de las áreas para la optimización de la extracción	68
8	Gráfica de las áreas para la optimización de la desorción	72
9	Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de extracción y desorción	73
10	Cromatograma obtenido en el análisis de la robustez instrumental	85
11	Cromatogramas de las muestras sin adicionar	87
12	Cromatogramas de las muestras adicionadas	88

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionización química a presión atmosférica
°C	Grados Celsius
CG	Cromatógrafo de gases
CNA	Comisión Nacional del Agua
CW/DVB	Carbowax / divinilvenceno
DSMD	Diseño simplex del múltiple descarte
EPA	Agencia de protección al medioambiente
ESP	Electrospray
FR	Factor de respuesta
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC – MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
L	Litro
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
µg	Microgramo
µL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro

MeOH

Metanol

nm

Nanometros

OMS

Organización Mundial de la Salud

PA

Poliacrilato

PAHs

Hidrocarburos aromáticos policíclicos

PDMS

Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB

Polidimetilsiloxano / divinilbenceno

% RSD

Porcentaje de desviación estándar relativa

SD

Desviación estándar

SPME

Microextracción en fase sólida

r^2

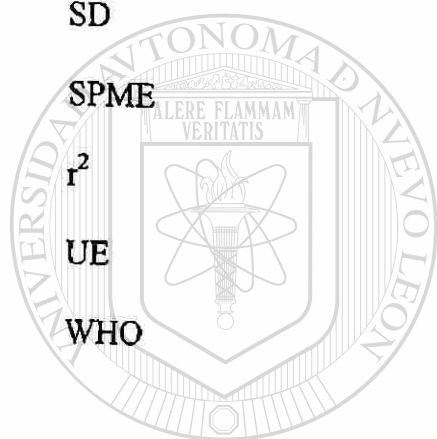
Coefficiente de correlación

UE

Unión Europea

WHO

World Health Organization



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



RESUMEN

Q.C.B. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Agosto de 2005

Título del estudio: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN AGUA POTABLE.

Número de páginas: 120

Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con orientación terminal
en Química Biomédica.

Área de estudio: Química Analítica.

Propósito y Método de Estudio:

El análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en muestras ambientales se ha convertido en un tema de importancia en la química analítica debido a sus efectos carcinogénicos y mutagénicos. En este trabajo se presenta el desarrollo y validación de un método de microextracción en fase sólida (SPME), seguido de la cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de PAHs en agua potable. En la primera etapa del trabajo se evaluó el desempeño de las diferentes fibras, obteniendo las mejores recuperaciones para casi todos los compuestos con la fibra de PDMS/DVB 65 μm por lo que fue la fibra elegida. La optimización de las etapas de extracción y desorción se realizó mediante diseños simplex de múltiple descarte. Las condiciones óptimas de extracción se establecieron en 60 min, 70 °C, agitación magnética alta, sin NaCl y las de desorción en 8 min, en 90 μL de acetonitrilo.

El método propuesto se validó, evaluando la linealidad en un intervalo de concentraciones de 0.04 a 30 $\mu\text{g/L}$, según el analito, con coeficientes de correlación mayores de 0.993. Para la precisión intradía se obtuvieron valores que van de 0.79 a 2.67 % RSD y para la interdía de 2.54 a 6.48 %. La exactitud expresada como % error presentó valores en un intervalo de 0.41 a 6.80 %. Los límites de detección estuvieron en un intervalo de 0.005 a 0.306 $\mu\text{g/L}$ y los de cuantificación de 0.017 a 0.929 $\mu\text{g/L}$. La robustez se evaluó con un diseño factorial que indicó que debe tenerse control cuidadoso de las condiciones de trabajo. Así mismo se encontró un efecto de la matriz de la muestra en la cuantificación, por lo que las curvas de calibración se elaboraron utilizando una muestra de agua potable libre de PAHs. El método desarrollado y validado se aplicó al análisis de muestras de agua de diferente procedencia, adicionadas y sin adicionar, obteniendo resultados satisfactorios.

Conclusiones:

El método de SPME desarrollado permite la determinación de PAHs, con excepción del naftaleno, en muestras de agua potable y de río. La fibra seleccionada y las condiciones obtenidas fueron las más adecuadas para el análisis. Los diseños experimentales fueron herramientas muy útiles en los procesos de optimización y en la evaluación de la robustez. Los procedimientos de extracción y análisis cromatográfico deben de ser cuidadosamente controlados para obtener resultados confiables. Una desventaja de elaborar la calibración en matriz adicionada, es que pueden presentarse interferencias procedentes de la matriz. La remoción del cloro residual es indispensable para lograr la recuperación de los analitos.

FIRMA DEL DIRECTOR



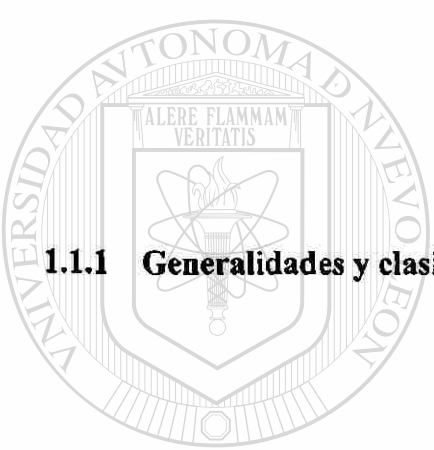
Dra. Rocío Castro Ríos

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El agua.

1.1.1 Generalidades y clasificaciones.



Todas las aguas naturales contienen cantidades variables de otras sustancias en concentraciones que fluctúan de unos cuantos miligramos por litro en agua de lluvia a cerca de 35 000 mg/L en agua de mar (Tebbutt, 1990).

La naturaleza fisicoquímica del agua, así como su abundancia y distribución, hacen de esta especie química la más importante de todas las conocidas (Catalán, 1981).

Algunas peculiaridades del agua son las siguientes:

- Debido a sus temperaturas de solidificación y de vaporización es la única sustancia que se encuentra naturalmente sobre la Tierra, en los tres estados físicos.

- Juega un papel vital en el desarrollo de los seres vivos.
- Es el medio universal y único en el que se realizan las reacciones organo-biológicas.
- Su calidad condiciona la calidad de los alimentos.
- Ejerce una gran influencia en el desarrollo de la agricultura, de la industria, de las fuentes de energía, etc.

Las clasificaciones del agua son múltiples, dependiendo del uso que se quiera hacer de ella o del criterio de la persona que las proponga. Una clasificación útil es la propuesta atendiendo a su uso que establece cinco categorías (Catalan, 1981):



1. Doméstico

2. Comercial

3. Industrial

4. Agrícola

5. Público

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Para la mayoría de estos usos, es de primordial interés controlar la calidad de la misma, ya que ligeras variaciones en el contenido de alguna de las sustancias presentes puede variar sensiblemente sus propiedades y hasta la puede convertir en inservible y a veces en altamente peligrosa para la salud.

1.1.2 Características del agua.

Para obtener un verdadero perfil de la naturaleza de una muestra en particular, es necesario cuantificar diferentes propiedades mediante un análisis que determine sus características físicas, químicas y biológicas. En el caso del agua para uso potable, es práctica común evaluar su calidad en relación con lineamientos o normas específicos. Como la formulación de tales valores guía requiere la evaluación crítica de las propiedades de los diferentes constituyentes, es común que se les clasifique en cinco grupos (Tebbutt, 1990):

1. **Parámetros organolépticos:** sus características son rápidamente percibidas por el consumidor pero normalmente tienen poco significado para la salud, por ejemplo, color, turbiedad, sabor y olor.
2. **Parámetros naturales fisicoquímicos:** son las características normales del agua, tal como el pH, conductividad, alcalinidad, dureza, etc., cuyo objetivo es establecer lineamientos para evitar el abastecimiento de aguas excesivamente desbalanceadas.
3. **Sustancias indeseables en cantidades excesivas.**
4. **Sustancias tóxicas:** la principal preocupación en el abastecimiento de agua es el efecto a largo plazo de la exposición crónica a niveles bajos de compuestos tóxicos. Entre los constituyentes que se pueden considerar tóxicos están los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

5. **Parámetros microbiológicos:** las normas de calidad microbiológica se basan esencialmente en asegurar la ausencia de bacterias indicadoras de contaminación por desechos humanos.

1.1.3 Tipos de contaminantes y sus propiedades.

Existen dos tipos de materiales contaminantes, los no conservativos y los conservativos. Los materiales no conservativos incluyen la mayoría de las sustancias orgánicas, algunas sustancias inorgánicas y muchos de los microorganismos que se degradan por los procesos de autopurificación, la concentración de este tipo de material se reduce con el tiempo. Los materiales conservativos son generalmente de naturaleza inorgánica y no son afectados por los procesos naturales, por lo que las concentraciones

de estos contaminantes solo se pueden reducir por dilución. Por lo regular los procesos de tratamiento de aguas no afectan a los contaminantes conservativos y su presencia en una fuente de agua limita su uso (Tebbutt, 1990).

Las propiedades generales de los contaminantes se pueden expresar en tres tipos dependiendo del tipo de material que se trate:

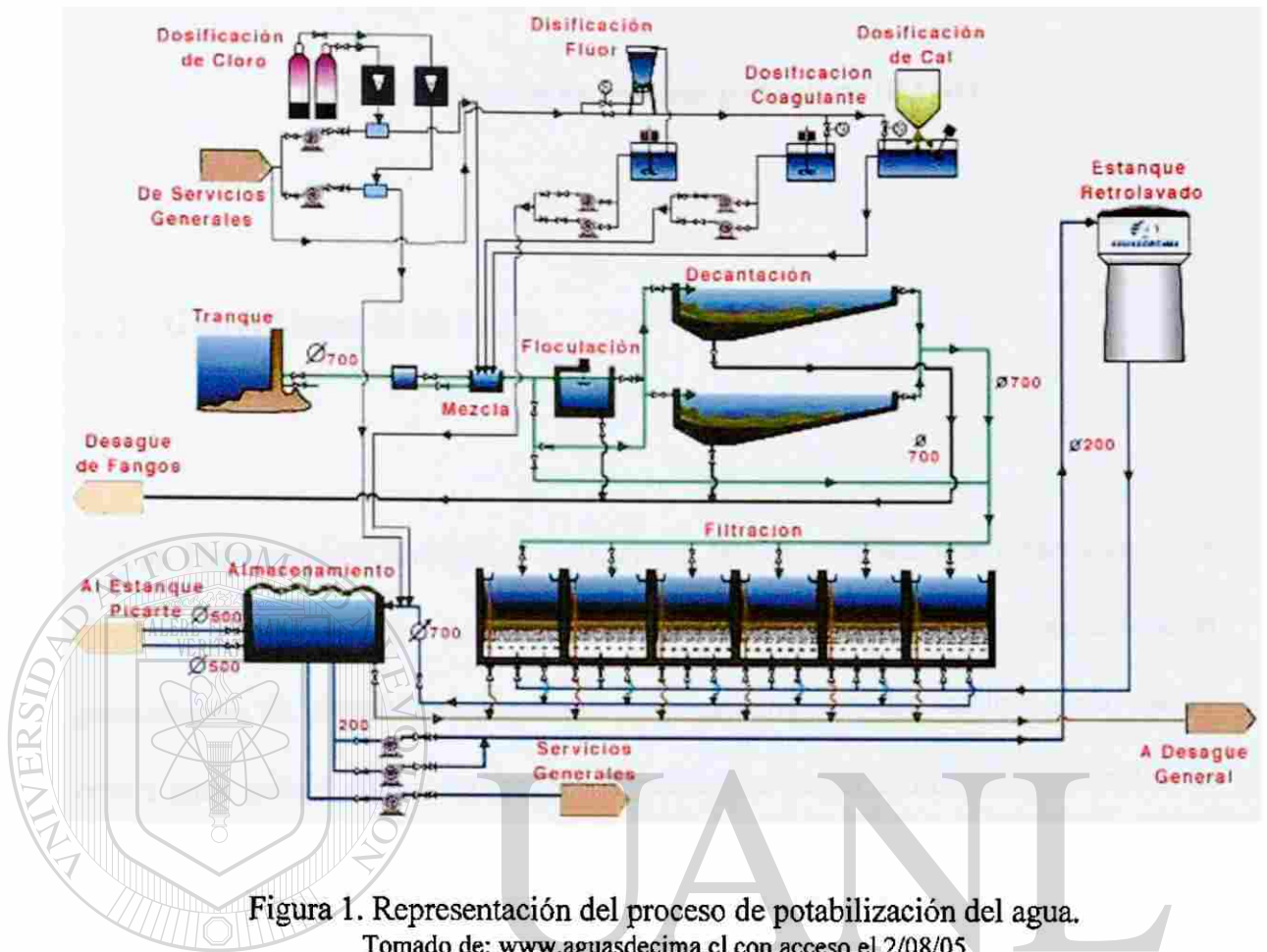
1. **Compuestos tóxicos que causan la inhibición o destrucción de la actividad biológica en el agua.**
2. **Materiales que afectan el balance de oxígeno del agua.**

3. Los sólidos inertes en suspensión o disueltos causan problemas en altas concentraciones, ya que pueden afectar la fauna acuática normal.

1.1.4 Tratamiento del agua.

El tratamiento del agua comprende por lo común cinco pasos: filtración gruesa, sedimentación, filtración por arena, aireación y esterilización (Brown, 1998). En la Figura 1 se representa un proceso de tratamiento típico.

Después de la filtración gruesa a través de un tamiz, el agua se deja reposar en grandes tanques de sedimentación en los cuales pueden asentarse las partículas suspendidas. Para ayudar a eliminar las partículas muy pequeñas, el agua se hace ligeramente alcalina agregando hidróxido de calcio y posteriormente sulfato de aluminio; este último reacciona con los iones hidroxilo para formar un precipitado esponjoso y gelatinoso de hidróxido de aluminio. Este precipitado se asienta lentamente, arrastrando consigo las partículas suspendidas y eliminando con ello casi toda la materia finamente dividida y la mayor parte de las bacterias. Posteriormente el agua se filtra a través de un lecho de arena y entonces se pasa a la aeración para acelerar la oxidación de las sustancias orgánicas disueltas. La etapa final del tratamiento implica la adición al agua de un agente químico para asegurar la destrucción de las bacterias, por lo general se emplea cloro. La acción esterilizadora del Cl_2 se debe probablemente no al Cl_2 mismo, sino al ácido hipocloroso que se forma cuando el cloro reacciona con el agua.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.1.4.1 Decloración

Cuando se pretende reincorporar al medioambiente las aguas tratadas, la toxicidad del cloro residual para la vida acuática hace que haya sido necesario añadir una etapa que consiste en eliminar todo o parte del cloro residual que permanece después de la cloración. Esto se realiza fundamentalmente con compuestos de azufre (Catalán, 1981).

1.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

1.2.1 Generalidades de los PAHs.

Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) forman una clase diversa de compuestos orgánicos que poseen dos o más anillos aromáticos, son contaminantes generalizados en el medio ambiente que están presentes en aire, suelo y agua. Tienen origen tanto natural como antropogénico producidos por la combustión incompleta de materia orgánica, la fundición del aluminio, las emisiones de vehículos, incineración de desechos y el derrame de combustibles fósiles (Doong, 2000). Debido a su baja solubilidad y alta afinidad por la materia particulada, no es usual encontrarlos en agua a concentraciones notables. Sin embargo, su naturaleza altamente peligrosa justifica su control en aguas potables y residuales (WHO, 1998). De aquí se puede empezar a elucidar la importancia que adquiere el contar con métodos para determinar estas sustancias en sus diferentes matrices.

Otros datos que apoyan esta idea son los registros de la emisión de PAHs al medio ambiente en Europa y Estados Unidos. Se ha estimado que se liberan 14,100 toneladas al año en Europa y 8,600 en Estados Unidos (Kabzinski, et al., 2002). En México, no se

cuenta con los datos de emisión, ya que no hay método oficial de análisis para estos compuestos y no son monitoreados.

La contaminación por PAHs se produce como consecuencia del vertido en el drenaje de las aguas de lavado de cocheras y gasolineras, lugares donde se eliminan cantidades notables de la fracción pesada de los hidrocarburos. Así mismo, el agua de lluvia arrastra en suspensión cantidades considerables de productos derivados de la combustión de hidrocarburos, producidos por los vehículos y derivados del asfalto. Los PAHs son contaminantes conservativos (ver sección 1.1.3) en nuestro medioambiente (Chunfeng, 2002), cuyos principales mecanismos de remoción en el agua y sedimentos son la biodegradación microbiana y la descomposición por la luz solar (Kabzinski, et al., 2002).

1.2.2 Clasificación y estructuras.

En la Figura 2 se presentan las estructuras de los PAHs en estudio. Los PAHs se dividen en dos grupos:

1. Los que poseen de dos a tres anillos en su estructura, tales como el naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno y antraceno. Algunos miembros de este grupo presentan una toxicidad aguda significativa.

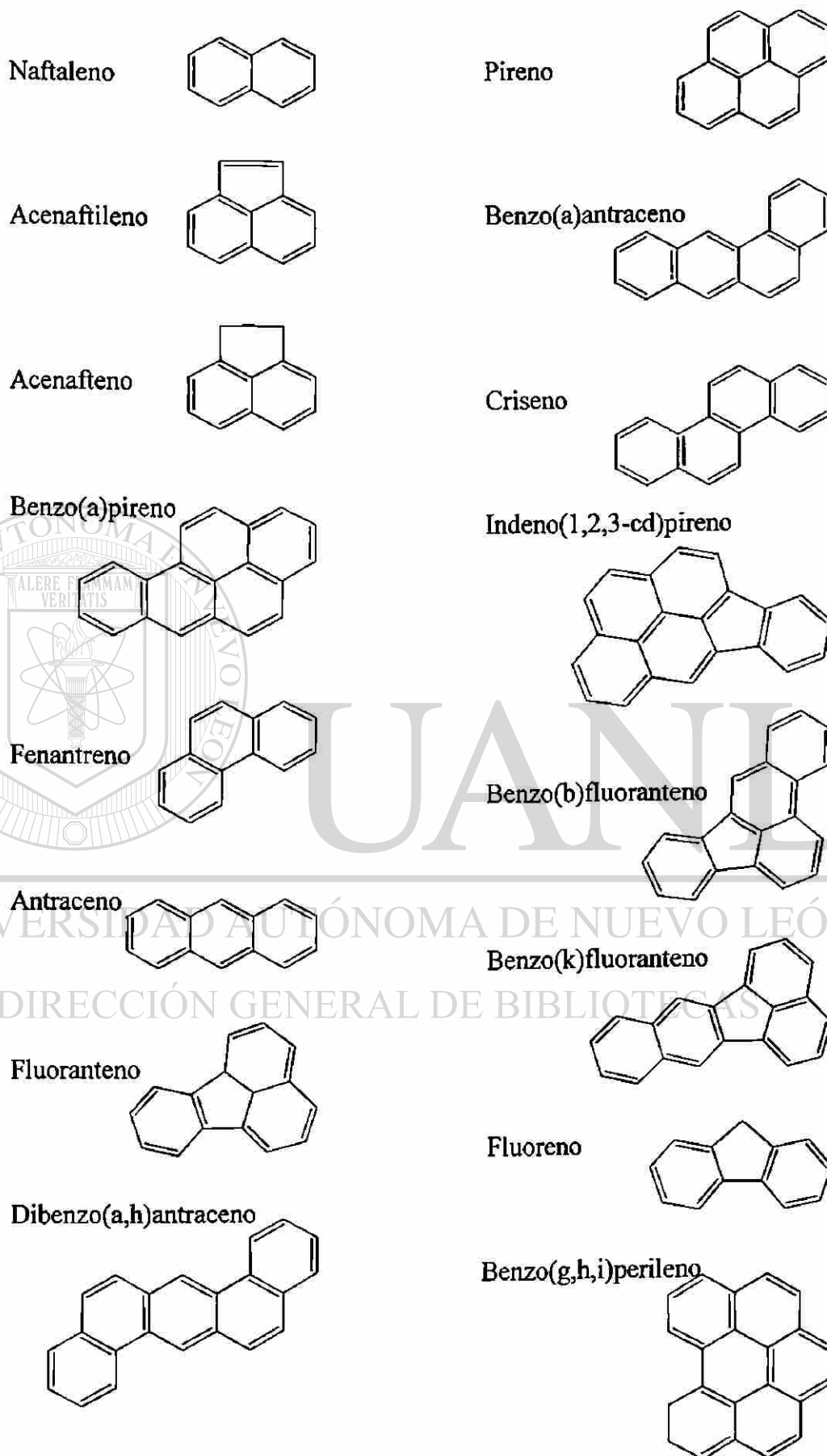


Figura 2. Estructuras de los PAHs

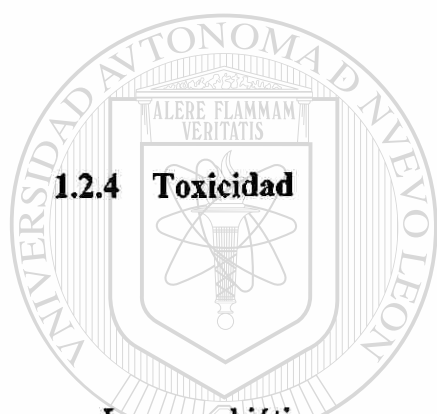
2. Los que poseen de cuatro a seis anillos en su estructura, que son potencialmente carcinogénicos y mutagénicos, en este grupo tenemos al fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno y el indeno(1,2,3-cd)pireno (Doong, 2000).

Así mismo se reconocen dos subclases de PAHs, los alternados cuyos sistemas aromáticos se encuentran completamente conjugados, como el pireno; y los no alternados cuya conjugación es interrumpida como resultado de los anillos de cinco miembros en la estructura de la molécula, tal es el caso del fluoranteno (Chunfeng, 2002).

1.2.3 Propiedades químicas y físicas generales.

Para ser considerada como tal, una molécula aromática policíclica debe contener solo átomos con hibridación sp^2 en el sistema aromático y todo el sistema anular debe ser plano. Los sistemas aromáticos policíclicos son más estables que los polienos hipotéticos correspondientes con enlaces π localizados. Pero, son más activos en su reacción ante la oxidación, reducción y sustitución electrofílica que los sistemas monocíclicos. Además, se requiere menos energía para romper el carácter aromático de un solo anillo de los compuestos policíclicos que la requerida para un sistema monocíclico.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son compuestos no polares y volátiles que presentan baja solubilidad en agua. Poseen alta solubilidad en diversos disolventes orgánicos, como la acetona y el acetonitrilo, y la mayor parte son sólidos. Son sensibles a la degradación por la radiación ultravioleta. Los puntos de fusión que presentan son variados y dependen en gran medida de la simetría que presente la molécula, ya que en estado sólido, entre más simétrica sea la molécula, puede formar una red cristalina más ordenada (Fessenden, 1983).



1.2.4 Toxicidad

Los xenobióticos son sustancias extrañas al organismo. Las principales clases de xenobióticos de importancia médica son los fármacos, carcinógenos químicos y varios compuestos que han llegado a nuestro ambiente. Con base en la afirmación anterior, podemos decir que los PAHs son xenobióticos y que en el cuerpo presentan reacciones de hidroxilación y conjugación para incrementar su solubilidad en agua y poder ser eliminados (Murray, et al., 1998). Se ha observado que los productos derivados de las formas hidroxiladas de los PAHs, pueden incrementar los daños en el DNA de la población humana y producir retardo en el crecimiento intrauterino (Srám, et al., 1999). De forma reciente, se ha encontrado evidencia que las formas hidroxiladas de diversos PAHs pueden interactuar con receptores celulares y presentar actividad hormonal (Kamiya, et al., 2005).

Así mismo, el benzo(a)pireno ha sido identificado como un bloqueador del sistema endocrino (Liu, 2001). La mayoría de los PAHs son compuestos lipofílicos que pueden ser bioacumulados hasta concentraciones altas (Kabzinski, et al., 2002)

Sin embargo, la información sobre la toxicología de los PAHs y de sus efectos en humanos es escasa; la mayoría es derivada de la exposición experimental de animales a los compuestos en condiciones controladas (García-Falcón, 2004). La evidencia de que mezclas de PAHs son carcinogénicas para el ser humano proviene principalmente de los estudios ocupacionales de trabajadores (WHO, 1998). La agencia de protección al ambiente de Estados Unidos (EPA) y la organización mundial de la salud (OMS), consideran al benzo(a)pireno como uno de los PAHs más carcinogénicos y al fluoranteno como el más frecuentemente detectado en agua potable (WHO, 1998). Dentro de la toxicología alimentaria, se han realizado estudios con modelos animales para la identificación del peligro, la valoración de dosis – respuesta y la caracterización del riesgo para los humanos (Taylor, 1989).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2.5 Normatividad nacional e internacional.

En la normatividad internacional se ha estipulado los niveles permisibles de los PAHs en diferentes matrices, los valores para agua potable se presentan en la Tabla 1.

La Comunidad Europea, elaboró la directiva 2000/60/EC que establece un esquema denominado COMMPS (Combined Monitoring-based and Modelling-based Priority Setting,) el cual originó una lista de 33 sustancias prioritarias o grupo de sustancias, en materia de agua, para su control dados los riesgos que representan. Esta lista incluye los siguientes PAHs: antraceno, fluoranteno, naftaleno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(k)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno así como a los hidrocarburos poliaromáticos como grupo, asignándoles una concentración máxima permisible de 0 a 2 µg/L. (EC, 2001).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por su parte, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, la EPA, ha incluido 16 PAHs no substituidos dentro de su lista de 129 contaminantes prioritarios (Doong, 2000), cuyos nombres y sus estructuras se presentan en la Figura 2. Debe mencionarse que la EPA considera al benzo(a)pireno como indicador para establecer el valor máximo de los PAHs, siendo de 0.0002 mg/L; los valores deben ser menores a éste.

La Organización Mundial de la Salud, OMS, considera al benzo(a)pireno como representativo de los PAHs y establece una concentración máxima recomendable de 0.7 mg/L en agua potable (WHO, 1998).

Con base en lo descrito previamente, se puede observar que existe una amplia variación en cuanto el criterio de la concentración permitida de PAHs. Sin embargo, es evidente que todos los organismos coinciden en que esta concentración debe ser sumamente baja.

Tabla 1. Límites permisibles de PAHs en agua potable

Sustancia	OMS µg/L	EPA µg/L	UE µg/L
Benzo(a)pireno	700	0.2	--
PAHs	--	--	0 – 2 *

* Sustancias de Referencia: Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)pireno e Indeno(1,2,3-cd)pireno

A nivel nacional, la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, establece los límites permisibles de calidad del agua en cuanto a sus características bacteriológicas, físicas, organolépticas, químicas y radiactivas; así como los tratamientos de potabilización para uso y consumo humano que deben cumplir los sistemas de abastecimiento públicos y privados o cualquier persona física o moral que la distribuya en todo el territorio nacional. Sin embargo, esta norma no contempla a ninguno de los PAHs (SSA, 1994).

1.3 Métodos analíticos para la determinación de PAHs.

La Asociación Americana de Salud Pública (APHA) en conjunto con la Asociación Americana de Trabajos del Agua (AWWA) y la Federación para el Control de la Contaminación del Agua (WPCF), han publicado los métodos normalizados de análisis 6440B y el 6440C para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas residuales (APHA, 1992). La EPA ha publicado una serie de métodos para el análisis de químicos orgánicos en diferentes tipos de agua que incluye a los PAHs, entre otros tenemos los métodos 525, 550, 610 y el 8310. Cabe mencionar que se consideran equivalentes los métodos 6440B y el 610 (APHA, 1992).

Los métodos de normas oficiales y los métodos analíticos aplicados a la determinación de PAHs que aparecen en la literatura científica son semejantes entre sí; es decir, la separación y / o análisis se realiza mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (CG) empleando columnas no polares. Por HPLC la detección se realiza por fluorescencia y ultravioleta, mientras que para CG se emplea ionización de llama o mediante un acoplamiento a espectrometría de masas. Sin embargo, al realizar una revisión de las publicaciones podemos encontrar procesos innovadores tales como el uso de nuevos detectores para las cromatografías o el desarrollo de métodos alternos, tanto de determinación como de preparación de muestra.

1.3.1 Cromatografía de líquidos

La HPLC de fase inversa es uno de los métodos usados más comúnmente para la separación y análisis de PAHs. Para lograr el análisis usualmente se emplea una columna con fase polimérica C₁₈ y una fase móvil con gradiente de agua – acetonitrilo (Chunfeng, 2002; Bashe, 1990). Ya que los PAHs presentan fluorescencia de forma inherente, el detector empleado es de fluorescencia junto con la detección ultravioleta.

Por otra parte, se ha evaluado el efecto de atenuadores selectivos de fluorescencia (quencher), tales como el cloruro de piridinio, como facilitadores de la detección de PAHs en agua analizada por cromatografía de líquidos con detección de fluorescencia, reportando la mejora de la detección de los analitos para muestras complejas (Chunfeng, 2002).

En aguas residuales, potables y subterráneas, el método normalizado 6440B y los EPA 550, 610 y 8310 describen procedimientos para la determinación de PAHs empleando como fase estacionaria ODS (inversa) y como fase móvil una mezcla de agua – acetonitrilo con detección de fluorescencia y UV. El método 550 describe el análisis de los 16 PAHs prioritarios en agua potable con tratamiento completo o en agua procedente de las fuentes de abastecimiento. Con este método se obtiene buena resolución de los compuestos, sin embargo existen interferencias por componentes de la matriz de naturaleza no identificada para ciertos analitos. El método 610 presenta las ventajas de la buena recuperación y resolución de los compuestos. El método 8310 presenta el inconveniente de tener que definir los procedimientos a seguir según la

matriz que se trate, ya que hace referencia a diversos métodos complementarios que tienen que ser consultados. Así mismo, para evitar interferencias, es parte integral del método un proceso de limpieza de la muestra; lo que conlleva a la pérdida de los analitos en el proceso. En general los límites de detección que reportan los métodos van de 0.010 a 10.0 $\mu\text{g/L}$.

El trabajo publicado por Galceran y Moyano trata sobre la determinación de derivados hidroxilados de PAHs, mediante el uso de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (HPLC – MS), resulta muy conveniente considerando lo expuesto en la sección 1.2.4. En dicho trabajo se realiza una comparación entre la ionización química a presión atmosférica (APCI) y el electrospray (ESP); sin embargo los límites de detección que reportan son elevados, presentándose de 1.5 a 35 $\mu\text{g/mL}$ para ESP y de 0.3 a 50 $\mu\text{g/mL}$ para APCI (Galceran, 1996). También empleando HPLC – MS se han analizado sedimentos del agua en la búsqueda de PAHs, con fines de estudio ecotoxicológico (Viguri, 2002).

1.3.2 Cromatografía de gases

Los métodos por CG emplean columnas capilares con fases estacionarias no polares tal como el polidimetilsiloxano, como gas acarreador se han utilizado nitrógeno y helio,

y la detección se realiza con el detector de ionización de llama o por espectrometría de masas (EPA, 2002).

El método 6440 B y el método 610, describen la determinación de los 16 PAHs prioritarios en aguas de desecho con el uso de la CG que emplea una fase estacionaria no polar (OV-17) y como fase móvil gas nitrógeno con detección de ionización de llama. Estos métodos no son adecuados para el análisis del antraceno, fenantreno, criseno y benzo(a)antraceno ya que no proporcionan una resolución aceptable de estos analitos (EPA, 2002; APHA, 1992).

Los métodos 6440C y 525 describen la determinación de compuestos orgánicos, entre los que se encuentran algunos PAHs, en agua residual y potable respectivamente. Consisten en un procedimiento por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas donde se emplea una fase estacionaria no polar (DB-5 o equivalente) y como fase móvil gas helio. Para la identificación y cuantificación de los analitos son utilizados tres iones generados por impacto electrónico o por ionización química.

Es interesante mencionar que los métodos 525 y 550, al haber sido desarrollados para el análisis de agua potable, consideran entre las posibles interferencias al cloro residual procedente del proceso de potabilización y por ello proponen tratamientos para su eliminación.

1.3.3 Electroforesis capilar

El trabajo realizado por Nguyen y Luang llevó al desarrollo de un método para la determinación de PAHs mediante la electroforesis capilar con ciclodextrina modificada. Aunque ellos evaluaron la reproducibilidad del procedimiento, reportando buenos resultados, no investigaron la relación entre la concentración en la matriz acuosa y la cantidad adsorbida de cada analito por la fibra; lo que origina dudas sobre sus aplicaciones cuantitativas (Nguyen, 1997).



1.4 Tratamiento de muestra.

El principio de operación de cualquier método de extracción de muestra es la partición de los analitos entre la matriz y la fase extractante. Así mismo, la tendencia actual es la de reducir el uso de sustancias contaminantes como los solventes empleados en los métodos tradicionales de extracción, como la extracción líquido – líquido (Pawliszyn, 1997).

Para el análisis de PAHs en agua se han empleado como técnicas preparativas de muestra la extracción líquido–líquido, la extracción en fase sólida y la microextracción en fase sólida (Doong, 2000). La extracción líquido – líquido requiere grandes cantidades de solventes, tales como el cloruro de metileno, siendo esto una seria

desventaja. Por esta razón se han desarrollado métodos de preparación de muestra prácticamente libres de solvente; entre estos métodos se tiene a la extracción en fase sólida y la microextracción en fase sólida. A continuación se describen brevemente las técnicas previamente mencionadas.

1.4.1 Extracción líquido – líquido

En la extracción líquido – líquido para el análisis de PAHs, una muestra se extrae de dos a tres veces con cloruro de metileno. El extracto de cloruro de metileno es secado con sulfato de sodio anhidro y concentrado con el uso del sistema Kuderna – Danish y flujo de gas nitrógeno. Posteriormente, es adicionado acetonitrilo al extracto y éste es concentrado (Bashe, 1990; AHPA, 1992). Con esta técnica se obtienen buenas

recuperaciones de los analitos que van de un 70 a un 100 %. Sin embargo, requiere de una cantidad considerable de cloruro de metileno y de una serie de etapas de concentración que pueden representar fuentes de variación.

1.4.2 Extracción en fase sólida.

La extracción en fase sólida de PAHs se realiza al pasar una muestra a través de un cartucho que contiene una matriz inorgánica sólida recubierta con una fase orgánica C_{18} unida químicamente. Los analitos son eluidos del cartucho con una pequeña cantidad de cloruro de metileno y concentradas por evaporación (Eichelberger, 1988).

Para tener buenos resultados las variables del proceso deben ser controladas. Por ejemplo, un vacío ligero es requerido para poder pasar la muestra por el cartucho de extracción; si este vacío no se controla apropiadamente los resultados tendrán una precisión pobre. Por otra parte, puede requerirse realizar la elución del cartucho en un dispositivo diferente al de extracción, como propone el método EPA 525, lo que implica factores adicionales de variación.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.4.3 Microextracción en Fase Sólida (SPME).

La Microextracción en Fase Sólida (abreviada SPME por sus siglas en inglés) fue introducida en 1990 por Arthur y Pawliszyn como una técnica analítica que utiliza segmentos pequeños de una fibra de sílice fundida con recubrimiento de polímero, para la extracción de analitos y que da la posibilidad de la subsiguiente introducción a un sistema cromatográfico (Mayer, 2000; Pino, 2004).

La SPME se basa en el equilibrio establecido entre los analitos en la fase acuosa (o gaseosa) y en la fase polimérica que cubre la fibra; por tanto la partición entre las fases se encuentra regida por una constante de distribución entre el polímero y la muestra (Doong, 2000; Chen, 2003). Diferentes tipos de cubiertas tendrán diferentes selectividades por los analitos. Las condiciones del equilibrio pueden ser descritas por la ecuación 1 (Pawliszyn, 1997):

$$N = K_{fs} V_f V_s C_0 / K_{fs} V_f + V_s \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

N = Cantidad del analito extraído por la fase polimérica

K_{fs} = Constante de distribución entre la fase polimérica y la muestra

V_f = Volumen de la cubierta polimérica

V_s = Volumen de la muestra

C_0 = Concentración inicial de un analito dado en la muestra

En la Figura 3 se presentan perfiles típicos de extracción, en los cuales se observa que la cantidad de analito extraída aumenta con el tiempo hasta un punto en el que se llega a una concentración máxima de éste; evento indicativo de que se ha alcanzado el equilibrio entre la fibra y la muestra. En este punto, aún incrementando el tiempo de extracción la cantidad de analito que se extrae es prácticamente la misma (Pawliszyn, 1997). Ya que la extracción es un proceso controlado por difusión, al incrementar el grosor de la cubierta de la fibra se mejora la sensibilidad del método; sin embargo el

tiempo requerido para lograr el equilibrio se incrementa también. Así, el equilibrio de extracción toma de horas a días para analitos de alto peso molecular, como los PAHs. Por razones prácticas, la SPME tiene que ser realizada en estados en los que no se ha alcanzado el equilibrio. Si se mantienen las condiciones y tiempos de extracción constantes pueden obtenerse resultados reproducibles, por lo que no es necesario alcanzar las condiciones de equilibrio para realizar el análisis (Xia, 2001; Liu, 2005).

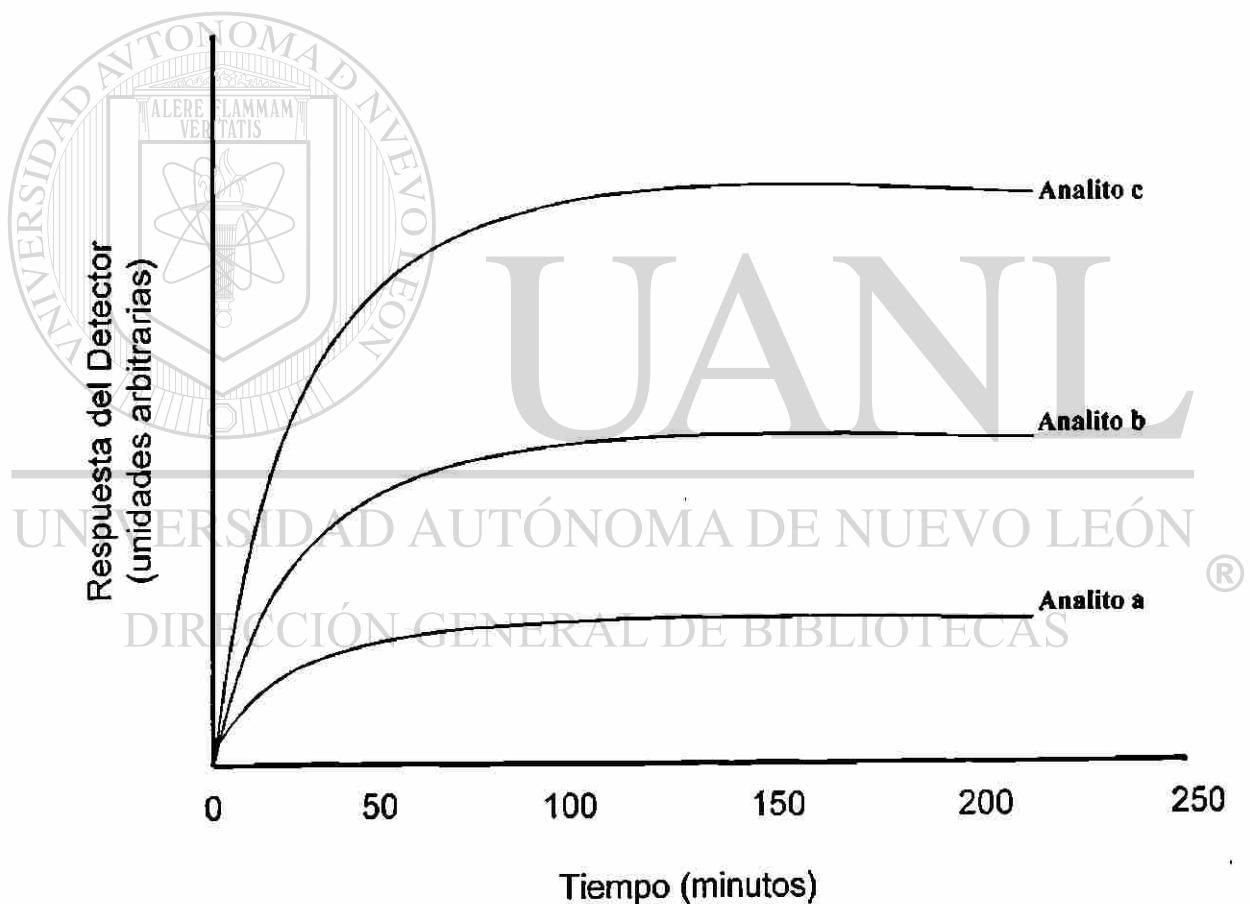


Figura 3. Perfiles típicos de microextracción

Los aspectos destacables de la SPME son: 1) que permite la reducción del uso de solventes o incluso puede ser un método libre de solvente, 2) está diseñado para ser aplicado a sistemas diluidos y 3) combina la extracción, preconcentración y transferencia de analitos al sistema de análisis sin etapas adicionales y en algunos casos puede reducir el tiempo de análisis considerablemente (Xia, 2001; Liu, 2005). Desafortunadamente la SPME, al no ser un método exhaustivo de extracción, presenta porcentajes de recuperación bajos comparados con los obtenidos por otras técnicas de extracción, como la extracción en fase sólida (García-Falcón, 2004).

1.4.3.1 Descripción del dispositivo para la SPME

Actualmente hay en el mercado dispositivos comerciales para la SPME que son de fácil manejo. De manera general dichos dispositivos constan de un sujetador para la fibra y de la fibra en sí, Figura 4. El sujetador (holder), tiene un émbolo para exponer o retraer la fibra, cuya posición es fijada por un tornillo. El émbolo se desplaza dentro de un cilindro metálico, que permite el ajuste de profundidad y se mantiene fijo por un anillo circular. Ya que las diferentes fibras se identifican con un color según su cubierta polimérica, el dispositivo posee una ventana que permite ver el código de color de la fibra que se encuentra ensamblada. Las funciones de la aguja son la de servir de guía de la fibra y protegerla de ruptura.

Algunos de los elementos del sujetador son removibles, lo que permite el intercambio de fibras. Las fibras disponibles actualmente en el mercado son de poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB), Carboxen/PDMS, Carbowax/DVB, Carbowax/Resina y DVB/Carboxen/PDMS. Estas fibras tienen diferente polaridad y son producidas con diferentes grosores de la cubierta polimérica.

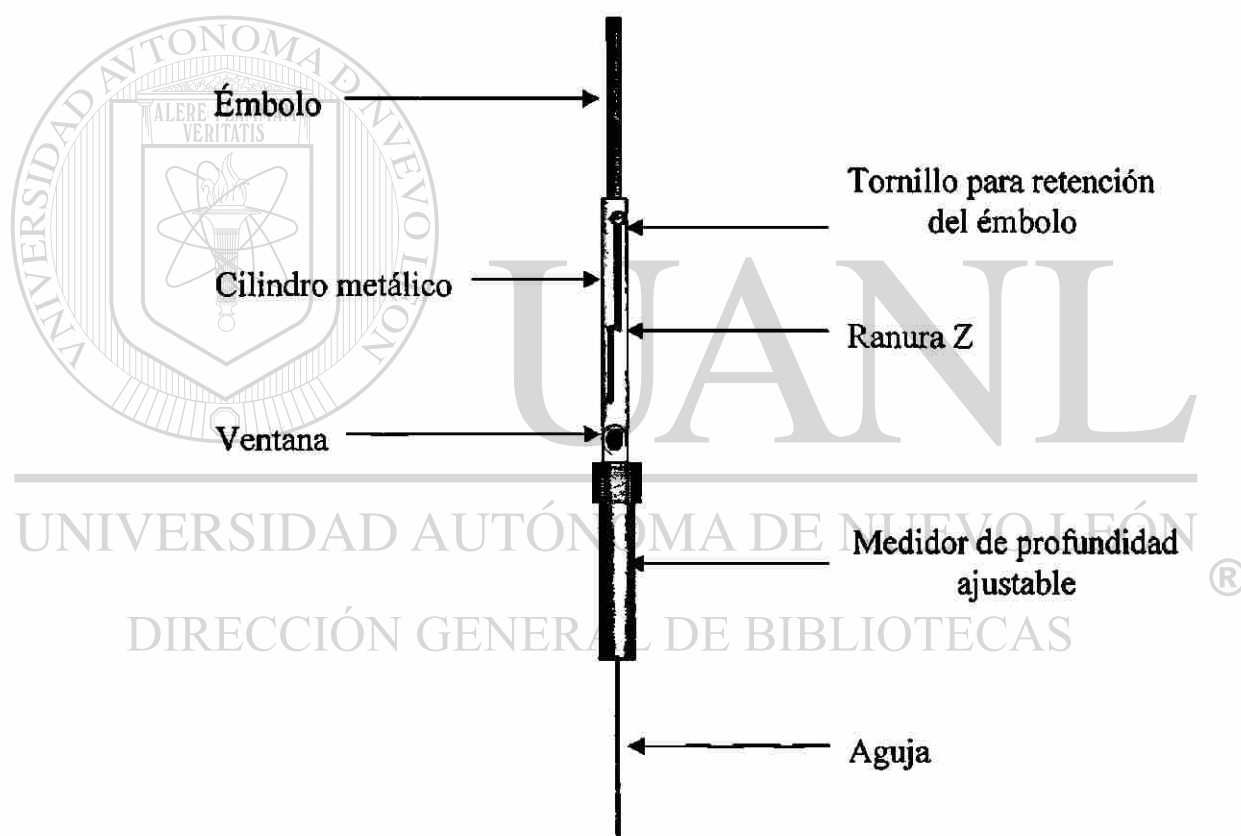


Figura 4. Dispositivo para la SPME

1.4.3.2 Procedimiento de la SPME

La SPME se realiza en dos pasos: el primero es la extracción de los analitos de la matriz de la muestra y el segundo es la desorción de los analitos para el análisis cromatográfico. Para realizar la extracción, con la fibra retraída, se pasa la aguja a través del septum del vial de la muestra. Se expone la fibra a la muestra líquida o gaseosa, se permite su exposición por un tiempo definido, se retrae la fibra dentro de la aguja y finalmente se remueve la aguja del vial de la muestra.

La desorción se puede realizar térmicamente en el caso de CG o con el uso de disolventes en HPLC, este último a su vez puede ser en línea o fuera de línea, de esta manera se originan tres modalidades. En la primera, la CG, se inserta el dispositivo de SPME en el puerto de inyección del cromatógrafo, se expone la fibra por un tiempo determinado, se retrae y se retira el dispositivo del cromatógrafo. En la segunda, HPLC - en línea, se inserta la aguja en una cámara de desorción de la interfase, se expone la fibra a una fase móvil de composición definida por un tiempo determinado, se permite la inyección, se retrae la fibra y se retira el dispositivo. Por último, en HPLC fuera de línea se realiza la desorción de los analitos en un vial con un volumen de disolvente apropiado y éste se inyecta de forma convencional al equipo (Chen, 1995; Pawliszyn, 1997).

1.4.3.3 Estudio de PAHs en agua por SPME.

La SPME se ha conjuntado con los métodos cromatográficos para la determinación de PAHs. Las condiciones de extracción y desorción varían ampliamente entre los investigadores. Así mismo, las estrategias de optimización y el número de analitos son diferentes. Sin embargo, los reportes coinciden en los tipos de polímeros empleados para la extracción. Así, las cubiertas poliméricas más utilizadas en la microextracción de PAHs en agua son: PDMS y PA. El estudio realizado por Doong, et al (2000), propone el uso de la fibra de 85 μm PA para los PAHs de bajo peso molecular y la de 100 μm PDMS para los de alto peso molecular. Este trabajo realiza la determinación de los 16 PAHs prioritarios de la EPA por CG acoplada a espectrometría de masas. Así mismo, Doong propone la determinación de los coeficientes de distribución de los 16 PAHs prioritarios con el uso de las fibras mencionadas (Doong, 2000). En ese trabajo se llega a la conclusión que la SPME es efectiva para la determinación de las constantes de distribución en el sistema de dos fases investigado.

En un intento por mejorar la eficiencia de la microextracción se han probado sales inorgánicas como cloruro de sodio (Liu, 1997) y sales orgánicas como el monoclora acetato de sodio (Chen, 2004). Los resultados indican que la presencia de una sal favorece la extracción de los PAHs de la matriz acuosa. Se han realizado experimentos que evalúan el acoplamiento directo de la SPME con la espectrometría de masas, es decir sin necesidad de separación cromatográfica (Meurer, et al, 2002). La introducción

directa de la fibra entre los filamentos de la fuente de ionización presenta las ventajas, según el reporte, de eliminar los efectos de memoria asociados con las líneas de transferencia y que presenta elevada sensibilidad.

1.5 Validación

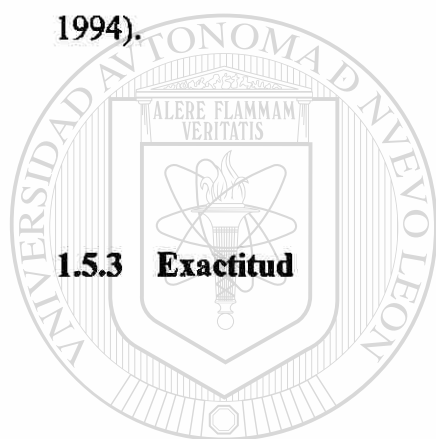
La validación de un método es el proceso de probar que dicho método analítico es aceptable para el propósito que fue desarrollado (ICH, 1994; Green, 1996). A continuación se mencionan algunos de los parámetros relacionados a la validación de un método, que fueron empleados en el presente trabajo.

1.5.1 Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad, dentro de un rango dado, para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra (ICH, 1994). Generalmente realizada mediante la preparación y análisis, por triplicado, de soluciones estándar en cinco niveles de concentración (Green, 1996).

1.5.2 Precisión

La precisión de un método analítico es la cantidad de dispersión en los resultados obtenidos de múltiples análisis de una muestra homogénea (Green, 1996). Sin embargo si no es posible obtener una muestra homogénea, puede ser empleada una muestra preparada por el analista. La precisión es usualmente expresada como varianza, desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones (ICH, 1994).



UANL

La exactitud de un método es la proximidad del valor medido al valor aceptado como verdadero en la muestra. Se puede realizar mediante la adición de los analitos a blancos de matriz y determinando el porcentaje de recuperación (Green, 1996).

1.5.4 Limite de detección

El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la más baja cantidad de analito en la muestra que puede ser detectado pero no necesariamente

cuantificado con exactitud (ICH, 1994). Puede calcularse mediante la siguiente ecuación (ICH, 1996):

$$LD = (3.3 * \sigma) / m \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

LD = Limite de Detección

σ = Desviación estándar de la respuesta

m = Pendiente de la curva de calibración

1.5.5 Limite de cuantificación

El límite de cuantificación para un procedimiento analítico individual es la más baja cantidad de analito en la muestra que puede ser cuantitativamente determinada con una precisión y exactitud apropiada (ICH, 1994). Puede calcularse mediante la siguiente ecuación (ICH, 1996):

$$LC = (10 * \sigma) / m \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

LC = Limite de Cuantificación

σ = Desviación estándar de la respuesta

m = Pendiente de la curva de calibración

1.5.6 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es la medida de su capacidad de permanecer sin afectación por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona un indicador de su confiabilidad durante el uso rutinario (ICH, 1994). Si las mediciones son susceptibles a variaciones de las condiciones de análisis, éstas deben de ser controladas de forma segura o deben de ser incluidas declaraciones precautorias en el proceso (ICH, 1996).

El término diseño experimental se utiliza habitualmente para describir las etapas de (1) identificación de aquellos factores que pueden influir en el resultado de un experimento, (2) el diseño del experimento de modo que se minimicen los efectos de los factores incontrolados y (3) la utilización del análisis estadístico para separar los efectos de los diferentes factores implicados (Miller, 1993).

1.6.1 Diseño factorial.

Un diseño experimental en el que se mide la respuesta para todas las combinaciones posibles de los niveles elegidos de las variables que influyen en el proceso, recibe el nombre de factorial. Hay dos razones de consideración para utilizar un diseño factorial en lugar de un sistema de experimentación de un factor (Miller, 1993):

- El diseño factorial detecta y estima cualquier interacción, el experimento de un factor no puede.
- Si los efectos de los factores son aditivos, el diseño factorial requiere de menos mediciones que el experimento de un factor para proporcionar la misma precisión

El diseño factorial puede ser aplicado al análisis de robustez cuando los factores a evaluar son muchos. Al ser un diseño global que permite agrupar todos los factores de interés reduce significativamente el número de ensayos (Quattrocchi, 1992). Un diseño factorial de dos niveles para cuatro variables (factores) es presentado en la Tabla 2.

El algoritmo del diseño factorial se resume como sigue: al realizar los experimentos como indica el diseño, se obtienen las respuestas y con éstas se calcula, para cada variable, la diferencia entre los experimentos con valores altos y los experimentos con valores bajos.

Esta diferencia es comparada con un valor obtenido a partir de las respuestas de experimentos realizados con los valores medios. Este valor se calcula con la ecuación 4. Si el valor absoluto de la diferencia es mayor al valor comparativo quiere decir que la variable afecta el proceso (Quattrocchi, 1992).

$$V = s * 2^{1/2} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

V = Valor comparativo

s = desviación estándar del estudio de precisión (realizado con los valores medios).

Tabla 2. Diseño factorial para cuatro factores

Experimento	Variable A	Variable B	Variable C	Variable D
1	-	-	-	-
2	-	-	+	+
3	-	+	-	+
4	-	+	+	-
5	+	-	-	+
6	+	-	+	-
7	+	+	-	-
8	+	+	+	+

El signo “+” indica los valores superiores al valor medio y al “-” los valores inferiores a este.

1.6.2 Diseño simplex.

Un diseño simplex se puede representar mediante una figura geométrica que tiene $N + 1$ vértices cuando se trata de optimizar una respuesta respecto a N variables; por ejemplo, para dos variables el diseño será un triángulo (Miller, 1993). Es decir, se diseñan $N + 1$ experimentos iniciales, donde N representa el número de variables que influyen el proceso.

El algoritmo del método simplex se puede describir en términos generales como sigue: se eligen las variables a optimizar y sus valores iniciales, representados por los vértices del triángulo. Se realizan los experimentos en las condiciones indicadas por el diseño y con las respuestas obtenidas se descartan los que tuvieron menor rendimiento y se calculan nuevos experimentos que cada vez se aproximan más a los valores óptimos.

Los ensayos finalizan cuando las variables retienen su valor o presentan una tendencia (Treviño, 1999). La posición del nuevo vértice de un simplex se puede encontrar por cálculo en lugar de dibujar, esto es esencial cuando hay más de dos variables. Un diseño simplex para cuatro variables a tres niveles se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño simplex para cuatro variables

Experimento	Variable A	Variable B	Variable C	Variable D
1	-	-	-	-
2	+	-	-	o
3	o	+	-	+
4	o	o	+	+
5	+	+	o	-

Los signos +, - y o; se interpretan como valor alto, bajo y medio respectivamente

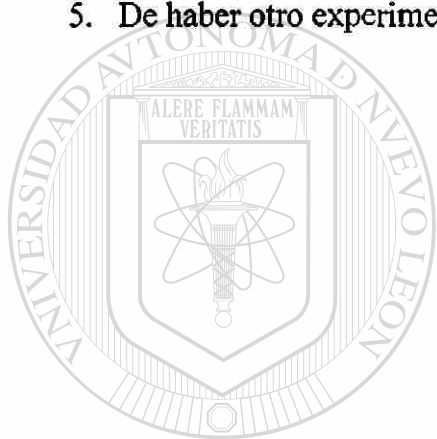
Para mejorar la ejecución del método simplex se han propuesto diversas variantes del algoritmo, una de estas variantes es el múltiple descarte. El múltiple descarte permite avanzar más rápido en la optimización ya que permite descartar varios experimentos a la vez, en lugar de uno, por cada ciclo del diseño. El algoritmo del simplex del múltiple descarte es como sigue (Treviño, 1999):

1. Ordenar las respuestas de la peor a la mejor

2. Clasificar el primer valor de la lista anterior como el peor grupo y el resto como mejor grupo
3. Calcular el promedio de cada grupo
4. Calcular la diferencia de los promedios de los grupos
5. Efectuar los pasos anteriores, ahora considerando que el peor grupo son los primeros dos valores de la lista, así sucesivamente hasta que el último valor sea el mejor grupo.
6. Elegir como mejor descarte aquel arreglo en el que la diferencia de los promedios sea máxima.

Para calcular los nuevos experimentos se procede como sigue:

1. Se obtiene el promedio de los valores de las variables que presentaron el mejor rendimiento
2. El promedio se multiplica por dos
3. Se resta el valor de las variables de uno de los experimentos que presentaron el peor rendimiento
4. El resultado de la resta origina el siguiente experimento
5. De haber otro experimento descartable se repite el paso tres y cuatro.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1.7 Justificación.

Los PAHs son sustancias generalizadas en el medio ambiente que presentan efectos nocivos para la salud humana. La normatividad actual hace necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan su determinación a bajas concentraciones. La SPME es una alternativa a los métodos preparativos tradicionales (extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida) para el análisis cromatográfico de estos compuestos, ya que permite la extracción y preconcentración simultánea de los analitos y tiene ventajas sobre los procesos de extracción en uso.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Establecer, mediante el empleo de diseños experimentales, las condiciones óptimas de extracción y desorción para la SPME de PAHs en agua potable como método preparativo para el análisis cromatográfico.

1.8.2 Objetivos específicos.

1. Desarrollar el procedimiento de SPME de PAHs.

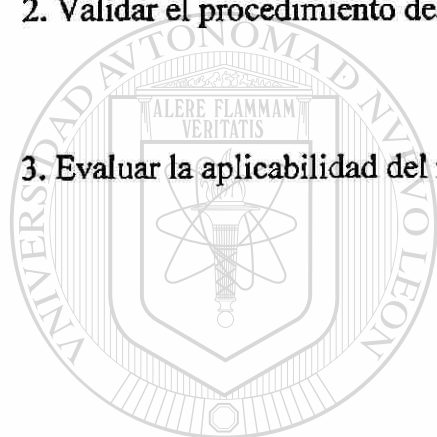
1.1 Seleccionar la fibra

1.2 Optimizar la extracción

1.3 Optimizar la desorción

2. Validar el procedimiento desarrollado.

3. Evaluar la aplicabilidad del método a muestras reales.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

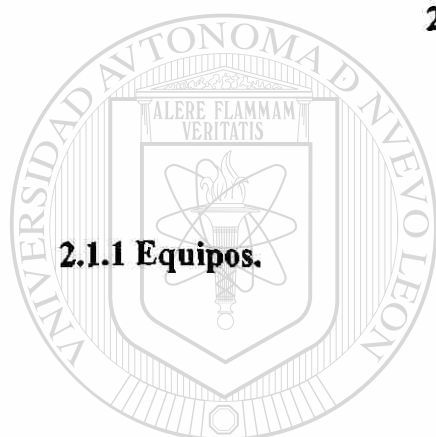


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Equipo, material y reactivos



UANL

- a) Cromatógrafo de Líquidos Waters 2695 con sistema desgasificador a vacío en línea, automuestreador, sistema de bombeo cuaternario, horno para columna, detector UV de arreglo de diodos (Waters 2996), detector de fluorescencia (Waters 2475) y con Software Empower versión 5.0
- b) Balanza Semianalítica AND GX-200
- c) Vortex, VWR
- d) Baño de Ultrasonido Branson 3510
- e) Estufa Shel Lab 1305 U
- f) Placa de Agitación Magnética, Thermolyne
- g) Bomba de Agua con Temperatura Controlada, HAAKE B3

2.1.2 Materiales.

- a) Columan Supelcosil LC – PAH, ODS, 250 x 4.6 mm, 5 μm , Supelco
- b) Guarda Columna Symmetry Sentry, C_{18} , 3.9 x 20 mm, 5 μm , Waters
- c) Membranas de Nylon 47 mm, 0.45 μm , PALL Corporation
- d) Termómetro de -20 a 150 $^{\circ}\text{C}$
- e) Pipeta Automática 10 – 100 μL , Eppendorf
- f) Pipeta Automática 100 – 1000 μL , Eppendorf
- g) Puntillas para Pipeta Automática
- h) Sujetador de Fibra de Uso Manual para Micoextracción en Fase Sólida, Supelco
- i) Fibra de Microextracción en Fase Sólida de Polidimetilsiloxano de 100 μm de espesor, Supelco
- j) Fibra de Microextracción en Fase Sólida de Poliacrilato de 85 μm de espesor, Supelco
- k) Fibras de Microextracción en Fase Sólida de Polidimetilsiloxano Divinilbenceno de 65 μm de espesor, Supelco
- l) Fibra de Microextracción en Fase Sólida de Carbowax / Divinilbenceno de 65 μm de espesor, Supelco
- m) Viales de Vidrio de 15 mL con Tapón de Rosca y Septum de Teflón / Silicón, Supelco
- n) Viales de Vidrio de 4 mL con Tapón de Rosca y Septum de Teflón / Silicón, HP

- o) Viales de Vidrio de 2 mL con Tapón de Rosca y Septum de Teflón / Silicón de 10 mm de Abertura, Supelco
- p) Insertos Cónicos de 0.1 mL con Resorte, Agilent
- q) Barras de Agitación Magnética de 7 por 2 mm, VWR
- r) Pipetas Volumétricas de 15 mL
- s) Vasos de Precipitado de 50 mL
- t) Vasos de Precipitado de 100 mL
- u) Matraz Volumétrico de 250 mL
- v) Matraces Volumétricos de 25 mL
- w) Matraz Volumétrico de 2 mL
- x) Cronómetro, VWR
- y) Cristalizador de 500 mL
- z) Soporte Universal
- aa) Pinzas para Termómetro y para Bureta

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

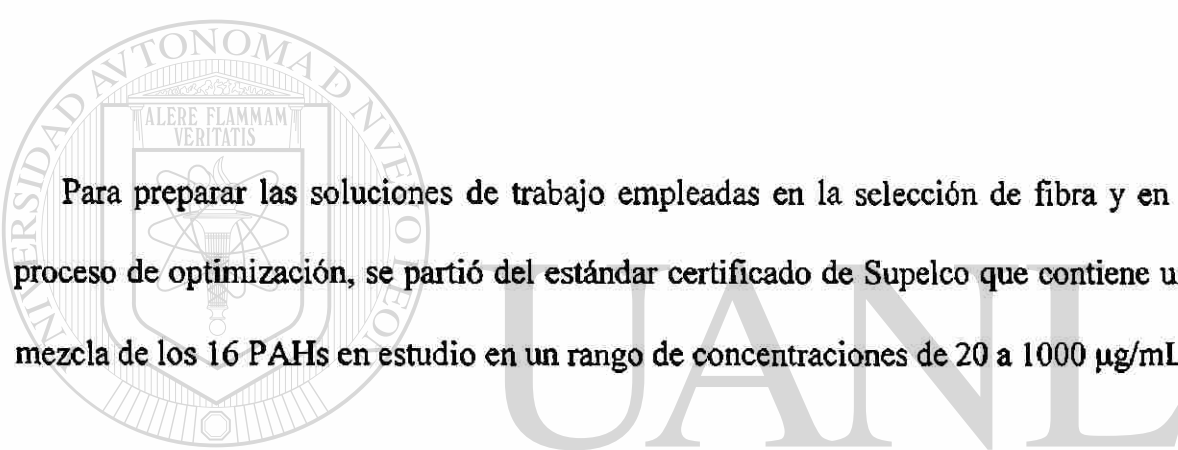
2.1.3 Reactivos.

- a) Cloruro de Sodio 99.5 %, Sigma
- b) Acetona Especificaciones ACS, Fermont
- c) Acetonitrilo Grado HPLC, Fisher Scientific
- d) Metanol Grado HPLC, Fisher Scientific
- e) Agua Bidestilada Plus, Laboratorios Monterrey S.A. de C.V.

- f) Mezcla Certificada de 16 Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares (20 – 1000 $\mu\text{g/mL}$), en Acetonitrilo – Metanol 90:10, Lote: LB06798, Supelco

2.2 Preparación de soluciones.

2.2.1 Soluciones para la selección de fibra y la optimización.



Para preparar las soluciones de trabajo empleadas en la selección de fibra y en el proceso de optimización, se partió del estándar certificado de Supelco que contiene una mezcla de los 16 PAHs en estudio en un rango de concentraciones de 20 a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Se prepararon 2 mL de una solución stock, con acetonitrilo grado HPLC, en un rango de concentraciones de 2 a 100 $\mu\text{g/mL}$, Tabla 4. El mezclado de la solución se realizó a velocidad baja con un agitador tipo vortex. Esta solución fue transferida a un vial cubierto con papel aluminio y guardada en congelación para su preservación.

Las soluciones de trabajo se prepararon con agua bidestilada en un rango de concentraciones de 5 a 250 ng/mL , a partir de la solución stock. Las soluciones de trabajo fueron transferidas a frascos ámbar de tapón esmerilado, sellados con parafilm y refrigerados a 4 °C hasta su uso.

Tabla 4. Concentraciones de PAHs en la Solución Stock

Analito	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Analito	Concentración $\mu\text{g/mL}$
Naftaleno	50	Benzo(a)antraceno	5
Acenaftileno	50	Criseno	5
Acenafteno	100	Benzo(b)fluoranteno	2
Fluoreno	10	Benzo(k)fluoranteno	2
Fenantreno	4	Benzo(a)pireno	5
Antraceno	2	Dibenzo(a,h)antraceno	20
Fluoranteno	5	Benzo(g,h,i)perileno	8
Pireno	10	Indeno(1,2,3-cd)pireno	5

2.2.2 Preparación de estándares.

Con el uso del estándar certificado de Supelco se prepararon dos soluciones stock, con acetonitrilo grado HPLC, en un rango de concentraciones de 100 a 5000 $\mu\text{g/L}$ y de 10 a 500 $\mu\text{g/L}$. Estas soluciones fueron transferidas a viales cubiertos con papel aluminio y guardadas en congelación para su preservación. A partir de estas soluciones stock, se prepararon cinco niveles de concentración para la curva de calibración. El rango de concentraciones en el que se encuentran los analitos para cada nivel de la curva, se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Niveles de concentración de la curva de calibración

Analito	N1 µg/L	N2 µg/L	N3 µg/L	N4 µg/L	N5 µg/L
Naftaleno	1.00	2.00	4.00	5.00	15.00
Acenaftileno	1.00	2.00	4.00	5.00	15.00
Acenafteno	2.00	4.00	8.00	10.00	30.00
Fluoreno	0.20	0.40	0.80	1.00	3.00
Fenantreno	0.08	0.16	0.32	0.40	1.20
Antraceno	0.04	0.08	0.16	0.20	0.60
Fluoranteno	0.10	0.20	0.40	0.50	1.50
Pireno	0.20	0.40	0.80	1.00	3.00
Benzo(a)antraceno	0.10	0.20	0.40	0.50	1.50
Criseno	0.10	0.20	0.40	0.50	1.50
Benzo(b)fluoranteno	0.04	0.08	0.16	0.20	0.60
Benzo(k)fluoranteno	0.04	0.08	0.16	0.20	0.60
Benzo(a)pireno	0.10	0.20	0.40	0.50	1.50
Dibenzo(a,h)antraceno	0.40	0.80	1.60	2.00	6.00
Benzo(g,h,i)perileno	0.16	0.32	0.64	0.80	2.40
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0.10	0.20	0.40	0.50	1.50

N = nivel de concentración

2.3 Análisis cromatográfico de PAHs

El análisis de los PAHs se realizó mediante cromatografía de líquidos con detección UV y de fluorescencia, utilizando el método de separación establecido por Díaz Moroles

(Tesis Doctoral, UANL). Se realizó el ajuste del volumen de inyección y la temperatura de la muestra, las condiciones empleadas fueron:

Temperatura de la columna:	27 °C	Fase móvil:	Agua - Acetonitrilo
Temperatura de la muestra:	25 °C	Flujo:	1.5 mL/min
Volumen de inyección:	20 µL		
Columna:	Supelcosil LC – PAH, 250 x 4.6 mm, 5 µm		

Se empleó un programa de gradiente de solventes de la fase móvil y un programa de longitudes de onda de excitación y emisión para el detector de fluorescencia, que son presentados en las Tablas 6 y 7, respectivamente. Con estas condiciones se monitorea la señal de 15 analitos por fluorescencia y la del acenaftileno por UV a una de longitud de onda de 228 nm.

Tabla 6. Programa del gradiente de la fase móvil

Tiempo minutos	Flujo mL/min	Agua %	Acetonitrilo %
0.01	1.50	40.0	60.0
12.00	1.50	0.0	100.0
23.00	1.50	0.0	100.0
24.00	1.50	40.0	60.0
29.00	1.50	40.0	60.0
30.00	1.50	40.0	60.0

Tabla 7. Programa del detector de fluorescencia

Tiempo min	Parámetro:	Longitud de onda nm	Tiempo min	Parámetro:	Longitud de onda nm
7.2	Excitación	224	14.5	Excitación	270
7.2	Emisión	330	14.5	Emisión	385
8.5	Excitación	254	16.0	Excitación	280
8.5	Emisión	323	16.0	Emisión	435
10.6	Excitación	250	21.0	Excitación	299
10.6	Emisión	366	21.0	Emisión	430
12.1	Excitación	252	22.2	Excitación	305
12.1	Emisión	400	22.2	Emisión	480
13.0	Excitación	235	26.0	Excitación	224
13.0	Emisión	420	26.0	Emisión	330
13.6	Excitación	236			
13.6	Emisión	390			

2.4 Microextracción en fase sólida.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4.1 Metodología General de la Microextracción.

El procedimiento de microextracción se realizó en cuatro etapas:

1. Acondicionamiento de fibra
2. Extracción
3. Desorción
4. Limpieza de fibra

2.4.2 Acondicionamiento de fibras.

El acondicionamiento de las fibras se realizó tanto en un CG como con el uso de solventes de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las condiciones para cada fibra se presentan en la Tabla 8. En todos los casos el flujo de la fase móvil, correspondiente a gas helio, fue de 2 mL/min.

Tabla 8. Condiciones para el acondicionamiento de fibras de SPME

Fibra	Grosor μm	Temperatura de Acondicionamiento $^{\circ}\text{C}$	Tiempo Horas
PDMS	100	250	0.5
PDMS/DVB	65	250	0.5
PA	85	300	2
CW/DVB	65	220	0.5

Para todas las fibras el acondicionamiento con solventes fue el mismo y posterior al realizado por CG. Para ello, se expuso la fibra a 4 mL de los solventes por un tiempo definido. Primero, la fibra fue expuesta a acetonitrilo grado HPLC por 15 minutos, posteriormente a una mezcla de agua – acetonitrilo en una proporción de 40:60 por 10 minutos y finalmente fue expuesta en agua por 5 minutos. Una vez acondicionadas las fibras fueron utilizadas inmediatamente en el proceso de microextracción.

2.4.3 Extracción

Posterior al acondicionamiento, el procedimiento de microextracción se realizó mediante inmersión directa de la fibra en agua. Se colocó un agitador magnético con ayuda de pinzas en un vial con 15 mL de solución patrón o muestra. Empleando pinzas para bureta y un soporte universal, el vial cerrado fue colocado en el baño de temperatura controlada, el cual estaba posicionado sobre la placa de agitación magnética, como se muestra en la Figura 5. Se introdujo el dispositivo de microextracción perforando el septum del vial con ayuda de la aguja de dicho dispositivo y se mantuvo en posición fija con una pinza para bureta. Presionando el émbolo, se expuso la fibra en la muestra a extraer. Después de completar el tiempo de exposición, el émbolo fue retraído con la finalidad de introducir la fibra en la aguja y el dispositivo fue retirado del vial con la muestra extraída.

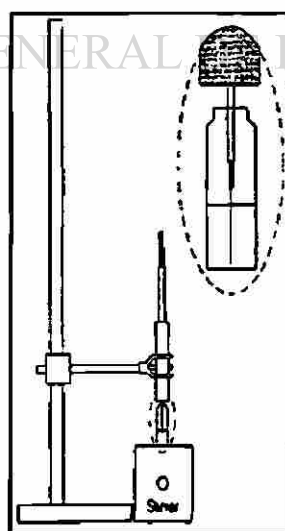


Figura 5. Configuración del sistema de extracción

2.4.4 Desorción

Se prepararon viales de 2 mL con insertos cónicos, a los cuales se les depositó el solvente de desorción. La desorción se realizó al introducir el dispositivo de microextracción al vial y presionar el émbolo para sumergir la fibra en el solvente por un tiempo definido, teniendo cuidado de no doblar la fibra y de que ésta se encontrara completamente inmersa. Finalizado el tiempo de desorción, la fibra fue retraída a la aguja protectora y el dispositivo retirado del vial con la desorción.

Las soluciones obtenidas de la desorción fueron llevadas al cromatógrafo de líquidos para sus análisis. Cuando fue requerido se cubrieron con papel aluminio y parafilm; y puestos en congelación para su posterior análisis.

2.4.5 Limpieza de la fibra.

Entre extracciones sucesivas se aplicó un procedimiento de limpieza de fibra para eliminar los analitos remanentes. Para ello se prepararon viales con 4 mL de solvente, tres con acetonitrilo y uno con agua bidestilada, en los cuales se introdujo el dispositivo de microextracción. El vial se colocó en el baño de temperatura controlada y fue expuesta la fibra por dos minutos. Este proceso se realizó con cada vial, es decir la fibra

fue sumergida en acetonitrilo por 6 minutos y en agua por 2 minutos. Entre viales la fibra era retraída o expuesta según fuera requerido.

2.5 Selección de fibra.

Considerando los reportes de investigadores (Doong, 2000; Popp, 2000; Liu, 1997; Pawliszyn, 1990; Doong, 2000; Xia, 2001; Gill, 2002), las recomendaciones del fabricante (Supelco) y las propiedades de los analitos; se realizó una selección preliminar de fibras y se establecieron las condiciones iniciales del procedimiento de microextracción.

Para seleccionar la fibra se realizaron extracciones por triplicado, a la misma solución de trabajo, con cada una las fibras seleccionadas. Las fibras probadas fueron: Polidimetilsiloxano de 100 μm , Poliacrilato de 85 μm , Polidimetilsiloxano [®] Divinilbenceno de 65 μm y Carbowax / Divinilbenceno de 65 μm de espesor. Las condiciones de extracción fueron: un volumen de muestra de 15 mL, temperatura de 50 °C, tiempo de 60 minutos y agitación magnética alta. La desorción se realizó con 110 μL de acetonitrilo durante 5 minutos. La selección definitiva de la fibra a emplear se realizó en base a la respuesta y al % RSD.

2.6 Optimización del procedimiento de microextracción.

Para realizar la optimización de los procesos de extracción y desorción de PAHs se empleó el diseño simplex del múltiple descarte (DSMD). El parámetro indicador de la evolución del proceso de optimización fue el área obtenida de los cromatogramas. Se eligieron las variables a optimizar en cada proceso y sus valores de partida. Con los valores de las variables, se estableció el conjunto inicial de experimentos siguiendo las indicaciones del DSMD (Tabla 3). Se realizó el procedimiento de microextracción a la solución de trabajo según las condiciones indicadas para cada experimento del diseño. Las soluciones obtenidas se sometieron a análisis por cromatografía de líquidos.

Considerando las posibilidades técnicas con las que se contaron, se originaron los nuevos experimentos a ensayar aplicando el algoritmo del DSMD a las respuestas obtenidas (ver sección 1.6.2). Una vez que las variables retuvieron su valor o presentaron una tendencia, se finalizaron los experimentos. Con el propósito de corroborar los datos generados por el diseño se elaboró, para cada proceso, un gráfico de todos los experimentos realizados con las respuestas obtenidas para cada analito. Se verificó que el resultado obtenido mediante la comparación gráfica y el obtenido de la aplicación del algoritmo fueran congruentes.

2.6.1 Optimización de la extracción.

Para la optimización de la extracción mediante DSMD, se establecieron los valores de las variables como sigue: el tiempo de 60 ± 20 min, la temperatura de 50 ± 20 °C, la concentración salina de un 2 ± 2 % y la agitación de 8 ± 2 . En el caso de la agitación los valores numéricos correspondieron a una agitación baja, media o alta. La desorción se realizó por 5 minutos en 110 μ L de acetonitrilo a temperatura ambiente. El diseño simplex original constó de 5 experimentos, los valores de las variables en cada experimento se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Diseño inicial de experimentos para la extracción

Experimento	Tiempo min	Temperatura °C	[Salina] %	Agitación
1	40	30	0	Baja
2	80	30	0	Media
3	60	70	0	Alta
4	60	50	4	Alta
5	80	70	2	Baja

2.6.2 Optimización de la desorción.

Se realizó la extracción de la solución de trabajo con las condiciones encontradas como óptimas. Posteriormente se realizó la desorción con las condiciones indicadas por el diseño. Los experimentos iniciales del DSMD para la optimización de la desorción fueron cuatro, se presentan en la Tabla 10. Los valores de tiempo se establecieron en 5 ± 3 minutos, los de volumen en 110 ± 10 μL y los de composición del solvente de desorción en 50 ± 50 % de Metanol (MeOH). Se aplicó el algoritmo simplex a las respuestas.

Tabla 10. Diseño inicial de experimentos para la desorción

Experimento	Tiempo min	Volumen μL	Composición MeOH-ACN
1	2	100	0:100
2	8	100	0:100
3	5	120	0:100
4	5	110	100:0

2.7 Validación.

Utilizando las condiciones óptimas de extracción y desorción, se realizaron extracciones de estándares y de matriz adicionada, lo que designaremos como sistema y

método respectivamente, evaluando los siguientes parámetros para cada uno: intervalo de trabajo y linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, así como la robustez del método.

Todos los cálculos que implican los procedimientos descritos, fueron realizados con el programa Microsoft Excel.

2.7.1 Linealidad.

Para evaluar la linealidad, tanto del sistema como del método, se consideró la desviación estándar relativa (% RSD) de los factores de respuesta y el estadístico aplicado al coeficiente de correlación como indicador de modelo lineal descrito por Quattrocchi (1992).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se elaboraron estándares de calibración a cinco niveles de concentración por triplicado (Tabla 5), las cuales fueron analizadas por HPLC. Una vez obtenidas las respuestas de los detectores para cada uno de los estándares de las diferentes concentraciones, se realizó el análisis de regresión por mínimos cuadrados y se elaboró la curva de calibración correspondiente graficando la respuesta en función de la concentración. Se calcularon los factores de respuesta (F.R.) para cada uno de los puntos que componen dicha curva empleando la ecuación 5:

F.R. = respuesta del detector / concentración del estándar (Ec. 5)

La respuesta del detector corresponde al área del pico y la concentración del estándar se empleó en $\mu\text{g/L}$.

Con los factores de respuesta obtenidos para cada uno de los puntos de la curva de calibración, se calculó la desviación estándar relativa de los mismos según la ecuación 6:

$\% \text{ RSD} = (\text{SD} \times 100) / \text{promedio de los F.R.}$ (Ec. 6)

Donde:

$\% \text{ RSD}$ = Desviación estándar relativa

SD = Desviación estándar de los factores de respuesta

Con el coeficiente de correlación obtenido del análisis de regresión se aplicó el estadístico indicador de modelo lineal descrito por Quattrocchi, según la ecuación 7:

$t_r = (r) (n-2)^{1/2} / (1 - r^2)^{1/2}$ (Ec. 7)

Donde:

t_r = Valor t calculado

r = Coeficiente de correlación obtenido del análisis de regresión

n = Numero de estándares empleados en la calibración

2.7.2 Precisión.

Para determinar la precisión intradía e interdía, para el sistema y el método, se emplearon estándares o matriz adicionada según el caso de igual concentración al nivel 2 de la curva de calibración. Estas soluciones fueron extraídas, analizadas por HPLC y cuantificadas con el uso de una curva de calibración elaborada el mismo día de trabajo. Para evaluar la precisión intradía se realizaron extracciones el mismo día a tres soluciones independientes. Para la precisión interdía se realizaron extracciones a tres soluciones independientes en tres días no consecutivos.

Con los tres y nueve datos de concentración obtenidos, se calculó el promedio, la desviación estándar y la desviación estándar relativa.

2.7.3 Exactitud.

La exactitud fue evaluada, tanto para el sistema como para el método, en función del porcentaje de error. Se calculó el promedio de nueve datos de concentración obtenidos a partir de la extracción de soluciones adicionadas al nivel dos de la curva de calibración, que fueron analizadas por HPLC y cuantificadas con una curva de calibración elaborada el día de trabajo. Para calcular el porcentaje de error se empleó la ecuación 8:

$$\% \text{ Error} = [(V.R. - V.P.) / V.R.] * 100 \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde:

% Error = Porcentaje de error calculado

V.R. = Valor real de concentración (Adicionada)

V.P. = Valor promedio de concentración calculada a partir de la curva de calibración

Así mismo, se evaluó la existencia de un efecto de matriz en la cuantificación mediante la adición de los analitos a una muestra de agua purificada, en una concentración igual al nivel dos de la curva de calibración, que fue analizada por triplicado. Se obtuvieron los valores de concentración de cada analito empleando una curva elaborada con estándares y otra elaborada en matriz. A estos valores se les aplicó la prueba t para determinar si existía diferencia entre los valores obtenidos con una calibración u otra.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.7.4 Limite de detección.

El límite de detección, para el sistema y el método, se determinó atendiendo las recomendaciones de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, 1996), basado en la curva de calibración con el uso de la desviación estándar residual de la línea de regresión y el valor de la pendiente según la ecuación 9:

$$LD = (3.3 \cdot \sigma) / m \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde:

LD = Limite de Detección

σ = Desviación estándar residual de la línea de regresión

m = Pendiente de la curva de calibración

El cálculo de la desviación estándar residual de la línea de regresión, se realizó con la ecuación 10 (IUPAC, 1998):

$$S_{yx} = \sqrt{\Sigma (y - y_i)^2 / m - 2} \quad (\text{Ec. 10})$$

Donde:

S_{yx} = Desviación estándar residual

y = Valor de la respuesta, en este caso área del pico

y_i = Valor de la respuesta estimada obtenida del análisis de regresión

m = Numero de estándares empleados en la elaboración de la curva de calibración

2.7.5 Limite de cuantificación.

El límite de cuantificación del sistema y método, fue calculado también atendiendo los lineamientos de la Conferencia Internacional de Armonización, mediante el uso de los datos de la curva de calibración según la ecuación 11:

$$LC = (10 \cdot \sigma) / m \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde:

LC = Limite de Cuantificación

σ = Desviación estándar residual de la línea de regresión

m = Pendiente de la curva de calibración

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

El cálculo de la desviación estándar residual de la línea de regresión, se realizó con la ecuación 10.

2.7.6 Robustez.

La robustez se evaluó tanto para el sistema de extracción como para el sistema cromatográfico.

Para evaluar la robustez de la extracción se empleó un diseño factorial en el que se realizaron 8 experimentos dentro de los cuales se asignaron valores altos y bajos a las variables, previamente optimizadas, que se observó eran de importancia en el proceso. Las variables y sus valores se presentan en la Tabla 11. Se mantuvieron los valores optimizados del resto de las variables. Se obtuvieron las respuestas y se les aplicó el algoritmo del diseño factorial, según lo descrito en la sección 1.6.1, para evaluar por analito si el cambio de la variable tuvo alguna influencia.

Tabla 11. Diseño factorial para evaluación de la robustez de la extracción

Experimento	Tiempo de Extracción min.	Temperatura de Extracción °C	Tiempo de Desorción min.	Volumen de Desorción μL
1	58	68	7	85
2	58	68	9	95
3	58	72	7	95
4	58	72	9	85
5	62	68	7	95
6	62	68	9	85
7	62	72	7	85
8	62	72	9	95

Para evaluar la robustez del sistema cromatográfico se cambiaron los valores originales de la composición inicial de fase móvil y la temperatura de la columna, asignando valores altos y bajos para cada variable, con el fin de observar si existen cambios en la apariencia de los cromatogramas. Al evaluar la composición de fase móvil se mantuvo en el valor original la temperatura de la columna y viceversa. La Tabla 12 resume los cambios realizados.

Tabla 12. Evaluación de la robustez del sistema cromatográfico

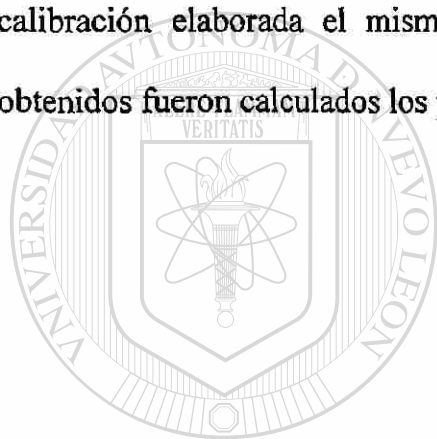
Parámetro Evaluado	Valor Original	Valor Bajo	Valor Alto	Variable Fija
Composición Inicial de Fase Móvil	Agua : ACN* 40 : 60	Agua : ACN 42 : 58	Agua : ACN 38 : 62	Temperatura de la Columna
Temperatura de la Columna	27 °C	26 °C	28 °C	Composición Inicial de Fase Móvil

*Acetonitrilo grado HPLC

2.8 Aplicabilidad del método a muestras reales.

Para evaluar la aplicabilidad del método a muestras reales, se realizaron extracciones a muestras de agua, adicionadas y sin adicionar, para posteriormente realizar su cuantificación. La procedencia de las muestras fue: agua purificada marca comercial GYM, agua del río "Cola de Caballo" del municipio de Santiago Nuevo León y agua de la red de suministro municipal de Monterrey y San Nicolás.

Las muestras colectadas fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C y fraccionadas para realizar el análisis fisicoquímico a cada una. La muestra procedente de río fue previamente filtrada con membrana de nylon. Las muestras procedentes de la red de suministro municipal fueron adicionadas con 100 mg/L de tiosulfato de sodio para eliminar el cloro residual. La muestra de agua purificada no recibió tratamiento alguno. Las muestras se extrajeron y analizaron sin adicionar, posteriormente fueron adicionadas con los analitos a nivel dos de la curva de calibración, extraídas con las condiciones previamente optimizadas, analizadas por HPLC y cuantificadas empleando una curva de calibración elaborada el mismo día de trabajo. Con los valores de concentración obtenidos fueron calculados los porcentajes de error para cada analito.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

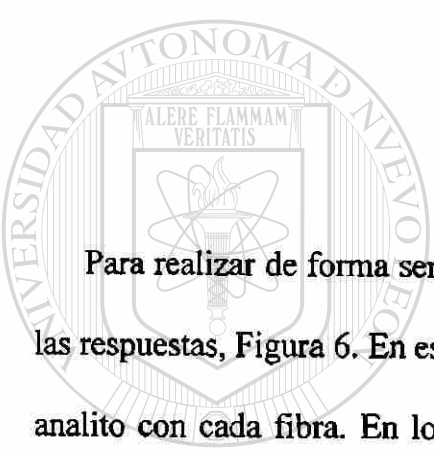
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Selección de Fibra



Para realizar de forma sencilla un comparativo entre fibras se elaboraron gráficos de las respuestas, Figura 6. En estos se presenta el área promedio ($n = 3$) obtenida para cada analito con cada fibra. En los gráficos podemos observar que la fibra de PDMS/DVB presentó el rendimiento más elevado para la mayoría de los analitos. Por lo que esta fibra fue la elegida para el resto del trabajo. Los % RSD obtenidos con cada fibra se presentan en la Tabla 13.

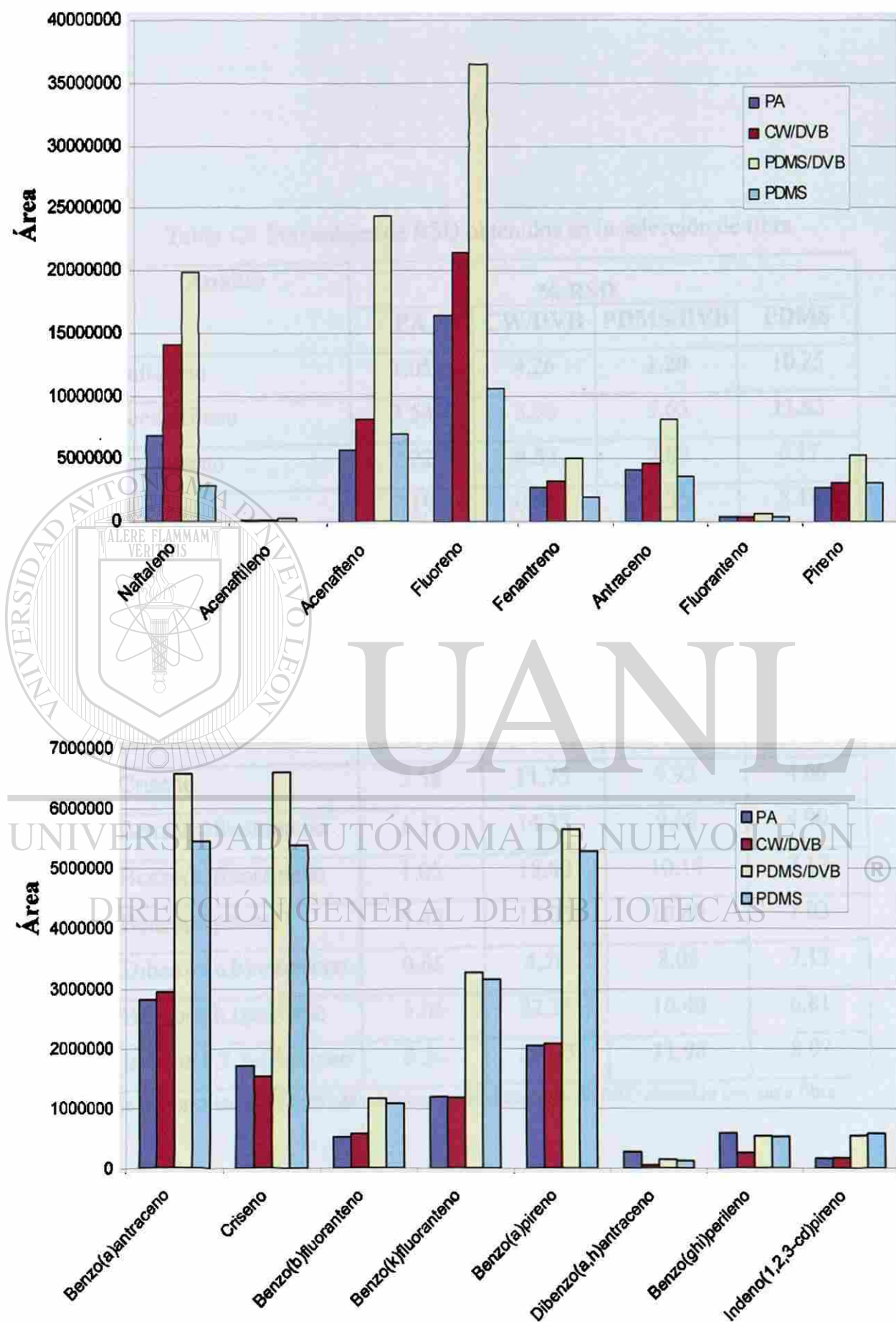


Figura 6. Gráfica de las áreas de los analitos para la selección de fibra

Tabla 13. Porcentajes de RSD obtenidos en la selección de fibra

Analito	% RSD			
	PA	CW/DVB	PDMS/DVB	PDMS
Naftaleno	1.05	4.26	1.20	10.25
Acenaftileno	3.54	3.36	5.65	11.83
Acenafteno	2.22	0.53	7.89	6.17
Fluoreno	2.19	0.84	9.35	8.18
Fenantreno	2.70	1.99	6.89	7.90
Antraceno	3.10	3.03	8.02	6.10
Fluoranteno	2.94	6.46	7.83	2.96
Pireno	4.02	6.31	6.82	2.55
Benzo(a)antraceno	3.81	9.45	9.15	4.69
Criseno	3.58	11.75	9.92	4.66
Benzo(b)fluoranteno	1.53	14.23	9.68	4.90
Benzo(k)fluoranteno	1.05	15.80	10.14	7.17
Benzo(a)pireno	1.42	15.03	10.80	7.03
Dibenzo(a,h)antraceno	0.66	4.76	8.08	7.13
Benzo(g,h,i)perileno	3.06	22.28	10.40	6.81
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2.30	27.75	11.98	8.07

Se presenta en negritas el valor mínimo y máximo de % de RSD obtenido con cada fibra

3.2 Optimización del procedimiento de microextracción

3.2.1 Optimización de la extracción.

Realizados los primeros cinco experimentos descritos en la Tabla 9, siguiendo la metodología de las secciones 2.6 y 2.6.1, se obtuvieron para cada analito las áreas. Con estas áreas se aplicó el algoritmo del DSMD según lo establecido en la sección 1.6.2, para descartar experimentos y originar los nuevos experimentos a realizar. La evolución del DSMD para la extracción planteó 13 experimentos, los primeros cinco son los iniciales, en donde se pudo apreciar que las variables retuvieron su valor o en su defecto presentaron una tendencia (Tabla 14).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 14. Evolución del diseño simplex para la extracción

Experimento	Tiempo en minutos	Temperatura °C	NaCl %	Agitación
1	40	30	0	Baja
2	80	30	0	Media
3	60	70	0	Alta
4	60	50	4	Alta
5	80	70	2	Baja
6	93	70	4	Alta
7	53	70	4	Alta
8	77	70	1.33	Alta
9	57	70	3.33	Alta
10	90	70	0	Alta
11	90	70	0	Alta
12	90	70	4	Alta
13	90	70	2.67	Alta

Así para el tiempo, la temperatura y la agitación la tendencia observada fue hacia valores altos. No se observó un efecto importante de la concentración salina, por lo que se prefirió no adicionar NaCl.

Graficando las áreas de los experimentos realizados se observó que el experimento 10 fue uno de los predominantes durante la evolución del diseño, Figura 7. El experimento 10 tiene los valores de tiempo, temperatura y agitación más altos y la concentración salina más baja. Este resultado confirmó el obtenido mediante cálculos. Por lo que estas condiciones fueron consideradas las óptimas.

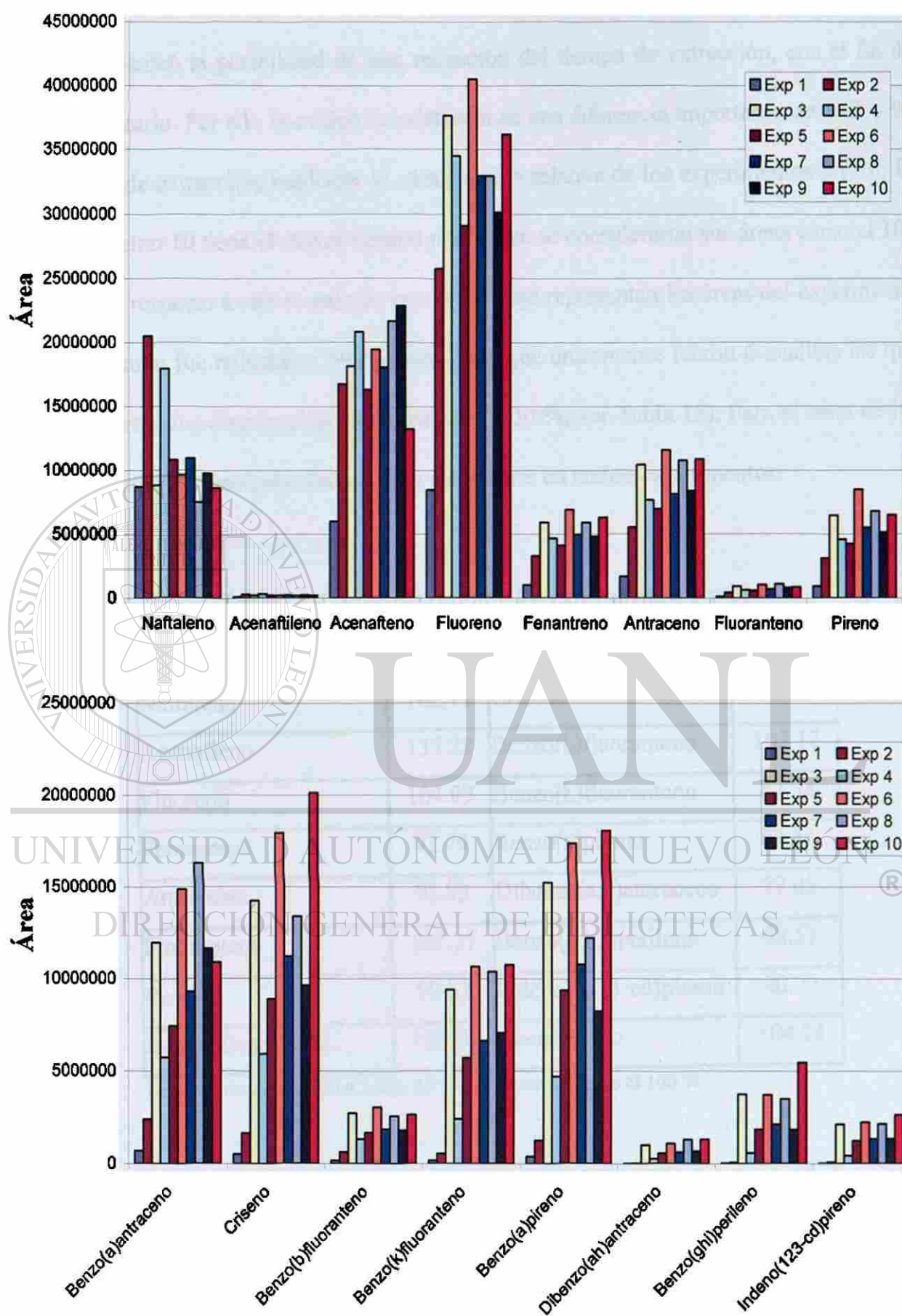


Figura 7. Gráfica de las áreas para la optimización de la extracción

Se planteó la posibilidad de una reducción del tiempo de extracción, con el fin de economizarlo. Por ello se evaluó la existencia de una diferencia importante entre 60 y 90 minutos de extracción, mediante la comparación relativa de los experimentos 3 y 10. El experimento 10 tiene el mayor tiempo por lo que se consideraron sus áreas como el 100 % y con respecto a este se calculó que porcentaje representan las áreas del experimento 3. El tiempo fue reducido a 60 minutos dado que únicamente fueron 6 analitos los que presentaron una disminución en su área (10 a 30 %, ver Tabla 15). Para el resto de los compuestos los resultados fueron muy semejantes en ambos experimentos.

Tabla 15. Comparación entre los experimentos 3 y 10

Nombre	%	Nombre	%
Naftaleno	102.11	Criseno	70.65
Acenafteno	137.22	Benzo(b)fluoranteno	103.17
Fluoreno	104.09	Benzo(k)fluoranteno	87.38
Fenantreno	93.79	Benzo(a)pireno	84.34
Antraceno	95.92	Dibenzo(a,h)antraceno	77.03
Fluoranteno	107.27	Benzo(g,h,i)perileno	68.57
Pireno	99.63	Indeno(1,2,3-cd)pireno	80.22
Benzo(a)antraceno	109.86	Acenaftileno	104.24

Nota: Se consideraron las áreas del experimento 10 como el 100 %

Así, las condiciones finales de extracción fueron 60 minutos a 70 °C con agitación alta y sin cloruro de sodio.

3.2.2 Optimización de la desorción.

Realizados los primeros cuatro experimentos descritos en la Tabla 10, siguiendo la metodología de las secciones 2.6 y 2.6.2, se obtuvieron para cada analito las áreas. Con estas áreas se aplicó el algoritmo del DSMD según lo establecido en la sección 1.6.2, para descartar experimentos y originar los nuevos a realizar. La evolución del diseño simplex nos llevó a realizar 9 experimentos, los cuales presentaron una clara tendencia hacia el menor volumen de desorción posible, Tabla 16. En el caso del tiempo se determinó que debería estar entre 5 y 8 minutos y en cuanto a la composición de solvente la alternancia de valores altos y bajos nos indicó que el efecto de la composición MeOH:ACN es de poca importancia.

Tabla 16. Evolución del diseño simplex para la desorción

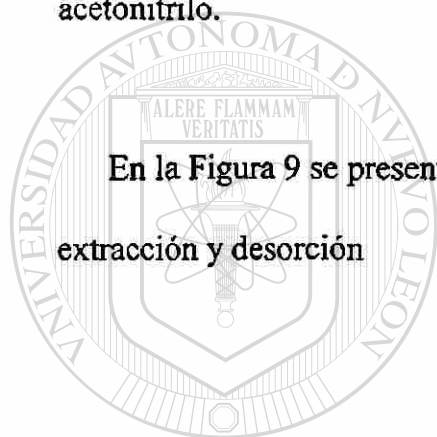
Experimento	Tiempo minutos	Volumen μL	Composición MeOH : ACN
1	2	100	0 : 100
2	8	100	0 : 100
3	5	120	0 : 100
4	5	110	100 : 0
5	5	90	70 : 30
6	11	90	70 : 30
7	8	90	0 : 100
8	5	90	70 : 30
9	2	90	0 : 100

MeOH = Metanol, ACN = Acetonitrilo

Para poder asignar valores a las variables de tiempo y composición de solvente se consideraron las tendencias del sistema previamente descritas y con ayuda de una gráfica de las áreas de todos los experimentos realizados, se evaluó cual de ellos presentaba el mejor rendimiento para la mayoría de los analitos, Figura 8.

El experimento 7 sobresalió de entre los demás, por lo que fue el seleccionado. Así, las condiciones óptimas de desorción se establecieron en 8 minutos y 90 μL de acetonitrilo.

En la Figura 9 se presenta un cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de extracción y desorción



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS. ®

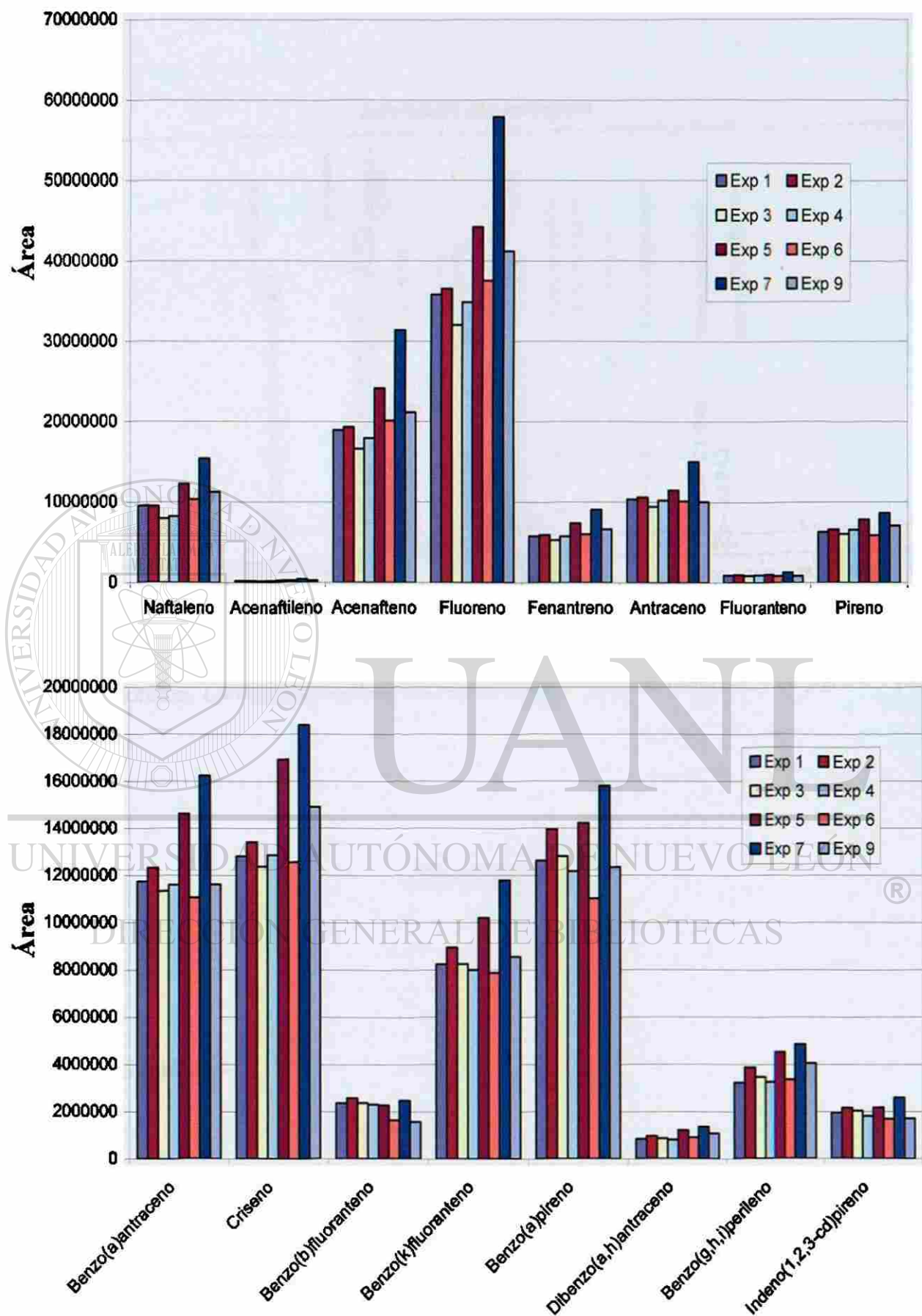


Figura 8. Gráfica de las áreas para la optimización de la desorción

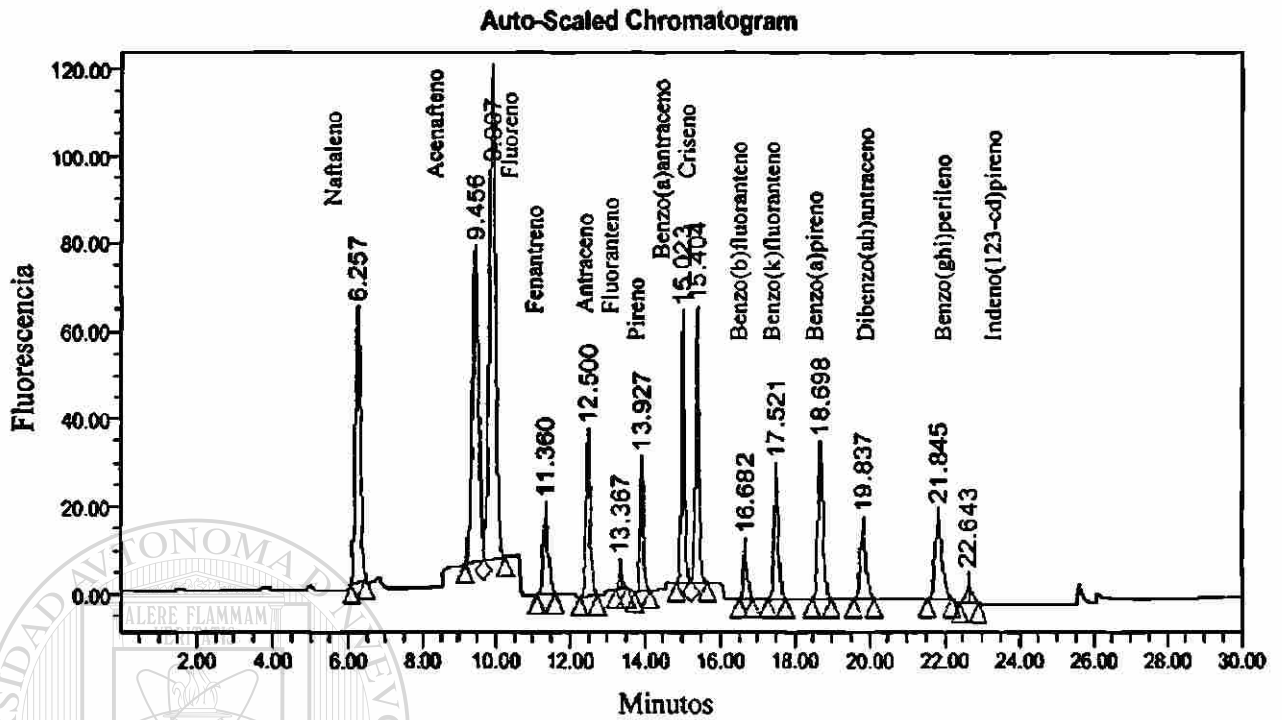


Figura 9. Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de extracción y desorción. La concentración de PAHs se encuentra en un rango de 0.08 $\mu\text{g/L}$ a 4 $\mu\text{g/L}$.

3.3.1 Linealidad.

Los % RSD promedio de los factores de respuesta, los coeficientes de correlación y el intervalo de trabajo obtenido para cada analito, se presentan en la Tabla 17 para el sistema y en la Tabla 18 para el método.

Tabla 17. Resultados de linealidad para el sistema

Analito	% RSD*	r ²	Intervalo de Concentraciones µg/L
Naftaleno	14.73	0.964	1 - 15
Acenaftileno	9.99	0.992	1 - 15
Acenafteno	4.26	0.996	2 - 30
Fluoreno	2.61	0.999	0.2 - 3
Fenantreno	4.58	0.998	0.08 - 1.2
Antraceno	3.75	0.999	0.04 - 0.6
Fluoranteno	8.20	0.996	0.1 - 1.5
Pireno	4.15	0.998	0.2 - 3
Benzo(a)antraceno	3.68	0.999	0.1 - 1.5
Criseno	3.56	0.999	0.1 - 1.5
Benzo(b)fluoranteno	3.66	0.997	0.04 - 0.6
Benzo(k)fluoranteno	4.01	0.999	0.04 - 0.6
Benzo(a)pireno	4.85	0.999	0.1 - 1.5
Dibenzo(a,h)antraceno	9.74	0.996	0.4 - 6
Benzo(ghi)perileno	10.67	0.995	0.16 - 2.4
Indeno(1,2,3-cd)pireno	8.90	0.998	0.1 - 1.5

* % RSD promedio de los factores de respuesta con n = 15

Tabla 18. Resultados de linealidad para el método

Analito	% RSD*	r ²	Intervalo de Concentraciones µg/L
Naftaleno	25.64	0.920	1 - 15
Acenaftileno	7.26	0.993	1 - 15
Acenafteno	9.23	0.995	2 - 30
Fluoreno	5.24	0.997	0.2 - 3
Fenantreno	3.53	0.999	0.08 - 1.2
Antraceno	5.10	0.994	0.04 - 0.6
Fluoranteno	1.92	0.999	0.1 - 1.5
Pireno	2.46	0.999	0.2 - 3
Benzo(a)antraceno	3.28	0.999	0.1 - 1.5
Criseno	3.38	0.999	0.1 - 1.5
Benzo(b)fluoranteno	2.03	0.999	0.04 - 0.6
Benzo(k)fluoranteno	2.83	0.999	0.04 - 0.6
Benzo(a)pireno	3.48	0.998	0.1 - 1.5
Dibenzo(a,h)antraceno	3.49	0.999	0.4 - 6
Benzo(ghi)perileno	4.44	0.997	0.16 - 2.4
Indeno(1,2,3-cd)pireno	5.33	0.998	0.1 - 1.5

* % RSD promedio de los factores de respuesta con n = 15

Los resultados del estadístico t aplicado al coeficiente de correlación, ecuación 7, se presentan en las Tablas 19 y 20, para sistema y método respectivamente. El valor de t de tablas para 13 grados de libertad con un alfa de 0.025 es de 2.16. Se acepta que existe linealidad si los valores de t calculados son superiores al valor t de tablas. Según esta prueba, todos los analitos presentaron linealidad.

Tabla 19. Prueba t para coeficientes de correlación
de curvas de calibración del sistema

Analito	Valor t Calculado
Naftaleno	13.07
Acenaftileno	27.98
Acenafteno	42.38
Fluoreno	80.56
Fenantreno	55.55
Antraceno	76.81
Fluoranteno	38.31
Pireno	61.76
Benzo(a)antraceno	84.93
Criseno	90.08
Benzo(b)fluoranteno	45.68
Benzo(k)fluoranteno	76.81
Benzo(a)pireno	76.81
Dibenzo(a,h)antraceno	39.69
Benzo(ghi)perileno	35.92
Indeno(1,2,3-cd)pireno	51.95

Tabla 20. Prueba t para coeficientes de correlación de curvas de calibración del método

Analito	Valor t Calculado
Naftaleno	8.47
Acenaftileno	30.10
Acenafteno	35.56
Fluoreno	48.08
Fenantreno	68.07
Antraceno	33.04
Fluoranteno	127.44
Pireno	127.44
Benzo(a)antraceno	76.81
Criseno	84.93
Benzo(b)fluoranteno	113.97
Benzo(k)fluoranteno	68.07
Benzo(a)pireno	63.66
Dibenzo(a,h)antraceno	113.97
Benzo(ghi)perileno	48.97
Indeno(1,2,3-cd)pireno	54.27

3.3.2 Precisión y exactitud.

Los resultados de precisión y exactitud para el sistema se presentan en la Tabla 21 y para el método en la Tabla 22.

Tabla 21. Resultados de precisión y exactitud para el sistema

Analito	Intradía % RSD	Interdía % RSD	% Error
Naftaleno	9.73	19.97	40.08
Acenaftileno	3.61	6.23	17.05
Acenafteno	2.23	5.55	10.84
Fluoreno	3.57	4.44	7.01
Fenantreno	3.02	3.95	3.21
Antraceno	4.19	3.36	5.94
Fluoranteno	0.40	11.28	8.61
Pireno	6.77	5.34	0.92
Benzo(a)antraceno	5.54	3.82	5.46
Criseno	6.00	4.35	5.15
Benzo(b)fluoranteno	4.90	8.35	10.13
Benzo(k)fluoranteno	4.27	8.12	10.35
Benzo(a)pireno	3.78	14.39	14.58
Dibenzo(a,h)antraceno	1.98	4.22	3.63
Benzo(ghi)perileno	4.18	3.31	1.90
Indeno(1,2,3-cd)pireno	3.01	16.57	19.79

Para la precisión intradía n = 3, para la interdía n = 9 y para la exactitud n = 9

Tabla 22. Resultados de precisión y exactitud para el método

Analito	Intradía CV	Interdía CV	% Error
Naftaleno	3.79	12.30	3.20
Acenaftileno	1.56	4.33	0.80
Acenafteno	1.92	6.48	2.41
Fluoreno	1.66	4.82	0.41
Fenantreno	1.80	3.06	2.03
Antraceno	0.97	2.54	2.49
Fluoranteno	1.13	5.66	4.69
Pireno	2.21	3.59	2.75
Benzo(a)antraceno	1.86	3.27	4.65
Criseno	2.31	2.91	3.26
Benzo(b)fluoranteno	1.68	6.05	4.65
Benzo(k)fluoranteno	1.69	2.68	4.26
Benzo(a)pireno	2.67	2.87	6.80
Dibenzo(a,h)antraceno	0.79	3.42	1.84
Benzo(ghi)perileno	2.83	2.70	7.40
Indeno(1,2,3-cd)pireno	1.21	5.16	6.70

Para la precisión intradía $n = 3$, para la interdía $n = 9$ y para la exactitud $n = 9$

En la Tabla 23 se presentan los resultados de la prueba t aplicada a los datos de concentración obtenidos para evaluar el efecto de matriz. Para cuatro analitos se encontró que existió una diferencia entre los valores de concentración obtenidos mediante el uso de estándares (sistema) o de matriz adicionada (método).

Tabla 23. Resultados del estudio de efecto de matriz

Analito	Concentración $\mu\text{g/L}^*$		Prueba t $-t_{\text{tab}} < t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$	Efecto de Matriz
	Sistema	Método		
Naftaleno	1.07	0.96	$-2.77 < 0.35 < 2.77$	No
Acenaftileno	1.56	1.79	$-2.77 < -5.67 < 2.77$	Si
Acenafteno	3.32	3.36	$-4.30 < -0.16 < 4.30$	No
Fluoreno	0.35	0.37	$-4.30 < -1.11 < 4.30$	No
Fenantreno	0.14	0.15	$-2.77 < -1.76 < 2.77$	No
Antraceno	0.07	0.07	$-4.30 < -1.84 < 4.30$	No
Fluoranteno	0.17	0.20	$-2.77 < -7.04 < 2.77$	Si
Pireno	0.38	0.38	$-2.77 < 0.26 < 2.77$	No
Benzo(a)antraceno	0.18	0.20	$-2.77 < -3.12 < 2.77$	Si
Criseno	0.18	0.20	$-2.77 < -2.51 < 2.77$	No
Benzo(b)fluoranteno	0.07	0.07	$-3.18 < -1.10 < 3.18$	No
Benzo(k)fluoranteno	0.07	0.08	$-2.77 < -3.13 < 2.77$	Si
Benzo(a)pireno	0.19	0.19	$-2.77 < 0.003 < 2.77$	No
Dibenzo(a,h)antraceno	0.80	0.78	$-2.77 < 1.20 < 2.77$	No
Benzo(ghi)perileno	0.30	0.29	$-4.30 < 1.96 < 4.30$	No
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0.18	0.18	$-2.77 < -0.99 < 2.77$	No

*Promedio de las concentraciones obtenidas con cada calibración ($n = 3$). Las muestras fueron adicionadas al nivel 2 de la curva de calibración (la concertación de cada analito con la adición puede ser consultada en la Tabla 27).

3.3.3 Límites de detección y cuantificación.

En las Tablas 24 y 25 se presentan los límites de detección y cuantificación para cada analito para sistema y método, respectivamente. En todos los casos los LC estuvieron por debajo del nivel 1 de la curva de calibración.

Tabla 24. Límites de detección y cuantificación para el sistema

Analito	LD µg/L	LC µg/L
Naftaleno	0.346	1.049
Acenaftileno	0.142	0.430
Acenafteno	0.296	0.896
Fluoreno	0.020	0.061
Fenantreno	0.009	0.028
Antraceno	0.005	0.016
Fluoranteno	0.035	0.107
Pireno	0.032	0.096
Benzo(a)antraceno	0.011	0.033
Criseno	0.011	0.033
Benzo(b)fluoranteno	0.002	0.007
Benzo(k)fluoranteno	0.006	0.017
Benzo(a)pireno	0.016	0.048
Dibenzo(a,h)antraceno	0.065	0.197
Benzo(ghi)perileno	0.025	0.077
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0.017	0.051

LD = Límite de detección, LC = Límite de cuantificación

Tabla 25. Límites de detección y cuantificación
para el método

Analito	LD µg/L	LC µg/L
Naftaleno	0.309	0.936
Acenaftileno	0.051	0.154
Acenafteno	0.306	0.929
Fluoreno	0.036	0.109
Fenantreno	0.009	0.028
Antraceno	0.006	0.017
Fluoranteno	0.005	0.017
Pireno	0.027	0.081
Benzo(a)antraceno	0.019	0.057
Criseno	0.017	0.053
Benzo(b)fluoranteno	0.006	0.018
Benzo(k)fluoranteno	0.006	0.018
Benzo(a)pireno	0.016	0.050
Dibenzo(a,h)antraceno	0.065	0.197
Benzo(ghi)perileno	0.029	0.088
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0.009	0.026

LD = Límite de detección, LC = Límite de cuantificación

3.3.4 Robustez.

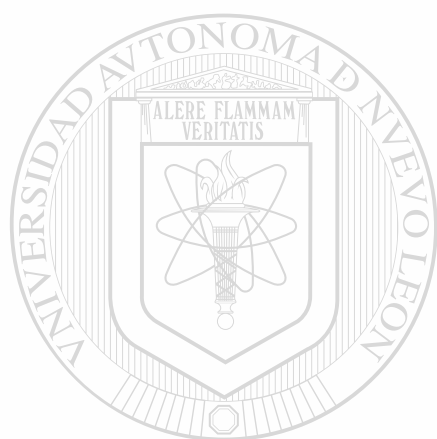
En la Tabla 26 se presenta un resumen de los resultados obtenidos de la evaluación de la robustez de la extracción. Se pudo apreciar que las cuatro variables tuvieron algún efecto en por lo menos dos analitos.

Tabla 26. Resultados de la evaluación de la robustez de la microextracción

Analito	Tiempo Extracción	Temperatura Extracción	Tiempo Desorción	Volumen Desorción
Naftaleno	Si	Si	No	Si
Acenaftileno	Si	Si	Si	Si
Acenafteno	No	No	No	Si
Fluoreno	No	No	No	Si
Fenantreno	No	No	No	Si
Antraceno	No	No	No	Si
Fluoranteno	No	No	No	Si
Pireno	No	No	No	No
Benzo(a)antraceno	No	No	No	No
Criseno	No	No	No	No
Benzo(b)fluoranteno	No	No	No	No
Benzo(k)fluoranteno	Si	No	No	No
Benzo(a)pireno	Si	Si	No	No
Dibenzo(a,h)antraceno	No	No	No	No
Benzo(ghi)perileno	No	Si	No	No
Indeno(1,2,3-cd)pireno	Si	Si	Si	No

Los resultados presentados son la interpretación de la información numérica analizada. La palabra "Si" indica efecto de la variable, la palabra "No" indica ausencia del efecto.

En cuanto la robustez de la parte instrumental, para los cuatro casos planteados en la Tabla 12 se percibieron cambios en los cromatogramas, un ejemplo de dichos cambios se presenta en la Figura 10. Los resultados de estos cambios produjeron en todos los casos afectación de las áreas de algunos analitos tal es el caso del acenafteno (9.45 min), el fluoranteno (13.36) y los dos últimos picos del cromatograma.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

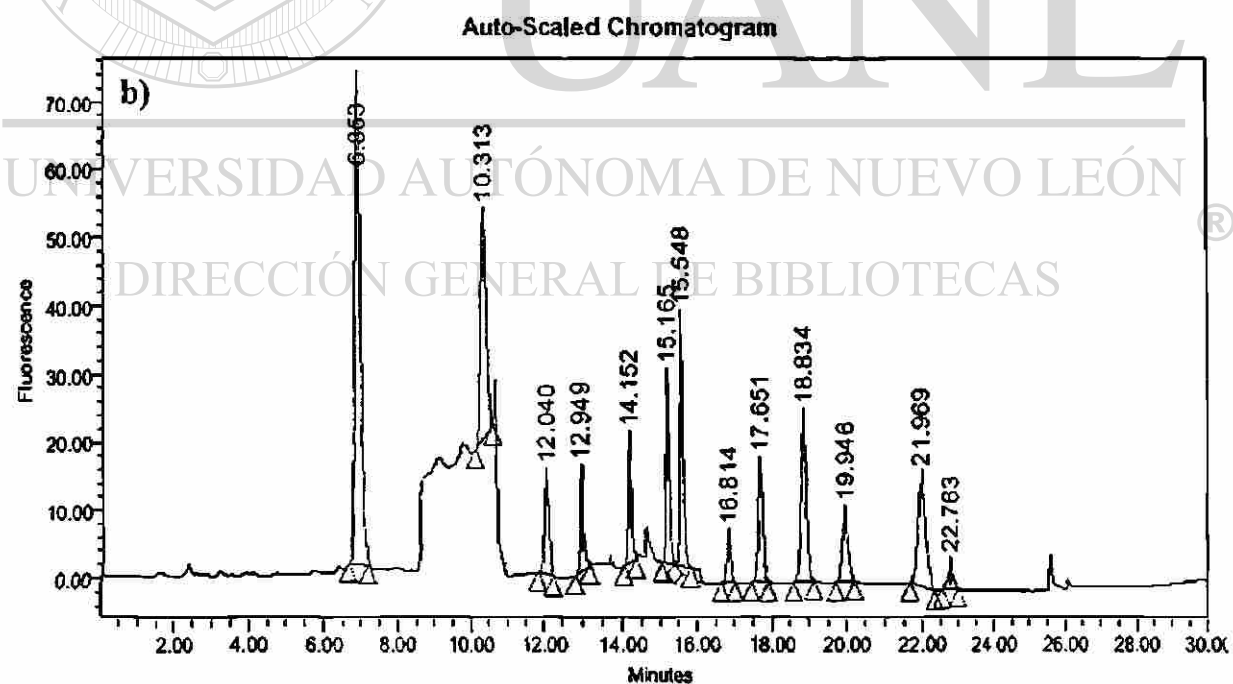
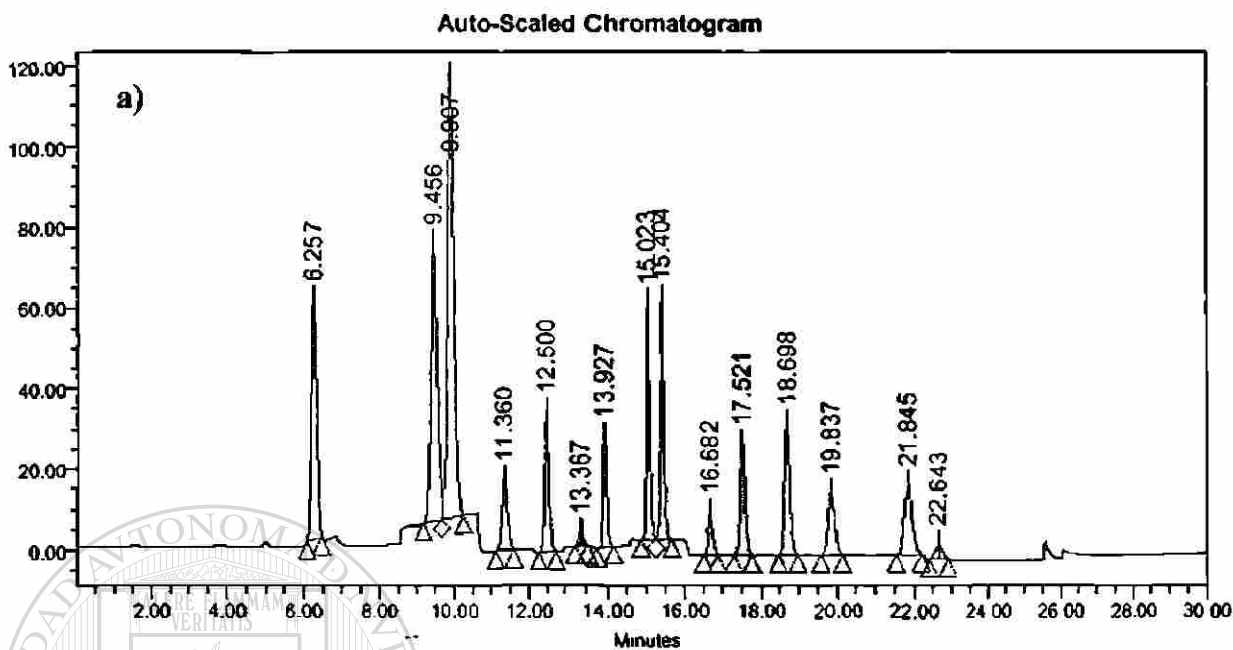


Figura 10. a) Cromatograma obtenido con las condiciones normales (fase móvil inicial agua - acetonitrilo 40:60), b) Cromatograma obtenido con una fase móvil inicial baja en acetonitrilo (agua - acetonitrilo 42:58).

3.4 Análisis de muestras reales

Se realizó el análisis de cuatro muestras: agua purificada marca GYM, agua del río “Cola de Caballo” (Santiago, N.L) y agua de la red de suministro municipal de Monterrey y San Nicolás. Los cromatogramas de las muestras sin adicionar no presentaron señales evidentes de los analitos, Figura 11.

Los resultados de las muestras adicionadas se presentan en la Tabla 27 y en la Tabla 28. Ejemplos de los cromatogramas obtenidos de la extracción de muestras adicionadas se presentan en la Figura 12.

Los análisis fisicoquímicos de todas las muestras fueron realizados en el Laboratorio de Servicio Analítico del Departamento de Químico Analítica (LASEQA) de la Facultad de Medicina de la UANL. Los resultados se presentan en la Tabla 29.

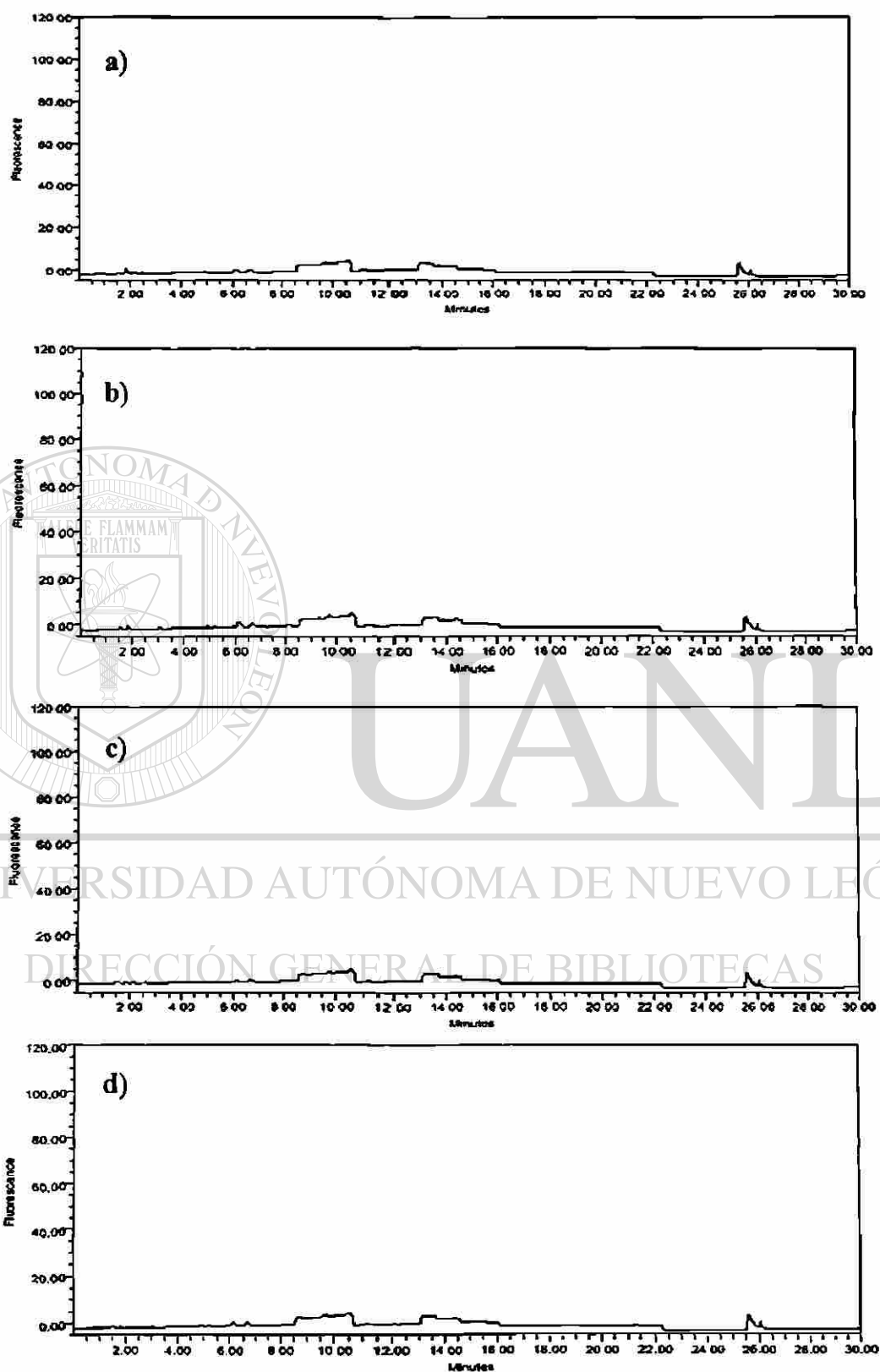


Figura 11. Cromatogramas de las muestras sin adicionar. a) agua GYM, b) agua de río, c) suministro municipal de Monterrey y d) suministro municipal de San Nicolás

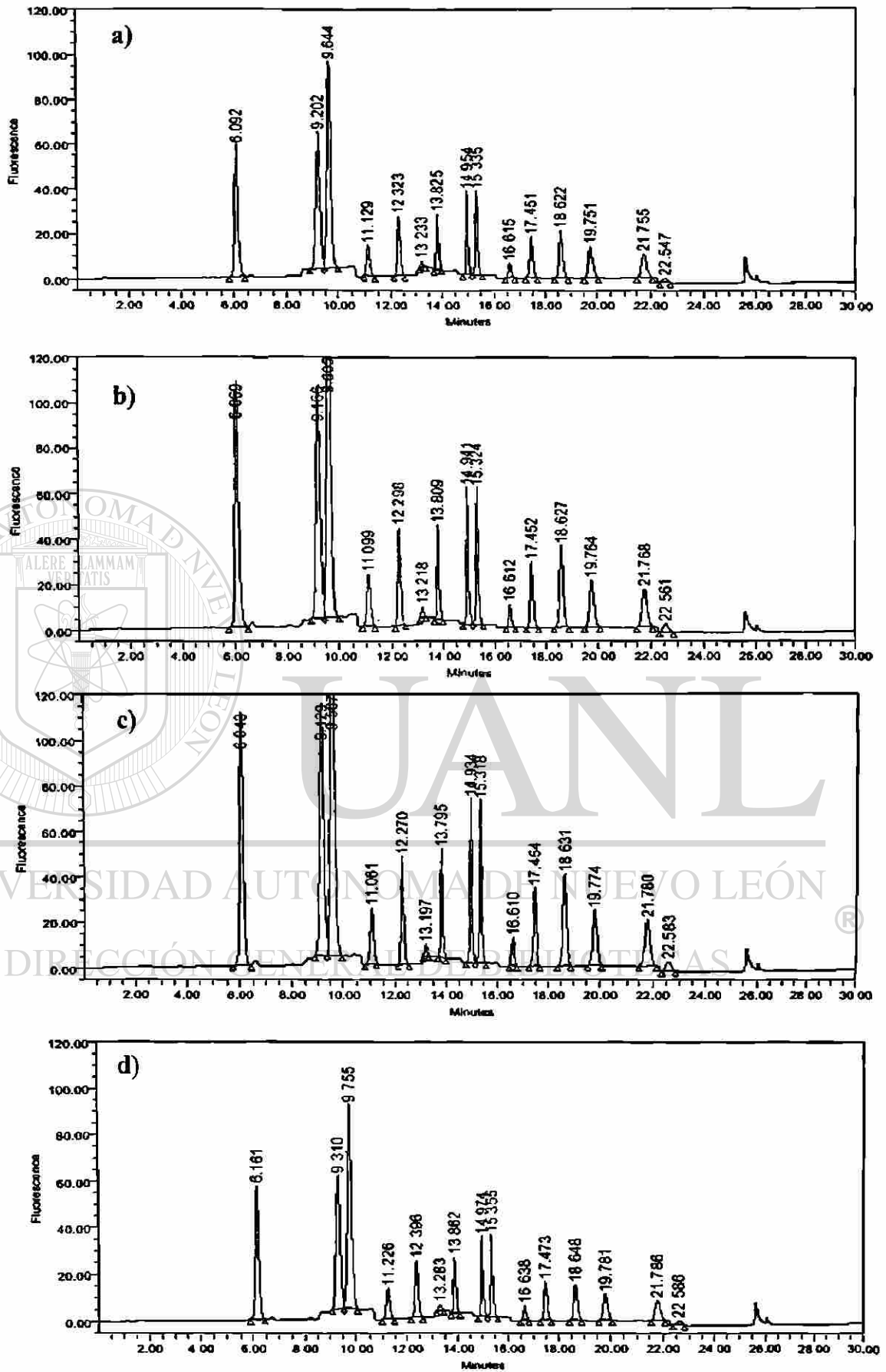


Figura 12. Cromatogramas de las muestras adicionadas. a) agua GYM, b) agua de río, c) suministro municipal de Monterrey y d) suministro municipal de San Nicolás

Tabla 27. Resultados y % error obtenidos para el agua GYM y el agua de río

Analito	Conc. Ad. µg/L	Muestra GYM* µg/L	% Error	Cola de Caballo* µg/L	% Error
Naftaleno					
Acenaftileno	2.00	1.95	2.40	1.70	14.98
Acenafteno	4.00	3.78	5.43	3.34	16.47
Fluoreno	0.40	0.39	1.90	0.34	14.98
Fenantreno	0.16	0.16	1.22	0.14	13.36
Antraceno	0.08	0.08	3.58	0.07	15.16
Fluoranteno	0.20	0.20	2.05	0.18	12.31
Pireno	0.40	0.39	3.62	0.32	19.39
Benzo(a)antraceno	0.20	0.19	6.49	0.17	16.88
Criseno	0.20	0.19	3.69	0.17	17.36
Benzo(b)fluoranteno	0.08	0.08	2.82	0.07	14.51
Benzo(k)fluoranteno	0.08	0.08	3.50	0.07	15.67
Benzo(a)pireno	0.20	0.19	5.00	0.17	16.53
Dibenzo(a,h)antraceno	0.80	0.79	1.24	0.60	24.94
Benzo(ghi)perileno	0.32	0.30	6.36	0.23	26.97
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0.20	0.19	6.14	0.16	19.77

* Concentración promedio obtenida de la curva de calibración (n = 3)

Tabla 28. Resultados y % error obtenidos para el agua de la red de suministro municipal de Monterrey y San Nicolás

Analito	Conc. Ad. µg/L	Monterrey µg/L	% Error	San Nicolás µg/L	% Error
Naftaleno					
Acenaftileno	2.00	1.66	16.76	0.80	60.02
Acenafteno	4.00	3.25	18.67	1.48	63.11
Fluoreno	0.40	0.33	16.75	0.16	60.80
Fenantreno	0.16	0.13	15.87	0.06	60.17
Antraceno	0.08	0.07	16.23	0.03	59.44
Fluoranteno	0.20	0.18	10.89	0.09	52.74
Pireno	0.40	0.32	18.77	0.14	64.49
Benzo(a)antraceno	0.20	0.17	15.69	0.08	61.74
Criseno	0.20	0.17	16.29	0.08	61.45
Benzo(b)fluoranteno	0.08	0.07	12.43	0.04	54.97
Benzo(k)fluoranteno	0.08	0.07	13.73	0.03	60.18
Benzo(a)pireno	0.20	0.16	20.35	0.06	70.65
Dibenzo(a,h)antraceno	0.80	0.63	20.89	0.25	68.31
Benzo(ghi)perileno	0.32	0.25	21.64	0.09	70.89
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0.20	0.16	18.42	0.07	67.15

* n = 3

Tabla 29. Resultados del análisis fisicoquímico de las muestras*

Parámetro	Agua GYM	Río "Cola de Caballo"	Suministro Municipal de Monterrey	Suministro Municipal de San Nicolás
pH	6.40	7.96	7.63	7.64
Conductividad	117	450	553	771
Dureza Total	35	277	290	350
Alcalinidad	61	244	183	244
Sólidos Totales	70	275	445	560
Sulfatos	11	44	128	144
Cloro Residual	N.D.	N.D.	126	85
Nitrógeno Amoniacal	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nitratos	2	N.D.	N.D.	1

* Resultados proporcionados por el LASEQA. La conductividad se reporta en milisiemens. Con excepción del pH, el resto de los resultados se reportan en mg/L. N.D. = No detectado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

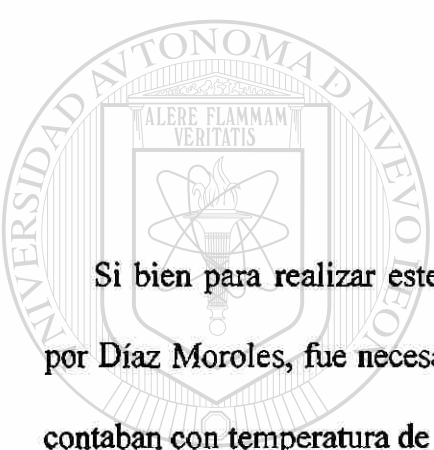
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Análisis cromatográfico.



Si bien para realizar este trabajo se partió del método cromatográfico desarrollado por Díaz Moroles, fue necesario realizar algunos ajustes. Las condiciones adoptadas no contaban con temperatura de muestra definida, por lo que fue controlada a 25 °C.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La temperatura de la columna es un parámetro de suma importancia que debe de ser cuidadosamente controlado, ya que pequeñas variaciones de la temperatura producen cambios en los tiempos de retención de los analitos. El mantener a 27 °C la temperatura de la columna presentó dificultades técnicas. Aunque se evaluó la posibilidad de emplear otras temperaturas de columna, no fue posible el cambio de esta temperatura debido a la pérdida de resolución entre el benzo(g,h,i)perileno y el indeno(1,2,3-cd)pireno y a las dificultades que representó el ajuste del programa de fluorescencia para “reubicar” la señal de algunos analitos, por lo que este parámetro quedó en su valor original.

Por otro lado, el volumen de inyección fue incrementado con el fin de aumentar la respuesta obtenida, cuidando que los picos no presentaran un ensanchamiento importante ya que podría afectar la resolución y el programa de fluorescencia, lo que resultaría en la afectación de las áreas.

Al emplear un programa de longitudes de onda de excitación y emisión para el detector de fluorescencia, tenemos la ventaja de proporcionar las longitudes de onda apropiadas para cada analito. Sin embargo, los cambios de longitudes de onda se realizan de forma programada en tiempos específicos de la corrida cromatográfica; si por alguna circunstancia el tiempo de elución del analito se modifica puede surgir la pérdida de la detección o bien el “corte” del pico con la consecuente disminución de áreas. Esto es particularmente problemático para las señales del fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno y el indeno(1,2,3-cd)pireno. Se observó que según el tipo de fibra empleada se presentaban variaciones en los tiempos de retención de algunos analitos con respecto a los tiempos de retención de un estándar inyectado directamente. Considerando lo anterior los tiempos del programa de fluorescencia debieron ser ajustados cada vez que fue necesario.

Es importante contar con controles del sistema cromatográfico. Uno de estos controles fue realizar la corrida de un estándar cada día de trabajo, para asegurar que la respuesta de los detectores y los tiempos de retención fueran los esperados. Por otra parte, ya que los analitos tienden a quedar adsorbidos en los materiales con los que tienen contacto, es importante realizar una buena limpieza del sistema cromatográfico y verificarlo mediante el empleo de blancos.

Debe tomarse cuidado especial para el inyector, el cual debe de purgarse con frecuencia y de forma extendida para garantizar que no existan arrastres entre corridas.

4.2 Microextracción en fase sólida.

4.2.1 Procedimiento de la SPME.

La microextracción presentó algunos desafíos a vencer. Uno de ellos fue lograr establecer una configuración de materiales que nos permitiera realizar las extracciones de forma controlada, reproducible y segura para la fibra. La configuración final empleada fue derivada de los materiales disponibles y de atender las necesidades intrínsecas de la microextracción. En dicha configuración, detalles como la posición de los viales en la placa de agitación y la altura a la que se posicionan los sujetadores de la fibra adquieren relevancia para la reproducibilidad de los resultados. La microextracción fue realizada en cuatro pasos, dada la fragilidad de la fibra cada uno de ellos representa una posibilidad de ruptura de la misma. Debe tenerse en consideración la resistencia de los septums de los viales, ya que aunque la fibra está protegida por una aguja metálica, si al intentar perforar el septum ésta empieza a doblarse, es posible la fractura interna de la fibra o el desprendimiento de la fase polimérica. Por otro lado, el exponer la fibra en un inserto con pocos microlitros de solvente para realizar la desorción representa un reto, ya que la fibra debe quedar completamente inmersa y no ser doblada para evitar daños.

4.2.2 Selección de fibra.

Para asegurar la visualización de todos los analitos en el proceso de selección de fibra (y la etapa de optimización), se trabajó a concentraciones relativamente elevadas de los analitos, con respecto a los niveles permisibles. Ya que está reportado que las fibras tienen capacidad de adsorción limitada por su cubierta polimérica (Chen, 2003), se tuvo en consideración que la concentración no fuese demasiado alta para evitar que la saturación de las fibras por los analitos con mayor capacidad de transferencia impidiera la extracción de los analitos que requieren más tiempo para ello. También se consideró que la concentración no fuera demasiado elevada para poder predecir el comportamiento a más bajas concentraciones.

Si bien se reporta el uso de las fibras de PA y PDMS para el análisis de PAHs en agua (Doong, 2000; Pino, 2004), se ha observado que presentan cierto grado de discriminación por los analitos según su peso molecular. Se pensó que las fibras de CW/DVB y PDMS/DVB al estar constituidas por fases poliméricas mixtas podrían extraer mayor cantidad de los analitos tanto de alto como de bajo peso molecular.

En los primeros experimentos de selección de fibra se obtuvieron % RSD elevados, lo que indicó que existían factores que no estaban controlados apropiadamente y que por tanto el sistema de extracción debía ser optimizado. El análisis minucioso del sistema para la identificación de las posibles fallas, indicó que el error principal era debido a que el volumen de desorción era insuficiente para cubrir totalmente la fibra, por lo que éste

fue incrementado. Con esta modificación se obtuvieron mejores % RSD lo que confirmó que el problema principal lo constituía el volumen de desorción. Aunque se tuvo la pérdida temprana de la fibra de CW/DVB, esto no representó mayor inconveniente ya que con la información disponible se pudo apreciar que ningún analito presentó la mejor respuesta con esta fibra.

Otro factor contemplado como fuente de variación, fue la limpieza de las barras magnéticas. Para evaluarlo se realizaron tres extracciones empleando barras magnéticas nuevas, de esta forma se obtuvieron % RSD menores a los obtenidos reutilizando las barras. Por tanto se incluyó una etapa de limpieza cuidadosa de los agitadores magnéticos que incluyó lavados repetidos con acetona en un baño de ultrasonido y secado en la estufa.

Se observó que con la fibra de PA se obtuvo buen rendimiento para los analitos de bajo peso molecular y la de PDMS para los de mayor peso molecular, tal como había sido reportado (Doong, 2000; Pino, 2004). La fibra de PDMS/DVB presentó un comportamiento muy similar a la de PDMS para los analitos de mayor peso molecular y tuvo mayor rendimiento que la fibra de PA para los de menor peso molecular. La fibra de CW/DVB se comportó muy similar a la de PA; presentó bajo rendimiento para los analitos de mayor peso molecular, en los casos del dibenzo(a,h)antraceno y del benzo(g,h,i)perileno se observó un rendimiento incluso menor. En cuanto a los analitos de menor peso molecular, se obtuvo mejor rendimiento con diferencia importante sólo para el naftaleno, el acenafteno y el fluoreno.

Como se observa en la Tabla 13, los % RSD más elevados obtenidos al final de los ajustes del sistema de extracción fueron como sigue: para la fibra de PA van de 0.66 a 4.02 %, CW/DVB de 0.53 a 27.75 %, PDMS/DVB de 1.20 a 11.98 % y PDMS de 2.55 a 11.83 %. Fue elegida la fibra PDMS/DVB, por el buen rendimiento para los 16 PAHs en estudio y los % RSD aceptables, Figura 6. Esto último es relevante ya que en la literatura se propone el uso de dos fibras para el análisis de los 16 analitos (Doong, 2000). En el trabajo desarrollado por King (2004) se realiza la determinación de los 16 analitos con el uso de la fibra de PDMS, sin embargo en nuestro caso esta fibra no fue la que presentó el mejor rendimiento. Así mismo las condiciones de trabajo son distintas a las nuestras, no le da importancia a la temperatura de la muestra y la agitación fue realizada con ultrasonido. Por otra parte, existen reportes donde se propone el uso de la fibra de PDMS para la determinación de PAHs, pero que sólo contemplan los analitos de alto peso molecular (Chen, 2004; Gracia-Falcón, 2004).

4.2.3 Optimización de la SPME.

El DSMD fue una herramienta muy útil para determinar las condiciones de extracción y desorción, pero en su uso deben tenerse ciertas consideraciones. Debido a que los experimentos no se realizan todos en un solo día y a que el parámetro utilizado es la respuesta del detector, tanto el DSMD como el diseño factorial requieren que exista precisión. Fue por ello que el DSMD se realizó a concentraciones relativamente elevadas para reducir las posibles variaciones que se tienen al trabajar con concentraciones

diluidas. Así mismo, con el estudio efectuado para la selección de fibra observamos que existió precisión.

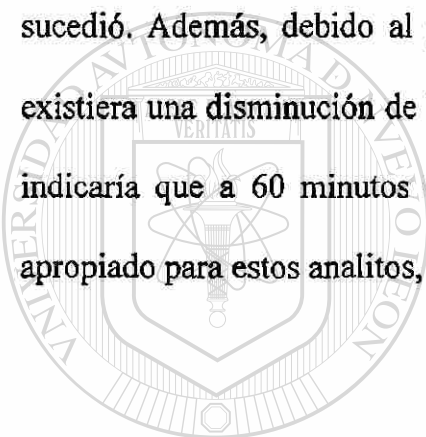
Por otro lado, tanto para la extracción como para la desorción, existieron tendencias de las variables en estudio lo que indica que el sistema estaba bajo control, Tablas 14 y 16. La carencia de control en la evolución del DSMD hubiera sido evidente por la falta de tendencia de las variables, es decir el realizar más experimentos no presentaría un patrón definido. La evolución del DSMD de la desorción nos permitió concluir que el tiempo óptimo de desorción debería estar entre 5 y 8 minutos, ya que en los experimentos llevados a cabo con tiempos fuera de este rango produjeron la disminución de las áreas para la mayoría de los compuestos. En cuanto a la composición de solvente la alternancia de valores altos y bajos nos indicó que el efecto de la composición MeOH:ACN fue de poca importancia. El hecho de que el solvente fuera solamente acetonitrilo y no una mezcla con metanol fue ventajoso, ya que se evitan variaciones no controladas en la composición, que pudieran alterar los resultados.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se consideraron las limitaciones operacionales de los equipos y los materiales disponibles para establecer los valores máximos que pudieron tomar las variables en el diseño. Sin embargo, las tendencias de las variables nos llevaron a plantear experimentos que eran técnicamente imposibles. Por ejemplo, para la extracción las tendencias del tiempo, la temperatura y la agitación siempre fueron hacia valores altos, planteando experimentos de varias horas, de más de 100 °C y donde la capacidad máxima de la placa de agitación era superada. Otro caso fue el volumen de desorción, cuya tendencia fue hacia volúmenes menores de 90 μ L. Ante esta situación para definir

las condiciones de los nuevos experimentos, se emplearon los valores límites establecidos y se probaron de esta manera.

La economía del tiempo es muy importante cuando se tiene o se requiere analizar una cantidad considerable de muestras, por lo que la reducción en el tiempo de extracción de 90 a 60 minutos fue ventajosa. Debe de aclararse que se permitió que el tiempo de extracción se prolongara hasta 90 minutos durante la evolución del DSMD con el fin de explorar si los incrementos de las respuestas eran significativos, lo cual no sucedió. Además, debido al principio por el que opera la SPME, se verificó que no existiera una disminución de la respuesta de los analitos de menor peso molecular, esto indicaría que a 60 minutos se estaba próximo a sobrepasar el tiempo de extracción apropiado para estos analitos, cosa que tampoco aconteció.



U.A.N.L.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



4.3.1 Linealidad.

Los intervalos de trabajo fueron diversos; para los analitos con menor concentración en el estándar certificado se originaron intervalos de 0.04 a 0.6 $\mu\text{g/L}$ y para el más concentrado de 2 a 30 $\mu\text{g/L}$, Tablas 17 y 18. Con excepción del naftaleno se obtuvieron

coeficientes de correlación que van de 0.992 a 0.999 y de 0.993 a 0.999 para sistema y método respectivamente. Para el naftaleno los resultados no fueron satisfactorios, los valores del coeficiente de correlación fueron de 0.964 para el sistema y de 0.920 para el método. Tanto los valores de los coeficientes de correlación como los intervalos de trabajo son similares a los reportados en otros trabajos de microextracción, incluyendo el valor obtenido para el naftaleno (Popp, 2000; Doong, 2000).

Como se puede interpretar a partir de las Tablas 19 y 20, la prueba t realizada sugiere que todos los analitos presentan linealidad. Sin embargo, si consideramos los coeficientes de correlación y la forma de las curvas de calibración es evidente que el naftaleno no presenta linealidad en el intervalo de 1 – 15 µg/L. El resto de los analitos presentan buena linealidad.

En el caso del naftaleno, como se obtuvieron coeficientes de correlación insatisfactorios, se analizó la posibilidad de emplear otros modelos que describieran la relación entre respuesta y concentración, sin embargo no se encontró un modelo satisfactorio. Las predicciones de concentración que se realicen bajo estas condiciones presentan porcentajes de error elevados, por lo que se decidió no considerarlo en la determinación de muestras reales. Cabe mencionar, que el comportamiento del naftaleno era esperado ya que en la bibliografía se reportan coeficientes de correlación bajos para este analito y por lo regular sus resultados son considerados de forma independiente (Popp, 2000). La explicación que se da a este fenómeno se fundamenta en que el naftaleno es el más volátil de los analitos analizados por lo que al trabajarlo a

temperaturas elevadas y a concentraciones bajas se favorece su pérdida generando grandes variaciones.

4.3.2 Precisión.

Para el sistema, la precisión intradía presentó valores que van de 0.40 a 6.77 % RSD y para la interdía de 3.31 a 16.57 %, sin considerar el naftaleno. En el caso del método, para la precisión intradía se obtuvieron valores que van de 0.79 a 2.67 % RSD y para la interdía de 2.54 a 6.48 %. Para el naftaleno, los resultados fueron como sigue: para el sistema se obtuvo 9.73 y 19.97 % y para el método 3.79 y 12.30 % para la precisión intradía e interdía, respectivamente. Nuestros resultados de precisión son similares a los reportados en otros trabajos de microextracción, aunque éstos son principalmente para la fibra de PDMS (King, 2004; Popp, 2000). Se ha reportado que son de esperarse % RSD mayores para los PAHs de mayor tamaño, sin embargo los resultados obtenidos por nosotros no presentan este patrón (Doong, 2000). Por otra parte, los resultados de precisión obtenidos en este trabajo fueron menores a los reportados para el método de extracción líquido – líquido, EPA 550, que se encuentran en un rango de 2.8 a 33.2 % RSD.

Considerando los resultados de las Tablas 21 y 22, se aprecia que para el sistema se obtuvieron los % RSD mayores tanto para la precisión intradía como para la interdía. Se desconoce la razón de este resultado experimental.

4.3.3 Exactitud.

La exactitud se expresó como % Error, se obtuvieron para el sistema valores en un intervalo de 0.92 a 19.79 % y para el método del 0.41 a 6.80 %, Tablas 21 y 22. Para el naftaleno los resultados fueron 40.08 % para el sistema y 3.20 % para el método.

Considerando los porcentajes de recuperación que se reportan en el método EPA 550, se calcularon los % de error, se encontró que es aceptable hasta un 30 %. Nuestros resultados estuvieron dentro de norma, a excepción del naftaleno por las razones descritas previamente en linealidad.

Ya que existió un efecto de la matriz en la cuantificación (Tabla 23), la calibración debe de ser realizada en matriz de forma preferente. Sin embargo debe de tomarse la precaución de evaluar la presencia de interferentes. Si bien nuestra calibración se realizó en una matriz sencilla (agua purificada), en ocasiones se pudo apreciar en los estándares de calibración elaborados con matriz, la presencia de una señal originada por una sustancia desconocida con tiempo de retención muy cercano al del fluoranteno (13.36 minutos). El problema de esta señal radicó en que, dependiendo de su intensidad y de la concentración del fluoranteno afectaba la señal de este último; por esta razón fueron necesarias hacer repeticiones de la curva de calibración en diferentes matrices.

4.3.4 Límites de detección y cuantificación.

Los LD y los LC obtenidos son muy similares para sistema y método, Tablas 24 y 25. Los LD se encuentran en un intervalo de 0.002 a 0.346 $\mu\text{g/L}$, considerando los resultados tanto del sistema como del método. Los LD reportados por Popp y otros investigadores que emplean SPME con HPLC van de 0.001 a 0.006 $\mu\text{g/L}$ (Popp, 2000), es decir son hasta de cien veces menores a los nuestros. Esto puede ser debido a la forma de calcular los LD; Popp los definió como tres veces la desviación estándar del ruido de la línea base y nosotros lo realizamos en función de la curva de calibración. Consideramos que fue mejor realizar el cálculo del LD en función de la curva de calibración, ya que de esta forma se toma en cuenta el efecto de matriz y la precisión, lo que origina resultados del LD más reales que si sólo se considera el ruido instrumental. Por otra parte, comparando nuestros LD con los reportados por el método EPA 550 que van de 0.002 a 3.3 $\mu\text{g/L}$, nuestros LD son similares para los analitos de alto peso molecular y mejores para los de bajo peso molecular.

Los LC se encuentran en un intervalo de 0.007 a 1.049 $\mu\text{g/L}$, considerando los resultados tanto del sistema como del método, son en la mayoría de los casos diez veces menores que los que reporta el método EPA 550 que están en un intervalo de 0.007 a 10.0 $\mu\text{g/L}$. Ya que la EPA considera en específico al benzo(a)pireno como indicador de PAHs, se debe de mencionar que nuestro método presentó un LC de 0.050 $\mu\text{g/L}$ para este analito el cual es menor al reportado en el método EPA 550, que se puede calcular

en 0.096 $\mu\text{g/L}$. Así mismo, los LC obtenidos tanto para el sistema como para el método, estuvieron por debajo del valor límite establecido por la UE para el conjunto de hidrocarburos aromáticos polinucleares que es de 2 $\mu\text{g/L}$. Los LC también estuvieron por debajo del valor permisible de la OMS, que considera al benzo(a)pireno como representante de los PAHs asignándole en un valor de 700 $\mu\text{g/L}$.

4.3.5 Robustez.

El diseño factorial empleado para evaluar la robustez de la microextracción reveló la afectación de analitos específicos según la variable de la que se trate, Tabla 26. El volumen de desorción tuvo un efecto importante en los analitos de menor peso molecular tales como el acenafteno, el fluoreno, el fenantreno, el antraceno y el fluoranteno que solo fueron afectados por esta variable. No fueron influenciados por ninguna de las variables estudiadas el pireno, el benzo(a)antraceno, el criseno, el benzo(b)fluoranteno y el dibenzo(a,h)antraceno. El acenaftileno fue afectado por todas las variables. Existieron otros analitos que fueron influenciados tanto por las variables de extracción como por las de desorción, tal es el caso del naftaleno y el indeno (1,2,3-cd) pireno. Así mismo, se observó los que fueron afectados solo por las variables de extracción tales como el benzo(a)pireno y el benzo(g,h,i)perileno. Aunque existen analitos que no fueron influenciados por ninguna variable y otros que solo les afecta

alguna en particular, hay que considerar que en una muestra no podemos predecir que analito está presente.

Por otro lado, fue necesario evaluar la robustez del sistema cromatográfico ya que durante el desarrollo de los experimentos se percibieron cambios en los tiempos de retención de los analitos. En la Figura 10 se observan ejemplos de los cambios sufridos, que radican principalmente en el corrimiento de los tiempos de retención con el consecuente desfase del programa de fluorescencia y la pérdida de detección, tal es el caso del acenafteno y el fluoranteno que aparecen a un tiempo de retención de 9.45 y 13.36 minutos respectivamente y el de los dos últimos picos de la corrida.

Los resultados obtenidos sugirieron que las condiciones instrumentales y de extracción deben ser cuidadosamente controladas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.4 Análisis de muestras reales.

Como se aprecia en las Tablas 27 y 28, todos los analitos fueron recuperados en la muestra de agua purificada marca GYM, en la muestra de agua de río procedente de “Cola de Caballo” y en la muestra de agua procedente del área de Monterrey y San Nicolás, presentando porcentajes de error en un intervalo de 1.22 a 6.49 %, de 12.31 a 26.97 %, de 10.89 a 21.64 % y de 52.74 a 70.89 respectivamente. Dado que la evaluación de la validación indicó que los resultados para el naftaleno no son confiables

en el intervalo de concentraciones probado, no fueron reportados. Los analitos que presentaron el mayor porcentaje de error en las tres primeras muestras fueron el benzo(a)antraceno y el benzo(g,h,i)perileno. La muestra procedente de San Nicolás presentó un efecto de matriz que originó % de error muy elevados. Los porcentajes de error encontrados en la literatura son diversos presentándose en intervalos de 2 a 12 % de error (Chen, 2004). Cabe aclarar que realizar una comparación con datos de la literatura es difícil dado que cada investigador maneja condiciones de análisis y número de analitos diferentes. Por ejemplo, García-Falcón (2004), Pino (2004) y Liu (2001); determinan PAHs con el uso de SPME pero sólo consideran algunos de los 16 analitos prioritarios de la EPA. Otros investigadores determinan los 16 analitos, pero difieren en el número de fibras necesarias y las condiciones de extracción y desorción. Así, Doong (2000) propone el uso de dos fibras para la microextracción de 15 mL de muestra empleando agitación magnética por 90 minutos. Popp (2000) utilizó la fibra de PDMS para extraer por una hora 5 mL de muestra empleando agitación magnética, pero realizando la propulsión de la muestra con los aditamentos denominados "glass-coated impellers" a los que les atribuye ventajas. Por su parte, King (2004) realizó la extracción de 30 mL de muestra por 45 minutos con la fibra de PDMS pero empleando agitación ultrasónica.

Trabajos preliminares en dos muestras de agua de la red de suministro municipal indicaron la presencia de interferencias, ya que tan solo pudieron recuperarse cinco de los 16 analitos adicionados y presentaron porcentajes de error elevados. Se consultaron métodos oficiales de la EPA relacionados con la determinación de PAHs, para la identificación de posibles interferentes. Los métodos 525 y 550 mencionan al cloro

residual como un interferente y recomiendan el tratamiento de muestra con tiosulfato de sodio para su eliminación. El cloro residual fue reducido por acción del tiosulfato que actúa como agente reductor. Aplicando este tratamiento todos los analitos fueron recuperados, lo cual hace evidente que el tratamiento con tiosulfato mejora la recuperación de los analitos, sin embargo la muestra procedente de San Nicolás presentó % de error elevados por lo que su uso tiene que ser optimizado en futuros trabajos para disminuir los porcentajes.

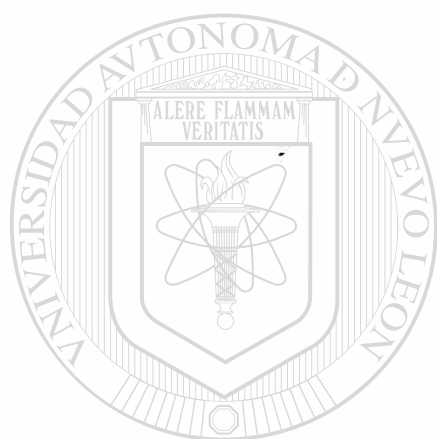
Por otra parte, con los porcentajes de error obtenidos y los resultados de los análisis fisicoquímicos, no podemos descartar la presencia de más interferentes de la matriz ya que no se aprecia una relación clara ente algún parámetro fisicoquímico de las muestras y los porcentajes de error. Incluso métodos oficiales presentan situaciones similares; por ejemplo el método EPA 550 indica que existen interferencias de matriz para el benzo(a)antraceno, el benzo(a)pireno y el benzo(g,h,i)perileno, cuya naturaleza no esta completamente evaluada.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.5 Costos.

Podemos decir que el método de microextracción, operado con eficiencia, es un método competitivo en términos económicos. La afirmación anterior se sustentó en dos puntos importantes: 1) según nuestra experiencia y la información que proporciona el fabricante (Supleco), las fibras de microextracción pueden ser utilizadas para más de 100

análisis y 2) se debe considerar que los requerimientos de solvente fueron aproximadamente de 25 mL de acetonitrilo por día de trabajo para todo el proceso de microextracción, incluyendo limpieza. Particularmente el ahorro de solvente es considerable, comparado con otros métodos de extracción como la líquido – líquido en la cual se requieren de aproximadamente 150 mL de solvente para realizar solo una extracción.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

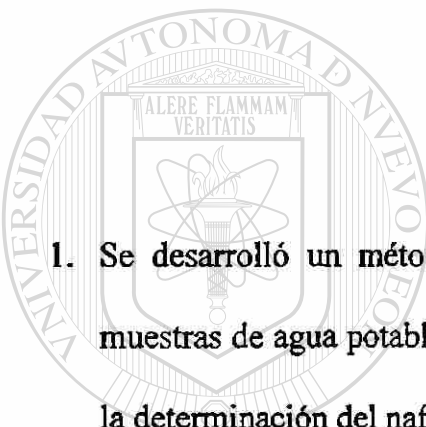


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones.

- 
1. Se desarrolló un método de SPME para la determinación de 15 PAHs, en muestras de agua potable y de río. El método desarrollado no fue apropiado para la determinación del naftaleno.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2. Se recomienda el uso de la Fibra de PDMS/DVB para la extracción de los PAHs[®] en estudio, según los datos observados durante el desarrollo de las etapas del trabajo sobre todo la de validación.
3. Los diseños experimentales fueron una herramienta efectiva en los procesos de optimización al permitirnos en pocos experimentos obtener las condiciones óptimas de la SPME, comparado con lo que pudo haber requerido analizar cada variable de forma individual.

4. Los procedimientos de extracción y análisis cromatográfico deben ser cuidadosamente controlados para obtener resultados confiables. Se tiene que tener muy presente esto, basándonos en la información proporcionada por el análisis de robustez.

5. Las sustancias empleadas para potabilizar el agua pueden representar una interferencia importante en el proceso de microextracción. Tal como se pudo apreciar, el cloro residual resultó ser un interferente de importancia que podría ser eliminado con un pretratamiento adecuado de la muestra.



UANL

5.2 Perspectivas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



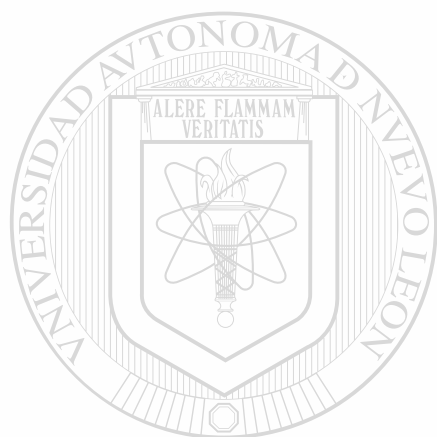
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1. Probar diversas configuraciones de material para superar las limitaciones en la reducción del volumen de desorción con la finalidad de incrementar la sensibilidad.

2. Evaluar intervalos de trabajo en los cuales el naftaleno ofrezca resultados aceptables.

3. **Determinar la causa por la cual los resultados de precisión y exactitud fueron mejores para el método que para el sistema.**

4. **Probar más pre-tratamientos de muestra para eliminar interferencias y reducir los porcentajes de error en muestras reales.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

BIBLIOGRAFÍA

APHA-AWWA-WPCF. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. Ed. Díaz de Santos S.A. 17ª edición, Madrid, España 1992. pp 6-159 a 6-170.

Bashe W. J., Baker T. V. Method 550. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid – Liquid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection. Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio, 45268, 1990. pp 121 – 142.

Brown Theodore L., LeMay H., Bursten B. Química. La Ciencia Central. Ed. Prentice Hall. 7ª edición, México, 1998. pp 684

Catalán Lafuente José G. Química del Agua. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2ª edición, España, 1981. pp 25 – 31, 275, 228 – 229.

Chen Hong-Wen. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water by Solid – Phase Microextraction and Liquid Chromatography. Analytical Sciences, 2004, 20, 1383 – 1388.

Chen J., Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction Coupled to High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 1995, 67, 2530 – 2533.

Chen Y., Koziel J., Pawliszyn J. Calibration for On – Site Analysis of Hydrocarbons in Aqueous and Gaseous Samples Using Solid – Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 6485 – 6493.

Chunfeng Mao, Sheryl A. Tucker. High-Performance Liquid Chromatography Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Pyridinium Chloride as a Selective Fluorescence Quencher to Aid Detection. *Journal of Chromatography A*, 2002, 966, 53 – 61.

Díaz Moroles Nora Emma. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Fuentes de Abastecimiento de Agua Potable de la Ciudad de Monterrey. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey Nuevo León, (en desarrollo).

Doong R., Chang S., Sun Y. Solid – Phase Microextraction for Determining the Distribution of Sixteen Environmental Protection Agency Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples. *Journal of Chromatography A*, 2000, 879, 177-188.

Doong R., Chang S. Determination of Distribution Coefficients of Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Solid – Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 3647 – 3652.

EC. Decision No. 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001, establishing the list of Priority Substances in the Field of Water Policy and Amending Directive 2000/60/EC. Official Journal of the European Communities, 15.12.2001, I 331.

Eichelberger J. W., Behymer T. D., Budde W. L. Method 525. Determination of Organic Compounds in Drinking Water by Liquid – Solid Extraction and Capillary Column Gas Chromatography / Mass Spectrometry. Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio, 45268, 1988. pp 325 – 356.

EPA Appendix A to Part 136 of Title 40 CFR. Methods for Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Wastewater. Method 610. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio, 45268, 2002.

EPA. Method 8310. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio, 45268, 1986. pp 8310-1 a 8310 -13.

Fessenden R., Fessenden J. Química Orgánica. Ed. Iberoamericana. 2ª edición, México, 1983. pp 461-462, 750-760.

Galceran M.T., Muyano E. Determination of Hydroxy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. Comparison of atmospheric pressure chemical ionization and electrospray. Journal of Chromatography A, 1996, 731, 75 – 84.

García-Falcón M.S., Pérez-Lamela M., Simal-Gándara J. Comparison of Strategies for Extraction of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Drinking Waters. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52, 6897 – 6903.

Gill K., Brown W. Extending the Solid – Phase Microextraction Technique to High Analyte Concentrations: Measurements and Thermodynamic Analysis. Analytical Chemistry, 2002, 74, 1031 – 1037.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Green J. Mark. A Practical Guide to Analytical Method Validation. Analytical Chemistry, 1996, 68, 305A – 309A.

ICH. Text on Validation of Analytical Procedures Q2A. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1994, European Union, Japan and USA.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Methodology Topic Q2B. Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Human Medicines Evaluation Unit. 1996, London.

IUPAC. Guideline for Calibration in Analytical Chemistry – Part 1. Fundamentals and Single Component Calibration. Commission on General Aspects of Analytical Chemistry. Pure and Applied Chemistry, 1998, 70, 993 – 1014.

Kabzinski A.K.M., Cyran J., Juszcak R. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water (Including Drinking Water) of Lodz. Polish Journal of Environmental Studies, 2002, 11, 6, 695 – 706.

Kamiya M., Toriba A., Onoda Y., Kizu R., Hayakawa K. Evaluation of Estrogenic Activities of Hydroxylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cigarette Smoke Condensate. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43, 7, 1017 – 1027.

King A. J., Readman J. W., Zhou J. L. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water by Solid – Phase Microextraction – Gas Chromatography – Mass Spectrometry. Analytical Chimica Acta, 2004, 523, 259 – 267.

Liu X., Korenaga T. Dynamics Analysis for the Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Rice. Journal of Health Science, 2001, 47, 5, 446 – 551.

Liu Y., Lee M. Solid – Phase Microextraction of PAHs from Aqueous Samples Using Fibers Coated with HPLC Chemically Bonded Silica Stationary Phases. *Analytical Chemistry*, 1997, 69, 5001 – 5005.

Liu Z., Pawliszyn J. Coupling of Solid – Phase Microextraction and Capillary Isoelectric Focusing with Laser – Induced Fluorescence Whole Column Imaging Detection for Protein Analysis. *Analytical Chemistry*, 2005, 77, 165 – 171.

Mayer P., Vaes W., Hermens J. Absorption of Hydrophobic Compounds into the Poly(dimethylsiloxane) Coating of Solid – Phase Microextraction Fibers: High Partition Coefficients and Fluorescence Microscopy Images. *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 459 – 464.

Miller J.C., Miller J.N. Estadística para Química Analítica. Ed. Addison – Wesley

Iberoamericana. 2ª edición, E.U.A., 1993. pp 147 – 148, 159 – 164, 168 – 170.

Meurer E., Tomazela D., Silva R., Augusto F., Eberlin M. Fiber Introduction Mass Spectrometry: Fully Direct Coupling of Solid – Phase Microextraction with Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 5688 – 5692.

Murray Robert K., Mayes Meter A., Granner Darl K., Rodwell Victor W. Bioquímica de Harper. Ed. Manual Moderno. 14ª edición, México, 1998. pp 879 – 880.

Nguyen A., Luong J. Separation and Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Solid Phase Microextraction / Cyclodextrin – Modified Capillary Electrophoresis. Analytical Chemistry, 1997, 69, 1726 – 1731.

Pawliszyn Janusz. Solid Phase Microextraction, Theory and Practice. Ed. Wiley – VCH. 1ª edición, E.U.A., 1997. pp 1 – 9, 15, 38 – 41.

Pawliszyn Janusz. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. Analytical Chemistry, 1990, 62, 2145 – 2148.

Pino V., Ayala J., González V., Afonso A. Solid - Phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography / Mass Spectrometry for Determining Polycyclic Aromatic Hydrocarbon – Michelle Partition Coefficients. Analytical Chemistry, 2004, 76, 4572 – 4578.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Popp Peter, Bauer C., Möder M., Paschke A. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Waste Water by Off – Line Coupling of Solid Phase Microextraction with Column Liquid Chromatography. Journal of Chromatography A, 2000, 897, 153 – 159.

Srám R., Binková B., Rössner P., Rubes J., Topinka J., Dejmek J. Adverse Reproductive Outcomes from Exposure to Environmental Mutagens. Mutation Research / Fundamentals and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1999, 428, 1-2, 203 – 215.

SSA. NOM-127-SSA1-1994, “Salud Ambiental, Agua para Uso y Consumo Humano – Limites Permisibles de Calidad y Tratamientos a que Debe Someterse el Agua para su Potabilización.

Taylor Steven L., Scanlan Richard A., Food Toxicology, A Perspective on the Relative Risks. Ed. Marcel Dekker Inc. 1ª edición, US, 1989. pp 214 – 216.

Tebbutt T.H.Y. Fundamentos de Control de la Calidad del Agua. Ed. Limusa. 1ª edición, México, 1990. pp 19 – 31, 75 – 76.

Treviño Flores N.N. Memorias del Curso “Estrategias de Optimación”. Sociedad Química de México Sección Nuevo León, Febrero de 1999.

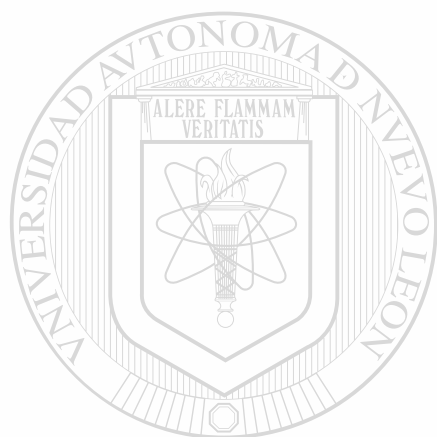
Quattrocchi O.A., Albelaira de A.S.I., Laba R.F. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires, 1992. pp. 312-315, 324- 326. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Viguri J., Verde J., Irabien A. Environmental Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Surface Sediments of the Santander Bay, Northern Spain. Chemosphere, 2002, 48, 2, 157 – 165.

WHO. Guidelines for Drinking-Water Quality. Second Edition, Volume 1, 1998. ISBN 92 4 154514 3.

Xia X., Leidy R. Preparation and Characterization of Porous Silica – Coated Multifibers for Solid – Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, 2001, 73, 2041 – 2047.

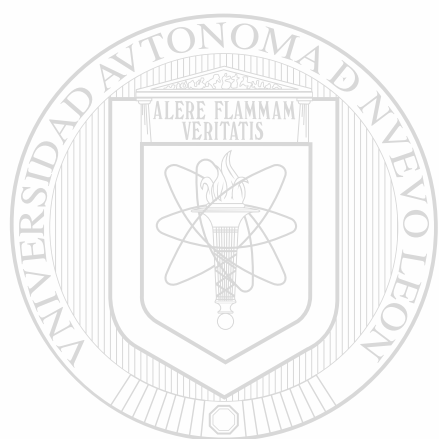


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



