

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**“OPTIMIZACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR
MICROONDAS Y ULTRASONIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUESTRAS DE *TILLANDSIA
RECURVATA* (L.) L BIOMONITOR DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA”**

Trabajo Especial de Grado (TEG)
presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela
por el Br. Juan Israel Ibedaca Lugo
para así optar al título de
Licenciado en Química opción
Tecnología.

Caracas, Abril de 2014

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



**“OPTIMIZACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR
MICROONDAS Y ULTRASONIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUESTRAS DE *TILLANDSIA
RECURVATA* (L.) L BIOMONITOR DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA”**

Trabajo Especial de Grado (TEG)
presentado ante la ilustre
Universidad Central de Venezuela
por el Br. Juan Israel Ibedaca Lugo
para así optar al título de
Licenciado en Química opción
Tecnología.

Caracas, Abril de 2014

Yo Profesora Raiza Fernández, Investigadora del Instituto de Ciencias de la Tierra de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y M.Sc. Janeth Salas, Investigadora del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“OPTIMIZACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS Y ULTRASONIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUESTRAS DE *TILLANDSIA RECURVATA* (L.) L BIOMONITOR DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA”

Que presenta el Br. Juan Israel Ibedaca Lugo, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Instituto de Ciencias de la Tierra de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y en el Laboratorio de Química Analítica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, bajo nuestra dirección, durante los años 2013 y 2014, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Abril de 2014.

Profesora Raiza Fernández

(Tutor)

M.Sc. Janeth Salas

(Tutor)

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“Optimización de las metodologías de extracción asistida por microondas y ultrasonido para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de *Tillandsia Recurvata* (L.) L. biomonitor de la contaminación atmosférica.** Presentado por el Br. Juan Israel Ibedaca Lugo, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Profa. Raiza Fernández
(Directora)

M.Sc. Janeth Salas
(Directora)

Profa. Rosa Amaro
(Jurado)

Profa. Katya Reategui
(Jurado)

RESUMEN

Diversas investigaciones han demostrado el efecto cancerígeno y mutagénico de algunos de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos clasificados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como contaminantes prioritarios. Sin embargo, estudiar los contaminantes del aire implica el empleo de equipos de muestreo y monitoreo muy costosos, como es el uso de equipos de captación de altos volúmenes de aire (HI-VOL). Estudios recientes a nivel mundial señalan el uso de musgos, líquenes y *tillandsias* (bromelias) como biomonitores de la contaminación atmosférica para la determinación de estos contaminantes, por ser esta técnica de biomonitorio ventajosa en términos de costos y sensibilidad.

La presente investigación tuvo como objetivo principal optimizar las metodologías de extracción asistida por microondas y ultrasonido para la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de *Tillandsia Recurvata* (L). L biomonitor de la contaminación atmosférica. En este estudio se tomó una muestra representativa de *Tillandsia Recurvata* (L). L y se evaluaron cuatro factores como lo son: tipo de solvente, volumen, tiempo y temperatura sobre la concentración de los HAP determinadas por GC-MS empleando un diseño factorial 2^4 . Los resultados obtenidos fueron para el microondas una condición óptima de mezcla de solventes hexano: diclorometano (4:1), un volumen de 15mL, un tiempo de extracción de 30min y una temperatura de 115°C. Fueron cuantificados 13 de 16 HAP y la concentración de los Σ HAP fue de 1491 ng/g.

La condición óptima para el ultrasonido correspondió al empleo de diclorometano como solvente, volumen 30mL, tiempo de extracción 30min y temperatura 40°C. Fueron cuantificados 15 de 16 HAP y la concentración de los Σ HAP fue de 2919 ng/g. La *Tillandsia Recurvata* (L). L permitió identificar los 16 HAP en los diversos ensayos experimentales, comprobando así su capacidad de bioacumulación y biomonitorio de estos analitos.

“Ad astra per aspera”

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios, a la Virgen, a Don Bosco y a mi ángel de la guarda, que siempre me han acompañado en toda mi vida y que me guían por los senderos correctos, a mis padres Cruz y Nohel por brindarme todo el apoyo, la firmeza, la fuerza y el ánimo para seguir adelante en el cumplimiento de mis metas, todos estos esfuerzos son para ustedes.

A mi tutora la profesora Raiza Fernández por brindarme muchos de sus conocimientos, además de su apoyo y ánimos a lo largo de todo el proyecto, de confiar en mí, guiarme correctamente y demostrarme que con esfuerzo y constancia se logran los objetivos propuestos, así como de darme sus buenos consejos tanto a nivel académico como personal. A mi tutora la profesora Janeth Salas del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas por permitirme realizar mi proyecto de investigación en los laboratorios del Centro de Química de ese instituto, además de brindarme sus conocimientos y consejos para toda mi parte experimental, también agradecer a Yorbin González por brindarme igualmente sus conocimientos y consejos para este proyecto de grado y a Fátima Rodríguez por siempre mostrar disposición de servicio y ayuda todas las veces que lo necesité en los laboratorios de investigación de ese instituto. Al Prof. Roschman González por considerarlo otro tutor de este trabajo y guiarme en la parte estadística, además de sus buenos consejos.

A mi compañero de estudio José Jesús Pinto por ayudarme en las primeras etapas de este trabajo de investigación, además de colaborar con muchos aspectos para mi tesis, a mi compañera Anelisse Bastardo, que siguió dándome su apoyo y diciéndome si puedes Juancito, ánimo! Gracias compañeros.

Finalmente a la Universidad Central de Venezuela, por permitirme estudiar en ella, aprender y crecer profesionalmente y personalmente, a ésta máxima casa de estudios que vence las sombras!!! GRACIAS!

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁG.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Fundamentos teóricos.....	4
2.1.1 Contaminación.....	4
2.1.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	5
2.1.2.1 Propiedades físico-químicas.....	7
2.1.2.2 Origen de los HAP.....	9
2.1.2.3 Fuentes de emisión de HAP.....	9
2.1.2.4 Parque automotor.....	10
2.1.2.5 Procesos industriales y de producción de energía.....	11
2.1.2.6 Origen pirogénico y petrogénico.....	12
2.1.2.7 Distribución en el Medio Ambiente.....	14
2.1.2.8 Toxicidad de los HAP.....	16
2.1.2.9 Identificación de las fuentes de procedencia.....	20
2.1.3 Biomonitorio.....	21
2.1.3.1 Bioindicador y Biomonitor.....	22

2.1.3.2 Criterio de selección de un biomonitor.....	23
2.1.4 Bromeliáceas.....	24
2.1.4.1 Género <i>Tillandsia</i>	24
2.1.4.2 Características.....	24
2.1.4.3 <i>Tillandsia Recurvata</i> (L). L como biomonitor.....	26
2.1.4.4 Taxonomía.....	28
2.1.5 Técnicas de extracción.....	30
2.1.5.1 Concepto general.....	30
2.1.5.2 Extracción asistida por ultrasonido.....	32
2.1.5.3 Extracción estática con ultrasonido.....	35
2.1.5.4 Extracción asistida por microondas.....	35
2.1.6 Método de análisis.....	39
2.1.6.1 Mecanismo y procedimientos generales de la GC.....	40
2.1.7 Análisis estadístico de datos.....	41
2.1.7.1 Diseño factorial 2 ^K	41
3. ANTECEDENTES	42
3.1 Antecedentes internacionales.....	42
3.2 Antecedentes nacionales.....	45

4. OBJETIVOS	53
4.1 Objetivo general.....	53
4.2 Objetivos específicos.....	53
5. ÁREA DE ESTUDIO	54
5.1 Ubicación geográfica y datos demográficos.....	54
5.2 Fuentes móviles de contaminación.....	54
5.3 Fuentes fijas de contaminación.....	55
5.4 Condiciones climáticas.....	56
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	57
6.1 Etapa de pre-campo.....	58
6.2 Etapa de campo.....	58
6.3 Etapa de laboratorio.....	60
6.4 OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN	61
6.4.1 Equipos, materiales y reactivos.....	64
6.4.2 Lavado del material de vidrio.....	66
6.4.3 Preparación de la muestra.....	67
6.4.4 Validación de la metodología.....	69
6.5 METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN	70

6.5.1 Extracción estática por ultrasonido.....	70
6.5.2 Extracción asistida por microondas.....	71
6.6 Separación de la fracción aromática (purificación).....	74
6.7 Análisis instrumental.....	75
6.8 Mezcla Estándar.....	76
6.9 Análisis De Recuperación.....	76
6.10 Análisis estadístico de datos.....	77
6.10.1 Diseño factorial 2^k	77
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	79
7.1 Análisis del diseño factorial para evaluar condiciones óptimas de la extracción asistida por microondas para HAP según diseño experimental.....	82
7.1.1 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas para los HAP de bajo peso molecular.....	82
7.1.2 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de los HAP de mediano peso molecular.....	91
7.1. 3 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de los HAP de alto peso molecular.....	101
7.2 Análisis del diseño factorial para evaluar condiciones óptimas de la extracción asistida por ultrasonido para HAP según diseño experimental.....	109

7.2.1 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas para los HAP de bajo peso molecular.....	109
7.2.2 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas para los HAP de mediano peso molecular.....	114
7.2.3 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas para los HAP de alto peso molecular.....	121
7.3 Condiciones óptimas para cada uno de los HAP por medio de la técnica de extracción asistida por microondas.....	128
7.4 Condiciones óptimas para cada uno de los HAP por medio de la técnica de extracción asistida por ultrasonido.....	141
7.5 Importancia secado de muestras vegetales.....	153
7.6 Comparación de las técnicas de extracción asistida por microondas y ultrasonido.....	155
8. CONCLUSIONES.....	158
9. RECOMENDACIONES.....	160
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	162
11. APÉNDICE.....	175

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁG.
TABLA 1. Propiedades físico-químicas HAP	8
TABLA 2. Clasificación de la IARC de algunos del 16 HAP estudiados según la evidencia de su capacidad carcinogénica sea: suficiente > no suficiente > limitada > no evidente.....	16
TABLA 3. Relaciones diagnósticas utilizadas para la determinación de las fuentes de origen más relevantes de HAP	20
TABLA 4. Taxonomía de la <i>Tillandsia Recurvata</i> (L).L	28
TABLA 5. Síntesis de las referencias nacionales e internacionales para la Determinación de HAP y el empleo de <i>Tillandsia</i> como biomonitor de contaminación atmosférica.....	51
TABLA 6. Factores y niveles considerados para el diseño experimental de la metodología de extracción asistida por microondas.....	62
TABLA 7. Factores y niveles considerados para el diseño experimental de la metodología de extracción asistida por ultrasonido.....	62
TABLA 8. Diseño experimental empleado para optimizar las condiciones experimentales en el equipo de radiación microondas y para el equipo de ultrasonido.....	63
TABLA 9. Condiciones Microondas CEM MARS 5.....	72

TABLA 10. Tiempos de retención HAP en estudio.....	80
TABLA 11. Condiciones óptimas para cada uno de los 16 HAP en estudio.....	128
TABLA 12. Condiciones óptimas de la técnica de extracción asistida por microondas para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).....	129
TABLA 13. Concentraciones HAP condición óptima para la técnica de extracción por microondas.....	134
TABLA 14. Porcentajes de Recuperación para la muestra óptima por la técnica de extracción asistida por microondas.....	135
TABLA 15. Referencias Bibliográficas.....	137
TABLA 16. Porcentajes de HAP según su peso molecular.....	138
TABLA 17. Condiciones óptimas para cada uno de los 16 HAP en estudio por la técnica de extracción asistida por ultrasonido.....	141
TABLA 18. Condiciones óptimas de la técnica de extracción asistida por ultrasonido para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).....	142
TABLA 19. Concentraciones HAP condición óptima para la técnica de extracción por ultrasonido.....	145
TABLA 20. Porcentajes de Recuperación para la muestra óptima por la técnica de extracción asistida por ultrasonido.....	146
TABLA 21. Comparación concentraciones de esta investigación con la bibliografía..	147
TABLA 22. Porcentajes de HAP según su peso molecular.....	148
TABLA 23. Comparación de Porcentajes de recuperación obtenidos vs otra investigación usando matriz vegetal y análisis por GC-MS.....	150

TABLA 24. Especies de muestras de origen vegetal empleadas como biomonitores de la contaminación atmosférica, área geográfica de estudio, ΣHAP totales o rango de concentraciones, rango de concentraciones de metales, tipo de monitoreo (P)=pasivo, (A)= activo, secado de muestra y tiempo y referencia bibliográfica.....	153
TABLA 25. Términos considerados de comparación de técnicas en base a muestra óptima.....	155
TABLA 26. Aspectos positivos y negativos de las técnicas de extracción de microondas y ultrasonido.....	166
TABLA 27. Compuestos posiblemente identificados adicionales a los 16 HAP prioritarios.....	196

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁG.
FIGURA 1. 16 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HAP) considerados en este trabajo y agrupados según el número de anillos aromáticos: 2, 3, 4, 5 y 6 anillos.....	6
FIGURA 2. Posible Mecanismo de Formación de HAP.....	10
FIGURA 3. Esquema General del Ciclo que siguen los HAP desde que son emitidos a la atmósfera	14
FIGURA 4. a) HAP alternantes cuya estructura no cumple los requisitos de 4 o más anillos bencénicos o la presencia de una región bahía o valle. b) HAP alternantes que cumplen los requisitos estructurales y de los que se conoce su capacidad carcinogénica.....	17
FIGURA 5. Proceso de Mutagénesis del ADN que experimenta el benzo[a]pireno.....	18
FIGURA 6. Especie <i>Tillandsia Recurvata</i> (L).L (Foto tomada por: Juan Ibedaca).....	29
FIGURA 7. Un Fruto abierto de <i>t. recurvata</i> , sus semillas plumosas en proceso de dispersión.....	29
FIGURA 8. Etapas seguidas por el disolvente para la extracción del analito en muestras sólidas.....	30
FIGURA 9. Esquema de una burbuja de cavitación	33

FIGURA 10. Principio del sistema de MAE.....	38
FIGURA 11. Mapa de la Ubicación de Fuentes Fijas en la transecta de estudio.	55
FIGURA 12. Etapa de campo, recolección de especímenes. (Fotografías tomadas por Juan Ibedaca).....	59
FIGURA 13. Esquema de recolección de muestra.....	60
FIGURA 14. Viales limpios y secos (Fotografía tomada por Juan Ibedaca).....	67
FIGURA 15. Pulverización del espécimen.....	68
FIGURA 16. Homogeneización de los especímenes.....	68
FIGURA 17. Muestra única representativa del espécimen.....	69
FIGURA 18. Baño de Ultrasonido.....	71
FIGURA 19. Microondas MARS 5 CEM.....	73
FIGURA 20. Proceso de Filtrado.....	73
FIGURA 21. Proceso de Rotavaporación.....	73
FIGURA 22. Elución de los HAP.....	74
FIGURA 23. Rampa de temperaturas utilizada para la separación de los HAP en el análisis por cromatografía gas.....	75
FIGURA 24. Esquema Experimental.....	78
FIGURA 25. Orden de elución de los analitos en estudio – Patrón de 0,19 ppm de Standard Mix de 10ppm.....	79
FIGURAS 26-76. Diagramas de Pareto - Interacción - Gráfico Efectos Principales.....	82-127

FIGURA 77. Cromatograma de la condición óptima para la extracción asistida por microondas de HAP.....	133
FIGURA 78. Cromatograma de la condición óptima para la extracción asistida por ultrasonido de HAP.....	144
FIGURA 79. Cromatograma correspondiente a experimento 5 de microondas.....	195
FIGURA 80. Cromatograma de un blanco.....	198

1. INTRODUCCIÓN

Las emisiones producidas por la quema de combustibles fósiles han sido tema reciente de investigaciones científicas y han despertado el interés público debido a su impacto negativo en el ambiente, hecho reflejado incluso en el “Cambio Climático”. Esfuerzos realizados en este tema han conducido a la toma de diversas decisiones como: la reducción de emisiones en cada ciudad, la disminución del volumen de quema de gas, mediciones de los compuestos liberados por estas emisiones así como sus efectos en el ambiente [1].

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de contaminantes ambientales muy conocidos por sus importantes propiedades carcinogénicas. Están presentes en las emisiones procedentes de los vehículos a motor y, en general, en las de cualquier proceso que implique una combustión. La contribución de las fuentes naturales, como los incendios forestales y los volcanes, es mínima comparada con las emisiones causadas por el ser humano. La quema de combustibles fósiles, así como la combustión de madera y residuos constituyen la principal fuente de emisión de HAP (origen pirogénico). Otra fuente de emisión de dichas sustancias se halla en los vertidos de petróleo y en sus derivados que en sí mismos contienen HAP (origen petrogénico)[2].

Existen dos métodos para el monitoreo de estos tipos de compuestos: el primero requiere el uso de equipos automáticos de alta tecnología. Sin embargo, estos implican una fuerte inversión financiera, un elevado costo de mantenimiento y además suponen una dificultad para el estudio de extensas áreas urbanas. El segundo método exige el

uso de un organismo vegetal cercano a las fuentes de emisión cuyas características biofísicas permiten la sorción de este tipo de sustancias químicas [3].

A pesar de las mejoras notables alcanzadas en el área de la Química Analítica durante los últimos años, la monitorización de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos, todavía supone un desafío importante para el químico analítico. Generalmente, para evaluar la calidad de los distintos subsistemas naturales que conforman el ambiente (aire, agua, suelo y biota) es necesario analizar una gran cantidad de muestras con el propósito de recoger la máxima información posible para determinar el grado de contaminación. Este tipo de enfoque suele consumir mucho tiempo y además puede llegar a ser costoso.

El objetivo de este trabajo de investigación consistirá en el desarrollo de un proceso analítico preciso para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en la evaluación de una planta epífita ampliamente conocida del tipo bromelia llamada *Tillandsia Recurvata* (L). L como biomonitor de la contaminación atmosférica. Esta planta epífita posee una matriz compleja que ha sido tratada anteriormente para la evaluación de metales pesados. Sin embargo, la bibliografía apenas contempla la determinación de HAP en este tipo de muestras. Esto supone, por un lado, una dificultad añadida desde el punto de vista de que ni siquiera disponemos de métodos de referencia utilizados por otros autores con los que poder contrastar nuestros resultados y, por otro lado, una posibilidad de innovación en un campo apenas estudiado.

Para el análisis de HAP en bromelias del género *Tillandsia Recurvata* (L). L. se consideraron dos aspectos importantes. Primero, el planteamiento de un procedimiento experimental que permitiera analizar el número de muestras necesarias exigidas por el diseño factorial 2^k aplicado para el estudio de muchos factores en el menor tiempo posible. Unido a este criterio, se sopesó la viabilidad de un método de análisis considerando: los procedimientos actuales en la disciplina analítica centrados en la utilización de un volumen reducido de disolvente, un tiempo de operación corto y la

minimización de la manipulación de la muestra. Esto se denomina en la disciplina analítica, con el nombre de “*Green Chemistry*” [2], que además de desarrollar métodos respetuosos con el medio ambiente, permite ahorrar costos, sobre todo en la gestión de residuos.

Por todo lo antes expuesto, el principal objetivo de este trabajo de investigación es la optimización y el desarrollo de metodologías analíticas de extracción para los hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante el uso de técnicas de extracción de ultrasonido y microondas empleando *Tillandsia recurvata* (L). L. como biomonitor de la contaminación atmosférica.

Para ello se diseñará un plan de muestreo que está orientado en la zona suroeste del distrito capital, en la dirección de la línea 3 del metro de Caracas. Con el fin de utilizar cada una de las estaciones como puntos de referencias para ejecutar un monitoreo pasivo y llevar a cabo un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) (GC-MS: siglas en inglés).

Estos análisis permitirán la caracterización y cuantificación de los HAP y así de ésta manera, evaluar la eficacia de la extracción asistida por microondas y ultrasonido, en términos de los porcentajes de analitos recuperados, cantidad y tipo de solvente empleado, tiempo y temperatura con el fin de lograr una condición óptima de cada una de las técnicas de extracción usadas, por lo que este trabajo de investigación se realizará con el fin de aportar información en estos aspectos y sirva como referencia para investigaciones similares en un futuro.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fundamentos teóricos

A continuación se presentan una serie de conceptos y tópicos relacionados con el trabajo de investigación. Es de vital importancia entenderlos y manejarlos para lograr una comprensión del presente proyecto científico.

2.1.1 Contaminación

El término contaminación ambiental se refiere a la presencia de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal. A medida que aumenta el poder del hombre sobre la naturaleza y aparecen nuevas necesidades como consecuencia de la vida en sociedad, el medio ambiente que lo rodea se deteriora cada vez más. El comportamiento social del hombre, que lo condujo a comunicarse por medio del lenguaje y que posteriormente formó la cultura humana, le permitió diferenciarse de los demás seres vivos. Pero mientras ellos se adaptan al medio ambiente para sobrevivir, el hombre adapta y modifica ese mismo medio según sus necesidades [1].

En los últimos años, estudios epidemiológicos han demostrado la relación entre el efecto de la concentración de partículas ambientales y la salud. Consecuentemente, la caracterización de estas partículas atmosféricas ha venido incrementándose en los últimos años, estas han sido caracterizadas desde varios puntos de vista, por ejemplo: nivel de concentración, químico (orgánico e iónico), composición, especiación, tamaño

de partículas, morfología de partículas, etc. Muchas de estas propiedades son interdependientes. Elementos trazas son parte de los contaminantes atmosféricos y su determinación en las partículas del aire corresponden a fracciones inhalables que representan un parámetro importante en la salud pública. Algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son poderosos contaminantes de carácter carcinogénico y mutagénico. La implementación de un control de la calidad del aire, requerirá el monitoreo de los niveles de contaminantes severos tales como los HAP, arsénico, cadmio, mercurio, plomo y níquel [4].

2.1.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) por sus siglas en inglés (PAHs) son compuestos constituidos por carbono e hidrógeno que se disponen formando estructuras aromáticas de tres o más anillos fusionados, entre los que se encuentra el naftaleno. También reciben el nombre de Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares o Poliarenos. Estos compuestos, junto con los HAP con derivados alquílicos, los HAP con grupos $-\text{NO}_2$, $-\text{OH}$, NH_2 y $-\text{Cl}$ como sustituyentes y los HAP con heterociclos nitrogenados, sulfurados y oxigenados, constituyen la familia conocida como Compuestos Policíclicos Aromáticos (PACs) (siglas en inglés) (Polycyclic Aromatic Compounds) [2].

La unidad constitutiva de estos compuestos es el benceno. De modo que la fusión de varios anillos bencénicos proporciona a los HAP la aromaticidad propia de estas moléculas. Disponen, por tanto, de un elevado número de electrones deslocalizados y una gran estabilidad. Los HAP existen en la naturaleza en una gran variedad de estructuras de distinta complejidad, llegando a presentar varios isómeros en algunos casos. Una primera clasificación de los HAP puede ser entre alternantes, los que contienen solamente anillos bencénicos, y no alternantes, los que presentan también anillos aromáticos distintos del benceno, como por ejemplo el acenaftileno (ver figura 1).

La importancia de los HAP como contaminantes ambientales radica en que han sido clasificados como cancerígenos por la *Agencia Internacional de Investigación del Cáncer* (IARC). Recientemente se han incluido dentro de los “contaminantes orgánicos persistentes” (POPs) (siglas en inglés) por el *United Nations-European Committee* en el tratado global firmado en mayo de 2001 en la “*Convention of Lon-range Transboundary Air Pollution*”[2].

En este trabajo se centrará la atención en 16 HAP, (ver figura 1) según el número de anillos aromáticos. Aunque en el medio ambiente se han identificado cientos de HAP, la selección de estos 16 compuestos se fundamenta la Environmental Protection Agency (EPA), que los ha clasificado por su amplio rango de toxicidad y su frecuente aparición en lugares contaminados.

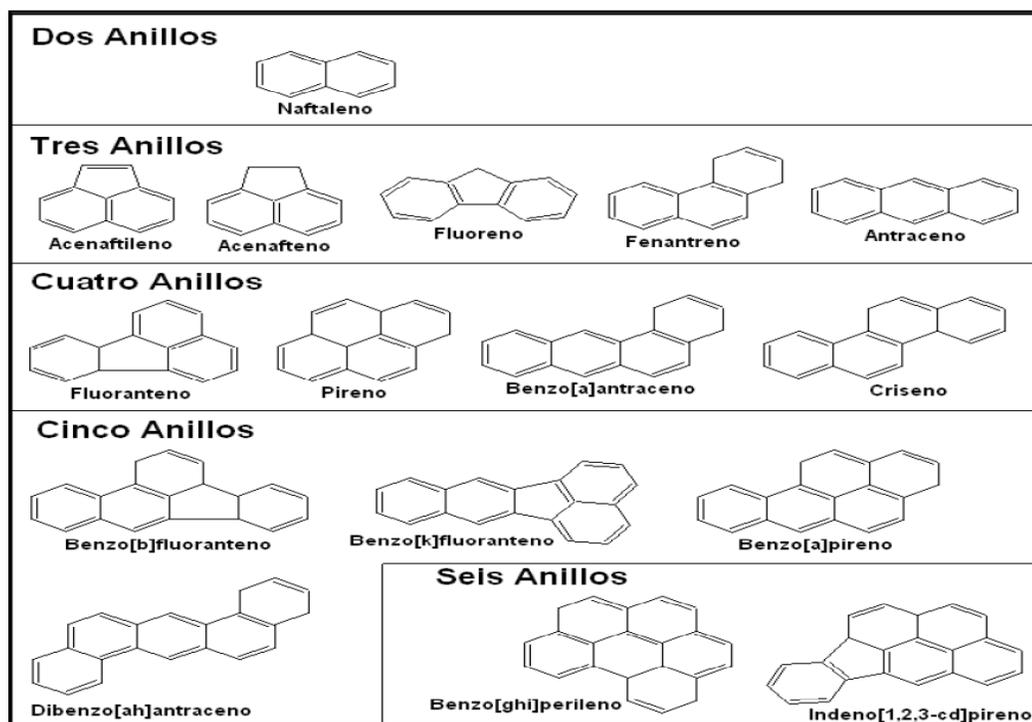


Figura 1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) considerados en este trabajo y agrupados según el número de anillos aromáticos: 2, 3, 4, 5 y 6 anillos.

2.1.2.1 Propiedades físico-químicas

Los HAP son una familia de compuestos que presenta propiedades fisicoquímicas muy heterogéneas. Las características comunes de estas sustancias son puntos de fusión y ebullición elevados, presión de vapor baja y solubilidad en agua muy baja. Pero estas propiedades varían al aumentar el peso molecular y tamaño de la molécula. Son solubles en disolventes orgánicos y por tanto, lipofílicos, de modo que son frecuentemente bioacumulados y concentrados en diversas matrices medioambientales, en función de su persistencia. Generalmente, la permanencia de estas sustancias en el medio ambiente aumenta conforme lo hace el tamaño de su molécula. Por ejemplo, el naftaleno y otros compuestos de bajo peso molecular y, por lo tanto, más volátiles presentan un tiempo de vida más bajo, ya que son más susceptibles a la biodegradación o a la formación de otros compuestos de mayor peso molecular. En cambio, los compuestos menos volátiles, como el benzo[a]pireno, son altamente persistentes y presentan tendencia a la bioacumulación mediante procesos de adsorción y deposición. Asimismo, dependiendo de su carácter aromático los HAP absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico [2].

Generalmente, los hidrocarburos más persistentes en el ambiente son los que tienen mayor peso molecular y los que poseen una mayor capacidad de bioacumulación.

La tabla 1 presenta algunas propiedades fisicoquímicas para 16 HAP, entre las que se incluyen: presión de vapor, solubilidad en agua y logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua, así como el peso molecular y el número de anillos para cada compuesto.

HAP	Fórmula Química	Número de anillos	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Presión de vapor (mmHg)	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	Log K _{ow}
Bajo peso molecular						
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	2	128,17	7,5x10 ⁻¹	31	3,36
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	3	152,20	2,9x10 ⁻²	16	4,03
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	3	154,21	4,5x10 ⁻³	3,8	3,55
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	3	166,20	3,2x10 ⁻⁴	1,98	4,18
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	3	178,20	6,8x10 ⁻⁴	1,20	4,57
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	3	178,20	1,7x10 ⁻⁵	7,6x10 ⁻²	4,54
Mediano peso molecular						
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	4	202,26	5,0x10 ⁻⁶	0,26	5,22
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	4	202,30	2,5x10 ⁻⁶	7,7x10 ⁻²	5,18
Benzo[a]antraceno	C ₁₈ H ₁₂	4	228,29	2,2x10 ⁻⁸	1,0x10 ⁻²	5,91
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	4	228,30	6,3x10 ⁻⁷	2,8x10 ⁻³	5,91
Alto peso molecular						
Benzo[b]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	5	252,30	5,0x10 ⁻⁷	1,2x10 ⁻³	6,50
Benzo[k]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	5	252,30	9,6x10 ⁻¹¹	7,6x10 ⁻⁴	6,20
Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂	5	252,30	5,6x10 ⁻⁹	2,3x10 ⁻³	6,50
Dibenzo[a,h]antraceno	C ₂₂ H ₁₄	5	278,35	1,0x10 ⁻¹⁰	5,0x10 ⁻⁴	6,20
Benzo[g,h,i]perileno	C ₂₂ H ₁₂	6	276,34	1,0x10 ⁻¹⁰	2,6x10 ⁻⁴	7,10
Indeno[1,2,3-cd]pireno	C ₂₂ H ₁₂	6	276,30	1,0x10 ⁻¹¹	6,2x10 ⁻²	6,50

Tabla 1. Propiedades Físico-Químicas HAP

2.1.2.2 Origen de los HAP

2.1.2.3 Fuentes de emisión de HAP

Los HAP se originan en los procesos de combustión de materiales que contienen carbono e hidrógeno y son incorporados a la atmósfera a través de las emisiones procedentes de estos procesos [5]. Según el origen del proceso de combustión distinguimos entre HAP de origen natural y antropogénico. Entre las fuentes de origen natural destacan la actividad volcánica y los incendios forestales, aunque al tratarse de focos muy esporádicos es difícil estimar su contribución. Más destacable es la incorporación de HAP de origen antropogénico en el medio ambiente. En los dos últimos siglos, el creciente uso de combustibles para aplicaciones industriales, calefacción y transporte, ha generado un aporte muy sustancial de estos compuestos. Los principales focos de HAP de origen antropogénico son el tráfico automotor, las calefacciones domésticas y los procesos industriales y de producción de energía [6].

El proceso transcurre a través de la formación de radicales libres, producidos por ruptura de enlaces C-C y C-H, que reaccionan entre sí. Puede observarse (ver figura 2) un posible mecanismo de formación de HAP en la combustión de ciertos materiales orgánicos. Las cantidades de HAP formadas dependen de la temperatura de combustión y de la naturaleza de los compuestos orgánicos implicados en el proceso. Varios de los compuestos formados en estas reacciones son alquil sustituidos, y como regla general, a temperaturas de combustión más elevadas son generados HAP con menos sustituciones alquílicas [7].

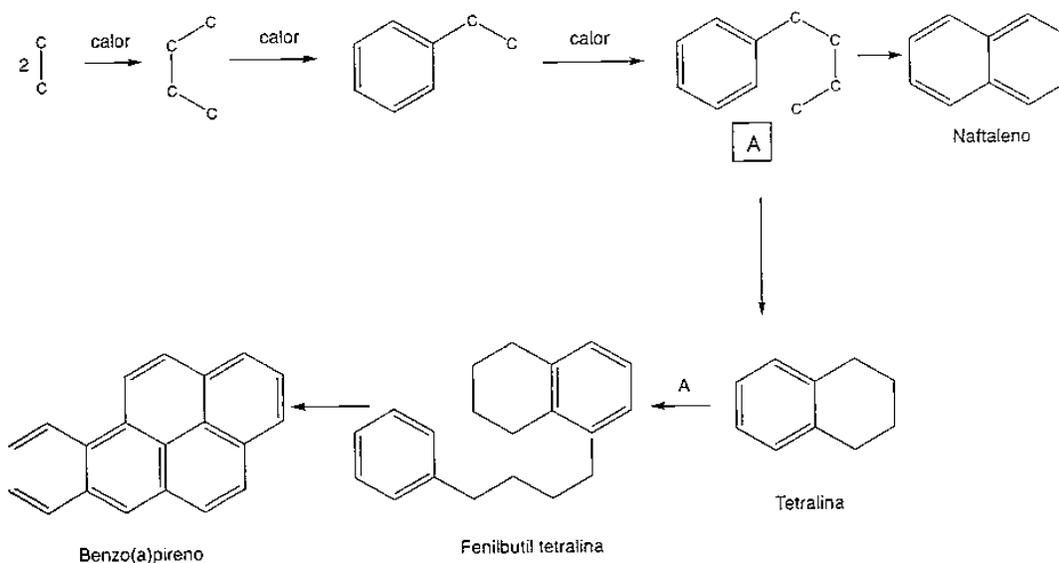


Fig. 2. Posible mecanismo de formación de HAP [5]

2.1.2.4 Parque automotor

Generalmente, en lo referente a la contaminación atmosférica causada por las emisiones de los vehículos a motor se contemplan sustancias como monóxido de carbono, óxidos de nitrógenos, hidrocarburos procedentes de combustibles denominados “*inquemados*” [2] y partículas. El grupo de los “*inquemados*” puede estar constituido por más de 20.000 hidrocarburos diferentes con una gran variedad de propiedades químicas y toxicológicas. Entre ellos se encuentran los HAP, además de compuestos como aldehídos, alquenos, fenoles y BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), entre otros.

La cantidad emitida por los vehículos depende del tipo de motor, el tipo de combustible y el tratamiento de los gases de escape previo a la salida a la atmósfera, además de factores como la edad del vehículo/motor o los hábitos de conducción ocasionados por la topografía y la calidad de las vías. Por lo general, los nuevos motores que incorporan catalizador emiten entre 5 y 10 veces menos HAP que los motores antiguos [8]. Sin embargo, se ha comprobado que la nueva tecnología diesel de los motores emite un perfil de HAP más rico en compuestos de menor peso molecular (3-4 anillos), reduciendo así el aporte de benzo[a]pireno (compuesto de referencia por su evidente efecto carcinogénico) a la atmósfera.

Además de las emisiones procedentes de los vehículos a motor, a causa del tráfico automotor, también se incorporan HAP a la atmósfera mediante el desgaste de los neumáticos, las partículas de asfalto que se desprenden de la carretera y los residuos de aceites lubricantes. El tráfico automotor es una fuente de emisión de HAP muy importante en áreas urbanas, donde se han hallado las concentraciones más elevadas de estos compuestos. No obstante, en zonas naturales la presencia de HAP ha cobrado importancia en los últimos años debido al impacto causado por la creciente densidad de tráfico a nivel general.

2.1.2.5 Procesos industriales y de producción de energía

Entre los procesos industriales que se caracterizan por la emisión de HAP se encuentran la producción de coque, de aluminio, la fabricación de asfaltos y creosota y la vulcanización de caucho. Aunque no todos los procesos industriales se encuentran caracterizados en cuanto a la emisión de HAP. La generación de energía en las centrales térmicas también es una fuente importante de emisión de HAP a la atmósfera. La formación de estos compuestos depende en gran medida de la eficacia del proceso

de combustión. La emisión de HAP en grandes centrales térmicas suele ser menor que en otros hornos, donde el proceso de combustión se lleva a cabo en peores condiciones. Principalmente, son las anomalías en los procesos de producción de energía (como arranques, paradas, descenso de la temperatura, cambio de combustible, etc.) cuando la concentración de HAP en las emisiones aumenta considerablemente.

Otras causas de emisión de HAP a la atmósfera son la incineración de residuos y el humo del tabaco, pero al igual que ocurre en las fuentes de origen natural, es difícil evaluar estos focos de contaminación por su carácter irregular.

2.1.2.6 Origen pirogénico y petrogénico

En la práctica, la identificación de las fuentes de emisión de HAP se realiza según su origen sea *pirogénico*: procedentes de la combustión de materia orgánica a altas temperaturas, *petrogénico*: procedentes del petróleo y derivados y, en menor proporción.

Los HAP de origen pirogénico se forman por la ruptura o “craqueo” a altas temperaturas de la materia orgánica en compuestos de bajo peso molecular que son rápidamente recombinados en estructuras de HAP no alquilados. Otro producto muy importante de la pirólisis es la formación de un tipo de hollín, constituido por una aglomeración de HAP condensados. La formación de HAP pirogénicos depende fuertemente de la temperatura del proceso de combustión. De hecho, la misma cantidad de materia orgánica quemada en iguales condiciones pero a diferente temperatura puede emitir cantidades muy distintas de estos compuestos [2]. Generalmente, entre los HAP de origen pirogénico predominan los compuestos de alto peso molecular (compuestos formados por más de 3 anillos aromáticos) frente a los más ligeros. Los

HAP de origen petrogénico se crean durante los procesos diagenéticos, en los que la materia orgánica sedimentada sufre una serie de procesos geoquímicos naturales dando lugar a la formación de estos compuestos. Estos procesos ocurren a temperatura relativamente baja ($< 150^{\circ}\text{C}$) y durante tiempo prolongado dando lugar a la formación de petróleo y combustibles fósiles que contienen HAP. En este tipo de procesos es frecuente la formación de HAP alquilados. Se trata generalmente de HAP de bajo peso molecular (compuestos de 2-4 anillos aromáticos) que en el medio ambiente se encuentran en combinación con los HAP pirogénicos.

Normalmente la presencia de HAP petrogénicos se asocia a fuentes locales o puntuales, como refinerías o industrias de petróleo, rutas de navegación o adyacentes a carreteras y autopistas, en contraste a los HAP de origen pirogénico que tienen lugar en una escala geográfica mayor. Otra diferencia importante entre los HAP de origen pirogénico y petrogénico es la persistencia en el medio ambiente. Este hecho se debe en parte a que la liberación de HAP petrogénicos al medio ambiente es menor que los de origen pirogénico. No obstante, estos últimos son más persistentes y se encuentran más protegidos frente a reacciones de degradación por la asociación en forma de aglomerado, antes mencionada, en la que pueden presentarse.

Por su parte, los HAP de origen petrogénico son más fácilmente degradados por reacciones de fotooxidación o por la acción de los microorganismos [2]. Este es el motivo de que los HAP de origen pirogénico se encuentren más ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Excepto en el caso de emisiones localizadas de derivados del petróleo, como por ejemplo los vertidos de crudo en aguas marinas que constituyen, junto con el asfalto, las fuentes más importantes de origen petrogénico. Resulta difícil distinguir los HAP pirogénicos de los petrogénicos, debido a que hay muchas maneras de introducir estos compuestos en el medio ambiente y, generalmente, no se deben a una única contribución. Sin embargo, la distribución de HAP en las diferentes matrices donde son determinados constituye una herramienta para elucidar las fuentes de procedencia, ya que cada fuente de origen produce un

patrón de HAP particular. Por eso, a través de las concentraciones relativas de determinados HAP, denominadas ratios de diagnóstico, es posible identificar las fuentes de procedencia más significativas.

2.1.2.7 Distribución en el medio ambiente

Estas sustancias están presentes en aire, agua, materia particulada, suelos, sedimentos y biota, presentando una gran variedad de estructuras. Nunca como compuestos aislados, sino formando mezclas de HAP. Además, presentan amplios rangos de concentración, dependiendo de la matriz en la que se encuentran. Para analizar el ciclo de estos compuestos en el medio ambiente (ver figura 3), es necesario comenzar con la liberación de HAP a la atmósfera. Normalmente son emitidos en fase gaseosa, de manera que pueden permanecer como tal, agruparse entre ellos y con otros contaminantes dando lugar a aerosoles, o quedar adsorbidos en partículas en suspensión [9].



Figura 3: Esquema general del ciclo que siguen los HAP desde que son emitidos a la atmósfera [10]

La distribución de estos compuestos entre la fase gaseosa y las partículas atmosféricas está condicionada por factores como la temperatura ambiente, la humedad relativa, las propiedades y concentración de los HAP y la composición química de los aerosoles.

Como regla general se considera que los HAP de menor peso molecular (2-3 anillos aromáticos) se encuentran preferentemente en fase gaseosa, los de peso molecular intermedio (4 anillos aromáticos) están distribuidos entre la fase gaseosa y asociados a partículas mientras que los HAP de mayor peso molecular (5-6 anillos) son predominantes en la materia particulada. Se ha comprobado que los HAP se encuentran en gran proporción adsorbidos en la fracción de partículas finas de la atmósfera, que a su vez constituye la fracción respirable [9].

Durante el tiempo de residencia en la atmósfera, los HAP pueden reaccionar con contaminantes atmosféricos como el ozono, óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre para transformarse en dionas, nitro y dinitro derivados y ácidos sulfónicos, respectivamente. De modo que es posible generar compuestos más polares y, por lo tanto, más solubles en agua que los compuestos iniciales. Igualmente pueden sufrir oxidaciones fotoquímicas dando lugar a quinonas, fenoles y dihidrodioles, generando algunos productos de carácter mutagénico. Es posible que sean transportados por acción del viento, dado su carácter semivolátil, o depositados sobre la superficie terrestre mediante los mecanismos de deposición húmeda (las precipitaciones) y seca (la sedimentación de las partículas atmosféricas que contienen HAP sobre la superficie terrestre). Así estos compuestos son transferidos de la atmósfera a las aguas superficiales, suelos, sedimentos o son bioacumulados por la materia vegetal. En los sistemas acuáticos, los HAP, además de ser introducidos por las deposiciones atmosféricas, también son liberados mediante vertidos directos, como en los vertidos de crudo. Por lo general, las cantidades de HAP que entran anualmente en el medio acuático son significativamente menores de las que lo hacen en la atmósfera o suelo. Además, si estos compuestos fueran distribuidos por igual a través de los ríos, mares y

océanos que pueblan La Tierra, su concentración resultaría indetectable. Pero normalmente estos compuestos permanecen relativamente cerca del punto de entrada en el medio acuático, decreciendo su concentración con la distancia al punto de entrada. Por esta razón, las mayores concentraciones de HAP se encuentran en ríos, estuarios y costas marinas [11].

2.1.2.8 Toxicidad de los HAP.

La principal característica que presentan los HAP sobre la salud, es su capacidad para inducir la formación de cáncer en los organismos expuestos. Varios de estos compuestos tienen una fuerte actividad carcinogénica conocida, como el benzo[a]pireno. En cambio, otros no se encuentran clasificados como carcinogénicos. Pero es importante señalar que todos los HAP en general, son sospechosos de ser carcinogénicos en un grado u otro, aunque el nivel sea muy bajo. La *Agencia Internacional de Investigación del Cáncer* (IARC) (siglas en inglés) clasifica estas sustancias según el grado de evidencia que se tenga de su efecto carcinogénico en los grupos que se muestran en la tabla 2.

Grupo	Categoría	Evidencia capacidad carcinogénica		HAP
		En humanos	En animales	
1	Cancerígeno	Suficiente No suficiente	- Suficiente	-
2A	Probablemente cancerígeno	Limitada	Suficiente	benzo[a]antraceno benzo[a]pireno dibenzo[a,h]antraceno
2B	Posiblemente cancerígeno	Limitada	No suficiente	Naftaleno benzo[b]fluoranteno benzo[k]fluoranteno
3	No clasificable como cancerígeno	No evidente	Limitada	Fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[g,h,i]perileno
4	Probablemente no cancerígeno	No evidente	No evidente	-

Tabla 2. Clasificación de la IARC de algunos de los 16 HAP estudiados según la evidencia de su capacidad carcinogénica sea: suficiente > no suficiente > limitada > no evidente

Las propiedades carcinogénicas y mutagénicas de los HAP pueden explicarse en gran medida por la estructura química. Algunos estudios llevados a cabo con animales, pusieron de manifiesto que los HAP constituidos por anillos bencénicos (HAP alternantes) han de cumplir algunos requisitos, como tener 4 o más anillos y una estructura en forma de bahía o valle, para presentar efecto carcinogénico o mutagénico[12].

En la figura 4 se muestra una comparación de algunos de los HAP que cumplen esa estructura y de los cuales se conoce su actividad carcinogénica. Acerca de los HAP no alternantes, es decir, compuestos tanto por anillos bencénicos como distintos al benceno, como el fluoranteno y derivados, no se han establecido requisitos estructurales para justificar su actividad carcinogénica.

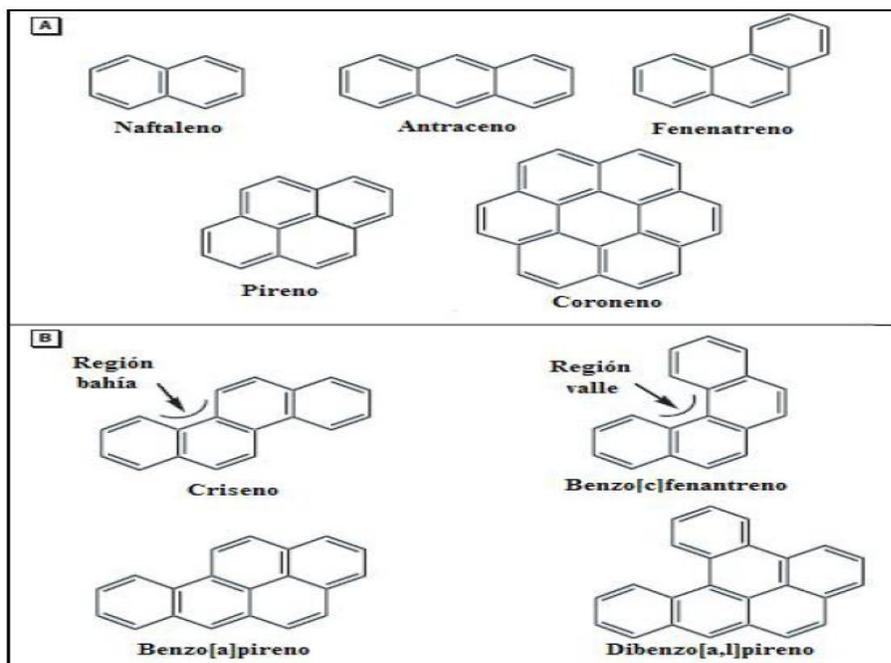


Figura 4. A) HAP alternantes cuya estructura no cumple los requisitos de 4 o más anillos bencénicos o la presencia de una región bahía o valle. B) HAP alternantes que cumplen los requisitos estructurales y de los que se conoce su capacidad carcinogénica.

En cualquier caso, la actividad carcinogénica de los HAP es debida a la biotransformación que experimentan y que produce reactivos intermedios capaces de enlazarse covalentemente con el ADN de las células e inducirlo a romper sus cadenas, mutándolo y provocando la iniciación de tumores. Bien conocido es el proceso de mutagénesis del ADN por los derivados del benzo[a]pireno (ver figura 5). Cuando se introducen HAP en el organismo, como se trata de una sustancia extraña, este intenta solubilizarlos para eliminarlos. Debido a su baja solubilidad, el organismo los transforma en derivados hidrosolubles, que dan lugar a los óxidos correspondientes. Estos, en presencia de agua, se hidratan dando lugar a dioles, que son sustancias que se excretan más fácilmente. Sin embargo, algunos de estos dioles forman una epoxidación, dando lugar a diol-epóxidos, los cuales son considerados importantes agentes carcinogénicos, ya que en presencia del ácido desoxiribonucleico (ADN), el grupo $-NH_2$ de su base nitrogenada produce un ataque nucleofílico sobre el epóxido. La unión de este gran hidrocarburo a la base nitrogenada, impide el acoplamiento adecuado a la doble hélice del ADN, impidiendo el establecimiento de puentes de hidrógeno con la base nitrogenada de la hebra opuesta, lo cual da lugar a una mutación

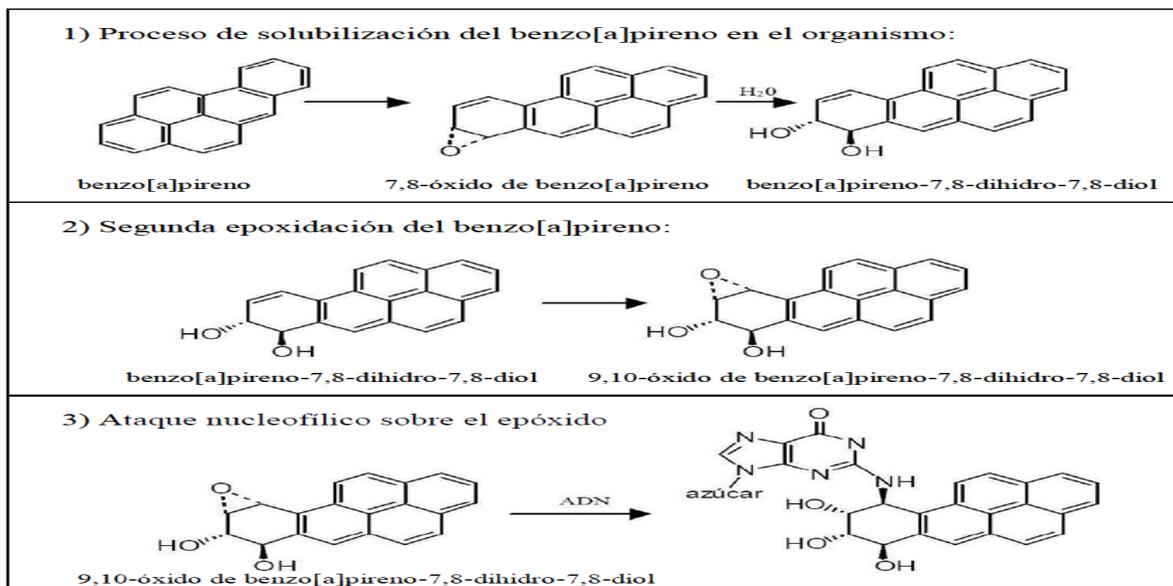


Figura 5. Proceso de mutagénesis del ADN que experimenta el benzo[a]pireno.

Por lo tanto, el potencial mutagénico y carcinogénico de los HAP depende de los metabolitos intermedios que se produzcan una vez introducidos en el organismo.

Existen principalmente 3 vías de exposición por parte de los seres humanos y mamíferos a los HAP:

La vía respiratoria: A través de las inhalaciones de emisiones procedentes de los vehículos a motor, calefacciones domésticas, aire contaminado por el sector industrial e incluso el humo del tabaco y los gases desprendidos al cocinar.

La ingestión de alimentos: Los HAP son acumulados en moluscos y pescados que luego se consumen como alimento. Estos compuestos también se generan en el proceso de preparación de algunos alimentos, como los alimentos ahumados (sobre todo si son ahumados por técnicas tradicionales), la carne asada y los aceites vegetales. Algunos cultivos pueden ser contaminados por deposición atmosférica, entre ellos los cereales y algunos vegetales de hoja verde como el té, espinacas y lechuga.

La vía dérmica: A través del contacto con sustancias como el petróleo y derivados como el hollín, brea, alquitrán o el asfalto.

La toxicidad aguda de los HAP ha sido experimentada en animales, obteniéndose como resultado valores de dosis letal al 50% de la población expuesta, superiores a 50 mg/Kg. de peso vivo. Desde este punto de vista, los HAP resultan menos peligrosos que una gran parte de los insecticidas, acaricidas o rodenticidas que se comercializan en el mercado. De hecho, un HAP muy comercializado es el naftaleno que se vende en forma de bolitas de antipolillas. Sin embargo, la gran diferencia que presentan estos compuestos se debe a su efecto a medio y largo plazo, lo cual deriva en una preocupación tanto científica como pública.

2.1.2.9 Identificación de las fuentes de procedencia (relaciones diagnósticas)

La identificación de las fuentes de procedencia de los contaminantes es una cuestión crítica dentro de la valoración del riesgo que implican. En el caso de los HAP, comúnmente es utilizada la comparación entre el patrón de HAP emitido y el obtenido en las muestras estudiadas, para evaluar la contribución de las distintas fuentes posibles. Generalmente, esta comparación es realizada a través de la relación entre pares de HAP con igual masa molecular, con el fin de minimizar las diferencias de volatilidad, solubilidad en agua, y otras propiedades fisicoquímicas, entre los compuestos. La relación entre HAP específicos se denominan relaciones diagnósticas y van a permitir diferenciar entre el origen pirogénico y/o petrogénico de los HAP encontrados en una muestra determinada [2]. Las relaciones diagnósticas más aplicadas para la diferenciación entre origen pirogénico o petrogénicos de los HAP se encuentran resumidos en la Tabla 3.

Relación diagnóstica	Origen pirogénico	Origen petrogénico
Fenantreno/Antraceno	<10	>10
Fluoranteno/Pireno	>1	<1
Benzo[a]antraceno/(Benzo[a]antraceno+Criseno)	>0,35	<0,2
Antraceno/(Antraceno+Fenantreno)	>0,1	<0,1
Fluoranteno/(Fluoranteno+Pireno)	>0,5	<0,5

Tabla 3. Relaciones diagnósticas utilizadas para la determinación de las fuentes de origen más relevantes de HAP [2].

De igual forma, el empleo de la relación $\text{Flu}/(\text{Flu}+\text{Pi})$ superior a 0,5 es indicativo de que la combustión de carbón o madera también contribuye al origen de esa mezcla de HAP [2], y valores superiores a 0,6 de la relación benzo[g,h,i]perileno/benzo[a]pireno indican la influencia del tráfico, debido a que el benzo[g,h,i]perileno es considerado un compuesto específico de las emisiones de gasolina. La relación $\text{I}[1,2,3\text{-cd}]\text{P}/(\text{I}[1,2,3\text{-cd}]\text{P}+\text{B}[g,h,i]\text{P}) > 0,5$ es empleada por algunos autores como característica de la combustión de pasto y madera [13].

Cabe destacar que las relaciones diagnósticas deben ser utilizadas con cuidado como método para identificar la fuente de procedencia de los HAP, ya que este procedimiento asume que los pares de HAP estudiados se transportan y transforman de igual modo en el camino desde la fuente de emisión hasta la muestra receptora. Pero esta hipótesis no siempre es cierta, ya que los pares de HAP empleados en las relaciones tienen propiedades muy similares pero no idénticas [14]. Sin embargo, es factible emplearlos, estudiando la problemática desde una perspectiva global.

2.1.3 Biomonitorio

Biomonitorio puede definirse como el uso de ciertos bio-organismos/materiales para obtener información sobre ciertas características de la biosfera [15].

Existen diferentes maneras de realizar estudios de biomonitorio de contaminación atmosférica empleando diferentes especies:

1. Al realizar un mapeo de todas las especies presentes en un área específica se puede indicar, de modo general, la calidad del aire mediante la presencia de diversidad de especies vegetales [16]. A través del muestreo *in situ* de especies y su posterior análisis químico para determinar los contaminantes que acumularon, también denominado **biomonitorio pasivo** [16].

2. Al trasplantar especies desde un área considerada como no contaminada hacia un área contaminada por un período de tiempo determinado y posteriormente medir cambios morfológicos y/o evaluar parámetros fisiológicos y/o evaluar la bioacumulación de los contaminantes en el organismo, lo cual también es definido como **biomonitoreo activo** [16].

Algunas ventajas y aspectos importantes del biomonitoreo son [17]:

1. La concentración de contaminantes en el biomonitor que es frecuentemente mayor cuando aumenta en el sistema que es monitoreado. Esto puede facilitar la exactitud del muestreo y del análisis, cuando existen dificultades por otros métodos debido a los bajos niveles de contaminantes trazas presentes en la atmósfera.
2. Tolerancia a los agentes contaminantes.
3. Abundancia en el área de interés, independientemente de las condiciones meteorológicas.
4. Respuesta a las concentraciones que se presumen serán evaluadas.
5. Captación apreciable del elemento en la atmósfera.
6. Diseño sencillo del muestreo y preparación de la muestra.
7. Acumulación del elemento a niveles de contaminación accesibles por las técnicas analíticas rutinarias, tomando en consideración las ventajas y desventajas de las mismas.

2.1.3.1 Bioindicador y Biomonitor

Un bioindicador se refiere generalmente a todos aquellos organismos que permiten deducir información acerca de la calidad del ambiente o de cambios en el mismo [17].

Biomonitor se define como todo organismo que provee información cuantitativa de la calidad del ambiente [17].

La información cuantitativa derivada de un biomonitor sobre el estado de un ecosistema puede ser determinada mediante procesos químicos a través de la acumulación de sustancias particulares en sus tejidos. La información cualitativa es deducida del impacto causado por alteraciones del ambiente que derivan en cambios en el comportamiento de estos organismos, es decir, modificaciones en la composición de la especie y/o enriquecimiento, cambios fisiológicos, morfológicos y ecológicos [15].

2.1.3.2 Criterio de selección de un biomonitor.

El biomonitor o los organismos pueden ser seleccionados con base en su comportamiento acumulativo y el tiempo de integración. En la literatura, las especies de biomonitorio de la contaminación del aire con frecuencia son seleccionadas sobre la base de criterios tales como la especificidad, esto significa que la acumulación se considera un hecho limitado solamente a la atmósfera o a una representación bien definida de un sitio de muestreo. Wolterbeek razonó que la selección debe considerarse sobre la base de las diferencias entre las variaciones locales y de la muestra. Por supuesto, el criterio para la selección casi implícita es la ocurrencia de biomonitores comunes [18].

En trabajos anteriores, la contaminación del aire fue indexado por las variaciones geográficas en la biodiversidad y la riqueza de biomonitorización de las especies, el trabajo más reciente está destinado a aclarar el impacto de los diferentes niveles de contaminación atmosférica en las respuestas de la biomonitorización. En este sentido, muchos estudios se dedican a procesos como la fotosíntesis, la respiración, la transpiración, la acumulación de elementos, etc.

Los últimos estudios comparten dos objetivos diferentes: el conocimiento en primer lugar, se recoge en el impacto (ecológico / fisiológico) de la contaminación del aire atmosférico y, en segundo lugar, sobre el impacto de la respuesta en términos de acumulación elemental, el conocimiento se fundamenta en las relaciones dosis-respuesta para la biomonitorización de interés [15].

2.1.4 Bromeliáceas

La familia de las bromeliáceas comprende alrededor de 60 géneros y más de 1400 especies, nativas de las regiones umbrosas, cálidas y húmedas de América tropical y las Antillas. Son plantas herbáceas, la mayor parte de las especies epifitas, crecen sobre los árboles, acomodadas en las horquillas de las ramas y en las excrecencias de la corteza. Su tamaño varía según la especie de 2,5 pulgadas hasta los 10 metros de altura. Lo más atractivo de las bromelias es su follaje, algunas tienen varias bandas en sus hojas de distintos colores, pero también destacan sus tallos floridos. Su crecimiento por lo general es lento. El periodo de crecimiento va de marzo hasta agosto, el periodo de reposo se extiende desde agosto a febrero.

2.1.4.1 Género *Tillandsia*

2.1.4.2 Características:

Las *Tillandsias* son plantas que se nutren por las hojas. Sus requerimientos de agua y nutrientes son mínimos. Todas sus necesidades las obtienen del aire. Las hojas, en algunos casos suculentas o semisuculentas están cubiertas por tricomas, unas células adaptadas que les permiten absorber agua y nutrientes. Las raíces no tienen capacidad de absorción, solo les sirven para fijarse a un soporte.

Las inflorescencias, particularmente las brácteas, se visten de colores más vivos y más variados en las regiones húmedas del Perú que en las secas.

Entre todos los géneros, *Tillandsia* tiene el mayor número de especies y la mayor extensión geográfica; pero no sube tanto como la Puya (*Puya de Raimondi*) sino que termina en los 4000 m.; puede ser de vida terrestre o de vida epífita; una misma especie puede variar respecto a eso. Algunas *Tillandsias* del desierto, las cuales se encuentran en arenales o rocas, resisten tanto a la escasez de agua como ciertos líquenes y se mantienen exclusiva o principalmente con la poca agua de rocío que sus hojas reciben; tienen una exposición total de la superficie foliar y poseen una gran cantidad de escamas absorbentes, de propiedades muy útiles en tales circunstancias; así prevalecen las especies de hojas angostas y grises (color debido a las escamas), p.ej. *Tillandsia tectorum*, *aurea*, *aureo-brunnea*, *paleacea*, *straminea*, *capillaris*, *recurvata*.

Sin embargo, otras *Tillandsias* viven en zonas lluviosas. Aquí predominan los tipos de hojas anchas y poco escamosas, las que se juntan unas a otras, formando un recipiente de agua (p.ej. *Tillandsia rubra*, *Wangerini*, *fuscoguttata*, *Schimperiana*, *complanata*, *maculata*, *tetrantha*) [19]. La familia bromeliáceas actualmente en Venezuela se reportan 374 especies, incluidas en 25 géneros, estando presente en género *Tillandsia sp* [20].

2.1.4.3 *Tillandsia Recurvata* (L). L como biomonitor.

La *Tillandsia recurvata* (L) también conocida comúnmente como “Clavel del Aire” o “Bola de Musgo”, es una planta epífita de 8 cm de radio, agrupada por lo general en varias masas esféricas con un sistema rudimentario de raíces. Suele colonizar árboles y cables telefónicos. Posee tricomas foliares higroscópicos que les permiten condensar la humedad del viento y así absorber nutrimentos. No ataca el sistema vascular de sus forofitos, solo los utiliza como soporte y tiene fotosíntesis tipo C3. Las semillas son fusiformes, muy pequeñas y poseen vellos blancos y sedosos que le facilitan su adherencia a cualquier superficie [21].

La *Tillandsia recurvata* (L). L se distribuye en ambientes tropicales secos, desde el sur de los E.U.A. hasta la parte media de Argentina, y en altitudes desde el nivel del mar hasta los 3000 m de elevación. El talo de la planta está formado por un número variable de brotes que, en conjunto, forman una pequeña esfera que rodea las ramas (generalmente delgadas) de los árboles en los que se establece. Cada brote está formado por 3-8 hojas lineares de color blanco verdoso, cubiertas de tricomas escamosos. La emergencia de una inflorescencia terminal, que aparece en los meses de otoño, determina el fin del crecimiento de los brotes. Cada inflorescencia produce una o dos flores (ocasionalmente hasta cinco) de forma tubular, cuyos estambres y pistilos están profundamente incluidos en la corola (por lo que se presume que se autopoliniza). Sus infrutescencias son cápsulas dehiscentes de las que emergen semillas plumosas que se dispersan por viento durante los meses del invierno. El área de distribución de *T recurvata* abarca zonas de clima seco, por lo que se le considera una epífita extrema [22].

A pesar de que la mayoría de los autores ha subestimado el impacto que las epifitas pueden causar sobre sus forofitos [23], plantean la existencia de un parasitismo facultativo o epiparasitismo como una posibilidad en la relación epifita-forofito. El mismo autor menciona que algunas epifitas pueden dañar a los forofitos a través de varios mecanismos, como puede ser la producción de fitotoxinas, que conllevan a la defoliación de los hospederos, así como a la creación de condiciones que favorecen el ataque de patógenos a los tejidos de los hospederos. En este sentido, se llegaron a observar ocasionalmente restos de hifas creciendo en la interfase raíz-corteza del material estudiado, sin que se pudiera precisar su identidad ni su función. A este respecto Benzing (1990) [23] atribuye a algunos hongos asociados a las raíces de las tillandsias, una probable acción virulenta, transformando a la epifita en un reservorio de enfermedades infecciosas. Como respuesta las plantas pueden producir varios cambios estructurales y toxinas o metabolitos repelentes contra dicho fenómeno [23]. Por otra parte, Benzing (1990) [23], menciona que muchos autores y él mismo suponen que nutrimentos disponibles en la superficie de la corteza son incorporados por las epifitas, pero en el caso de *Tillandsia* no se había encontrado alguna evidencia que apoyara esta idea. El desarrollo limitado de las raíces de epifitas como *Tillandsia recurvata* (L.) L. sobre sus hospederos fue descrito por Benzing (1990) [23], como epifitismo extremo y en pocas ocasiones parece causar algún daño a los forofitos. Sin embargo, las raíces podrían acentuar el daño en la corteza de las ramas dependiendo de la abundancia de la epifita en ellas. Todos los cambios observados en la corteza por influencia de la epifita, dependiendo de su frecuencia y extensión, pueden repercutir en el intercambio gaseoso de la corteza, disminuyendo la movilización de CO₂ en áreas disfuncionales y, a nivel de la madera, pueden afectar la movilización de agua y minerales [23].

2.1.4.4 Taxonomía

Tabla 4. Taxonomía de la *Tillandsia Recurvata* (L). L [24]

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	<u>Liliopsida</u>
Subclase	Commelinidae
Orden	Bromeliales
Familia	Bromeliaceae
Género	<i>Tillandsia</i>
Especie	<i>T. recurvata</i>

Los organismos más utilizados como biomonitores (bioacumuladores) de contaminantes atmosféricos son los musgos y los líquenes. Más recientemente, en algunos países centroamericanos (Costa Rica) y suramericanos (Argentina y Brasil) se han utilizado algunas especies de la planta epifita *Tillandsia* (L). L, para biomonitoreo de metales pesados y HAP (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) aerotransportados. Algunos autores han documentado correlaciones positivas entre la cantidad de

contaminantes acumulados por estas plantas y los niveles de contaminación atmosférica. De manera similar a los musgos y líquenes, la *Tillandsia* (L). L, obtiene el agua y los nutrientes disueltos en ella a partir de la atmósfera, por lo que se les conoce como “plantas atmosféricas” [25]. En la Figura 6 se puede observar la epífita *Tillandsia Recurvata* (L). L y en la figura 7 una semilla en proceso de dispersión.

Figura 6. Especie *Tillandsia Recurvata* (L).L (Foto tomada por: Juan Ibedaca)



Figura 7. Un fruto abierto de *T. recurvata*, sus semillas plumosas en proceso de dispersión [22]

2.1.5 Técnicas de extracción

2.1.5.1 Concepto general

El proceso de extracción se basa fundamentalmente en la puesta en contacto de la muestra con un disolvente adecuado. Posteriormente, la mezcla de la muestra sólida con el disolvente líquido es sometida a una serie de tratamientos de distintos rangos de agresividad, que van desde la simple agitación hasta la puesta del disolvente en condiciones críticas de presión y temperatura, dependiendo de la fortaleza de la interacción entre el analito y la matriz. Un esquema de las etapas seguidas por el disolvente en el proceso de extracción de muestras sólidas se puede visualizar en la figura 8.

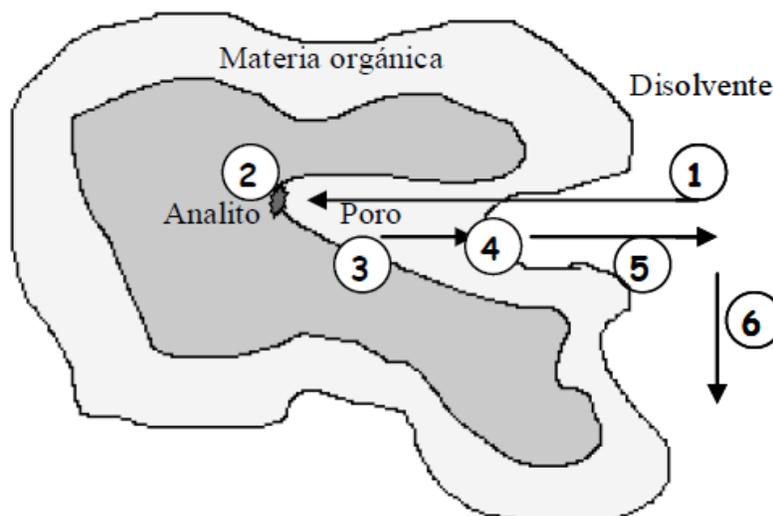


Figura 8. Etapas seguidas por el disolvente para la extracción del analito en muestras sólidas [26]

Siendo:

- 1- Entrada del disolvente en el poro
- 2- Desorción del analito.
- 3- Difusión del analito a través de la materia orgánica adherida a la partícula.
- 4- Disolución del analito en el disolvente
- 5- Difusión del analito a través del disolvente para salir del poro.
- 6- Arrastre del analito en el disolvente

De acuerdo a este esquema, las investigaciones en la mejora de la extracción están orientadas a descubrir cómo influir sobre los parámetros que controlan cada una de las etapas mostradas en el esquema. Resulta esencial el estudio del disolvente más adecuado para disolver los analitos (etapas 2 y 6), así como la aplicación de temperatura y/o de presión. Aumentando la temperatura del disolvente generalmente se mejora la solubilidad de los analitos, además de los coeficientes de difusión (etapas 3 y 5) y la capacidad del disolvente para debilitar las interacciones analito-matriz. Mediante la aplicación de presión se facilita la penetración del disolvente en los poros de la partícula del sólido (etapa 2). La optimización de estos parámetros permitirá mejorar la eficacia de la extracción, así como reducir el tiempo dedicado a la misma [26].

Por lo tanto, en la **optimización** y desarrollo de un método de extracción, los resultados suelen ser estudiados y discutidos desde el punto de vista de la eficacia de la extracción, en términos de los porcentajes de analitos recuperados, y de la cantidad de disolvente empleada. Sin embargo, es también muy relevante considerar la selectividad del método hacia los analitos de interés respecto a otros componentes de la muestra [27].

2.1.5.2 Extracción asistida por ultrasonido

Los ultrasonidos se definen como sonidos cuyas frecuencias se encuentran más allá del rango perceptible por el ser humano. Las frecuencias de los ultrasonidos generalmente se encuentran entre 20 y 500 Mhz [28]. Muchos animales, como los delfines y los murciélagos, lo utilizan de forma parecida al radar en su orientación. Esto es posible porque las ondas de ultrasonidos emitidas por estos animales “rebotan” fácilmente en todos los objetos alrededor de ellos, esto hace que creen una “imagen” y se orienten de su posición.

La primera aplicación comercial de los ultrasonidos data de 1917 con la técnica de sonar, desarrollada por Lagenvin para estimar la profundidad de las aguas. Más recientemente, su aplicación comienza en los años precedentes a la Segunda Guerra Mundial, en los que se desarrollaron un gran número de procesos que incluyen la emulsificación, limpieza y pulido de superficies. En los años sesenta la industria ya utilizaba frecuentemente los ultrasonidos. Desde entonces se ha desarrollado un gran número de aplicaciones para análisis no destructivo y, sobre todo, para las ciencias médicas. En este campo son utilizados para técnicas de diagnóstico, que se basan en ultrasonidos de baja potencia y alta frecuencia (medido en el rango de Mhz) que no afectan a la naturaleza física y química del medio donde se propagan. También son utilizados para procesos destructivos, como son la destrucción de tejidos cancerígenos o la disolución de coágulos sanguíneos, mediante la aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia (generalmente entre 10-40 Khz.) y alta potencia. Este tipo de ultrasonidos sí provoca cambios significativos en el medio de propagación, debido a la generación y posterior implosión de burbujas de cavitación. A este proceso se le conoce como cavitación acústica.

En el campo de la Química Analítica, los equipos de ultrasonido constituyen una técnica muy empleada debido a su gran eficiencia en diferentes campos como la extracción de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos [29].

De hecho, en la inmensa mayoría de laboratorios de química es común encontrar un baño de ultrasonidos. El efecto de los ultrasonidos basa su eficacia en el proceso de cavitación acústica, que depende fuertemente de la potencia del ultrasonido. Este proceso (ver Figura 9) puede ser caracterizado por la formación, crecimiento e implosión de burbujas de gas en disolución. La implosión sucede en forma de una compresión adiabática que genera altas temperaturas y presiones por lo que se crean unas condiciones inusuales para las reacciones químicas [30].

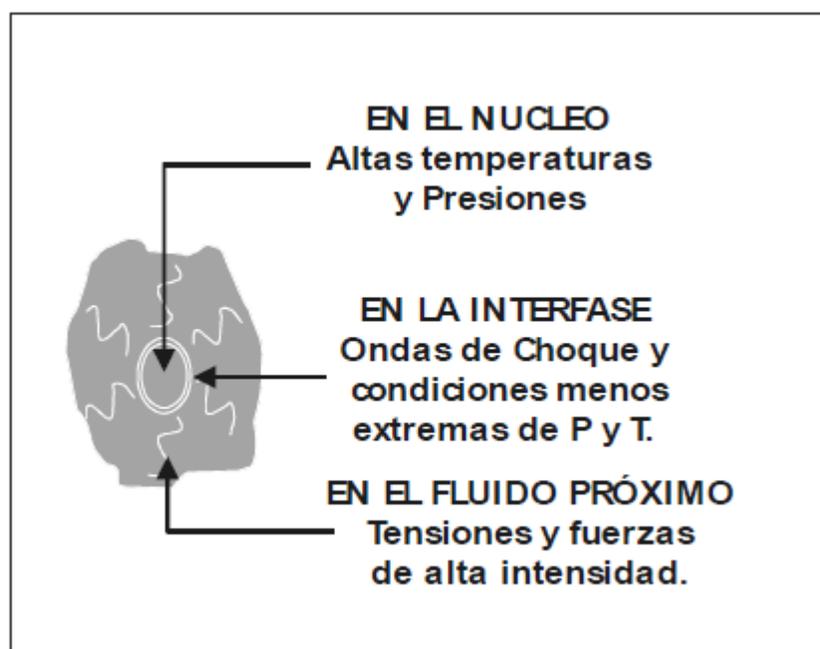


Figura 9: Esquema de una burbuja de cavitación [31]

Cuando las ondas de los ultrasonidos de alta potencia se propagan por el líquido, ocurre una ruptura de la continuidad de dicho líquido con la formación de la burbuja de cavitación, creando zonas de presiones negativas. La cavitación así formada se llena del vapor y de los gases disueltos en el líquido colindante. Entonces, la burbuja de gas formada colapsa y se destruye rápidamente bajo la acción de la compresión siguiente. Esta destrucción da como resultado la creación de una gran fuerza hidráulica que tiene una fuerte acción destructiva. Tanto es así que los efectos de la cavitación hidrodinámica pueden destruir una bomba impulsora de una refinería o deformar las grandes tuercas que sujetan las hélices de los barcos mercantes. La duración de este estado de baja presión, mientras aparecen las burbujas de cavitación, decrece con el incremento de la frecuencia del ultrasonido. De modo que el efecto de la cavitación se reduce con ultrasonidos de frecuencias altas [30]:

El efecto de los ultrasonidos depende de muchas variables. Las más importantes están relacionadas a las características químicas del medio donde se produce la reacción (densidad, viscosidad, tensión superficial, etc), a la presión, la temperatura, la frecuencia, la potencia del aparato y el tamaño y geometría tanto del aparato como del recipiente de extracción [32]. Asimismo, hay que tener en cuenta que la extracción también dependerá de la posición del recipiente dentro del baño [33]. Por lo que habrá que tener cuidado en colocar el recipiente siempre en el mismo lugar prefijado en el baño para que se encuentre expuesto a las ondas de ultrasonidos de la misma manera y evitar así problemas en la baja reproducibilidad de los experimentos.

2.1.5.3 Extracción estática con ultrasonido

En este caso será la técnica a utilizar en ésta investigación, la muestra sólida se pone en contacto con el disolvente dentro de un recipiente de extracción que se introduce en un baño de ultrasonidos. Las ondas de ultrasonidos provocan la vibración de las moléculas aumentando la eficacia de los choques entre ellas y debilitando así las interacciones entre los analitos y la matriz. La difusión del disolvente dentro de los poros de la muestra sólida también se ve favorecida, mejorando el contacto entre el disolvente y la muestra. Además es posible la aplicación de temperatura durante la extracción porque la mayoría de baños de ultrasonidos comerciales van provistos de controladores de temperatura. En comparación con la aplicación de agitación mecánica convencional, la aplicación de ultrasonidos en los procesos de extracción de muestras sólidas mejora la eficacia de la extracción. Sin embargo, presentan las mismas desventajas en el sentido de que es necesario realizar extracciones consecutivas para conseguir la extracción cuantitativa y hay que incluir etapas de filtrado entre las extracciones, por lo que son métodos laboriosos y que consumen un tiempo de operación y un volumen de disolvente considerables.

2.1.5.4 Extracción asistida por microondas

Energía Microondas es una radiación no ionizada (frecuencia 300-300.000 MHz) que causa el movimiento molecular por la migración de iones y la rotación de los dipolos. Rotación dipolo se refiere a la alineación, debido al campo eléctrico, de moléculas que tienen ya sea momentos dipolares permanentes o inducida, tanto en el disolvente como en las muestras. Como la intensidad de campo disminuye, el desorden térmico es restaurado por lo que se traduce en energía térmica liberada. En 2450 MHz (la frecuencia usada en los sistemas comerciales), la alineación de las moléculas

seguida por el retorno al desorden se produce $4,9 \times 10^9$ veces por segundo, lo que resulta en un rápido calentamiento. Sin embargo, la absorción de energía de microondas y su liberación en forma de calor son fuertemente dependientes de la permitividad relativa y el momento dipolar del medio. Cuanto mayor es la permitividad relativa, más energía térmica es liberada, y el calentamiento es más rápido, para una frecuencia dada. A pesar de que las microondas se han utilizado durante varios años en laboratorios de análisis de muestras, estudios preliminares realizados a finales de 1980 utilizando hornos domésticos mostraron el gran potencial de microondas para extracción [34]. Por lo que, su uso se extendió en laboratorios, esto comenzó en la década de los 90, con la comercialización de varios instrumentos dedicados a las extracciones.

Extracción asistida por microondas (MAE) (siglas en inglés) utiliza la radiación de microondas como la fuente de calentamiento de la muestra con mezcla de disolvente [34]. Debido a los efectos particulares de las microondas sobre la materia (es decir rotación dipolar y la conductancia iónica), la calefacción con microondas es instantánea y se produce en el corazón de la muestra, dando lugar a extracciones muy rápidas. La mayoría de las veces, la extracción con disolvente se elige para absorber microondas. Alternativamente (para los compuestos termolábiles), las microondas pueden ser absorbidas solo por la matriz, lo que permite el calentamiento de la muestra y la liberación de los solutos en el disolvente frío. Los resultados obtenidos hasta la fecha han concluido que la radiación microondas no causa la degradación de los compuestos extraídos, a menos que una temperatura demasiado alta surja en el envase [34]. Al mismo tiempo, un efecto específico de las microondas en material de plantas ha sido encontrado. Ellos interactúan selectivamente con las moléculas de agua libres presentes en la glándula y sistemas vasculares, que conducen a un calentamiento rápido y a un aumento de la temperatura, seguido por rotura de las paredes y la liberación de los aceites esenciales en el disolvente.

La aplicación de energía de microondas a las muestras puede realizarse utilizando dos tecnologías: recipientes cerrados (bajo presión y temperatura controladas), o recipientes abiertos (a presión atmosférica) [34]. Estas dos tecnologías son comúnmente denominadas (MAE PMAE) a presión o MAE centrado (FMAE), respectivamente. Ambos sistemas se muestran en la figura. 10. Mientras que en los vasos abiertos la temperatura está limitada por el punto de ebullición del disolvente a presión atmosférica, en vasos cerrados la temperatura puede ser elevada mediante la simple aplicación de la presión corregida [34]. Este último sistema parece más apropiado en el caso de compuestos volátiles. Sin embargo, con recipientes cerrados, después de extracción se necesita esperar a que la temperatura baje antes de abrir el recipiente, aumentando el tiempo de extracción global (en torno a 20 minutos). Con respecto a las eficiencias de extracción, ambos sistemas se han mostrado a actuaciones similares para la extracción de los HAP de sedimentos.

La naturaleza del disolvente es obviamente de importancia primordial en MAE. Al igual que con otras técnicas, el disolvente (o mezcla de disolventes) eficiente debería solubilizar los analitos de interés y solubilizar muy poco material adicional de la matriz. (Es decir, la extracción debería ser tan selectiva como sea posible para evitar aún más la limpieza). Además, debe ser capaz de desplazar las moléculas de soluto adsorbidas en los sitios activos de la matriz con el fin de garantizar la eficacia de las extracciones. Finalmente, las propiedades de adsorción de microondas del disolvente son de gran importancia así como el suficiente calor suministrado (para permitir la desorción eficiente y solubilización, por tanto lograr una eficiente extracción). La mayor parte del tiempo, el disolvente elegido debe absorber las microondas sin que conduzca a un calentamiento fuerte para evitar la degradación de los compuestos. Así, es práctica común utilizar una mezcla binaria (por ejemplo, hexano-acetona, 1 +1), con un solo disolvente absorbente microondas. Sin embargo, en algunos casos, disolventes polares (tales como agua o alcoholes) pueden dar extracciones eficientes [34]. En figura 10 se muestra el principio del sistema MAE.

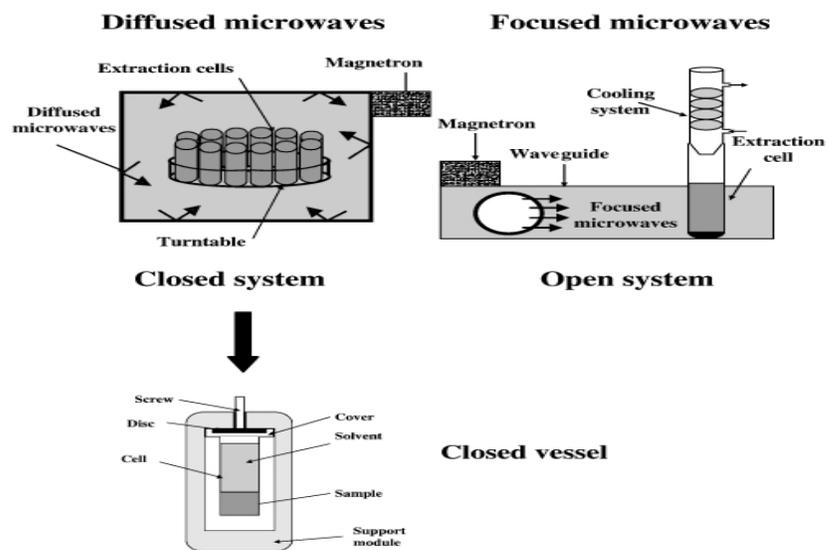


Figura 10. Principio del sistema de MAE [34]

2.1.6 Método de análisis

Uno de los métodos frecuentemente usados para la separación, identificación y cuantificación de HAP en diversas matrices ambientales es: La Cromatografía de Gases /Espectrometría de masas por sus siglas en inglés GC-MS.

La cromatografía consiste en la separación de una mezcla de compuestos (solutos) en componentes independientes por el paso de los mismos a través de una fase sólida ayudados por una fase móvil.

La cromatografía de gases (GC) es una de las diversas técnicas cromatográficas que existen y resulta adecuada para analizar entre un 10 y 20% de todos los compuestos conocidos. Para reunir los requisitos para un análisis por GC, un compuesto debe poseer la volatilidad y estabilidad térmica adecuada. En caso de que todas o algunas de las moléculas de un compuesto se encuentren en la fase gaseosa o de vapor a 400 - 450 °C (o inferior) y no puedan descomponerse a tales temperaturas, lo más probable es que el compuesto pueda analizarse mediante GC [36].

En esta técnica la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna [35].

2.1.6.1 Mecanismo y procedimientos generales de la GC

El primer paso en el proceso de GC es suministrar uno o varios gases de elevada pureza al GC. Uno de estos gases (denominado gas portador) entra por el inyector, a través de la columna hacia el detector. A continuación, se introduce una muestra en el inyector, que se encuentra generalmente a una temperatura de entre 150 y 250 °C, lo cual provoca que los solutos de la muestra volátil se vaporicen. Estos solutos vaporizados son transportados a la columna por medio del gas portador, mientras la columna permanece en un horno a temperatura controlada.

Los solutos recorren la columna a diversas velocidades, que vienen determinadas principalmente por las propiedades físicas de estos solutos, así como por la temperatura y composición de la propia columna. El soluto más rápido es el primero en salir (eluir) de la columna, seguido por el resto de los solutos en el orden correspondiente. A medida que cada soluto eluye, entra en el detector calentado, donde se genera una señal electrónica en función de la interacción del soluto con el detector. Un sistema de datos (por ejemplo, el software ChemStation de Agilent) almacena el nivel de la señal y la dibuja en función del tiempo transcurrido generando un cromatograma [36].

2.1.7 Análisis estadístico de datos

2.1.7.1 Diseño factorial 2^k

Son diseños en los que se trabaja con k factores, todos ellos con dos niveles (se suelen denotar + y -). Es de particular utilidad en las etapas iniciales del trabajo experimental, cuando probablemente se estén investigando muchas variables en un experimento. Debido a que solo hay dos niveles para cada factor, debe suponerse que la respuesta es aproximadamente lineal en el rango escogido para los niveles de los factores [37].

Por su sencillez, una matriz de experimentos factorial completa 2^k no requiere un software especializado para construirla ni para analizar sus resultados. En estos diseños, cada factor se estudia a sólo dos niveles y sus experimentos contemplan todas las combinaciones de cada nivel de un factor con todos los niveles de los otros factores.

Los experimentos factoriales en si no constituyen un diseño experimental si no un diseño de tratamiento (un arreglo de tratamiento es una disposición geométrica de ellos bien en el espacio o en el tiempo). El diseño experimental 2^k posee ventajas como lo son: este permite estudiar los efectos principales y los efectos de interacción de los factores, efectos simples y efectos cruzados. Todas las unidades experimentales intervienen en la determinación de los efectos principales y de los efectos de interacción de los factores, por lo que el número de repeticiones es elevado para estos casos. El número de grados de libertad para el error experimental es alto, comparándolo con los grados de libertad de los experimentos simples de los mismos factores, lo que contribuye a disminuir la varianza del error experimental, aumentando por este motivo la precisión del experimento [37].

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes internacionales

Brighigna et al. (2001). Emplearon dos especies de angiospermas epífitas (*Tillandsia caput-medusae* E. Morren y *Tillandsia bulbosa* Hook) para el seguimiento de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en el aire de Florencia, Italia. El estudio se realizó un muestreo durante 6 meses por toda la zona de estudio. Los resultados de las concentraciones de los HAP fueron obtenidos mediante análisis por GC / MS, a partir de los extractos de las especies.

Señalaron que para los datos analíticos hubo una tendencia creciente en el tiempo de bioacumulación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Para la sumatoria total de HAP del espécimen de *T. caput-medusae* se encontró una concentración máxima de 238,18 ng/g y mínima de 34,69 ng/g, mientras que para el de *T. bulbosa* se encontró una concentración máxima de 329,79 ng/g y mínima de 16,95 ng/g. Una vez obtenidos los resultados fueron comparados con los análisis de partículas suspendidas realizados con anterioridad. Finalmente, se realizó un estudio mediante un microscopio electrónico de barrido con el que se confirmó el papel de los tricomas y concluyen que las *Tillandsias* son particularmente útiles y de bajo costo para el biomonitoreo de la atmósfera [38].

Guidotti et al. (2003). La especie utilizada para este estudio fue el líquen epifítico *Pseudevernia furfuracea* colectado en la Montaña de Terminillo, Italia. Aplicando un muestreo activo; la muestra fue subdividida en 18 sub-muestras de 30g cada una y guardadas en bolsas herméticas. Ocho (8) puntos de la Ciudad de Rieti, Italia fueron escogidos de acuerdo a sus niveles de tráfico, dos (2) muestras fueron colocadas en cada estación de monitoreo. Cada 5 meses cerca de 5g de líquen eran colectados y guardados en el laboratorio para determinación de HAP. Las extracciones de las muestras fueron realizadas por el método de ultrasonidos y la técnica de análisis aplicada para obtención de datos fue GC-MS.

En el líquen *Pseudevernia furfuracea* se encontró una concentración mínima de los 16 HAP de 36 µg/g y una concentración máxima de HAP de 375 µg/g en las estaciones estudiadas. Señaló que los hidrocarburos aromáticos policíclicos con concentraciones por encima del límite de cuantificación fueron: fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno y criseno (compuestos de 3 y 4 anillos en su estructura), los autores explican que la predominancia de los HAP nombrados anteriormente se deben a que están presentes en la atmósfera parcialmente o totalmente en fase de vapor y pueden ser más fácilmente acumulados en líquenes. En este estudio también resaltan el importante rol de la calefacción doméstica y el tráfico vehicular en las concentraciones de HAP en la atmósfera [39].

Domeño et al. (2006). Realizaron una investigación en Rio Gallega, Ciudad de Zaragoza, España. Se estudiaron muestras del líquen *Xanthoria Parietina*, donde hicieron uso de un *spike* de solución estándar de 16 HAP en hexano con una concentración de 15 µg/g de cada compuesto. El estudio se basó en la comparación y optimización de las técnicas de extracción de ultrasonido dinámico (DSASE), ultrasónico estático y Soxhlet con base en recuperación de tiempo y consumo de

solvente. Los análisis de HAP fueron realizados por GC-MS sin ningún paso previo de purificación seguido de la extracción.

Los resultados obtenidos demostraron que por las tres técnicas aplicadas se obtuvieron 12 de 16 HAP reportados en la literatura y que el ultrasonido dinámico (DSASE) logra tiempos de extracción de 10min comparado con el ultrasonido estático de 2 horas, y un volumen de solvente de tan solo 2 mL. El límite de detección fue de 0,021-0,032 $\mu\text{g/g}$. también los autores explican que los líquenes son buenos bioindicadores de la contaminación del aire [40].

Zambrano et al. (2009). Estudiaron las concentraciones de metales pesados como Pb, Ti y V e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en una zona industrial del Valle de Mezquital, México, empleando la especie *Tillandsia recurvata* en biomonitorio activo. La especie estuvo a una exposición de 3 meses. Las extracciones fueron realizadas por microondas y los análisis por la técnica de HPLC.

Como resultado encontraron concentraciones tanto de metales como de los HAP entre 18 - 214% más elevadas en la zona industrial sur con respecto a la zona de agricultura. La determinación de estos hidrocarburos fue realizada mediante la técnica de HPLC con la cual la investigación logró la cuantificación de 15 HAP excepto el dibenzo[a.h] antraceno.

La concentración regional y la variabilidad de la sumatoria de ΣHAP cuantificados, para varios sitios, se determinó desde los 143 hasta 2568 ng/g, con un promedio igual a 572 ng/g de HAP totales. Como una de las conclusiones se señaló que la especie *Tillandsia recurvata* es un excelente bioacumulador y biomonitor para la determinación y seguimiento de contaminantes atmosféricos [41].

3.2 Antecedentes nacionales

Vareschi et al. (1953). Los líquenes fueron empleados por primera vez en Venezuela como bioindicadores. Estos autores realizaron un mapeo de los líquenes en la ciudad de Caracas, en el cual obtuvieron un “desierto de líquenes”; indicando que probablemente existió contaminación para esa área de estudio. En esa época, se empezaba a conocer la correlación entre la presencia de éstos y los niveles de contaminación, y solo fue dos décadas más tarde (Vareschi et al., 1973) cuando se verificó la correlación entre las comunidades de líquenes sobre amplias áreas geográficas y la concentración de los contaminantes en estas áreas de estudio [42].

Tugues (1976). Empleó por primera vez el género *Tillandsia* como indicadores de plomo en la atmósfera de Caracas, en sitios como Plaza Venezuela y el centro de la ciudad de Caracas, a fin de buscar correlaciones con las concentraciones de plomo (Pb) en el aire. Las concentraciones de las muestras fueron determinadas mediante espectrometría de absorción atómica. El estudio estableció que las concentraciones de plomo en las plantas está muy relacionada con la distancia a la fuente de contaminación, que la concentración varía dependiendo de las características de la fuente contaminante, es decir, si el tráfico era rápido o lento y el número de vehículos; y la concentración de plomo en las plantas y en aire depende también de la velocidad y dirección predominante de los vientos [43].

Jaffé et al. (1992). En su investigación realizaron la determinación de compuestos orgánicos alifáticos, aromáticos y metales pesados (Pb, Cu, Ni, Zn, Fe y Cd) estos fueron analizados de partículas atmosféricas en 6 sitios de la zona metropolitana de Caracas-Venezuela, las cuales identificaron como zona industrial,

urbana, suburbana y rural, evaluaron la composición y la concentración de los compuestos orgánicos durante 5 meses en las zonas urbanas, de esta manera lograron determinar la variabilidad estacional y temporal. Los análisis de los metales lo realizaon mediante espectrometría de absorción atómica en la llama (FAAS) y los compuestos orgánicos alifáticos y aromáticos por cromatografía de gases (GC).

Por otra parte en sus resultados señalaron que las concentraciones de contaminantes fueron disminuyendo desde las zonas industriales y urbanas a las suburbanas y rurales; también señalaron que los niveles de concentración de la mayoría de los contaminantes fueron altos para las zonas industriales y urbanas, indicando que estas concentraciones son comparables con las de otras grandes ciudades del mundo. Para el análisis de metales se encontró un rango de concentración entre $(3,8 \pm 1.66) \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{m}^3$ hasta $7,93 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y para los HAP: $24 \pm 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ hasta $149 \pm 37 \mu\text{g}/\text{m}^3$ [44] .

Catriona A. et al. (1995). La química de los líquenes epifíticos fue determinada en dos bosques nublados adyacente en los Valles de Caracas en Altos de Pipe y el Parque Nacional el Ávila. El líquen común *Parmotrema madagascariaceum* fue elegido como indicador de metales traza. Los experimentos de colección y transplante fueron llevados a cabo para evaluar las tendencias espaciales en la deposición atmosférica de metales traza en diferentes altitudes y deposiciones de dos localizaciones montañosas. Las elevadas concentraciones de metales incluyendo Pb y Zn fueron observadas en tejidos de líquenes y en la corteza. Los niveles de plomo en líquenes alcanzaron $190 \mu\text{g}/\text{g}$ en peso seco. Los líquenes transplantados de zonas relativamente limpias a sitios con mayor contaminación mostraron incrementos significativos de metales, particularmente plomo (Pb), con un incremento de $6.3 \mu\text{g Pb g}^{-1} \text{mo}^{-1}$. En contraste cuando los líquenes fueron transplantados en bolsas de nylon de menos a más sitios de exposición hubo un significativo decrecimiento en concentraciones de Pb y Zn después

de 6 y 10 meses. Con la exposición prolongada resultó en altas concentraciones de estos metales traza en líquenes, así como otra biota sensible bosque nublado, pueden estar en riesgo de descenso [45].

Ceballos (2002). Determinó la concentración de HAP y PTS en los sectores de Parque del Este y Santa Eduvigis. Para la recolección empleó un captador de alto volumen (Hi-Vol) durante los meses de abril hasta agosto del 2002. Para el análisis utilizó 15 muestras y un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas con la que obtuvo como resultado la identificación de 10 HAP y que las concentraciones de PTS fueron mayores en Santa Eduvigis ($74 \mu\text{g}/\text{m}^3$) con respecto a las de Parque del Este ($53 \mu\text{g}/\text{m}^3$), esto probablemente a que la estación de Santa Eduvigis se encuentra en contacto directo con emisiones vehiculares y por lo tanto a mayores concentraciones de HAP, a diferencia de la estación del Parque del Este donde las concentraciones se encontraron por debajo del límite de detención [46].

Requíz (2006). Llevó a cabo un estudio del tipo pasivo para la cuantificación y la caracterización de los HAP mediante el empleo de líquenes como biomonitores, en diferentes zonas de la ciudad de Caracas. Realizó los análisis mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GCMS) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para realizar una comparación entre las técnicas, con los cuales logró identificar 13 HAP. Como resultado obtuvo valores dentro del 65 al 96% de eficiencia para el análisis de recuperación del procedimiento experimental, para cada uno de los poliaromáticos. En cuanto a la diferencia entre ambas técnicas describió que, en términos de facilidad, la técnica de cromatografía de gases acoplada a masas presenta una ventaja en cuanto a la sencillez para la caracterización de los HAP, además la cromatografía líquida de alta eficiencia facilita la cuantificación de estos compuestos. Por otra parte, se obtuvo

un rango de concentración máxima y mínima de la sumatoria de los HAP de (0,24-9,08) $\mu\text{g/g}$ [47].

Mendoza (2008). Desarrolló una metodología para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en 4 muestras de partículas atmosféricas sedimentadas en el estadio universitario de la UCV, utilizando microextracción en fase sólida en un espacio confinado por cromatografía de gases. El método empleado permitió de forma cualitativa la determinación de 9 HAP que estuvieron presentes en muestras sólidas, sin la necesidad de tratamiento de la muestra, esto facilitó el muestreo y la utilización de un menor número de pasos para el análisis [48].

Arguello (2009). Estudió la distribución de metales pesados en una transecta entre la quebrada Quintero y Altamira (Caracas) empleando líquenes del género *Pyxine* y la bromelia *Tillandsia recurvata* como monitores de contaminación atmosférica. La metodología utilizada para la determinación de los elementos consistió en la pulverización del biomaterial con nitrógeno líquido, para su posterior digestión. El análisis se realizó mediante ICP-OES permitiendo registrar las concentraciones de los siguientes metales: Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, V y Zn.

En esta investigación las concentraciones de los metales antes mencionados variaron a lo largo de la transecta. El estudio reveló que para alturas mayores entre 890-1200m, se encontraron máximos valores de concentración. Para el caso de los resultados que se obtuvieron con el empleo de líquenes se encontró el siguiente rango de concentración: $4,20 \pm 0,75 \mu\text{g/g}$ hasta $760,71 \pm 7,81 \mu\text{g/g}$; y el rango de concentración obtenido mediante el empleo de *Tillandsia* estuvo entre $1,66 \pm 0,58 \mu\text{g/g}$ hasta $112,44 \pm 8,60 \mu\text{g/g}$ [49].

Gómez (2010). Determinó la concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* como bioacumulador y un muestreo de tipo activo, en 6 localidades de la ciudad de Caracas. Para los análisis de los HAP empleó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/EM) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

El autor señala que mediante el empleo de GC/EM identificó 14 de los 16 HAP, de los cuales solo 13 pudieron ser cuantificados mediante la técnica HPLC. Por otra parte, la concentración de HAP total obtenida estuvo en el rango de $6,47 \pm 3,80 \mu\text{g/g}$ a $2,30 \pm 0,49 \mu\text{g/g}$, además determinó que la emisión vehicular era una de las principales fuentes de estas concentraciones de HAP. En su investigación también realizó un perfil de bioacumulación entre dos especies de líquenes. El estudio reveló que los valores de HAP totales para la especie *Parmotrema sancti-angelii* siempre tienden a ser mayores que los de *Usnea* sp (en su ecosistema natural y al ser trasplantados). La especie *Parmotrema sancti-angelii* presenta un contenido más alto en compuestos asociados a partículas atmosféricas (con 5 y 6 anillos) que el género *Usnea* sp, en el cual predominan los compuestos formados por 3 y 4 anillos aromáticos, asociados a la fase gaseosa [50].

Fernández. et al. (2011). Realizaron biomonitorio con líquenes para el estudio de HAP en la atmósfera. Dieciséis HAP fueron estudiados en 11 localidades a lo largo del valle de Caracas (Venezuela). Dos (2) gramos de cada muestra de líquen *Pyxine Coralligera* fueron usados (realizado por triplicado) y se extrajeron con 30ml de ciclohexano – diclorometano (4:1) usando un baño de ultrasonido a temperatura ambiente durante 30min. El extracto final fue purificado por una columna de adsorción cromatográfica y los análisis químicos fueron realizados por HPLC.

Los resultados de este trabajo indican que 14 de los 16 HAP analizados fueron acumulados abundantemente en los talos de líquenes *Pyxine coralligera* Malme. Los niveles de HAP en las muestras revelaron que los HAP volátiles (naftaleno, acenaphtylene, acenaphtene, y fluoranteno) tienen los niveles más altos en la mayoría de los lugares estudiados. Las relaciones fluoranteno / pireno y fenantreno / antraceno sugieren que las principales fuentes de HAP son antropogénicas, principalmente asociadas con gasolina y diesel de combustión (pirólisis) y derivados del petróleo (petrogénico no quemados). Las concentraciones de HAP totales obtenidos en el presente estudio estuvieron en el rango de 0,24 a 9,08 $\mu\text{g} / \text{g}$, similar a los reportados por otros trabajos en ciudades de Europa y Asia [51].

En resumen, los antecedentes internacionales y nacionales mostrados, se caracterizan por tener una gran variedad de métodos para la determinación tanto de los metales pesados como de los HAP, desde los solventes empleados para la extracción de la fracción aromática hasta la técnica para el análisis de los analitos. El empleo de *Tillandsia* como biomonitor de contaminación atmosférica en nuestro país es escaso.

La tabla 5 presenta una síntesis detallada de todas las referencias antes descritas tanto nacionales como internacionales.

Tabla 5. Síntesis de las referencias nacionales e internacionales para la determinación de HAP y el empleo de *Tillandsia* como biomonitor de contaminación atmosférica

Autor País y Año	Tipo de Referencia	Tipo de Muestra	Tipo de Localidad	Especies Químicas determinadas	Técnica de Extracción	Instrumentación	Rango de Concentraciones
Tugues – Venezuela – 1976	Nacional	<i>Tillandsia</i>	Urbana	Plomo (Pb)		FAAS	
Jaffé et al – Venezuela – 1992	Nacional	Partículas atmosféricas	Urbana, rural e industrial	Pb, Cu, Ni, Zn, Fe y Cd y HAP.	Muestreador de aire de alto volumen.	FAAS	Σ HAP:149±37, 24±10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
						GC	M: 7,93 ± 0.35, 0.27 ±0.15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Gordon Catriona A et al – Venezuela – 1995	Nacional	Liquen <i>Parmotrema madagascariaceum</i>	Urbana	Pb y Zn	Digestión ácida	ICP-OES	Pb =190 $\mu\text{g}/\text{g}$
							Zn = 35-80 $\mu\text{g}/\text{g}$
Brighigna et al – Italia – 2.001	Internacional	<i>Tillandsia caput-medusae</i>	Urbana	16 HAP	CCF	GC/MS	329,79; 16.95 ng/g
Ceballos – Venezuela – 2002	Nacional	Partículas atmosféricas	Urbana	16 HAP	Muestreador de aire de alto volumen	GC/MS	74 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
							53 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
Guidotti et al. – Italia - 2003	Internacional	Liquen <i>Pseudevernia furfuracea</i>	Urbana	16 HAP	Ultrasonido	GC/MS	36 $\mu\text{g}/\text{g}$ - 375 $\mu\text{g}/\text{g}$
Requí – Venezuela – 2006	Nacional	Líquenes	Urbana	13 HAP	Ultrasonido	GC/MS HPLC	Σ HAP: 0,24-9,08 $\mu\text{g}/\text{g}$

Domeño et al. – España – 2006	Internacional	Liquen <i>Xanthoria</i> <i>Parietina</i>	Urbana	12 HAP	DSASE – Ultrasonido - Sohxlet	GC/MS	LOD:0.021-0.032 µg/g
Mendoza – Venezuela – 2008	Nacional	Partículas atmosféricas	Urbana	16 HAP	Muestrador de Aire de alto volumen	GC	Determinación cualitativa
Arguello – Venezuela – 2009	Nacional	<i>Tillandsia</i> <i>Recurvata</i>	Urbana	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn		ICP-OES	1,66±0.58 ; 460,71±7,81 µg/g
Zambrano – México – 2.009	Internacional	<i>Tillandsia</i> <i>Recurvata</i>	Industrial	15 HAP	Microondas	HPLC	143 ; 2568 ng/g
Gómez – Venezuela – 2010	Nacional	Liquen <i>Parmotrema</i> <i>sancti-angelii.</i>	Urbana	14 HAP	Ultrasonido	GC/EM - HPLC	6,47±3,80 ; 2,30±0,49 µg/g
Fernández. – Venezuela – 2011	Nacional	Liquen <i>Pyxine</i> <i>Coralligera</i>	Urbana	14 HAP	Ultrasonido	HPLC	0,24 a 9,08 µg / g

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar las metodologías de Ultrasonido y Microondas para la extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en una muestra representativa de *Tillandsia Recurvata* (L.) L. biomonitor de la contaminación atmosférica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Optimizar la metodología para la extracción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en una muestra representativa de *Tillandsia Recurvata* (L.)L mediante la técnica de extracción estática por ultrasonido.

Optimizar la metodología para la extracción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en una muestra representativa de *Tillandsia Recurvata* (L.)L mediante la técnica de extracción asistida por microondas.

Comparar la técnica de extracción estática por ultrasonido con la técnica de extracción asistida por microondas de los HAP, en *Tillandsia Recurvata* (L.)L para determinar el método más eficiente.

Determinar la concentración de los HAP en una muestra representativa de *Tillandsia Recurvata* (L). L empleando la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

5. ÁREA DE ESTUDIO

5.1 Ubicación geográfica y datos demográficos.

La ciudad de Caracas está situada en la zona centro-norte del país, a unos 15 km del Mar Caribe, localizada geográficamente a la longitud oeste de 66° 55' y latitud norte de 10° 30'. El Municipio Libertador solo lo constituye el Distrito Capital, y junto con los Municipios Baruta, Chacao, El Hatillo y Sucre, pertenecientes al estado Miranda, conforman el Distrito Metropolitano. Caracas tiene una extensión territorial de 650 km², y una población de 3.220.540 habitantes (sin incluir ciudades periféricas). Posee 1.246.910 vehículos (aproximadamente el 24% del parque automotor en circulación de Venezuela) [52].

5.2 Fuentes móviles de contaminación.

Las vías más importantes de Caracas incluyen las autopistas: del Este, Valle-Coche, Francisco Fajardo, Francisco de Miranda, Boyacá (Cota Mil), Caracas-Baruta y Caracas-La Guaira. Actualmente, no se cuenta con datos sobre mediciones de flujo vehicular en todas estas vías, sin embargo, los volúmenes de tráfico más grandes están ubicados en la autopista del Este. Otras vías de mediano tráfico, incluyen las avenidas Libertador, Sucre y Bolívar [53].

5.3 Fuentes fijas de contaminación.

Las mayores zonas industriales se localizan al Este y Suroeste del área metropolitana, en los municipios Sucre y Libertador respectivamente. Para el área del Municipio Libertador, en la transecta de estudio, se encuentran grandes cantidades de estaciones de servicio de gasolina, así como talleres mecánicos automotrices (ver figura 11) [54].

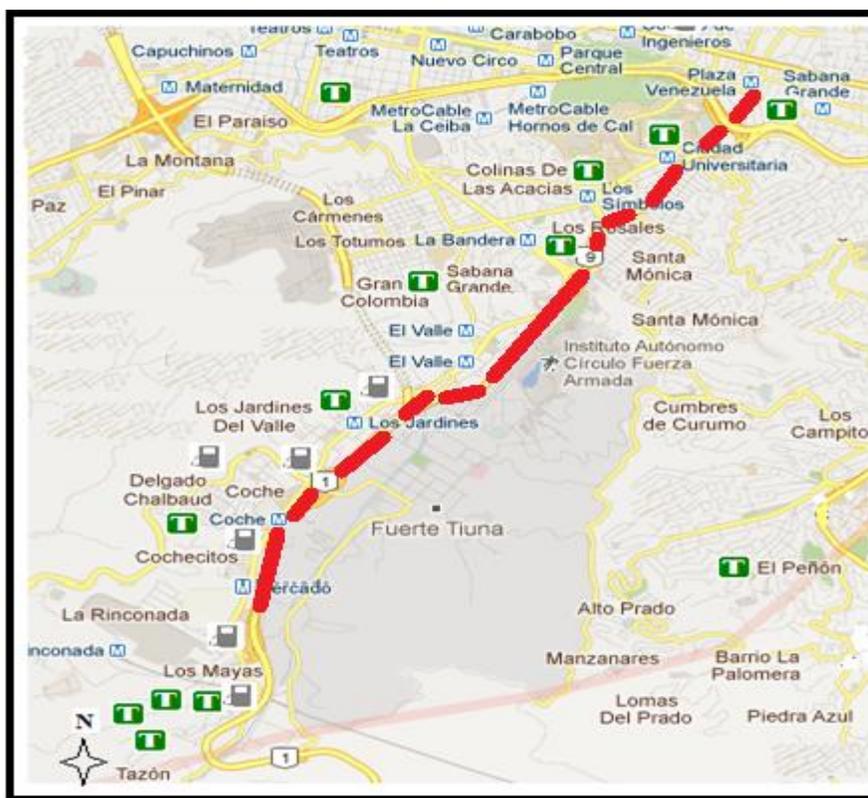


Figura 11. Mapa de la ubicación de fuentes fijas en la transecta de estudio. [54]

 Talleres Mecánicos

 Estaciones de Servicio

5.4 Condiciones climáticas.

El clima de Caracas es de tipo intertropical de montaña, con precipitaciones que varían entre los 900 y 1300 mm anuales en la ciudad, y hasta los 2000 mm en algunas partes de la Cordillera. Entre los meses de mayo a diciembre incrementan las precipitaciones, denominada época de lluvia, esta condición se ve reducida entre los meses de enero a abril, denominada época de sequía [55]. Las características del terreno hacen que el viento sea canalizado en la dirección Este. La mayor parte del tiempo las masas de aire están calmadas. En las tardes y temprano en la mañana el aire queda atrapado en la cuenca y se crea una inversión de capas [53].

Los vientos predominantes en el Parque Nacional Warairarepano (El Ávila) y la Cordillera Central son los alisios del N-E, los cuales soplan todo el año. Sin embargo, durante los meses marzo, abril y mayo los vientos alisios confluyen con los vientos que vienen del sur hacia el norte y N-O. La temperatura media anual varía conforme a la ubicación y altitud de la cordillera. La temperatura media anual en el valle de Caracas, ronda los 21 °C [53].

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

Uno de los puntos claves de esta propuesta consistió en el desarrollo de una metodología adecuada para el análisis de los HAP en las muestras de *Tillandsia recurvata* (L.)L. Los estudios realizados hasta ahora apenas contemplan la determinación de HAP en este tipo de muestras. Esto supone, una dificultad añadida porque no se dispone de una gran variedad de métodos de referencia utilizados por otros autores con los que se puedan contrastar nuestros resultados. Por otro lado, se tiene la posibilidad de innovar en un campo apenas estudiado. A la hora de plantearnos el análisis de HAP en *Tillandsia recurvata* (L.)L. se tomaron en cuenta dos aspectos muy importantes. En primer lugar, ante el elevado número de muestras requeridas para la realización del trabajo, resulta vital la disponibilidad de un método que permita procesar un número de muestras considerable en el menor tiempo posible y que a la vez sea sensible y robusto. Unido a este criterio, se sopesó la viabilidad de un método de análisis siguiendo las últimas tendencias en la disciplina analítica que se centran en la utilización de un volumen reducido de disolvente, un tiempo de operación corto y la minimización de la manipulación de la muestra, así como el máximo respeto posible hacia el medio ambiente.

El primer paso para abordar cada uno de los objetivos propuestos en este trabajo de investigación fue la elaboración de un plan que abarque un diseño basado en las siguientes etapas:



6.1 Etapa de pre-campo.

Esta etapa comprendió lo relacionado con la evaluación de la transecta de estudio desde la estación del metro Plaza Venezuela hasta la estación El Mercado que forma parte de la línea 3 del Metro de Caracas. El monitoreo escogido fue **pasivo**, es decir, se utilizan especies que están presentes en los ecosistemas a evaluar, es generalmente más rápido, simple y puede permitir la evaluación de la exposición a la contaminación a largo plazo a diferencia del monitoreo **activo** donde se introducen o trasplantan especies y son utilizadas en sistemas de exposición controlados por el hombre, representa un seguimiento de la contaminación concluido en un periodo de tiempo corto.

Cada una de las estaciones se tomaron como punto de referencia y se recorrieron de 100 a 120 metros de distancia para la búsqueda de *Tillandsia recurvata* (L.)L en árboles cercanos al punto de referencia. Una vez localizadas las muestras de la especie de 5 a 10 cm de diámetro y con flores, lo que representa la madurez de la planta, se registraron los siguientes datos: nombre de la estación del metro, número de muestra, punto de referencia, número de pasos que hay hasta la estación, ubicación en coordenadas desde la estación (Norte, Sur, Este y Oeste), coordenadas geográficas con un GPS, altura en la que se encontró el espécimen y el número de cada foto asociado a la muestra.

6.2 Etapa de campo (muestreo pasivo)

Esta etapa fue apoyada por la especialista en la familia Bromeliaceae de la Fundación Instituto Botánico de Venezuela “Dr. Tobías Lasser” Prof. Yuribia Vivas. El 25 de octubre del 2012 fueron colectados 8 especímenes maduros por cada punto de referencia, exceptuando (2) estaciones donde solo fueron recolectados 6 especímenes según las estaciones del metro de Caracas: Plaza Venezuela, Ciudad Universitaria, Los Símbolos, La Bandera, El Valle, Los Jardines, Coche y El Mercado, para la evaluación

de hidrocarburos aromáticos policíclicos, lo que correspondió a un total de 60 especímenes. Para la recolección de las muestras de *Tillandsia recurvata* (L). L se utilizaron guantes de látex, lentes de seguridad y una descopadora de 3 metros y medio con la cual se facilitó la toma de los especímenes ya que estos fueron recolectados a una altura de 3 a 5 metros (figura 12), basados en estudios previos con líquenes[51].

Los especímenes fueron envueltos en papel de aluminio (para evitar la fotólisis de los HAP) [56], y colocados en bolsas de papel para evitar su contaminación [57]. Las muestras fueron identificadas con un número y acompañadas de sus respectivos datos de campo: localidad, hábitat, sustrato (por ejemplo; corteza de árbol con su nombre científico, si es posible), altitud, fecha de colección y nombre del colector, colocados en bolsas herméticas, y mantenidos a bajas temperaturas, con el objeto de evitar al máximo la pérdida de los HAP más volátiles [58].



Figura 12. Etapa de campo, recolección de especímenes.

(Fotografías tomadas por Juan Ibedaca)

La Figura. 13. Indica el esquema de muestreo empleado.

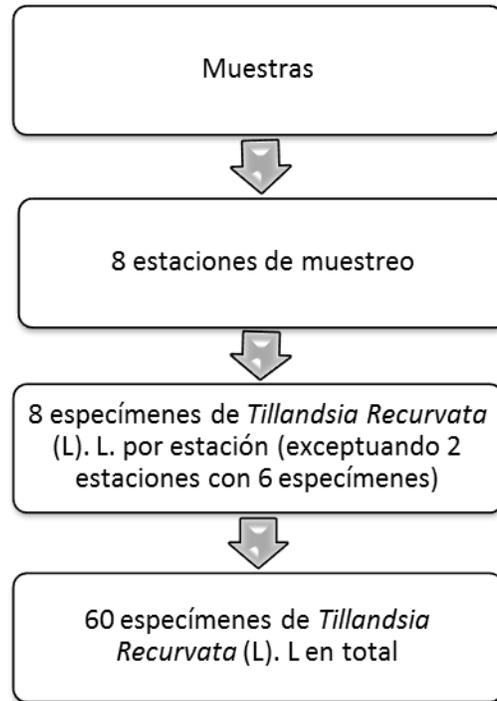


Figura 13. Esquema de recolección de muestra

6.3 Etapa de laboratorio

Esta sección describirá todo el procedimiento experimental desarrollado para el trabajo de laboratorio.

6.4 OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN.

El principal objetivo planteado en este trabajo fue la optimización de la extracción de los HAP de una **muestra representativa** de *Tillandsia Recurvata* (L). L, mediante la homogeneización de las 60 muestras recolectadas en una sola y el empleo de las técnicas de extracción asistida por microondas y extracción estática asistida por ultrasonidos, seleccionando la mejor de ambas para el estudio de HAP en *Tillandsia Recurvata* (L). L por GC-MS. Es importante mencionar que la bibliografía apenas contempla la determinación de HAP en este espécimen, y por ende mediante dichas técnicas. La elección de dichas técnicas se realiza tomando en cuenta las ventajas que estas ofrecen en términos de tiempo y volumen de solvente empleado.

Son varios los factores que influyen en la extracción de los HAP mediante dichas técnicas; este estudio evaluó algunas variables como: el tipo de solvente empleado, volumen de solvente, el tiempo y la temperatura. Dichas variables son esenciales para lograr un óptimo método de extracción. Este estudio evaluó a través de un diseño 2^k el efecto de las variables como, tipo de solvente (diclorometano y hexano – diclorometano (4:1), volumen de solvente, tiempo de extracción y temperatura de extracción sobre la concentración de cada HAP, así como también los porcentajes de recuperación para cada uno de ellos. De acuerdo a las tablas 6 y 7 se pueden observar los factores y niveles estudiados para cada sistema de extracción.

Factores	Nivel -	Nivel +
A: Tipo de Solvente	Hexano : Diclorometano (4:1)	Diclorometano
B: Volumen (mL)	15	30
C: Tiempo (min)	15	30
D: Temperatura (°C)	100	115

**Temperatura de 115°C basado en Método USEPA 3546*

**Temperatura 100°C [59]*

Tabla 6. Factores y niveles considerados para el diseño experimental de la metodología de extracción asistida por microondas.

Factores	Nivel -	Nivel +
A: Tipo de Solvente	Hexano : Diclorometano (4:1)	Diclorometano
B: Volumen (mL)	15	30
C: Tiempo (min)	15	30
D: Temperatura (°C)	20	40

Tabla 7. Factores y niveles considerados para el diseño experimental de la metodología de extracción asistida por ultrasonido.

En base a la información de las tablas anteriores se plantea todas las posibles combinaciones experimentales, lo cual da lugar a 16 condiciones distintas con una réplica por cada experimento; esto da lugar a 32 experiencias por cada método de extracción usado, es decir, un total de 64 experimentos, cuyo diseño experimental se muestra detalladamente en la tabla 8.

Experimento	A	B	C	D
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Tabla 8: *Diseño experimental empleado para optimizar las condiciones experimentales en el equipo de radiación microondas y para el equipo de ultrasonido.*

6.4.1 Equipos, materiales y reactivos

A continuación se detalla la relación de equipos y materiales que se emplearon tanto en los dos métodos de extracción utilizados como el proceso de purificación y el análisis de los HAP empleando cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS):

Para el pesado y secado de la muestra se utilizaron:

- Balanza Analítica *AND A&D Weighing* serie GR-200 máx. 210g min. 10mg e=1mg d=0,1mg.
- Estufa Cole-Parmer® Model 05015-58 *Laboratory Oven* 120V -1.600W 1 phase 50/60Hz. Vernon Hills, Illinois. 60061. USA.

Para la extracción estática asistida por ultrasonido se utilizaron:

- Tubos de ensayo de vidrio con capacidad para 50mL.
- Cole-Parmer® *Stainless Steel Ultrasonic Cleaner with Heater and Mechanical Timer*, 3/4 gal, 220 VAC EW-08895-08. 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061 USA.
- Soporte universal con abrazadera para colocación de tubos de ensayo.
- Rotaevaporador Büchi N° 311670 *Glass apparatus fabrik Flawil* (Volts = 110, Watts = 1.200) Hecho en Suiza.

Para la extracción asistida por microondas se utilizaron:

- CEM® *Mars 5 Microwave Accelerated Reaction System*. International Equipment Trading Ltd 960 Woodlands Parkway Vernon Hills, Illinois 60061 USA.
- Montaje de envase control (*HP-Greenchem Glass Control Vessel Assembly* N° parte: 431762).

- Termoposo con punta de safiro 326280.
- Sensores de Temperatura y Presión.
- Envases de reacción (HP-Greenchem Plus Glass Vessel Assembly 431761).
- Rotavapor Büchi N° 311670 Glass apparatus fabrik Flawil (Volts = 110, Watts = 1.200). Hecho en Suiza.

Para la purificación de los HAP se utilizaron:

- Minicolumnas de vidrio para cromatografía de 25 cm de longitud y 1 cm de diámetro.
- Silica gel 60 *for column chromatography* (0,06-0,2)mm 50 micrones ASTM.

Para el análisis de los HAP se utilizaron:

- Cromatógrafo de gases modelo 6890N con automuestreador 7683B ALS Agilent Technologies Inc. 2850 Centerville Road. Wilmington, DE. 19808-1610 USA, con detector de masas Agilent 5975.
- Columna capilar HP5-MS (5% fenil – 95% metilpolisiloxano - 60 m x 0,250 mm x 0,25 µm).
- Sistema de adquisición de datos ChemStation (Agilent Technologies).

Los reactivos, disolventes y otros materiales necesarios:

- *Estándar Mix 16 Priority PAH*, EPA method 610, Cocktail 2: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, dibenzofurano, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno. Chiron AS, Stiklestadvn. 1 N-7041 Trondheim. Norway.
- *Estándar Mix Multivariado 16 Priority PAH*, NIST 1647e.

- Hexano grado HPLC, ACS, Espectrofotometría Burdick & Jackson AH212. Suministrado por DIDACTA. C.A
- Diclorometano p.a. SIGMA-ALDRICH 32222. Suministrado por DIDACTA. C.A.
- Agua destilada, obtenida a partir de un sistema de purificación *Milli-Q. Gradient, Millipore.*
- Lana de vidrio silanizada (Supelco, USA).
- Papel Filtro Cualitativo No 2 Ø: 12.5 cm caja x 100 ADVANTEC equiv. a *WHATMAN* N° 1.
- Papel parafinado para evitar pérdidas de solvente en microondas *Parafilm Pechiney Plastic Packaging. Laboratory film. 4in x 125 ft Roll.*
- Papel parafinado para muestra *Weighing Paper* 09.898-12A 3x3" 500 sheets. Fisher Scientific Co.
- Lámpara de radiación UV.
- Viales de 5mL de capacidad *WHEATON*[®] 1501 North 10th Street Millville, NJ 08332 USA.

6.4.2 Lavado del material de vidrio

El material de vidrio se dejó en remojo en un detergente de uso común y se enjuagó con agua, posteriormente se curó 2 veces con agua destilada y se dejó secar al aire libre.

Para el caso del material de vidrio donde se tratan los extractos orgánicos, estos se remojaron en potasa alcohólica de 10-15 min, se enjuagaron con agua destilada y finalmente se dejaron secar al aire libre.

Los viales de 5 y 1,5 mL a emplear para pesar las fracciones y la inyección de las muestras, se lavaron con diclorometano, seguido de agua y jabón, y finalmente se curaron con el solvente donde se trata la muestra y se secaron en la estufa a 40 °C por 1 h.



Fig. 14. *Viales limpios y secos (Fotografía tomada por Juan Ibedaca)*

6.4.3 Preparación de la muestra

Una vez en el laboratorio, los especímenes fueron separados de las ramas (sustrato) y limpiados de todo tipo de residuo o materiales que pudieran haber quedado adheridos (restos de corteza de árbol, insectos y restos de otro tipo de partículas).

Luego se pulverizaron utilizando nitrógeno líquido en un mortero de ágata dentro de la campana con la ayuda de un recipiente para nitrógeno líquido (Dewar) hasta que se obtuvo un polvo homogéneo, posteriormente el material se colocó en la estufa a 70°C durante dos horas, para retirar la humedad de las muestras.



Figura 15. Pulverización del espécimen

Posteriormente pulverizadas cada una de las muestras recolectadas se homogeneizaron uniformemente para formar una muestra representativa del espécimen.



Figura 16. Homogeneización de los especímenes



Figura 17. Muestra única representativa del espécimen.

6.4.4 Validación de la metodología

Como ya se comentó anteriormente, debido a que los HAP apenas han sido determinados en muestras de *Tillandsia Recurvata* (L). L, también conocida comúnmente como “Clavel del Aire” o “Bola de Musgo” aún no existe material de referencia certificado para este tipo de muestra, por lo tanto tuvo que recurrirse a un diseño experimental que permita evaluar la recuperación de los HAP bajo diversas condiciones experimentales de acuerdo a las variables en estudio; para optimizar los métodos de extracción y una vez obtenido el método óptimo se agregó un *spike* (*rociado de muestra*) con un Estándar Mix a la muestra a fin de evaluar la recuperación de los HAP.

6.5 METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN

6.5.1 Extracción Estática por Ultrasonido

Este método consiste en la obtención del extracto orgánico de la muestra bajo la acción de ultrasonidos.

Aproximadamente 2g de muestra pulverizada fue pesada en una balanza analítica y se vertió en un tubo de ensayo de capacidad de 50mL previamente limpio y curado con el solvente a tratar la muestra. Se sujetó el tubo de ensayo a una agarradera colocada en un soporte universal o por medio del uso de una rejilla metálica con el fin de mantener el tubo firme y en posición vertical una vez sumergido en el baño de ultrasonido. (Ver apéndice 11.13). Se agregó un volumen de solvente de acuerdo al diseño experimental (**VER TABLA 7**) en contacto directo con la muestra. Se colocó una tapa diseñada especialmente para este tubo, y se ajustó a las condiciones de extracción según el diseño experimental (**VER TABLA 8**). El extracto fue filtrado empleando un embudo de tallo largo con papel de filtro tipo *Advantec* N° 2 y fiola receptora de 50 mL. Una vez filtrado, el extracto fue llevado a un rotavapor con una temperatura del baño de agua menor a la temperatura de ebullición del solvente usado y con una velocidad de rotación baja, con el fin de evaporar la mayor cantidad de solvente en un tiempo prudencial hasta llevarlo a mínimo volumen y evitar la pérdida de los analitos.

Luego el extracto es trasvasado a un balón aforado de 2 mL, este se llevó a un volumen de enrase de 2mL con el solvente usado para la extracción. Finalmente se colocó en un vial Wheaton® de capacidad de 5mL debidamente acondicionado para la protección de la incidencia de luz y se guardó en un refrigerador a baja temperatura. Este procedimiento se repitió para las diferentes muestras evaluadas según el diseño experimental de la tabla 7.



Figura 18. Baño de Ultrasonido

6.5.2 Extracción Asistida por Microondas

Este método consiste en irradiar la muestra bajo la acción de ondas microondas. Este tipo de radiación permite el calentamiento selectivo de la muestra según el disolvente utilizado.

Aproximadamente 2g de muestra pulverizada fue pesada en una balanza analítica, se transvasó al envase de reacción y se agregó un volumen de solvente de acuerdo al diseño experimental (**VER TABLA 6**) y se colocó la junta con tapa, se dejó en reposo 3 min para una previa extracción de la muestra en contacto directo con el solvente.

Una vez realizado esto, el envase de reacción fue colocado con los implementos necesarios en el equipo de microondas MARS 5. (Ver apéndice 11.12)

Posteriormente el equipo microondas fue programado para extracción de acuerdo a las condiciones que siguen:

Etapa (N°)	Potencia Nivel (W)	Rampa de calentamiento t(min)	Presión (Psi)	Tipo de envase para extracción	Tiempo de Enfriamiento (Cool-down) (min)
1	400	10:00	200	GreenChem	5:00

Tabla. 9 Condiciones Microondas CEM MARS 5

Las condiciones adicionales (variables en estudio) como tipo de solvente, volumen, tiempo y temperatura se colocaron de acuerdo al diseño experimental 2⁴ (**VER TABLA 8**).

Una vez terminado el proceso de extracción, se permitió la etapa de enfriamiento automático (cool-down) por 5 min y se extrajeron los envases del equipo microondas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocó papel parafinado en las tapas de los envases para evitar pérdidas por evaporación no controlada. El extracto fue filtrado empleando embudo de tallo largo con papel de filtro tipo *Advantec* N° 2 y fiola receptora de 50 mL. Una vez filtrado, el extracto se llevó a un rotavapor a una temperatura del baño de agua menor a la temperatura de ebullición del solvente usado y con una velocidad de rotación baja, con el fin de evaporar la mayor cantidad de solvente en un tiempo prudencial hasta llevarlo a mínimo volumen y evitar la pérdida de los analitos.

Luego el extracto se trasvasó a un balón aforado de 2mL, este se llevó a un volumen de enrase de 2mL con el solvente usado para la extracción y finalmente se colocó en un vial Wheaton® de capacidad de 5mL debidamente acondicionado para la protección de la incidencia de luz y se guardó en un refrigerador a baja temperatura.

Figura 19. Microondas MARS 5 CEM

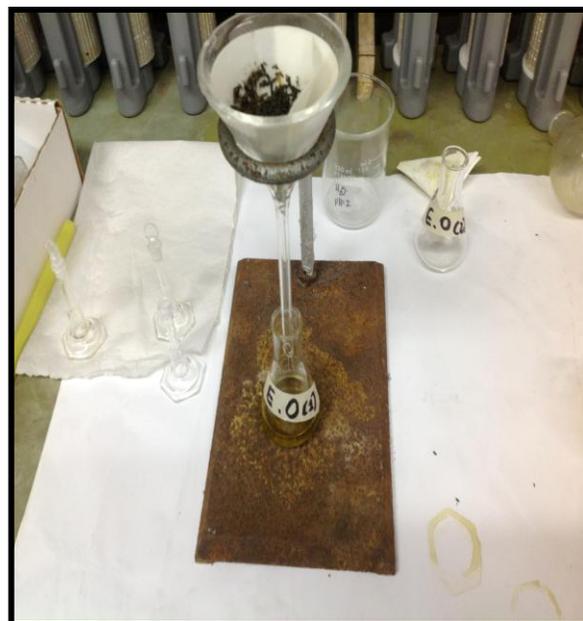


Figura 20. Proceso de Filtrado



Figura 21. Proceso de Rotavaporación

6.6 Separación de la fracción aromática (purificación)

La limpieza del extracto orgánico del espécimen se realizó en una minicolumna de vidrio rellena de una suspensión de sílica gel (*slurry*) (activada a 130 °C durante 16 horas) [60] y hexano (empacado de 14 cm de longitud). En la parte inferior de la columna se agregó lana de vidrio, para evitar el paso de la suspensión por la llave. Previo al empacado de la columna, la misma se curó 3 veces con 10 mL de hexano, lo cual también permite verificar la ausencia de fugas. Para el empacado de la columna deben emplearse pipetas Pasteur en la transferencia de la suspensión, y a medida que se agrega, se le dieron golpes leves a la columna para impedir la formación de burbujas. Posterior al empacado de la columna se añadieron 2 mL del extracto, reconstituidos en su respectivo solvente de origen. La elución se inició con 20 mL de hexano para separar los compuestos saturados. Los analitos fueron eluidos de la columna con 40 mL de mezcla diclorometano: hexano (3:1 v/v) para obtener la fracción de los compuestos aromáticos seguidos mediante una lámpara de UV, como los HAP poseen la propiedad de fluorecer se pudo ver claramente su elución [61]. Dicho eluato se recolectó en fioles de 50 mL de capacidad y se llevó a mínimo volumen mediante rotavapor.

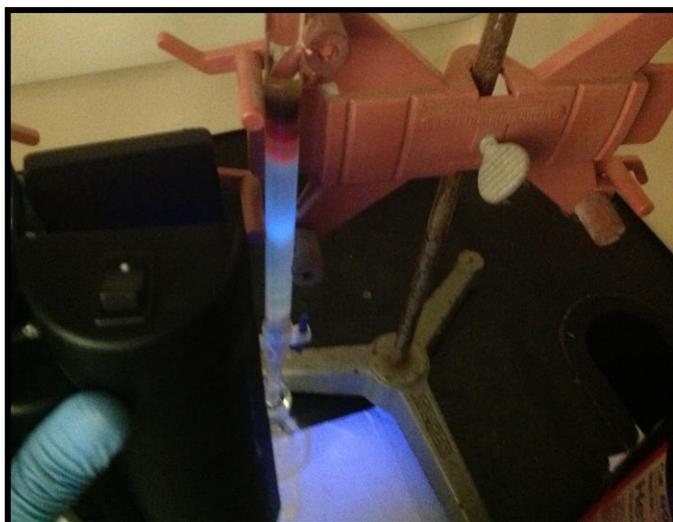


Figura 22. Elución de los HAP

En la aplicación de los tres procedimientos, todo el trabajo experimental se desarrolló bajo un exhaustivo **control gravimétrico**.

6.7 Análisis Instrumental

Las fracciones aromáticas se transfirieron a los viales de 1,5 mL dispuestos para el análisis, estas se analizaron mediante cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas descrito en el apéndice 11.11. El análisis se llevó a cabo con una columna HP-5ms (ver apéndice 11.14) a un flujo constante de 1 mL/min de Helio. La temperatura inicial de la columna debe ser de 120 °C durante 3,00 min, seguido de una tasa de calentamiento de 15,00 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 180 °C, en la cual debe estar por 8,00 min, luego a razón de 15 °C/min hasta 200 °C por 5,00 min, para continuar con un tasa de 6,00 °C/min hasta llegar a 265 °C por 5,00 min, para finalmente aumentar la temperatura a una tasa de 2,00 °C/min hasta alcanzar los 310 °C, temperatura a la cual se mantiene por 5,00 min, para un total de 64,67 min de duración.

La rampa de temperaturas utilizada para separar los analitos se muestra en la Figura 23:

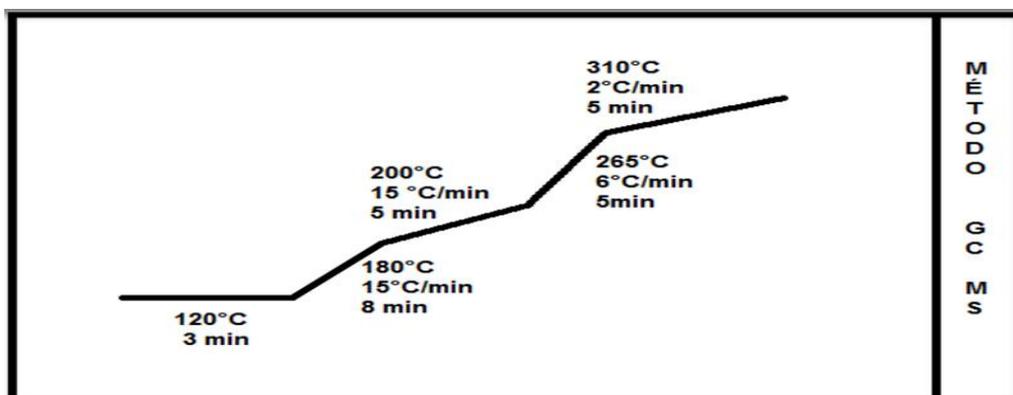


Figura 23. Rampa de temperaturas utilizada para la separación de los HAP en el análisis por cromatografía gas

La interfase entre ambos instrumentos se mantuvo a una temperatura de 280 °C y el cuadrupolo y la fuente de ionización del espectrómetro de masas a 150 °C y 230°C respectivamente. La ionización se lleva a cabo por impacto electrónico (EI).

La identificación y cuantificación de los analitos se realizó en modo SIM (selected ion monitoring) empleando las masas características de cada uno de los compuestos que se muestra en la tabla del apéndice 11.14a. La identificación de los analitos se realiza en base a la relación de masas entre el primer ión (ión cuantificador) y el segundo (ión cualificador), mientras que la cuantificación se lleva a cabo con base en el primer ión.

6.8 Mezcla estándar y tratamiento

La preparación de los patrones fue hecha a partir de la mezcla estándar (Estándar Mix) conformada por los 16 HAP de concentraciones variables, como se muestra en el apéndice 11.4, en acetonitrilo (NIST 1647e) [62]. De dicha solución original se realizó una solución madre y luego se realizaron distintas diluciones pesadas, en un rango de 0,002ppm a 1,34ppm en base al HAP de menor concentración (Antraceno), para realizar la curva de calibración de los compuestos determinados en cada ensayo experimental.

6.9 Estudio de recuperación

Para el estudio de recuperación se empleó una solución de los 16 HAP (Estándar Mix) 16 Priority PAH, EPA method 610, Cocktail 2. Producto N° S-4064-10-5CY [63]. El análisis de recuperación fue realizado agregando 0,5mL de la solución de 10µg/mL de los 16 HAP (*Standard Mix*) a alícuotas de bromeliácea de aproximadamente 2g. De este modo la concentración resultante de cada HAP en la muestra fue de aproximadamente 2,5µg/g, a partir de este estándar se realizó una curva de calibración con concentraciones de 4,82; 2,83; 0,93; y 0,19 µg/mL.

En dicha etapa fueron utilizadas 3 alícuotas de bromeliácea enriquecidas y 2 sin enriquecer, empleada como blancos, se dejaron reposar por 48 horas en ausencia de luz y se le aplicó todo el procedimiento experimental descrito anteriormente.

Es importante destacar que este procedimiento se realiza una vez alcanzadas las condiciones óptimas de las metodologías de extracción por medio de los resultados obtenidos en el análisis instrumental y en el tratamiento estadístico de los datos.

6.10 Análisis estadístico de datos

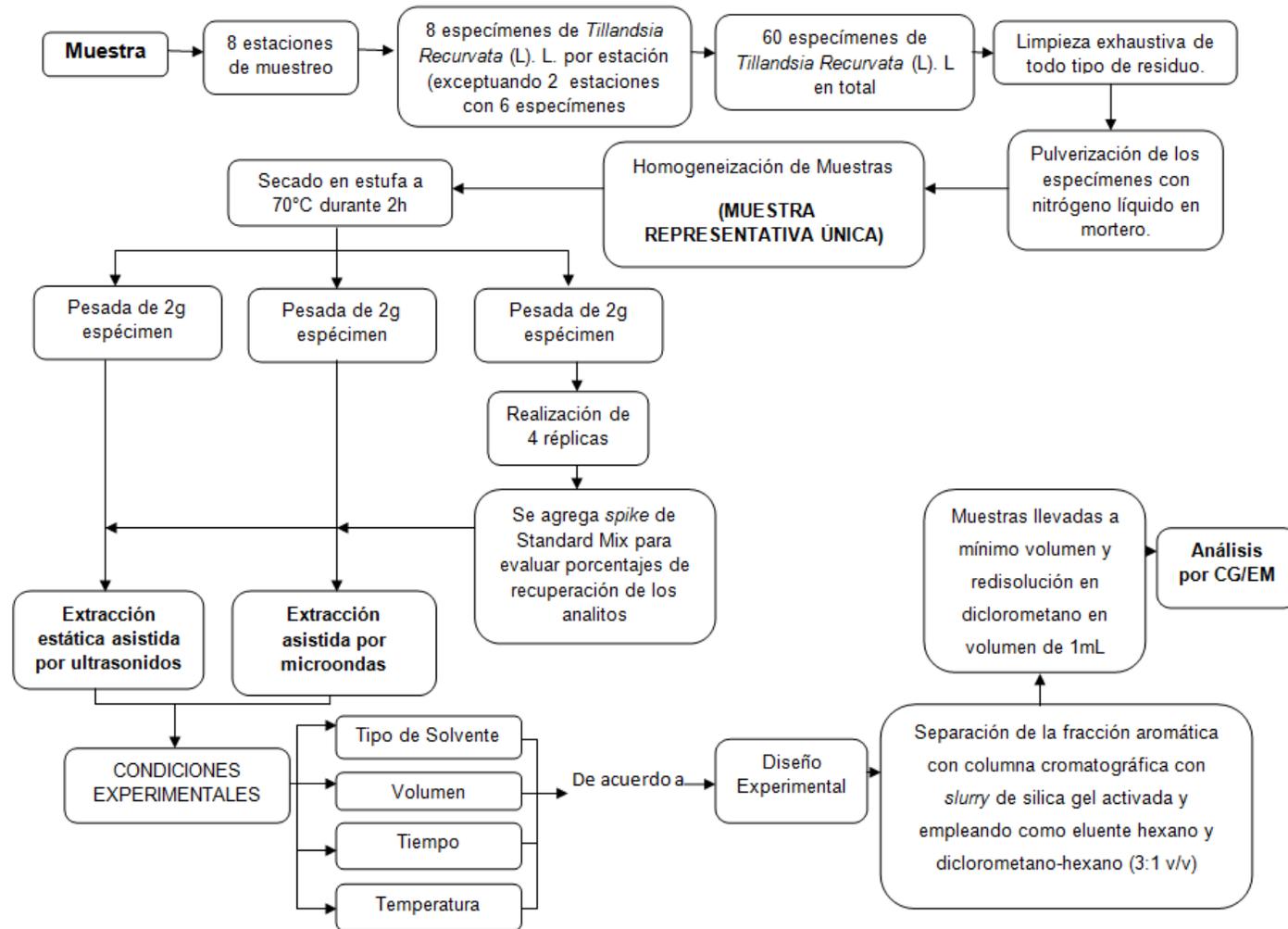
Los estadísticos han desarrollado métodos que permiten obtener, analizar e interpretar datos que proceden de observaciones sistemáticas, con el fin de conocer el efecto de los factores que intervienen en un fenómeno bajo estudio.

6.10.1 Diseño factorial 2^k

Es de particular utilidad en las etapas iniciales del trabajo experimental, cuando probablemente se estén investigando muchos factores. Proporciona el menor número de corridas con las que puede estudiarse k factores en un diseño factorial completo. Debido a que solo hay dos niveles para cada factor, debe suponerse que la respuesta es aproximadamente lineal en el rango escogido para los niveles de los factores [37]. En este trabajo se aplicara un diseño 2^4 el cual genera 16 experimentos + réplica de cada uno de ellos, que permitirán determinar el efecto de las variables estudiadas y sus interacciones sobre la recuperación de los HAP.

La figura 24 presenta de manera esquemática y resumida la metodología experimental para la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

Figura 24. Esquema experimental



7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Optimización de las condiciones de separación

Las condiciones de separación de los 16 HAP se optimizaron tomando en cuenta los parámetros instrumentales descritos en la sección 6.7 (análisis instrumental). En la figura 25 se muestra un cromatograma característico del orden de elución de los diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos evaluados, correspondiente a un patrón de 0,19 μ g/mL de la mezcla estándar de 10 μ g/mL [63].

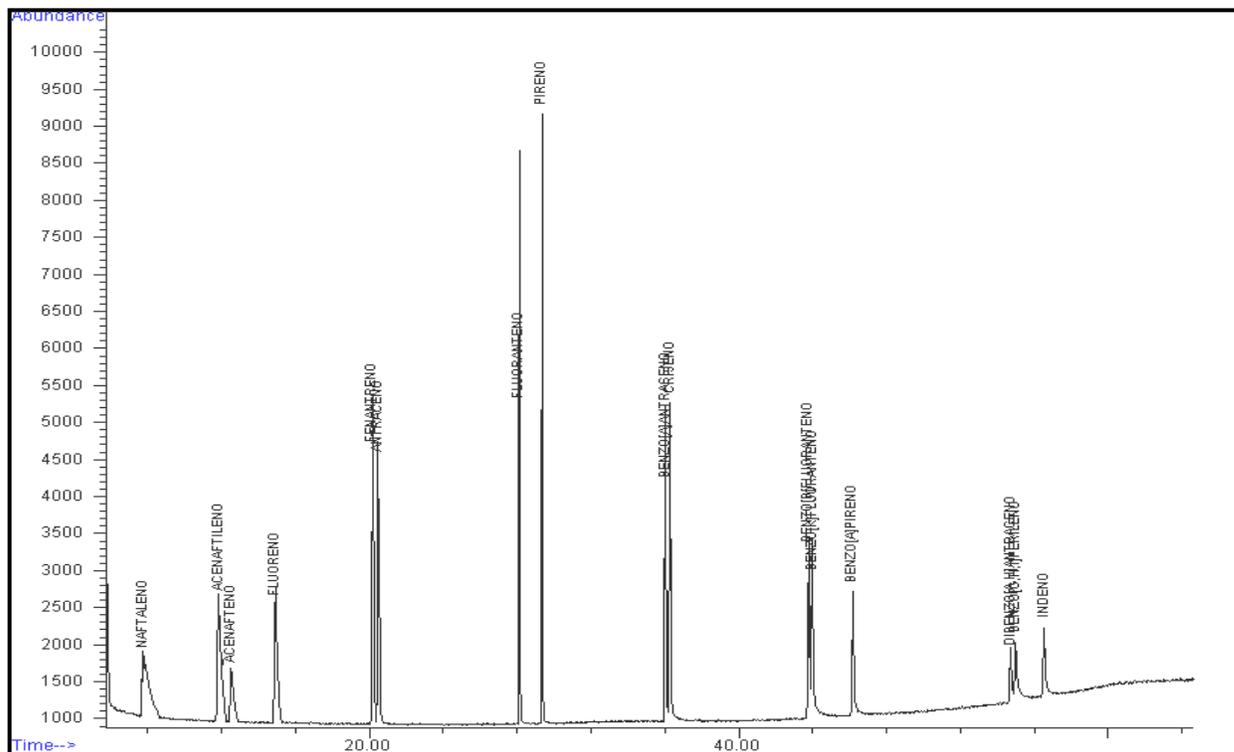


Figura 25. Orden de elución de los analitos en estudio – Patrón de 0,19 μ g/mL de Mezcla Estándar correspondiente al estudio de recuperación [63].

Puede observarse que todos los componentes se separan bajo las condiciones de cromatográficas establecidas, la tabla 10 muestra los tiempos de retención promedio a los cuales eluyen los mismos.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)
Naftaleno (NAF)	7,911
Acenaftileno (ACI)	11,88
Acenafteno (ACE)	12,59
Fluoreno (FLU)	14,99
Fenantreno (FEN)	20,25
Antraceno (ANT)	20,55
Fluoranteno (FLT)	28,15
Pireno (PIR)	29,37
Benzo[a]antraceno (BaA)	36,07
Criseno (CRI)	36,35
Benzo[b]fluoranteno (BbF)	43,86
Benzo[k]fluoranteno (BkF)	44,03
Benzo[a]pireno (BaP)	46,23
Dibenzo [a,h]antraceno (DahA)	54,79
Benzo [g,h,i]perileno (BghiP)	55,06
Indeno[1,2,3-cd]pireno (IcdP)	56,58

Tabla 10. *Tiempos de retención HAP en estudio.*

Los resultados encontrados correspondientes a las concentraciones de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) para cada uno de los ensayos experimentales realizados se indican en el Apéndice 11.1 y 11.2. Es importante destacar que las concentraciones obtenidas corresponden a cada ensayo experimental más su réplica; siguen el diseño experimental 2^4 planteado en la tabla 8. Los niveles y factores considerados en este diseño, pueden observarse en las Tablas 6 y 7.

También se optimizaron las condiciones experimentales obtenidas de acuerdo al diseño factorial para cada técnica de extracción y se analizaron los resultados, así como también una comparación de las metodologías de extracción.

7.1 Análisis del diseño factorial para evaluar condiciones óptimas de la extracción asistida por microondas para HAP según diseño experimental.

Para llevar a cabo la evaluación del diseño experimental 2^4 , se empleó el software estadístico Statgraphics ® versión 16.2 Statpoint technologies inc. Statgraphics ® versión 16.2 32bits, [programa de computadora], requerimientos del sistema Pentium IV 500MHZ o superior; 2 GB RAM [64]. Los resultados de las concentraciones arrojadas aplicando este diseño son mostrados en el apéndice 11.1. En el apéndice 11.10 se muestran las tablas con las propiedades de los hidrocarburos aromáticos policíclicos correspondientes a bajo, medianos y alto peso molecular.

En la Figura 26 se muestra el diagrama de Pareto obtenido con las concentraciones de Naftaleno. El diagrama de Pareto presenta cada uno de los factores estudiados, las barras que representan los factores correspondientes a una magnitud cualquiera están ordenados de mayor a menor (en orden descendente) y de izquierda a derecha, diagramas de Pareto fueron estandarizados, esto quiere decir que, cada efecto es transformado a un estadístico-t dividiéndolo entre su error estándar. Esta estandarización de efectos son graficados en orden decreciente de la magnitud absoluta.

En adición, una línea es dibujada sobre el gráfico para determinar si un efecto es estadísticamente significativo en un nivel de significancia especificado del 5%, además con un efecto de orden máximo, puesto en 2 para pedir ajuste de tanto efectos principales como de interacciones entre dos factores. Si se especifica como 1, solo se estimarán los efectos principales.

El nivel de significancia se determinó para cada efecto, haciendo uso de Tablas de análisis de la varianza, por sus siglas en inglés *ANOVA* (ver apéndice 11.3). Este particiona la varianza de la respuesta en diversos componentes: uno para cada efecto principal, uno para cada interacción, y uno para el error experimental. Hay cinco efectos en la tabla del ANOVA con valores *p* debajo de 0,05. Estos son los mismos cinco efectos identificados como significativos sobre el gráfico de Pareto estandarizado. En su totalidad, el modelo considera al menos un 98% de la variabilidad observada en la respuesta.

7.1.1 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas para los HAP de bajo peso molecular.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Naftaleno

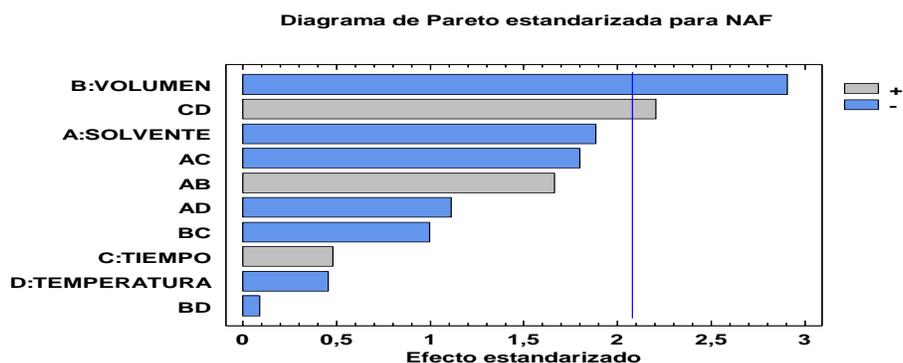


Figura 26. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Naftaleno

El diagrama de Pareto obtenido señala cuales de las variables estudiadas tienen una incidencia significativa sobre la respuesta. Para las concentraciones de naftaleno obtenidas, en el Apéndice 11.1 este gráfico exhibe un efecto marcado para uno de los factores en estudio, en este caso el volumen, con una tendencia negativa marcada, el signo negativo indica que la mayor respuesta se obtiene a menores volúmenes de extracción, en este caso 15mL.

Por otro lado aunque las variables tiempo y temperatura no son significativas, la interacción de las mismas si lo son, dando lugar a una interacción cuadrática con tendencia positiva. El efecto cuadrático causa la estimación de la superficie de respuesta al exhibir la curvatura, la cual puede parecerse a una colina, un valle o una cresta. Es posible establecer que valores deben tomar las variables que interactúan para que den lugar a una mayor respuesta, para ello se construye un diagrama de interacción [65] como se muestra en la figura 27:

Diagrama CD

Factor C		
+		
-	199,8 ng/g	442,5 ng/g
	438,9 ng/g	69,90 ng/g
	-	
		+ Factor D

Figura 27. Diagrama de interacción tiempo – temperatura para el hidrocarburo aromático policíclico naftaleno

El diagrama anterior indica los valores promedios de respuesta (concentración) de acuerdo a las interacciones mostradas. El diagrama CD muestra la interacción de estos dos factores el valor que se muestra en el primer cuadrante (442,5 ng/g) corresponde al valor promedio de concentraciones de naftaleno en ng/g para los experimentos cuyos niveles sean C+ y D+ (tiempo de extracción: 30 minutos, temperatura 115°C) la tabla 8 muestra que los experimentos en los que las variables ocupan esos valores son los números: 13,14,15 y 16 y sus réplicas. Los resultados obtenidos para el resto de los cuadrantes son calculados de la misma manera considerando siempre los niveles involucrados para cada factor.

Aunque este compuesto se extrajo a temperaturas superiores, se debe recordar que la técnica de extracción por microondas al trabajar en un sistema presurizado baja los puntos de ebullición de los solventes y por ende los analitos en estudio [34] pero también se observa en las concentraciones obtenidas una abundancia especial de este compuesto, donde se puede atribuir a la capacidad de bioacumulación de la matriz en estudio para este compuesto, este comportamiento será explicado más adelante.

La figura 28 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta.

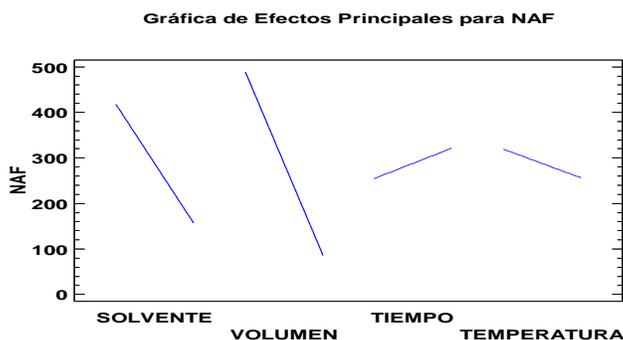


Figura 28. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Naftaleno.

Mientras mayor sea la pendiente correspondiente a una variable en particular mayor es su efecto sobre la respuesta del sistema. Se observa el marcado nivel de significancia que exhibe el volumen, ya que su pendiente es más pronunciada, las variables tiempo y temperatura no son significativas porque sus pendientes son menos pronunciadas.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas para Acenaftileno.

A continuación se presenta en la Figura 29 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Acenaftileno (ACI).

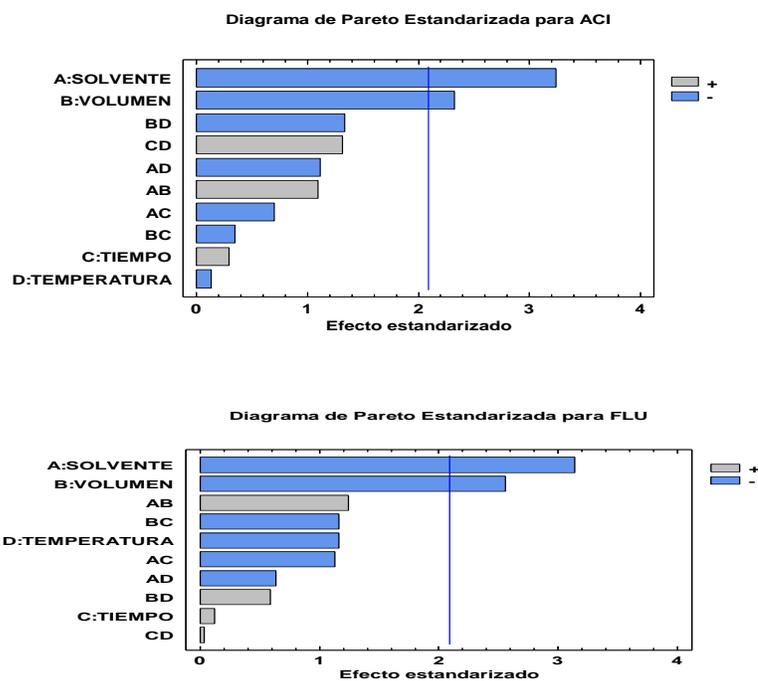


Figura 29. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Acenaftileno y Fluoreno.

El Acenaftileno y Fluoreno (FLU) presentan un mismo comportamiento dentro del grupo de los HAP de bajo peso molecular. El diagrama de Pareto anterior indica los efectos significativos de acuerdo a los factores estudiados, como se puede observar los factores que afectan son A- y B- (A- = solvente (hexano:diclorometano (4:1)) y B- = Volumen (15mL), donde se evidencia un mayor efecto del factor A-, es decir, una clara evidencia de la interacción de la mezcla de solventes con respecto a la identificación y cuantificación del analito.

La figura 30 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta.

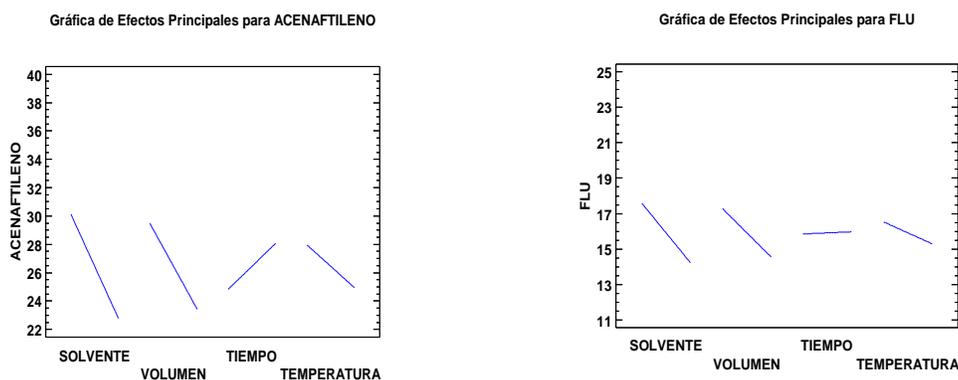


Figura 30. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Acenaftileno y Fluoreno.

Como se evidenció en el diagrama de Pareto, se muestra una tendencia negativa de los factores solvente, volumen y temperatura para los analitos acenaftileno y fluoreno, y para el tiempo positiva, aunque solo son significativas el solvente y el volumen.

El hidrocarburo aromático policíclico acenafteno (ACE) no fue determinado en la mayoría de los experimentos como se observa en el apéndice 11.1. Sólo se detectó para los experimentos 1, 7, 11 y 14, al observar el diseño experimental este difiere en las condiciones.

Bajo el criterio de su ausencia en la mayoría de los casos existe la posibilidad de que como la diferencia entre el tiempo de retención entre acenafteno y acenaftileno es pequeña, puede que en la resolución de los picos hayan salidos conjugados y el detector MS no pudo diferenciarlos.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Fenantreno.

A continuación se presenta en la Figura 31 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Fenantreno (FEN):

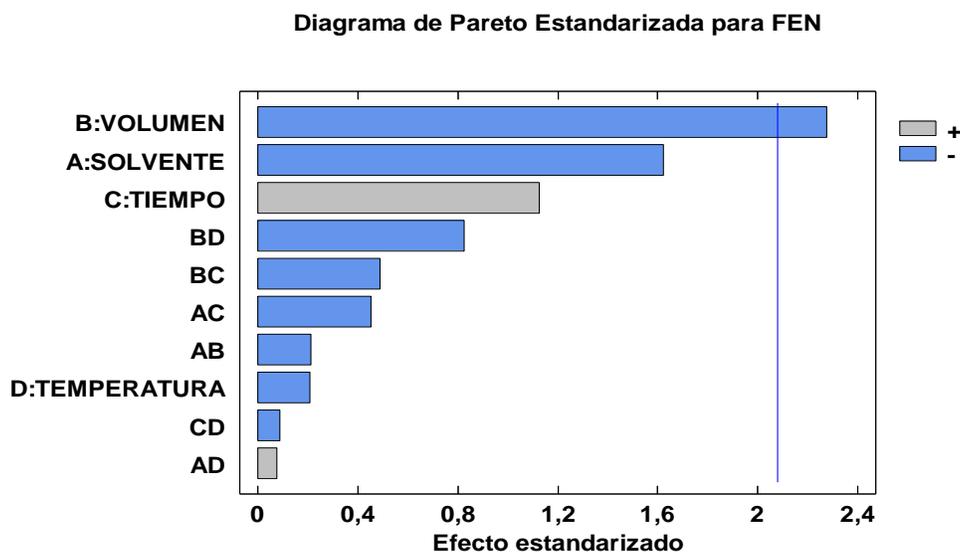


Figura 31. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Fenantreno.

Para las concentraciones de Fenantreno obtenidas, reportadas en el Apéndice 11.1 este diagrama exhibe un efecto marcado para uno de los factores en estudio, en este caso el volumen, con una tendencia negativa marcada, el signo negativo indica que la mayor respuesta se obtiene a menores volúmenes de extracción, en este caso 15mL.

La figura 32 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta

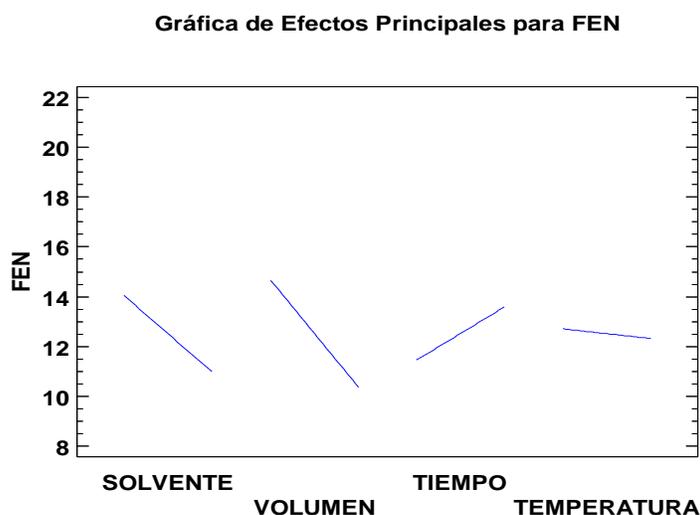


Figura 32. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Fenantreno.

Como se evidencia en la gráfica de efectos principales para el fenantreno, existe una tendencia con pendiente negativa para cuando el volumen es menor, es decir, 15mL. No se puede omitir la tendencia negativa del factor solvente no significativa para el diagrama de Pareto, pero que muestra una pendiente pronunciada para el caso cuando se hace uso de mezcla de solventes (hexano: diclorometano (4:1)), sugiere una vez más la afinidad por el solvente.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Antraceno.

A continuación se presenta en la Figura 33 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Antraceno (ANT):

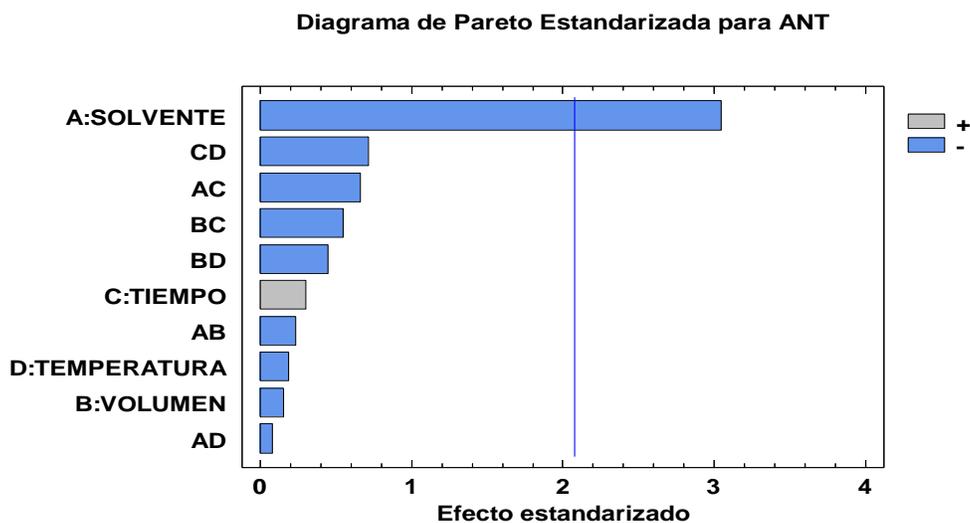


Figura 33. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Antraceno.

En el diagrama de Pareto se puede ver los efectos significativos de acuerdo a los factores estudiados, como se puede observar el factor que afecta sería A- (A- = solvente (hexano:diclorometano (4:1)), donde se evidencia la interacción de la mezcla de solventes con respecto a la extracción y cuantificación del analito, en este caso, el antraceno.

La figura 34 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta:

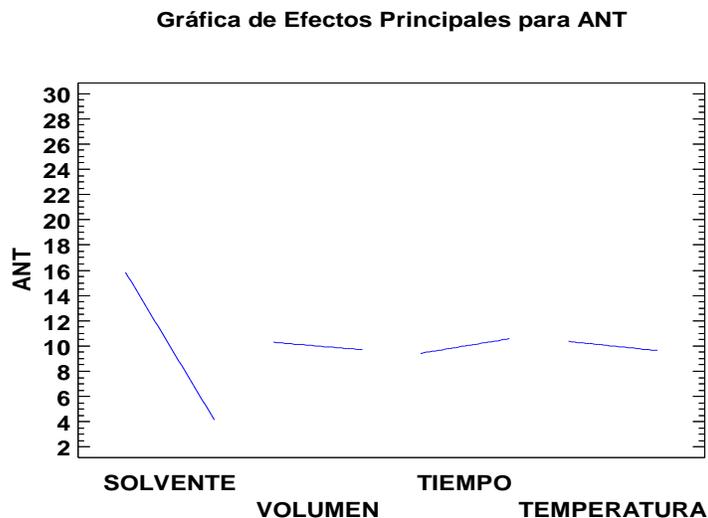


Figura 34. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Antraceno.

Como se evidencia en la gráfica de efectos principales para el antraceno, existe una tendencia con pendiente negativa en el análisis factorial, es decir, mayor respuesta con hexano:diclorometano (4:1).

7.1.2 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de los HAP de mediano peso molecular.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Fluoranteno.

A continuación se presenta en la Figura 35 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Fluoranteno (FLT):

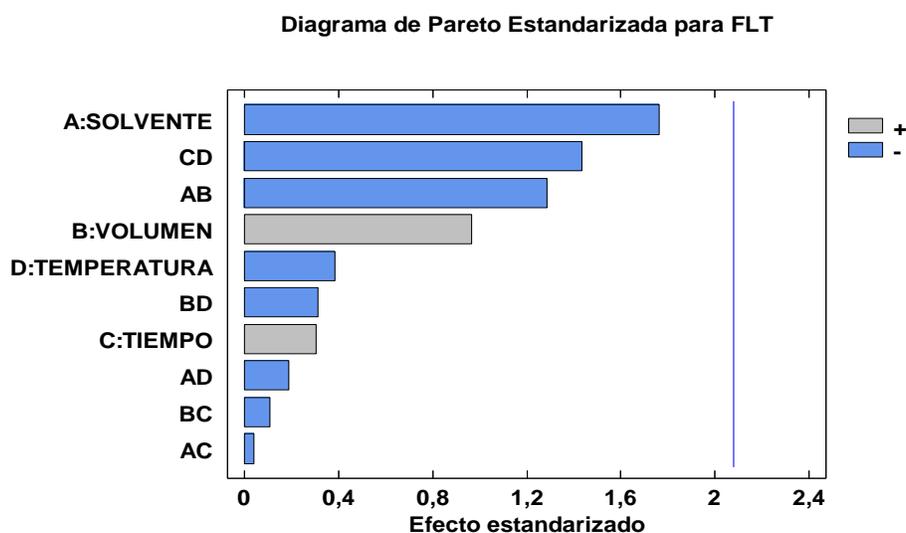


Figura 35. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Fluoranteno.

Para las concentraciones obtenidas de fluoranteno (FLT) el diagrama de Pareto no indica un nivel de significancia pronunciado hacia alguno de los factores, evidenciando que su eficiencia de extracción no está marcada por alguno de los factores en estudio, solo está marcada su tendencia negativa en cuanto al factor A- (solvente: hexano:diclorometano (4:1)).

La figura 35 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta:

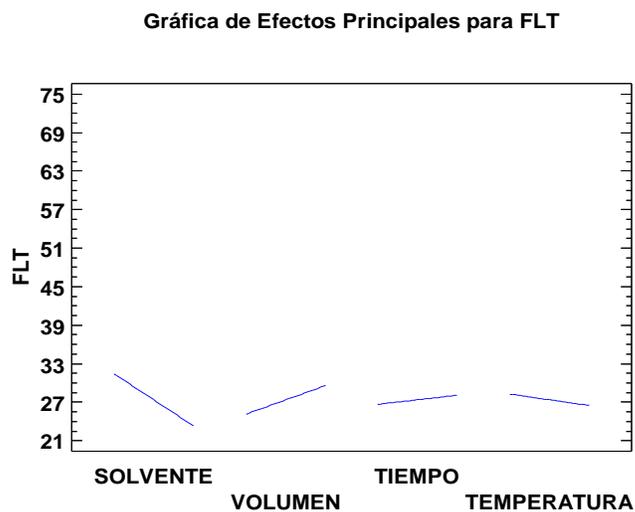


Figura 35. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Fluoranteno.

El gráfico de efectos principales señala claramente una vez más, la evidencia de el efecto con pendiente negativa del solvente con el analito en estudio, mostrando así que el solvente con nivel – (hexano:diclorometano (4:1) en el análisis factorial, ofrece mayor respuesta sobre la eficiencia de extracción.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Pireno.

A continuación se presenta en la Figura 36 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Pireno (PIR):

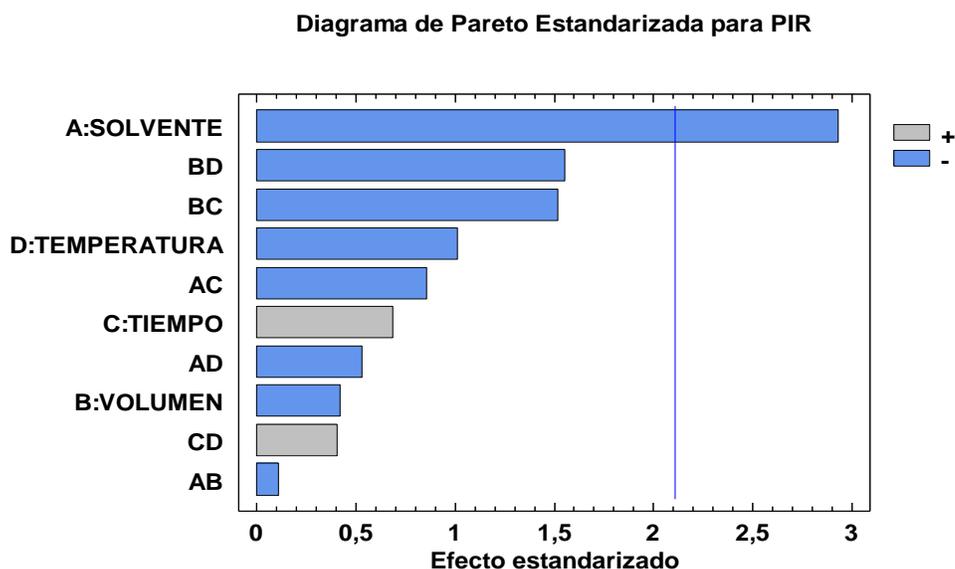


Figura 36. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Pireno.

El diagrama de Pareto señala los efectos significativos de acuerdo a los factores estudiados, como se puede observar el factor que afecta corresponden a A- (A- = solvente (hexano:diclorometano (4:1))), donde se pone de manifiesto la interacción de la mezcla de solventes con respecto a la extracción y cuantificación del analito, en este caso, el pireno.

La figura 37 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables principales sobre la respuesta:

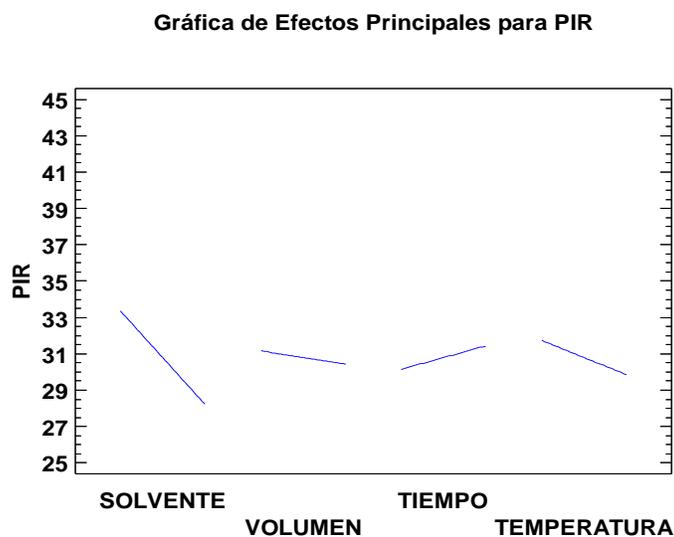


Figura 37. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Pireno.

El gráfico de efectos principales evidencia el efecto con pendiente negativa del solvente con el analito en estudio, mostrando así que el solvente con nivel – (hexano:diclorometano (4:1)) en el análisis factorial es el que genera la mayor respuesta.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[a]antraceno.

A continuación se presenta en la Figura 38 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[a]antraceno (BaA):

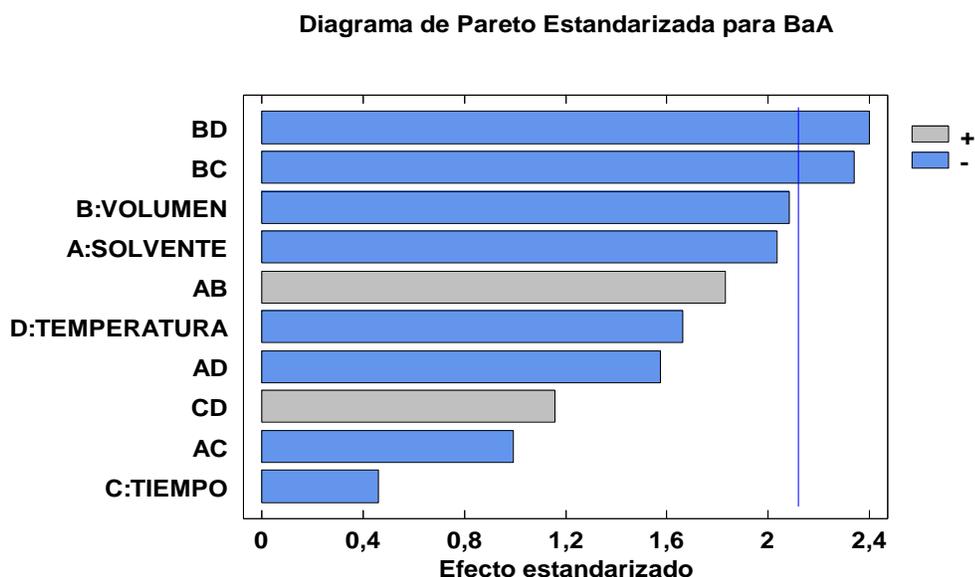


Figura 38. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Benzo[a]antraceno.

El diagrama de Pareto señala que aunque ninguna de las variables individuales son significativas, la interacción de las mismas si lo son, dando lugar a una interacción cuadrática con tendencia negativa BD, y BC respectivamente. Es posible establecer que valores deben tomar las variables que interactúan para que den lugar a una mayor respuesta, para ello se construye un diagrama de interacción [65] como se indica en la figura 39:

Diagrama BD
Factor B

	+	
-	15,3 ng/g	15,90 ng/g
	15,00 ng/g	19,70 ng/g
		-

+ Factor D

Figura 39. Diagrama de interacción volumen – temperatura para el Benzo[a]antraceno.

El diagrama señala los valores promedios de respuesta de acuerdo a las interacciones mostradas. La tendencia negativa para las interacciones BD, es atribuida de acuerdo al valor promedio mas alto observado en el diagrama, cuando el factor B esta en su nivel menos y el factor D en su nivel mas, es decir, menor volumen de solvente y mayor tiempo de extracción. La tabla 8 muestra que los experimentos en los que las variables ocupan esos valores son los números: 9,10,13 y 14 y sus réplicas.

Diagrama BC
Factor B

	+		
-	19,70 ng/g	12,10 ng/g	+ Factor C
	18,80 ng/g	15,90 ng/g	
		-	

Figura 40. Diagrama de interacción volumen – tiempo para el Benzo[a]antraceno.

En el diagrama de interacción BC se señala el valor de concentraciones promedio, B+ C- (Volumen: 30mL., Tiempo: 15min), correspondiendo la información a la obtenida por el diagrama de Pareto, observándose una vez más la influencia de los factores volumen y tiempo para este analito. La tabla 8 muestra que los experimentos en que las variables ocupan estos valores son los números 3,4,11 y 12.

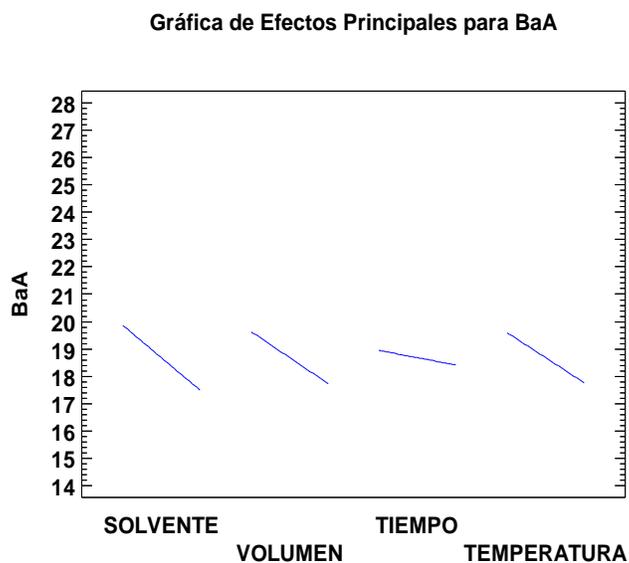


Figura 41. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de *Benzo[a]antraceno*.

La figura 41 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta: El gráfico de efectos principales exhibe el efecto marcado de 3 factores con tendencia negativa, como lo son, solvente, temperatura y tiempo, resultando de los diagramas de interacción AB más pronunciada hacia uso de un solvente de nivel -, es decir, la mezcla hexano: diclorometano (4:1).

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Criseno.

A continuación se presenta en la Figura 42 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Criseno (CRI).

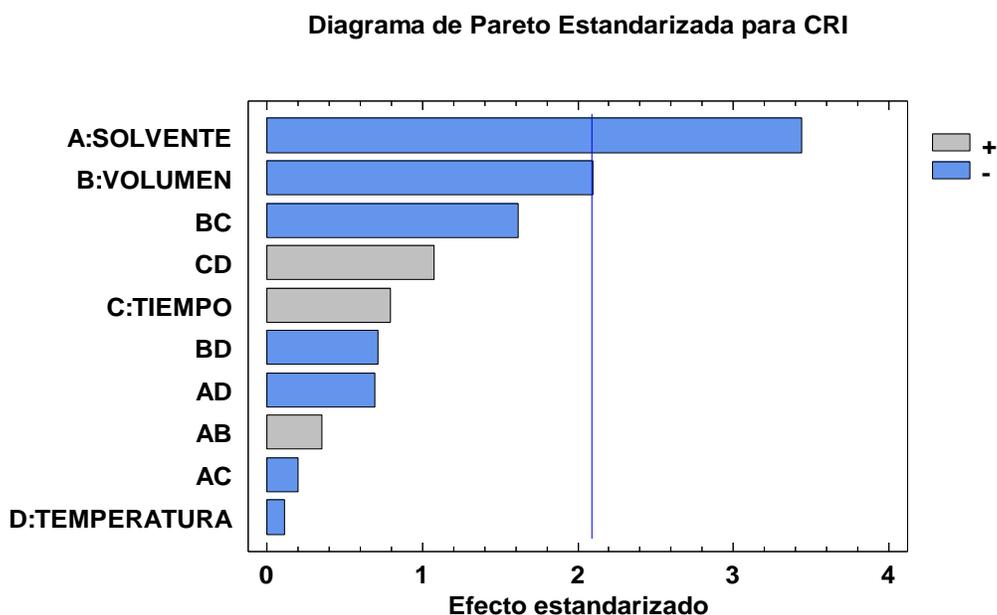


Figura 42. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Criseno.

Para las concentraciones de Criseno obtenidas, en el Apéndice 11.1 este gráfico exhibe un efecto marcado para uno de los factores en estudio, en este caso el solvente, con una tendencia negativa marcada, el signo negativo indica que la mayor respuesta se obtiene haciendo uso de la mezcla de solventes hexano: diclorometano (4:1).

El factor B con nivel -, (B- : volumen 15mL) aunque no muestra un nivel de significancia como el volumen, se encuentra en el punto límite del efecto estandarizado, pudiéndose decir que presenta un efecto relativamente marcado en la interacción con este analito.

La figura 43 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta:

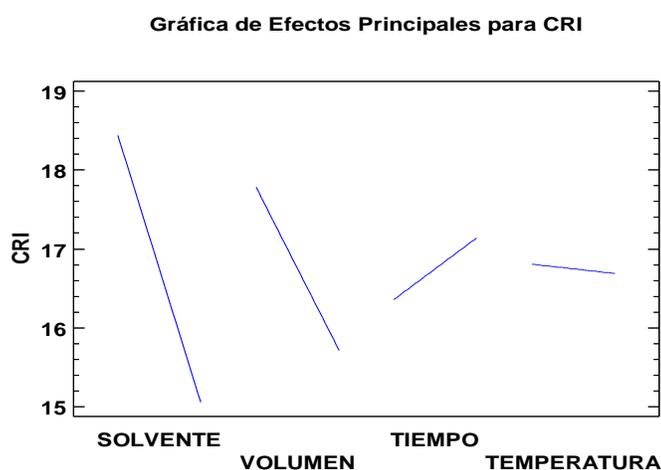


Figura 43. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Criseno.

El gráfico de efectos principales indica una vez más la pendiente negativa de solvente, haciendo referencia al uso de una mezcla de solventes hexano: diclorometano (4:1), así como también un volumen de 15mL.

Los HAP de mediano peso molecular dependiendo de sus propiedades físico-químicas, y su incremento en la hidrofobicidad y estabilidad electrotérmica son factores que contribuyen a su presencia o ausencia y el comportamiento en base a su estructura molecular, interacción y bioacumulación con muestras de material vegetal [66].

7.1.4 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de los HAP de alto peso molecular.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[b]Fluoranteno.

A continuación se presenta en la Figura 44 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[b]Fluoranteno.

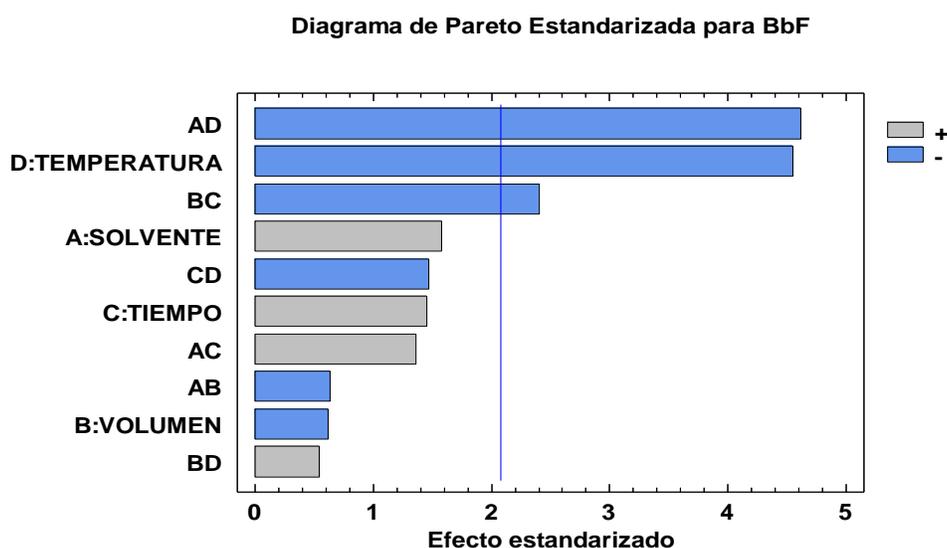


Figura 44. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Criseno.

El diagrama de Pareto ilustra que aunque el factor A (solvente) no es significativo, la interacción AD (Solvente, temperatura) de las mismas si lo son, dando lugar a una interacción cuadrática con tendencia negativa AD, así como también el efecto marcado del factor D con nivel - , reportando el uso de temperatura de 100°C.

La interacción BC (volumen, tiempo) también presenta un nivel de significancia marcado. Para establecer el valor de la interacción de los factores AD y BC, se indican los siguientes diagramas de interacción:

Diagrama AD
Factor A

+		
-	44,10 ng/g	0,000 ng/g
	14,30 ng/g	14,60 ng/g
	-	

+ Factor D

Figura 45. Diagrama de interacción solvente– temperatura para el Benzo[b]fluoranteno.

La interacción AD, señala que para los factores A+,D- (Solvente: diclorometano y temperatura: 100°C) la eficiencia de extracción es mayor, mostrando una clara evidencia de el efecto del solvente con el uso de bajas temperaturas. La tabla 8 muestra que los experimentos en que las variables ocupan estos valores son los números, 2,4,6 y 8 y sus réplicas.

Diagrama BC
Factor B
+

-	93,80 ng/g	14,50 ng/g	+ Factor C
-	14,00 ng/g	76,60 ng/g	

-

Figura 46. Diagrama de interacción volumen- tiempo para el Benzo[b]fluoranteno.

La interacción BC indica una mayor eficiencia de extracción para cuando los valores de los factores son B+,C- (Volumen: 30mL) y tiempo (15min), y en menor grado en el caso donde los valores son B-,C+ (Volumen: 15mL) y tiempo (30min) mostrando una dualidad cuando una de las dos variables aumenta o disminuye su valor. Para mostrar más claramente que factores influyen significativamente en este analito se ilustra el gráfico de efectos principales:

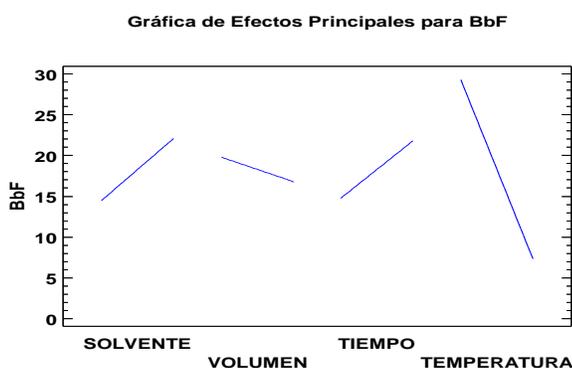


Figura 47. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[b]fluoranteno.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[k]Fluoranteno.

A continuación se presenta en la Figura 48 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[k]Fluoranteno.

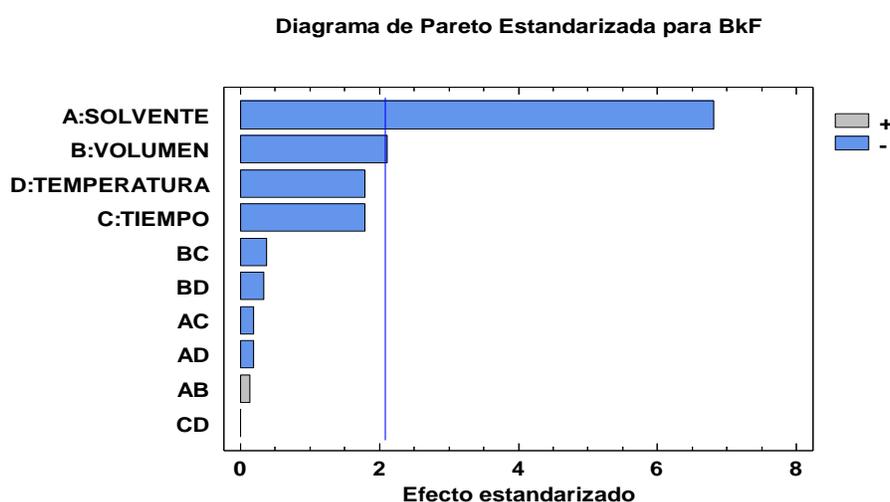


Figura 48. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Benzo[k]Fluoranteno.

En lo que respecta a las concentraciones de de benzo[k]fluoranteno obtenidas, en el Apéndice 11.1 este gráfico exhibe un efecto marcado para uno de los factores en estudio, en este caso el solvente, con una tendencia negativa marcada, el signo negativo indica que la mayor respuesta se obtiene haciendo uso de la mezcla de solventes hexano: dicloromentano (4:1). El factor B con nivel -, (B- : volumen 15mL) aunque no evidencia un nivel de significancia como el volumen, se encuentra en el punto límite del efecto estandarizado, pudiéndose decir que presenta un efecto relativamente marcado en la interacción con este analito. El indeno [1,2,3-cd] pireno presenta el mismo comportamiento que el BkF.

La figura 49 muestra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta:

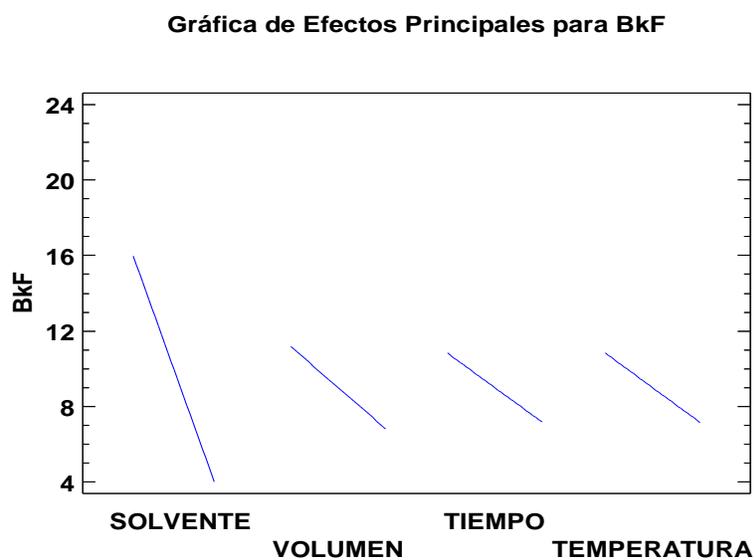


Figura 49. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[k]fluoranteno.

El gráfico de efectos principales señala una vez más la pendiente negativa de solvente, haciendo referencia al uso de una mezcla de solventes hexano: diclorometano (4:1), así como también un volumen de 15mL.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[a]pireno.

A continuación se presenta en la Figura 50 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[a]pireno:

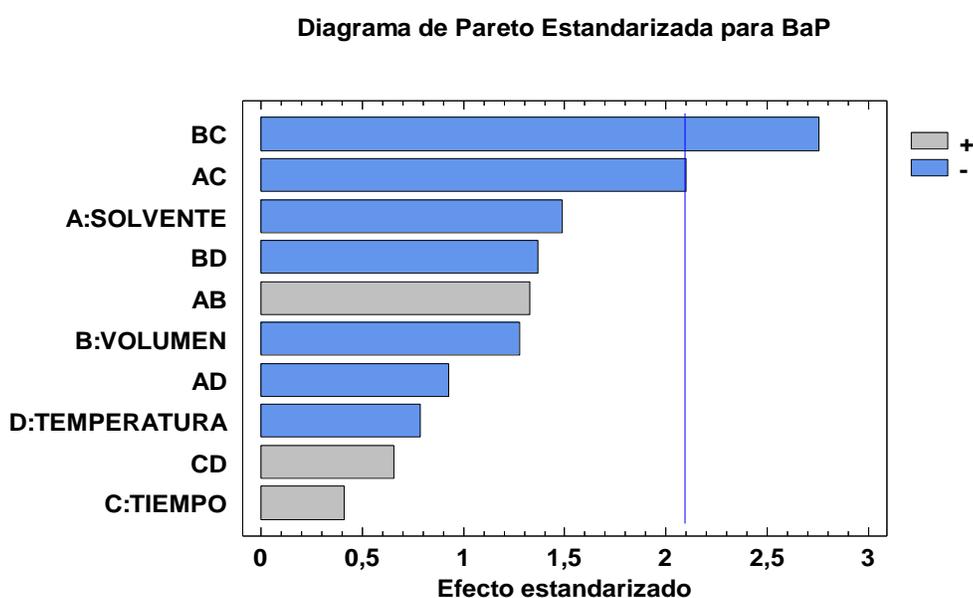


Figura 50. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Benzo[a]pireno.

La interacción BC (Volumen, tiempo) es significativa, dando lugar a una interacción cuadrática con tendencia negativa, así como también la interacción cuadrática AC, (solvente, tiempo) presenta un nivel de significancia marcado. Para establecer el valor de la interacción de los factores BC y AC, se muestra los siguientes diagramas de interacción:

Diagrama BC
Factor B

+

77,30 ng/g	49,10 ng/g	+ Factor C
66,80 ng/g	13,15 ng/g	

-

Figura 51. Diagrama de interacción volumen-tiempo para el Benzo[a]Pireno.

El diagrama de interacción BC ilustra que la mayor eficiencia de extracción se muestra para cuando el factor es B+,C- (Volumen: 30mL, tiempo: 15min). Estos valores corresponden a los experimentos que se observan en la Tabla 8

Diagrama AC
Factor A

+

68,40 ng/g	53,70 ng/g	+ Factor C
75,70 ng/g	12,69 ng/g	

-

Figura 52. Diagrama de interacción solvente, tiempo para el Benzo[a]Pireno.

El diagrama de interacción AC señala la similitud con la tendencia observada en el diagrama BC, para cuando el factor es A-,C- (solvente: hexano:diclorometano (4:1) y tiempo: 15min).

La figura 53 indica el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta:

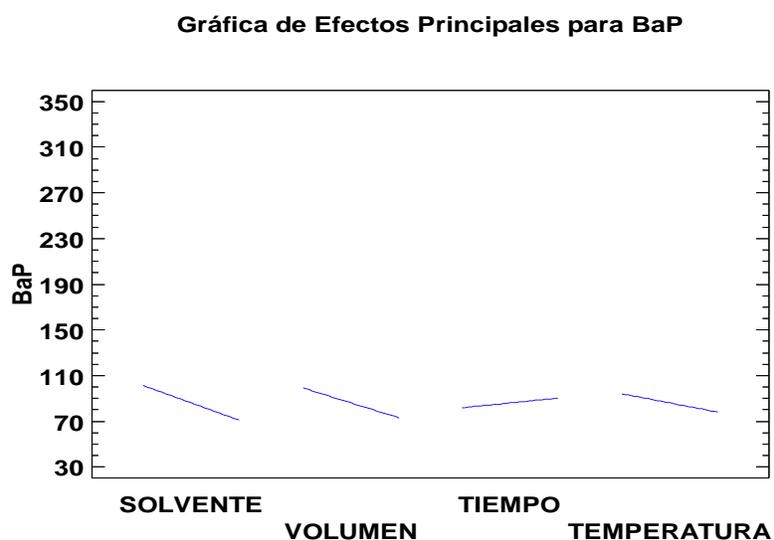


Figura 53. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[a]pireno.

Este gráfico de efectos principales resume los efectos marcados con tendencias negativas para la interacción del solvente (hexano:diclorometano (4:1)) y el volumen 15mL para el Benzo[a]pireno, así como también un tiempo de extracción mayor.

No se detectaron los compuestos dibenzo[a,h]antraceno ni benzo[g,h,i]perileno, compuestos de alto peso molecular, asociados a partículas, pero si benzo[a]pireno, uno de los más cancerígenos, para todos estos compuestos la fuente es la combustión de gasolina [67], sin embargo los dos primeros compuestos no fueron detectados, a pesar que la muestra representativa fue tomada de lugares con elevado tráfico vehicular, esto puede asociarse principalmente a las estructuras químicas de ambos compuestos y su grado de interacción con la matriz vegetal, así como procesos de biodegradación [41].

7.2 Análisis del diseño factorial para evaluar condiciones óptimas de la extracción asistida por ultrasonido para HAP según diseño experimental.

7.2.1 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas para los HAP de bajo peso molecular.

A continuación se presenta en la Figura 54 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Naftaleno (NAF):

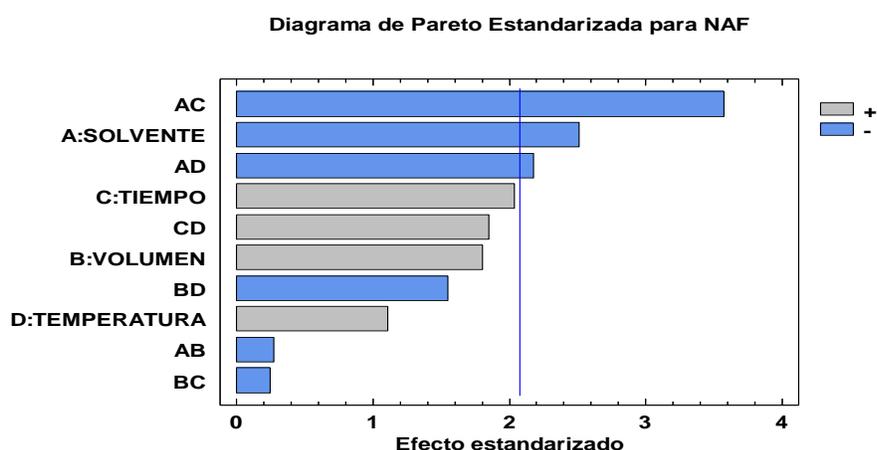


Figura 54. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Naftaleno.

Para las concentraciones de naftaleno obtenidas, en el Apéndice 11.2 este gráfico exhibe un efecto marcado para uno de los factores en estudio, en este caso el solvente, con una tendencia negativa marcada, el signo negativo indica que la mayor respuesta se obtiene haciendo uso de la mezcla de solventes hexano: diclorometano (4:1). Sin embargo el mayor efecto se observa con la interacción de los factores AC (solvente: tiempo) y en menor grado la interacción de los factores AD (solvente:temperatura) como a continuación se observará en los diagramas de interacción AC y AD:

Diagrama AC
Factor A

+		
-	25,23 ng/g	99,7 ng/g
	14,71 ng/g	704,4 ng/g
-		+ Factor C

Figura 55. Diagrama de interacción solvente-tiempo para el naftaleno.

El diagrama de interacción AC indica una mayor eficiencia de extracción cuando el factor C+ (tiempo) es mayor (30min) y haciendo uso de hexano-diclorometano (4:1). Estos valores corresponden a los experimentos: 5,7,13 y 15.

Diagrama AD
Factor A

+		
-	22,93 ng/g	122,7 ng/g
	262,4 ng/g	589,1 ng/g
-		+ Factor D

Figura 56. Diagrama de interacción solvente-temperatura para el naftaleno.

El diagrama de interacción AD indica una mayor eficiencia de extracción cuando el factor D+ (temperatura: 40°C) es mayor, haciendo uso de la mezcla de solventes hexano: diclorometano (4:1). Estos valores corresponden a los experimentos 9,11,13 y 15.

La figura 57 ilustra el nivel de significancia y la tendencia de las distintas variables sobre la respuesta:

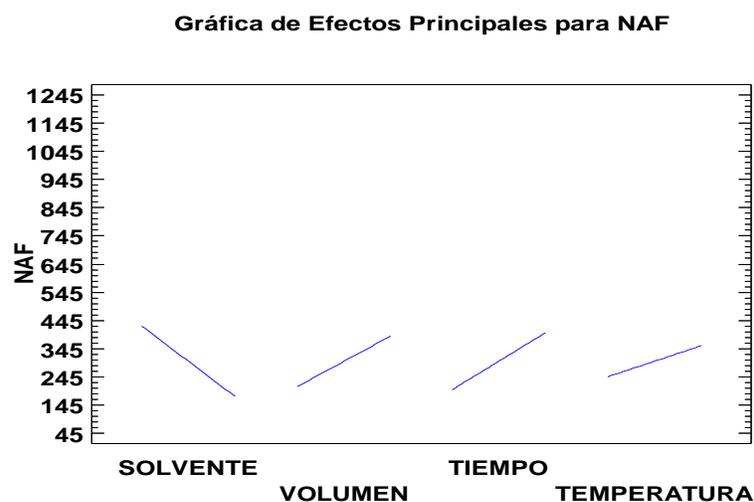


Figura 57. Gráfico de efectos principales para las concentraciones obtenidas de Naftaleno.

Este gráfico de efectos principales exhibe en resumen, los efectos marcados con tendencias negativas para la interacción del solvente (hexano:diclorometano (4:1)), sin embargo muestra tendencias positivas marcadas para los factores B, C Y D.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de fluoreno.

A continuación se presenta en la Figura 58 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Fluoreno (FLU):

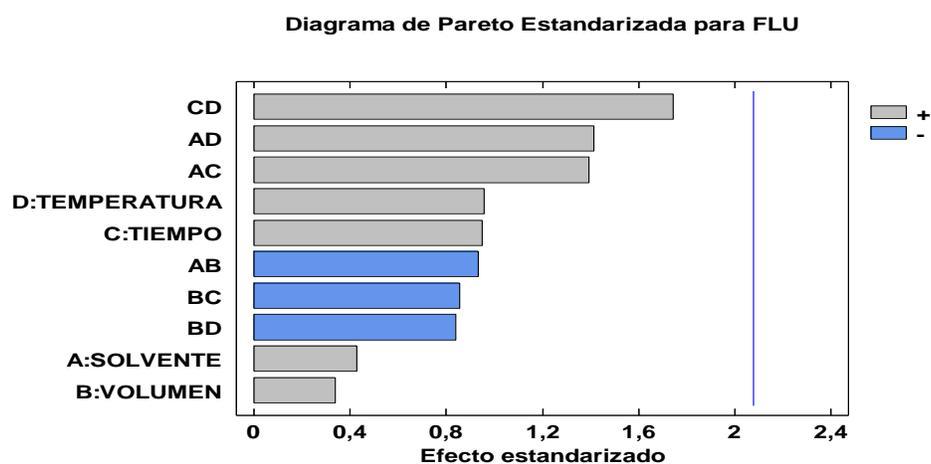


Figura 58. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Fluoreno.

El acenaftileno, fenantreno y antraceno presentan el mismo comportamiento que el mostrado en el diagrama de Pareto para el Fluoreno. El diagrama de Pareto de Fluoreno (FLU) no exhibe un nivel de significancia pronunciado hacia alguno de los factores, evidenciando que su eficiencia de extracción no está marcada por alguno de los factores en estudio, solo está marcada su tendencia positiva para el factor B+ (Volumen:30mL) y para la interacción positiva de los factores C+ y D+ (tiempo: 30min y temperatura: 40°C).

A continuación se muestra en la figura 59 el gráfico de efectos principales para estos analitos:

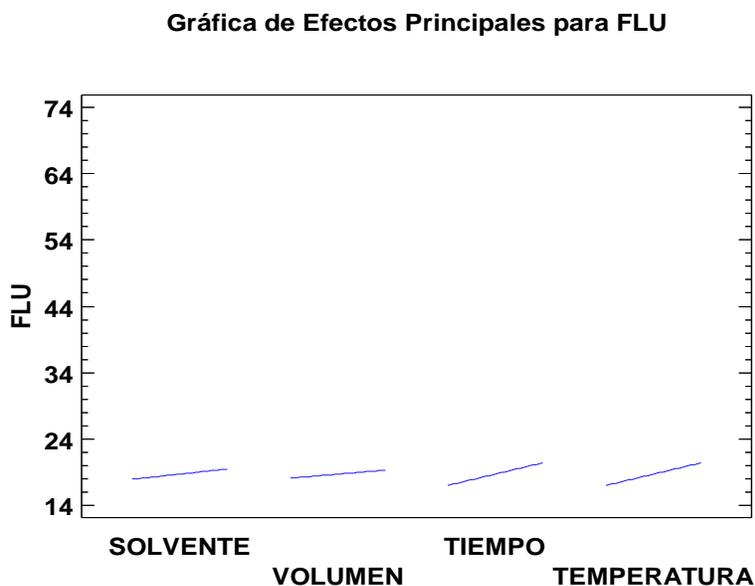


Figura 59. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de varios de los HAP de bajo peso molecular.

En el gráfico de efectos principales, a pesar de que no se observó una tendencia marcada para el diagrama de Pareto, en este se puede observar una tendencia positiva para cada uno de los factores en estudio, principalmente para los factores C y D (Temperatura y tiempo respectivamente). Es importante destacar que para estos analitos de bajo peso molecular existe un mismo comportamiento. El acenafteno no fue detectado, probablemente por las causas ya descritas anteriormente en la sección de la técnica de extracción asistida por microondas.

7.2.2 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas para los HAP de mediano peso molecular.

A continuación se presenta en la Figura 60 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Fluoranteno (FLT):

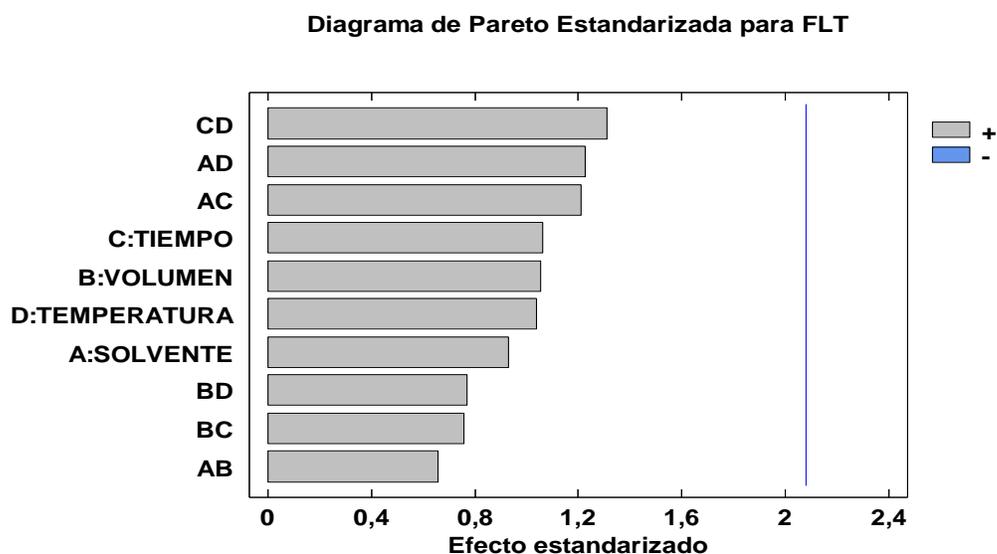


Figura 60. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Fluoranteno.

Para las concentraciones obtenidas de fluoranteno el diagrama de Pareto no ilustra un nivel de significancia pronunciado hacia alguno de los factores, evidenciando que su eficiencia de extracción no está marcada por alguno de los factores en estudio, solo está marcada su tendencia para la interacción positiva de los factores C+ y D+ (tiempo: 30min y temperatura: 40°C) y A+D+ (solvente: diclorometano y temperatura: 40°C). El criseno presenta el mismo comportamiento que el ilustrado para el FLT.

A continuación se señala en la figura 61 el gráfico de efectos principales para estos analitos:

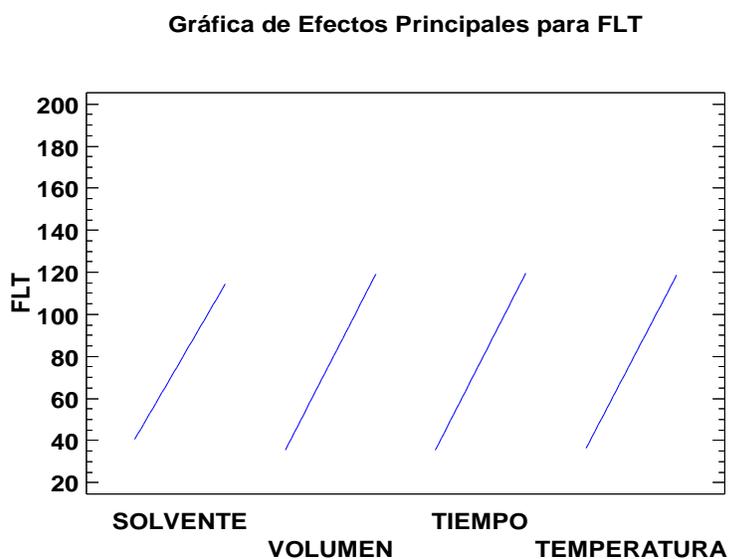


Figura 61. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Fluoranteno

Como se observa en el diagrama sugiere efecto similar de cada variable casi iguales en pendiente positiva, A+,B+,C+ y D+. (solvente: diclorometano, volumen: 30mL, tiempo: 30min y temperatura: 40°C). Este comportamiento sugiere que el fluoranteno es mejor extraído con un solvente con características polares y un tiempo de extracción prolongado.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Pireno.

A continuación se presenta en la Figura 62 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Pireno (PIR):

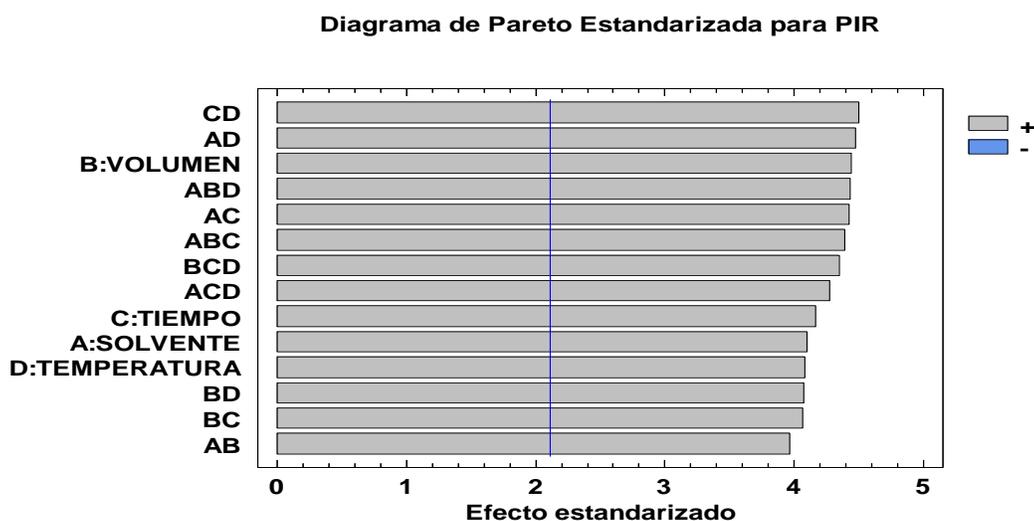


Figura 62. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Pireno.

Para el diagrama de Pareto de Pireno (PIR) se muestra un nivel de significancia para uno de los factores B (volumen) con tendencia positiva, es decir un $V=30\text{mL}$, sin embargo las tendencias más significativas se muestran con la interacción cuadrática CD, AD y AC, además interacciones de 3er. orden ABC, BCD, Y ACD. para conocer los valores de estas interacciones cuadráticas podemos realizar diagramas de interacción como los que se indican a continuación:

El diagrama de interacción CD concuerda con la información mostrada en el diagrama de Pareto, mostrando una mayor eficiencia de extracción cuando las condiciones son C+ y D+ (tiempo: 30min y temperatura: 40°C). Estos valores corresponden a los experimentos: 13,14,15 y 16.

Diagrama CD
Factor C

+		
-	32,50 ng/g	376,8 ng/g
	46,10 ng/g	29,20 ng/g
	-	

+ Factor D

Figura 63. Diagrama de interacción tiempo-temperatura para el Pireno.

El diagrama de interacción AD nuevamente arroja valores de mayor eficiencia de extracción para los factores A+ y D+ (solvente: diclorometano, y temperatura 40°C). Estos valores corresponden a los experimentos: 10,12,14 y 16.

Diagrama AD
Factor A

+		
-	31,60 ng/g	374,9 ng/g
	46,90 ng/g	31,10 ng/g
	-	

+ Factor D

Diagrama AC
Factor A

+

-	31,10 ng/g	375,5 ng/g	+ Factor C
	44,30 ng/g	33,70 ng/g	

-

Figura 64. Diagrama de interacción solvente-tiempo para el pireno.

El diagrama de interacción AC nuevamente arroja valores de mayor eficiencia de extracción para los factores A+ y C+ (solvente: diclorometano, y tiempo: 30min). Estos valores corresponden a los experimentos: 6,8,14 y 16.

A continuación se muestra en la figura 65 el gráfico de efectos principales para este analito:

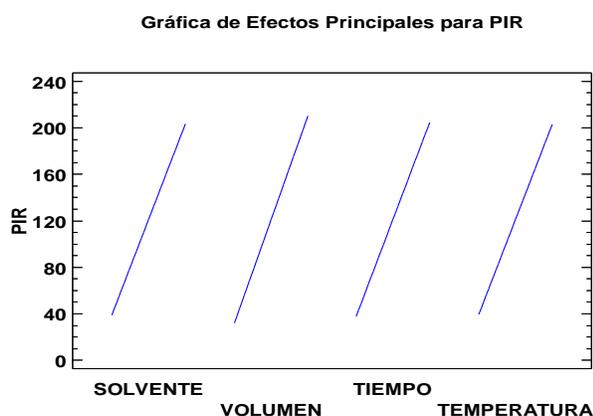


Figura 65. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Pireno.

Como se observa en el diagrama existe una marcada tendencia para cada uno de los factores casi iguales en pendiente positiva, A+,B+,C+ y D+. (solvente: diclorometano, volumen: 30mL, tiempo: 30min y temperatura: 40°C).

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[a]antraceno.

A continuación se presenta en la Figura 66 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[a]antraceno.

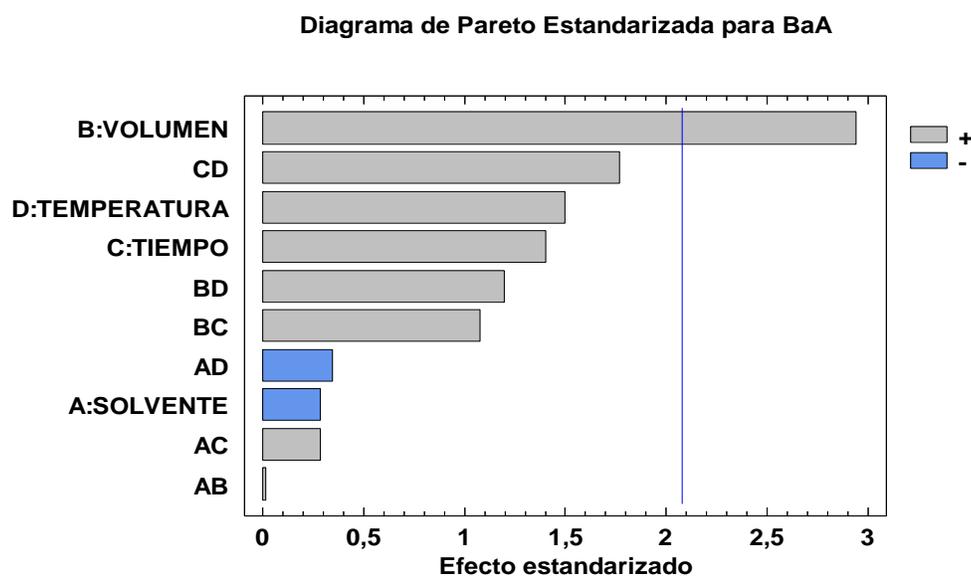


Figura 66. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Benzo[a]antraceno.

El diagrama de Pareto obtenido señala cuales de las variables estudiadas tienen una incidencia significativa sobre la respuesta. Para las concentraciones de benzo[a]antraceno obtenidas, en el Apéndice 11.2 este gráfico exhibe un efecto marcado para uno de los factores en estudio, en este caso el volumen, con una tendencia positiva marcada, el signo positivo indica que la mayor respuesta se obtiene a mayores volúmenes de extracción, en este caso 30mL.

A continuación se muestra en la figura 67 el gráfico de efectos principales para este analito:

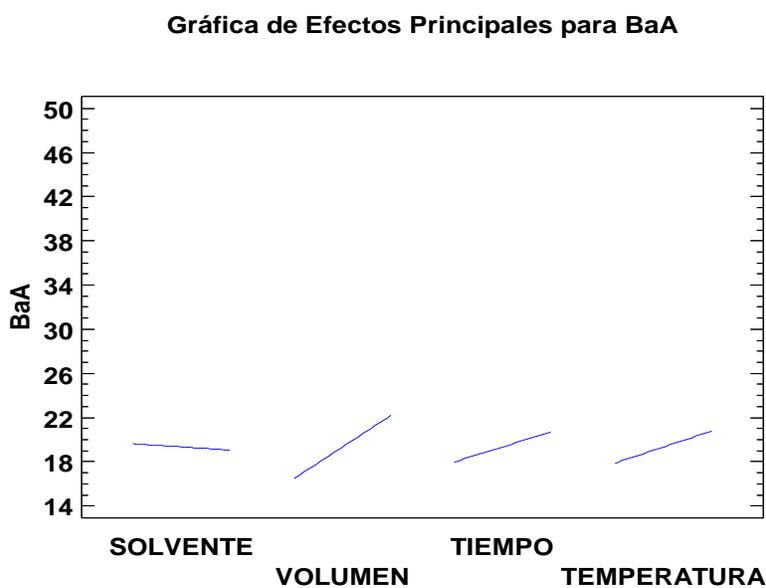


Figura 67. Gráfico de efectos principales para las concentraciones obtenidas de Benzo[a]antraceno.

El gráfico de efectos principales indica una marcada tendencia positiva hacia el factor B y unas menos marcadas para los factores C y D, el factor A carece de influencia para este analito.

7.2.3 Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas para los HAP de alto peso molecular.

A continuación se presenta en la Figura 68 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de benzo[b]fluoranteno:

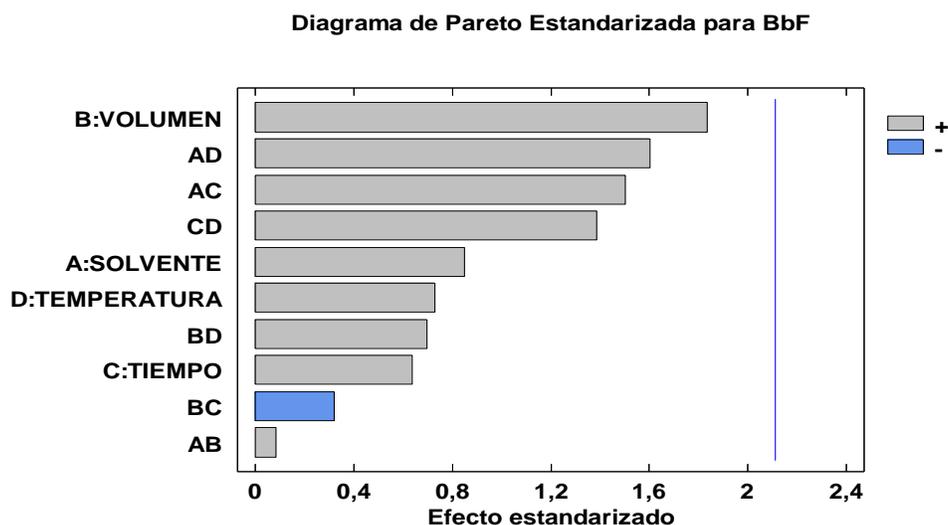


Figura 68. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Benzo[b]fluoranteno.

Para las concentraciones obtenidas de benzo[b]fluoranteno el diagrama de Pareto) no señala un nivel de significancia pronunciado hacia alguno de los factores, evidenciando que su eficiencia de extracción no está marcada por alguno de los factores en estudio, solo está marcada su tendencia para el factor B+ (Volumen: 30mL) y los factores AD.

A continuación se muestra en la figura 69 el gráfico de efectos principales para este analito:

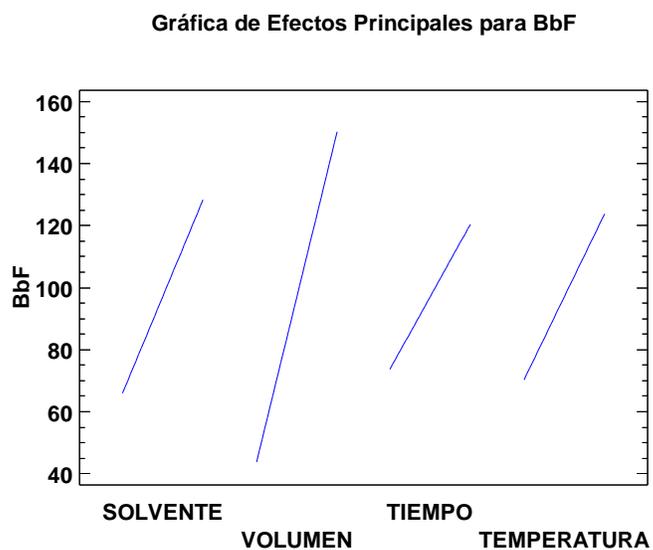


Figura 69. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de *Benzo[b]fluoranteno*

El gráfico de efectos principales muestra una tendencia positiva más pronunciada para el factor B (volumen), al igual que para el resto de los factores presentan tendencia positiva.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[k]fluoranteno.

A continuación se presenta en la Figura 70 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de benzo[k]fluoranteno:

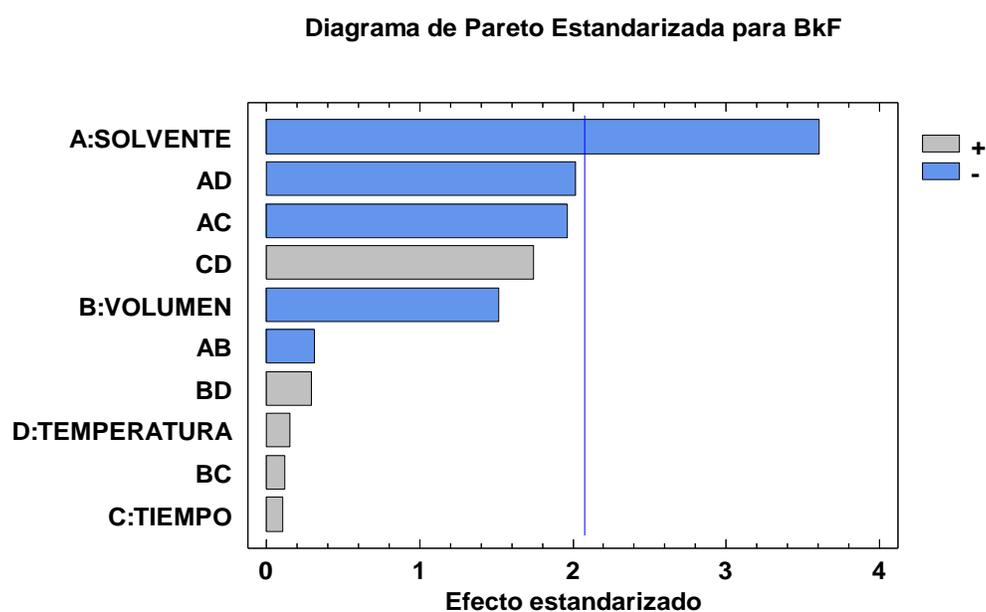


Figura 70. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Benzo[k]fluoranteno.

El diagrama de Pareto exhibe los efectos significativos de acuerdo a los factores estudiados, como se puede observar el factor que afecta serían A- (A- = solvente (hexano:diclorometano (4:1))), donde se evidencia la interacción de la mezcla de solventes con respecto a la identificación y cuantificación del analito, en este caso, el benzo[k]fluoranteno.

A continuación se indica en la figura 71 el gráfico de efectos principales para este analito:

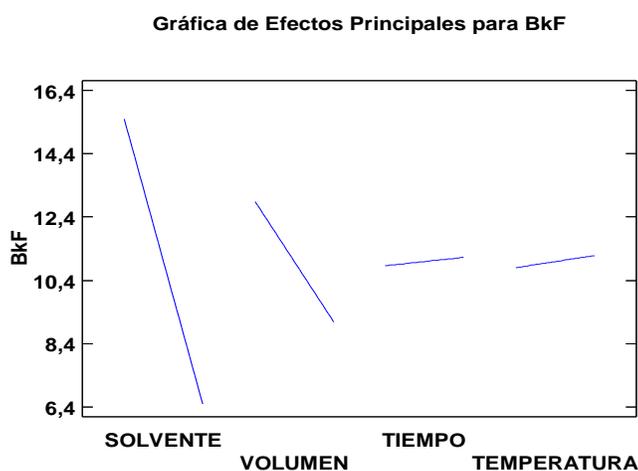


Figura 71. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de *Benzo[b]fluoranteno*

El gráfico de efectos principales señala claramente una vez más, la evidencia de el efecto con pendiente negativa del solvente con el analito en estudio, mostrando así que el solvente con nivel – (hexano:diclorometano (4:1) en el análisis factorial, realiza mayor eficiencia de extracción.

Análisis del diseño factorial sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[a]pireno.

A continuación se presenta en la Figura 72 el diagrama de Pareto sobre las concentraciones obtenidas de benzo[a]pireno:

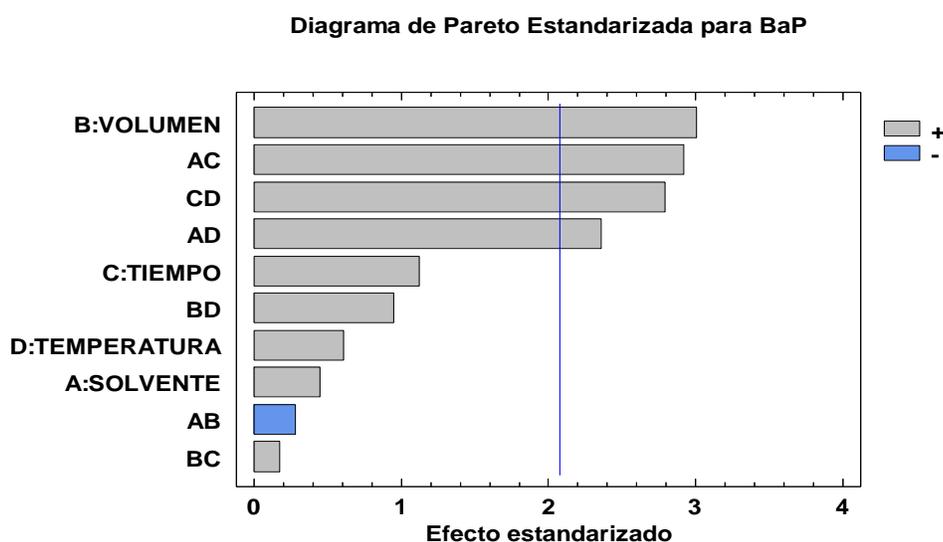


Figura 72. Diagrama de Pareto sobre las concentraciones de Benzo[a]pireno.

Para el diagrama de Pareto de benzo[a]pireno: se ilustra un nivel de significancia para uno de los factores B (volumen) con tendencia positiva, es decir un $V=30\text{mL}$, sin embargo las tendencias significativas se señalan con la interacción cuadrática AC, CD y AD. El indeno[1,2,3-cd]pireno presenta el mismo comportamiento que el BaP. Para conocer los valores de estas interacciones cuadráticas podemos realizar diagramas de interacción como los que se muestran a continuación:

Diagrama CD
Factor C

+		
-	123,5 ng/g	414,3 ng/g
	266,6 ng/g	79,20 ng/g
-		+ Factor D

Figura 73. Diagrama de interacción solvente-tiempo para el Benzo[a]pireno.

El diagrama de interacción AC indica una mayor eficiencia de extracción para los valores A+C+ (solvente: diclorometano y tiempo: 30min). Estos valores corresponden a los experimentos: 6,8,14 y 16.

Diagrama AC
Factor A

+		
-	67,20 ng/g	413,1 ng/g
	278,6 ng/g	124,7 ng/g
-		+ Factor C

Figura 74. Diagrama de interacción tiempo-temperatura para el Benzo[a]pireno.

El diagrama de interacción CD señala una mayor eficiencia de extracción para los valores C+D+ (tiempo: 30min y temperatura: 30min). Estos valores corresponden a los experimentos: 13,14,15 y 16.

El diagrama de interacción AD muestra una mayor eficiencia de extracción para los valores A+D+ (solvente: diclorometano y temperatura: 40°C). Estos valores corresponden a los experimentos: 10,12,14 y 16.

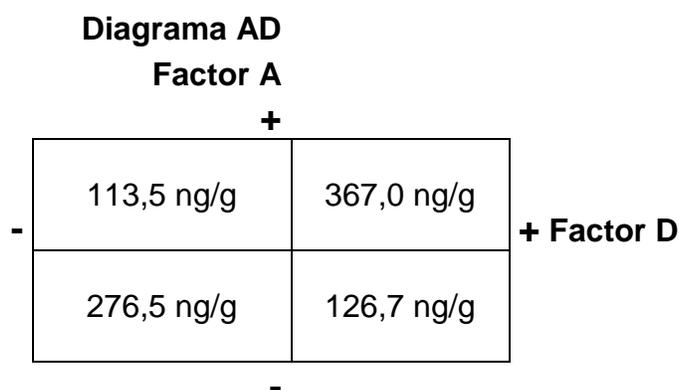


Figura 75. Diagrama de interacción tiempo-temperatura para el Benzo[a]pireno.

A continuación se observa en la figura 76 el gráfico de efectos principales para este analito:

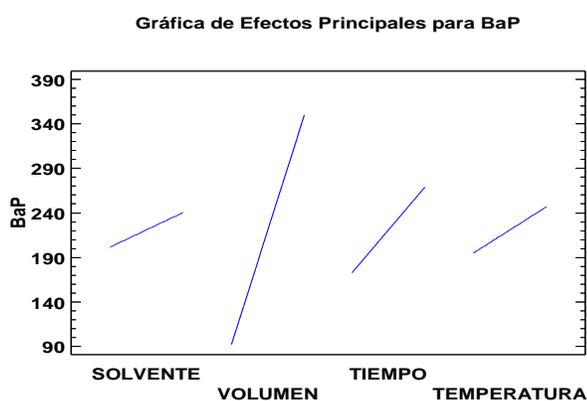


Figura 76. Gráfico de efectos principales sobre las concentraciones obtenidas de Benzo[a]pireno.

El gráfico de efectos principales indica una clara tendencia positiva para uno de los factores (Volumen) y unas menos marcadas igualmente positivas.

7.3 Condiciones óptimas de los HAP empleando la técnica de extracción asistida por microondas.

La tabla a continuación resume las condiciones óptimas para cada uno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en estudio haciendo uso de la técnica de extracción asistida por microondas:

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS									
PESO MOLECULAR	HAP	FACTORES							
		A		B		C		D	
		SOLVENTE		VOLUMEN (mL)		TIEMPO (min)		TEMPERATURA (°C)	
		NIVELES							
		-	+	-	+	-	+	-	+
HEX:DCM (4:1)	DCM	15	30	15	30	100	115		
BAJO	NAF	X		X					
	ACI	X		X					
	ACE								
	FLU	X		X					
	FEN	X		X					
	ANT	X		X					
MEDIANO	FLT	X			X				
	PIR	X		X					
	BaA	X		X					
	CRI	X		X					
ALTO	BbF		X	X					
	BkF	X		X					
	BaP	X		X					
	DahA								
	BghiP								
	IcdP	X			X				

X: Condición óptima encontrada

HEX:DCM: mezcla hexano: diclorometano

Tabla 11. Condiciones óptimas para cada uno de los 16 HAP en estudio.

De acuerdo a la información suministrada por la Tabla N°11 donde señala las condiciones óptimas para cada uno de los analitos en estudio, se puede deducir que de los cuatro (4) factores, sólo dos (2) de ellos tienen un nivel de significancia considerable con respecto a la media de datos de acuerdo al diseño factorial 2^4 , ellos son el factor A (solvente) con nivel (-) (mezcla hexano: diclorometano (4:1) y el factor B (Volumen) con nivel (-) (volumen: 15mL).

Al analizar el factor A (solvente) podemos observar en la Tabla 11 que el factor A con nivel (-) que se trata de la mezcla de solventes hexano: diclorometano (4:1) presenta mejores resultados de extracción para los HAP en estudio, en este caso: naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, e indeno[1,2,3-cd]pireno, mientras que únicamente el benzo[b]fluoranteno posee una tendencia a ser extraído mejor con diclorometano. La mezcla hexano: diclorometano (4:1) pareciese mejorar la desorción desde la matriz vegetal, en este caso del tipo bromeliaceae de la mayoría de los HAP bajo estudio. Resulta esencial el estudio del disolvente para disolver los analitos, así como la aplicación de temperatura a una presión variable se mejora la solubilidad de los analitos, además de los coeficientes de difusión y la capacidad del disolvente para debilitar las interacciones analito-matriz, así como el poco volumen (factor B, nivel (-)) necesario que resultó suficiente para la interacción con la matriz. Como se hizo uso de un sistema microondas de sistema cerrado, la aplicación de presión facilita la penetración del disolvente en los poros de la partícula del sólido.

La optimización de estos parámetros, disolventes y volumen permitió mejorar la eficacia de la extracción [26]. La mezcla de disolventes elegidos permitió absorber microondas sin que conduzca a un calentamiento fuerte para evitar la degradación de los compuestos, por ello se hizo uso de una mezcla binaria absorbente microondas [34].

Los resultados del presente estudio contrastan a los reportados por Zambrano (2009) [41]; se extraen los HAP de la *Tillandia Recurvata* (L). L bajo la misma técnica de extracción de microondas pero haciendo solo uso de diclorometano como solvente de extracción, el cual puede acarrear una mayor extracción de sustancias polares de la matriz vegetal, disminuyendo así los porcentajes de recuperación de los analitos [50]. La naturaleza del disolvente es de importancia primordial en la extracción asistida por microondas. Al igual que con otras técnicas, el disolvente de extracción (o mezcla de disolventes) ideal debería solubilizar los analitos de interés y solubilizar muy poco material adicional de la matriz, es decir, la extracción debería ser tan selectiva como sea posible para evitar aún más la purificación. Además, debe ser capaz de desplazar las moléculas de soluto adsorbidas en los sitios activos de la matriz con el fin de garantizar la eficacia de las extracciones. Finalmente, las propiedades de adsorción de microondas del disolvente son de gran importancia así como el suficiente calor suministrado (para permitir la desorción eficiente y solubilización, por tanto lograr una eficiente extracción). La mayor parte del tiempo, el disolvente elegido debe absorber las microondas sin que conduzca a un calentamiento fuerte para evitar la degradación de los compuestos. La extracción asistida por microondas (MAE) depende fuertemente de efectos particulares de las microondas sobre la materia, es decir, rotación dipolar y la conductancia iónica, ésta actúa en el corazón de la muestra, la mayoría de las veces, la extracción con disolvente se elige para absorber microondas. Alternativamente (para los compuestos termolábiles), las microondas pueden ser absorbidas solo por la matriz, lo que permite el calentamiento de la muestra y la liberación de los solutos en el disolvente frío [34]. Así, es práctica común utilizar una mezcla, con un solo disolvente absorbente microondas, tal y como se hizo uso de una mezcla de solventes en este estudio.

Los factores C (tiempo) y D (temperatura) para el diseño factorial no arrojaron resultados significativos para la extracción de estos analitos, de lo que puede deducirse que para esta matriz vegetal el uso de temperaturas menores a los 100°C y tiempos de extracción usados (15-30min) en este trabajo de investigación son adecuados.

La información suministrada por la Tabla 11 permite establecer una serie de condiciones óptimas de acuerdo a las tendencias obtenidas, donde los factores A y B son los más influyentes, para deducir adecuadamente, consideraremos solo estos factores y al revisar las condiciones obtenidas óptimas con el diseño experimental (ver Tabla 8), como se observa en la Tabla 12 entran dentro de este rango los siguientes experimentos: 1,5,9 y 13.

Condiciones óptimas encontradas para la técnica de extracción por microondas

Experimento	Solvente	Volumen (mL)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	hexano: diclorometano (4:1)	15	15	100
5	hexano: diclorometano (4:1)	15	30	100
9	hexano: diclorometano (4:1)	15	15	115
13	hexano: diclorometano (4:1)	15	30	115

Tabla 12. *Condiciones óptimas de la técnica de extracción asistida por microondas para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).*

Para determinar la condición única se muestra un gráfico de concentraciones (ng/g) Σ HAP(sumatoria HAP) vs analitos según su peso molecular.

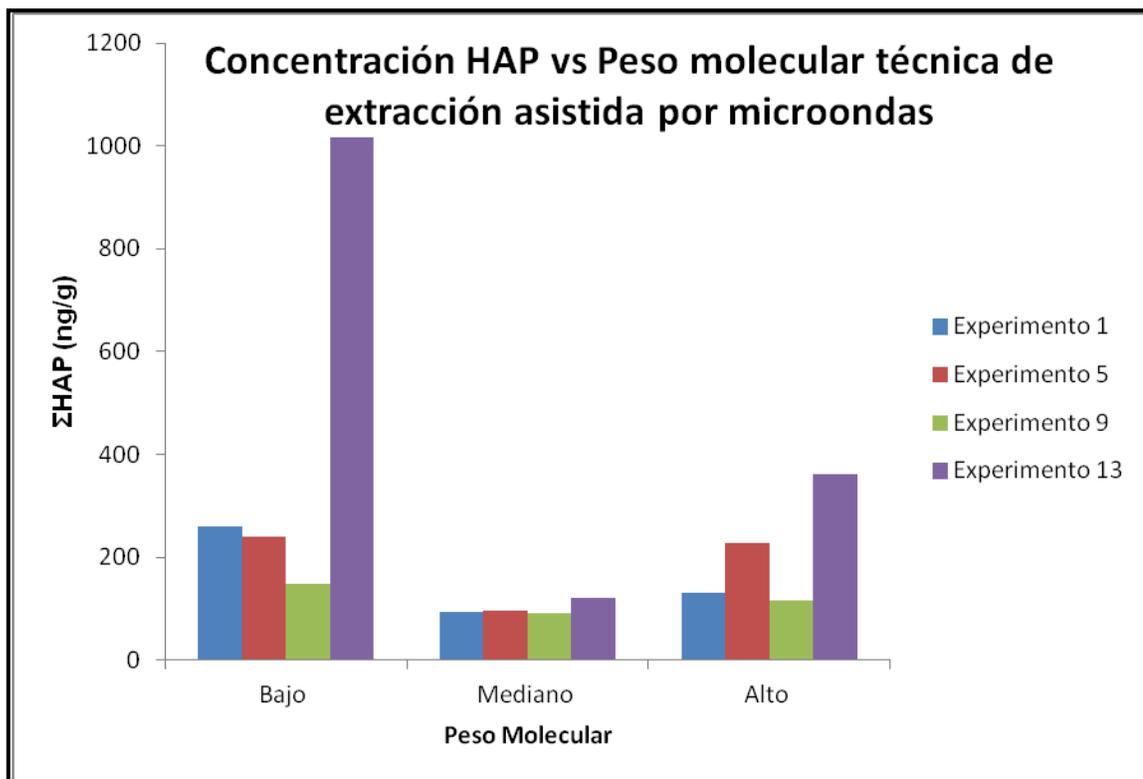


Gráfico 1. Concentración Σ HAP vs peso molecular técnica de extracción asistida por microondas.

De acuerdo al gráfico 1, el experimento 13 presenta mayor eficiencia de extracción con respecto a los otros 3 experimentos, considerando este como óptimo para la técnica de extracción asistida por microondas. Como se observa en la Tabla corresponde a los factores A (mezcla hexano: diclorometano (4:1)) y B (volumen: 15mL).

La figura 77 muestra el cromatograma obtenido bajo las condiciones consideradas como óptimas para los HAP determinados en el experimento 13:

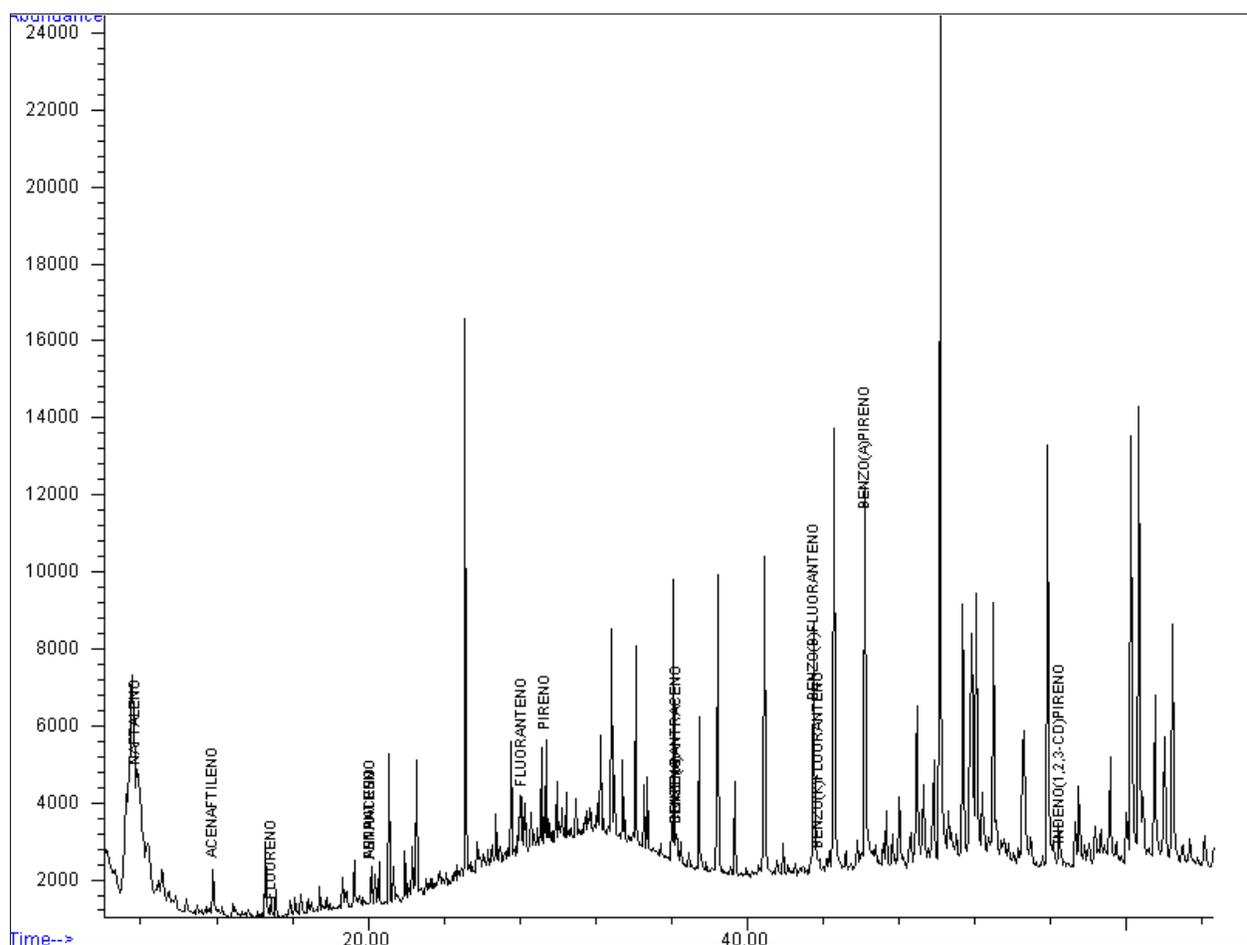


Figura 77. Cromatograma empleando la condición óptima para la extracción de HAP asistida por microondas.

A continuación se analizan los parámetros de calidad analítica para la condición óptima de la extracción asistida por microondas. En primer lugar se evalúa la precisión del método de extracción, estudiando el grado de concordancia de los datos obtenidos de forma independiente y bajo una misma condición experimental, realizando al menos tres réplicas de la condición óptima encontrada, entre ellos tenemos la desviación estándar (S), desviación estándar relativa (RSD), y el coeficiente de variación (CV). La tabla 13 muestra los HAP identificados, así como los valores de concentraciones obtenidos de HAP cuantificados para estos parámetros de acuerdo al cromatograma mostrado en la figura 77.

	Concentraciones (ng/g)	S	RSD	CV(%)
Naftaleno	908,1	12,01	0,096	9,638
Acenanftileno	38,32	3,412	0,089	8,903
Acenafteno	ND	ND	ND	ND
Fluoreno	22,70	2,314	0,102	10,19
Fenantreno	19,80	2,001	0,101	10,11
Antraceno	25,23	3,156	0,125	12,51
Fluoranteno	29,01	3,443	0,119	11,87
Pireno	40,34	4,050	0,100	10,04
Benzo[a]antraceno	24,96	2,430	0,097	9,736
Criseno	24,65	2,690	0,109	10,91
Benzo [b]Fluoranteno	15,55	0,360	0,023	2,315
Benzo[k] fluoranteno	21,54	1,400	0,065	6,500
Benzo [a]Pireno	250,8	12,36	0,049	4,928
Dibenzo[a,h]antraceno	ND	ND	ND	ND
Benzo [g,h,i]Perileno	ND	ND	ND	ND
Indeno[1,2,3-cd]pireno	70,42	2,632	0,037	3,738
	ΣHAP= 1491			

ND: no detectado.

Σ (sumatoria)

Tabla 13. Concentraciones HAP condición óptima para la técnica de extracción por microondas

Los resultados obtenidos muestran que para la condición óptima del método de extracción asistida por microondas, la precisión es similar para los diferentes HAP evaluados, esto se puede corroborar con los valores de desviación estándar que muestra la desviación de los datos en su distribución respecto a la media aritmética.

Para los parámetros de exactitud del método hay algunos términos principales a discutir: el porcentaje de recuperación y el error absoluto, estos parámetros comparan la cantidad obtenida de analito con la cantidad que había inicialmente en la matriz, la cual debe ser conocida por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración HAP enriquecido} - \text{Concentración HAP no enriquecido}}{\text{Concentración HAP de mezcla estándar adicionado}} \times 100$$

La tabla 14 indica los resultados obtenidos para estos parámetros.

	Porcentaje de Recuperación (%)	Error absoluto
Naftaleno	87,33	4,850
Acenanftileno	82,01	6,321
Fluoreno	78,87	7,851
Fenantreno	80,21	3,258
Antraceno	80,50	2,365
Fluoranteno	83,33	4,991
Pireno	84,12	8,114
Benzo[a]antraceno	88,62	3,968
Criseno	85,50	5,300
Benzo [b]Fluoranteno	81,15	3,335
Benzo[k] fluoranteno	82,44	4,358
Benzo [a]Pireno	86,38	6,632
Indeno[1,2,3-cd]pireno	82,91	4,031

Tabla 14. Porcentajes de Recuperación para la muestra optimizada por la técnica de extracción asistida por microondas

El porcentaje de recuperación es el parámetro más útil para determinar la exactitud de los métodos de extracción estudiados, puesto que la evaluación de ellos se basa precisamente en la obtención de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) después de la extracción, cuando ha sido agregada una cantidad conocida del compuesto en un proceso definido en inglés como *spike*. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) ha establecido que para que un método de análisis sea exacto y fiable debe dar lugar a valores de porcentaje de recuperación entre 80 y 115%, con base en el grado de asociación entre el analito y la matriz [68]. Los valores de error absoluto por su parte muestran la diferencia absoluta entre la cantidad recuperada y la cantidad añadida, esto va a depender mucho de las interacciones entre los hidrocarburos y la matriz vegetal y de la cantidad de muestra empleada.

Las concentraciones obtenidas de HAP mostradas en la Tabla 13 para la condición óptima por medio del uso de la técnica de extracción asistida por microondas, permitió determinar una cantidad de HAP totales ($\Sigma\text{HAP} = 1491 \text{ ng/g}$) para 13 de los 16 HAP, con una concentración mínima de HAP de 15,55 ng/g y una concentración máxima de 908,1 ng/g.

Estos resultados los podemos comparar con resultados previos donde se hace uso de distintas matrices vegetales del mismo género y la misma técnica de extracción anteriormente nombrada (Tabla 15) donde Zambrano *et al* 2009 haciendo uso del mismo espécimen que este trabajo de investigación obtienen una concentración de $\Sigma\text{HAP} = 572 \text{ ng/g}$, como se puede observar existe variabilidad en las concentraciones encontradas por cada autor, producto de la influencia del tipo de muestreo, por ejemplo pasivo o activo, zona de estudio, procedimiento analítico aplicado, entre otros.

HAP	Autor			
	Ibedaca J. - 2,014	Zambrano <i>et al.</i> 2009 ^[41]	Souza Pereira <i>et al.</i> 2007 ^[69]	Brighingna <i>et al.</i> 2002 ^[38]
	Suroeste - Caracas - Venezuela	Valle del Mezquital - México	Sao Paulo - Brazil	Florescia - Italia
	<i>Tillandsia Recurvata</i> (L). L	<i>Tillandsia Recurvata</i> (L).L	<i>Tillandsia Usnenoides</i>	<i>Tillandsia Bulbosa</i>
	Concentraciones (ng/g)			
Naftaleno	908,1	82,30	70,70	ND
Acenanftileno	38,32	88,60	10,20	55,10
Acenafteno	ND	19,60	13,70	53,90
Fluoreno	22,70	37,60	24,60	112,1
Fenantreno	19,80	136,0	198,2	ND
Antraceno	25,23	9,000	23,30	14,00
Fluoranteno	29,01	192,0	211,5	ND
Pireno	40,34	25,90	145,1	ND
Benzo[a]antraceno	24,96	12,80	41,90	10,80
Criseno	24,65	22,50	119,4	18,50
Benzo [b]Fluoranteno	15,55	ND	ND	ND
Benzo[k] fluoranteno	21,54	31,80	111,6	ND
Benzo [a]Pireno	250,8	41,70	72,70	35,20
Dibenzo[a,h]antraceno	ND	ND	ND	ND
Benzo [g,h,i]Perileno	ND	28,10	29,30	ND
Indeno[1,2,3-cd]pireno	70,42	67,00	31,11	12,40
ΣHAP	1491	572,0	1067	330,0

ND: no detectado, Σ(sumatoria)

Tabla 15. Resultados obtenidos y referencias bibliográficas de distintos autores haciendo uso de matrices vegetales en zonas de estudio consideradas con alto nivel de contaminación

En los resultados obtenidos para las concentraciones de HAP de la muestra óptima que de la Tabla 15 y en el gráfico, se observa un mayor porcentaje de HAP de bajo peso molecular (2 y 3 anillos) y de alto peso molecular (5 y 6 anillos), dominando los de bajo peso molecular como se observa en la Tabla 16.

Porcentajes Microondas (%)	Experimento 13 (%)
Bajo	68,00
Mediano	7,98
Alto	24,03
Total HAP	100,0

Tabla 16. Porcentajes de HAP según su peso molecular

Es importante destacar que existe predominancia de HAP de bajo peso molecular (68,00%) seguidos por los de alto peso molecular (24,03%) debido a las altas concentraciones de naftaleno y de benzo[a] pireno encontradas.; considerado este último como el de mayor carácter carcinogénico según la *Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC)*. Para poder explicar los comportamientos encontrados de los distintos HAP es necesario conocer que la presencia de estos depende de: la existencia de una fuente del mismo, que las condiciones promuevan su formación o descomposición y sus propiedades físicoquímicas como se observa en la Tabla 1, donde muestra si el analito se encuentra en estado gaseoso, partición entre fase vapor y fase partícula de acuerdo a su coeficiente de partición o en fase partícula.

Normalmente la presencia de HAP, ya descrito en la parte teórica, depende de su origen, en este caso los petrogénicos se asocian a fuentes locales o puntuales, como refinerías o industrias del petróleo, rutas de navegación o adyacentes a carreteras y autopistas, en contraste a los HAP de origen pirogénico que tienen lugar en una escala geográfica mayor. Otra diferencia importante entre los HAP de origen pirogénico y petrogénico es la persistencia en el medio ambiente. Este hecho se debe en parte a

que la liberación de HAP petrogénicos al medio ambiente es menor que los de origen pirogénico [2].

No obstante, estos últimos son más persistentes y se encuentran más protegidos frente a reacciones de degradación por la asociación en forma de aglomerado antes mencionada en la que pueden presentarse.

Por su parte, los HAP de origen petrogénico son más fácilmente degradados por reacciones de fotooxidación o por la acción de los microorganismos [70] y [71]. Este es el motivo de que los HAP de origen pirogénico se encuentren más ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Excepto en el caso de emisiones localizadas de derivados del petróleo, como por ejemplo los vertidos de crudo en aguas marinas que constituyen, junto con el asfalto, las fuentes más importantes de origen petrogénico.

Como ya se dijo anteriormente, 24,03% de los HAP corresponden a aquellos con alto peso molecular (asociados a las partículas atmosféricas), El incremento en la proporción de HAP de alto peso molecular (menor volatilidad) es explicado perfectamente por el mayor flujo vehicular presente en toda la transecta donde se tomaron los especímenes, lo que implica un incremento en la cantidad de partículas provenientes de las emisiones de los vehículos, así como también de la remoción del polvo del suelo [72].

Lo antes descrito conduce a la suposición de que la contaminación a través del polvo es altamente variable y probablemente depende de las características locales de los sitios bajo estudio. De acuerdo a Simonich y Hites (1995) [72], los HAP de bajo peso molecular (HAPBPM) se acumulan más en forma gaseosa, ya que tienen mayor poder de penetración (debido a su naturaleza volátil) por lo que alcanzan la parte interna de la matriz vegetal, mientras que aquellos HAP enlazados a partículas están formados principalmente por los compuestos de alto peso molecular (HAPAPM), no volátiles, así que se acumulan sobre la superficie del espécimen. El alto porcentaje (68%) de presencia de HAP de bajo peso molecular puede deberse a que los especímenes fueron recolectado a alturas de 2 a 3 metros respecto al piso y en un área

con cobertura vegetal, no expuestos directamente a intensidad de radiación solar y por ende de temperatura que puedan acarrear reacción de fotooxidación como se nombró anteriormente, también influye drásticamente la naturaleza morfológica de esta planta del genero bromeliaceae [50].

La *Tillandsia Recurvata* (L).L es altamente dependiente de la atmósfera, de la cual toma sus nutrientes directamente en fase gas y a través de las deposiciones húmedas y secas. El perfil de HAP encontrado indica una mayor tendencia a bioacumular HAP de bajo peso molecular, principalmente porque estos son más volátiles y tienden a estar presentes en la fase gas, mientras, el mecanismo de acumulación de los HAP de mayor peso molecular generalmente se asocia a las partículas atmosféricas a través de las deposiciones secas [73].

Para explicar el perfil encontrado de la presencia de algunos HAP de bajo peso molecular en mayor concentración, por ejemplo el naftaleno que reacciona con radicales hidroxilo (-OH) y nitrato (-NO₃) a través de su adición a un anillo aromático [74], así como de algunos de alto peso molecular, mientras que otros no fueron determinados, se ha de tomar en cuenta la forma de crecimiento (biotipo) de la especie en estudio [75]. La morfología de cada especie puede influir sobre la tendencia de tomar los nutrientes procedentes de un tipo de deposiciones u otras y, por lo tanto, sobre la biomonitorización de un patrón de HAP determinado. Nos atrevemos a decir que la especie *Tillandsia Recurvata* (L).L presenta una estructura morfológica similar a la de los líquenes donde estos realizan la biosíntesis de metabolitos secundarios, principalmente depsidos y depsidonas. Estos son compuestos orgánicos con anillos que contienen radicales -OH altamente reactivos (efecto *orto*). Ellos suministran fácilmente este grupo para la formación de aductos. Por lo tanto los HAP (de carácter hidrofóbico) se combinan fácilmente con esta porción orgánica para formar aductos. La alta acumulación de HAP de dos y tres anillos puede deberse a que las especies contengan depsidos y depsidonas con grupos -OH activos, los que fácilmente se combinan con los HAP para formar los aductos mencionados [74].

7.4 Condiciones óptimas de los HAP empleando la técnica de extracción asistida por ultrasonido.

En la siguiente tabla se muestra en resumen las condiciones óptimas para cada uno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en estudio haciendo uso de la técnica de extracción asistida por ultrasonido:

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO									
PESO MOLECULAR	HAP	FACTORES							
		A		B		C		D	
		SOLVENTE		VOLUMEN (mL)		TIEMPO (min)		TEMPERATURA (°C)	
		NIVELES							
		-	+	-	+	-	+	-	+
		HEX:DCM (4:1)	DCM	15	30	15	30	20	40
BAJO	NAF					X		X	
	ACI					X		X	
	ACE								
	FLU					X		X	
	FEN					X		X	
	ANT					X		X	
MEDIANO	FLT					X		X	
	PIR					X		X	
	BaA					X		X	
	CRI					X		X	
ALTO	BbF					X		X	
	BkF					X		X	
	BaP					X		X	
	DahA								
	BghiP								
	IcdP					X			X

X: Condición óptima encontrada

HEX:DCM: mezcla hexano: diclorometano (4:1)

Tabla 17. Condiciones óptimas para cada uno de los 16 HAP en estudio.

De acuerdo a la información suministrada por la Tabla N° 17 donde muestra las condiciones óptimas para cada uno de los analitos en estudio, se puede deducir que de los cuatro (4) factores, sólo dos (2) de ellos tienen un nivel de significancia considerable y además una relación cuadrática con respecto a la media de datos de acuerdo al diseño factorial 2^4 , ellos son el factor CD (tiempo y temperatura) nivel (+), es decir, tiempo 30min y temperatura 40°C.

Al analizar el factor C (tiempo) y el factor D (temperatura) podemos observar en la Tabla 17 que el factor C con nivel (+) y factor D con nivel (+) presentan un valor óptimo de 30 min y 40°C para la mayoría de los analitos, entre los que se identificaron naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b] fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, e indeno[1,2,3-cd]pireno para la mayoría de los ensayos experimentales.

La información suministrada por la Tabla 17 permite establecer una serie de condiciones óptimas de acuerdo a las tendencias obtenidas, donde los factores C y D son los más influyentes, para deducir adecuadamente, consideraremos solo estos factores y al revisar las condiciones obtenidas óptimas con el diseño experimental (ver Tabla 8), como se observa en la Tabla 18 entran dentro de este rango los siguientes experimentos: 13, 14, 15 y 16.

Condiciones óptimas encontradas para la técnica de extracción por ultrasonido

Ultrasonido				
Experimento	Solvente	Volumen (mL)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
13	hexano: diclorometano (4:1)	15	30	40
14	diclorometano	15	30	40
15	hexano: diclorometano (4:1)	30	30	40
16	diclorometano	30	30	40

Tabla 18. Condiciones óptimas de la técnica de extracción asistida por ultrasonido para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

La Tabla 18 muestra las condiciones óptimas de extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos para la técnica de extracción asistida por ultrasonido. Para determinar la condición única se muestra un gráfico de concentraciones Σ (ng/g) vs analitos según su peso molecular.

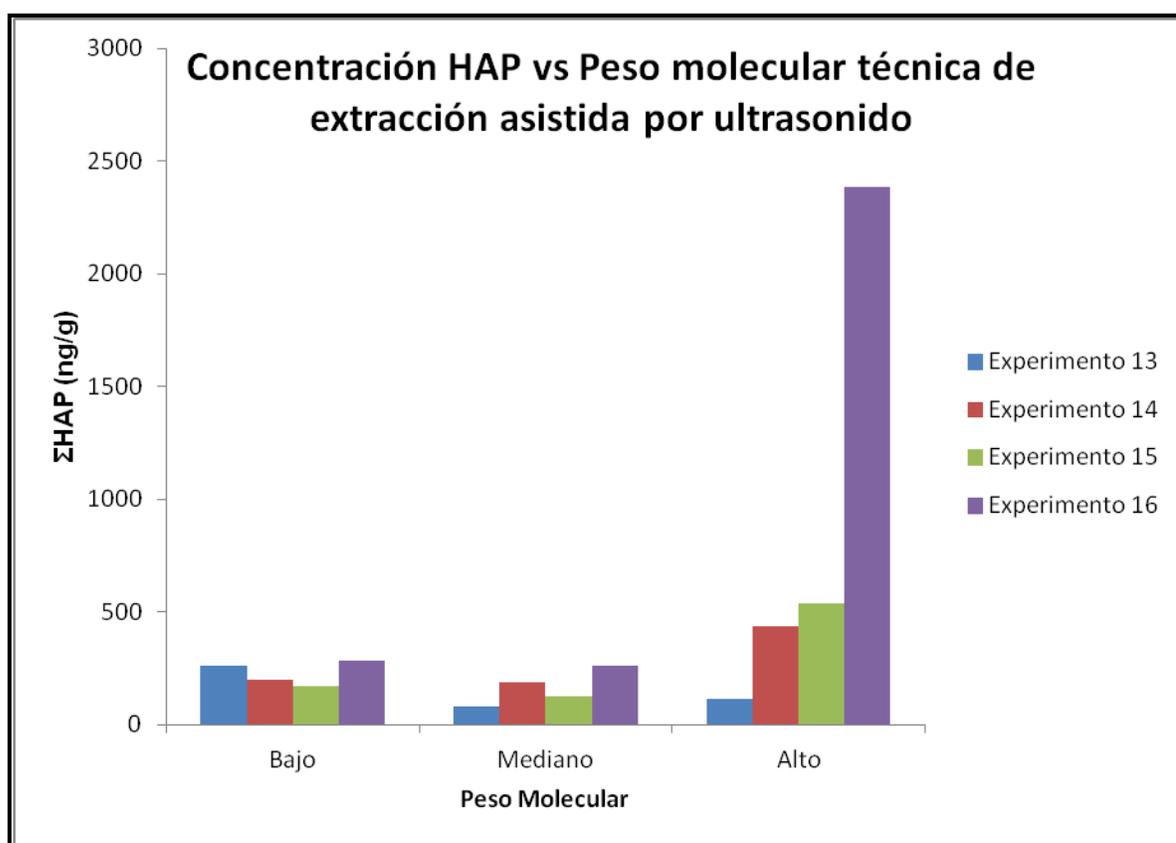


Gráfico 2. Concentración Σ HAP vs Peso molecular técnica de extracción asistida por ultrasonido.

Al observar el gráfico 2 destaca que el experimento 16 presenta mayor eficiencia de extracción con respecto a los otros 3 experimentos, produciendo este los resultados óptimos para la técnica de extracción asistida por ultrasonido. Como se observa en la Tabla 18 corresponde a los factores A (diclorometano) B (volumen: 30mL), C (tiempo: 30min) y D (temperatura: 40°C).

La figura 78 muestra el cromatograma obtenido bajo las condiciones consideradas como óptimas para los HAP encontrados en el experimento 16:

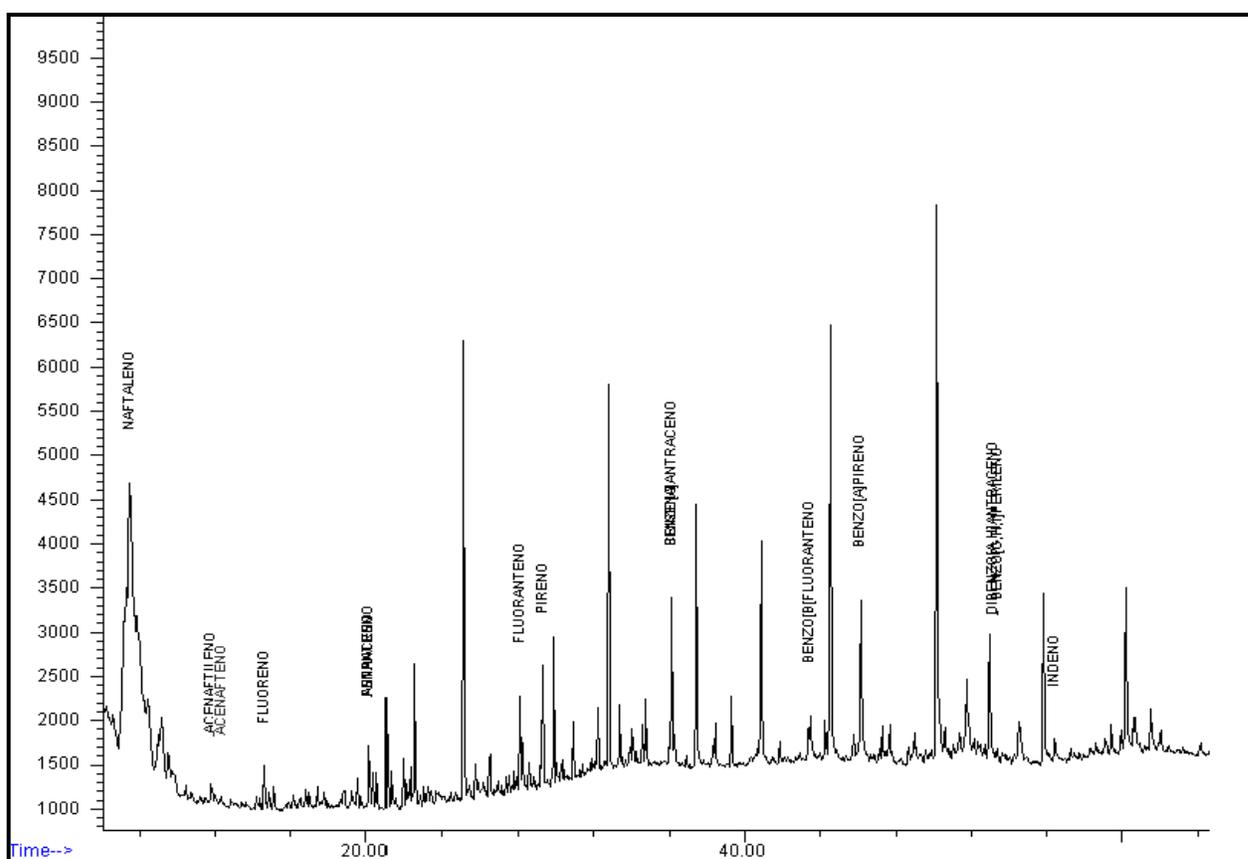


Figura 78. Cromatograma empleando la condición óptima para la extracción de HAP asistida por ultrasonido.

A continuación se discuten los parámetros de calidad analítica para la condición óptima de la extracción asistida por ultrasonido. En primer lugar se evalúa la precisión del método de extracción, donde se estudia el grado de concordancia de los datos obtenidos de forma independiente y bajo una misma condición experimental, realizando al menos tres réplicas de la condición óptima encontrada, entre ellos tenemos la desviación estándar (S), desviación estándar relativa (RSD), y el coeficiente de variación (CV). La tabla 19 muestra los HAP identificados, así como los valores de concentraciones obtenidos de HAP cuantificados para estos parámetros de acuerdo al cromatograma mostrado en la figura 78.

	Concentraciones (ng/g)	S	RSD	CV(%)
Naftaleno	163,2	9,50	0,058	5,821
Acenanftileno	36,84	0,400	0,011	1,086
Acenafteno	44,02	0,700	0,016	1,590
Fluoreno	27,91	7,865	0,282	28,18
Fenantreno	8,751	2,001	0,229	22,87
Antraceno	1,965	0,163	0,083	8,31
Fluoranteno	64,58	8,154	0,126	12,63
Pireno	141,3	7,805	0,055	5,52
Benzo[a]antraceno	30,01	2,256	0,075	7,517
Criseno	27,86	5,894	0,212	21,16
Benzo [b]Fluoranteno	510,3	0,360	0,001	0,071
Benzo[k] fluoranteno	ND	ND	ND	ND
Benzo [a]Pireno	1198	11,11	0,009	0,927
Dibenzo[a,h]antraceno	158,3	8,000	0,051	5,054
Benzo [g,h,i]Perileno	302,9	7,145	0,024	2,359
Indeno[1,2,3-cd]pireno	203,5	6,412	0,031	3,150
ΣHAP	2919			

ND: no detectado.

Σ(sumatoria).

Tabla 19. Concentraciones HAP condición óptima para la técnica de extracción por ultrasonido

Los resultados obtenidos muestran que para la condición óptima del método de extracción asistida por ultrasonido, la precisión es similar para los diferentes HAP evaluados, esto se puede corroborar con los valores de desviación estándar que muestra la desviación de los datos en su distribución respecto a la media aritmética. Para los parámetros de exactitud del método hay algunos términos principales a discutir: el porcentaje de recuperación y el error absoluto, ya explicados anteriormente

La tabla 20 muestra los resultados obtenidos para estos parámetros.

	Porcentaje de Recuperación (%)	Error absoluto
Naftaleno	95,44	3,256
Acenanftileno	81,56	8,564
Acenafteno	82,51	7,611
Fluoreno	91,10	8,224
Fenantreno	92,63	6,523
Antraceno	93,33	4,512
Fluoranteno	88,64	3,514
Pireno	93,71	6,332
Benzo[a]antraceno	94,40	5,147
Criseno	93,86	6,325
Benzo [b]Fluoranteno	85,12	10,154
Benzo [a]Pireno	92,62	5,984
Dibenzo[a,h]antraceno	86,57	10,231
Benzo [g,h,i]Perileno	84,02	8,645
Indeno	95,32	3,228

Tabla 20. Porcentajes de recuperación para la muestra optimizada por la técnica de extracción asistida por ultrasonido.

Las concentraciones obtenidas de HAP mostradas en la Tabla 19 para la condición óptima por medio del uso de la técnica de extracción asistida por ultrasonido se pueden comparar con resultados previos donde se hace uso de distintas matrices vegetales y la misma técnica de extracción anteriormente nombrada como se muestra en la Tabla 21.

HAP	Autor				
	Ibedaca J. - 2,014	Blasco M. <i>et al.</i> 2011 [76]	Fernández <i>et al.</i> 2011 [51]	Gómez 2011 [50]	Guidotti M. 2009 [61]
	Suroeste - Caracas - Venezuela	Valle de Aragon - España	Caracas - Venezuela	Caracas - Venezuela	Viterbo - Italia
	<i>Tllandsia Recurvata</i> (L). L	<i>E. Prunastri</i>	<i>Pyxine Coralligera</i>	<i>Parmotrema Sancti-angeli</i>	<i>Pseudovernia furfuracea</i>
HAP	Concentraciones (ng/g)				
Naftaleno	163,2	474,0	500,0	ND	6,000
Acenanftileno	36,84	85,00	2060	301,0	ND
Acenafteno	44,02	210,0	850,0	ND	ND
Fluoreno	27,91	509,0	430,0	ND	ND
Fenantreno	8,751	2059	60,00	240,0	64,00
Antraceno	1,965	140,0	ND	156,0	23,00
Fluoranteno	64,58	1170	ND	ND	107,0
Pireno	141,3	276,0	300,0	130,0	124,0
Benzo[a]antraceno	30,01	344,0	60,00	7,000	9,000
Criseno	27,86	119,0	ND	182,0	27,00
Benzo [b]Fluoranteno	510,32	186,0	160,0	135,0	10,00
Benzo[k] fluoranteno	ND	103,0	170,0	340,0	7,000
Benzo [a]Pireno	1198	92,00	ND	187,0	1,000
Dibenzo[a,h]antraceno	158,3	123,00	470,0	91,00	
Benzo [g,h,i]Perileno	302,9	153,0	ND	59,00	10,00
Indeno	203,58	ND	ND	2310	7,000
ΣHAP	2919	6043	5060	4138	395

ND: no detectado Σ(sumatoria).

Tabla 21. Comparación del trabajo actual con otras investigaciones en términos de HAP identificados en matrices vegetales por ultrasonido por CG/EM.

Las concentraciones obtenidas de HAP mostradas en la Tabla 21 para la condición óptima por medio del uso de la técnica de extracción asistida por ultrasonido indica una cantidad de HAP totales ($\Sigma\text{HAP} = 2.919$) ng/g y una identificación de 15 de 16 HAP, con una concentración mínima de HAP de 1,965 ng/g y una concentración máxima de 1198 ng/g. Estos resultados los podemos comparar con resultados previos donde se hace uso de distintas matrices vegetales y la misma técnica de extracción anteriormente nombrada, con el fin de evaluar la capacidad de bioacumulación de la especie en estudio, como se muestra en la Tabla 21 donde los autores Blasco *et al.* 2011 identifican 15 de los 16 HAP con una ($\Sigma\text{HAP} = 6.043$)ng/g encontrando concentraciones máximas obtenidas en el Valle de Aragón haciendo uso del líquen *E. Prunastri* y muestreo pasivo, también Fernández *et al* 2011, haciendo uso del líquen *Pyxine Coralligera* en la ciudad de Caracas identifican 10 de 16 HAP en el punto de La Floresta, con una $\Sigma\text{HAP} = (5.060)$ ng/g, como se puede observar existe variabilidad en las ΣHAP de cada uno de los autores, así como los de Gómez 2011 y Guidotti 2009, esto se explica debido a que estos estudios se realizaron por variabilidad de puntos geográficos, de sitios considerados más contaminados en distintas ciudades haciendo uso de una matriz vegetal.

En los resultados obtenidos para las concentraciones de HAP de la muestra óptima que se observan en la Tabla 19 y en el gráfico 2 indican un mayor porcentaje de HAP de alto peso molecular (5 y 6 anillos), como se observa en la Tabla 22.

Porcentajes Ultrasonido (%)	Experimento 16 (%)
Bajo	9,68
Mediano	9,03
Alto	81,3
	100

Tabla 22. Porcentajes de HAP según su peso molecular

Es importante destacar que existe predominancia de HAP de alto peso molecular (81,28%) debido a las altas concentraciones de benzo[a]pireno encontradas, donde el único HAP no determinado fue el benzo[k]fluoranteno. Para poder explicar los comportamientos encontrados de los distintos HAP es necesario conocer que la presencia de los de alto peso molecular de acuerdo a Simonich y Hites (1995) [72] no volátiles se acumulan sobre la superficie del espécimen, de acuerdo a su constante de partición se encuentran en fase partícula, lo que implica un incremento en la cantidad de partículas provenientes de las emisiones de los vehículos, así como también de la remoción del polvo del suelo.

Sin embargo, a pesar de que se empleó una muestra representativa haciendo uso de dos técnicas de extracción, existe variabilidad en los porcentajes extraídos de HAP de alto y bajo peso molecular, la técnica de ultrasonido muestra un mayor porcentaje de HAP de alto peso molecular, esto se explica posiblemente por la incidencia de la técnica, las ondas de ultrasonidos provocan la vibración de las moléculas aumentando la eficacia de los choques entre ellas y debilitando así las interacciones entre los analitos y la matriz [32], provocando la remoción principalmente de los HAP de alto peso molecular en la superficie del espécimen, y bajando el porcentaje de los HAP que se encuentran en fase gaseosa (HAPBPM). Sin embargo hay que destacar que influye mucho la morfología de la matriz vegetal en estudio y su capacidad de bioacumulación.

También se debe tomar en cuenta el tiempo y la temperatura que fue necesaria para la muestra óptima, haciendo uso de tiempos prolongados y una temperatura relativamente baja, el uso de solvente diclorometano, aunque no significativa para el diseño factorial, es la tendencia que muestra para esta técnica de extracción.

Contrastando con los resultados obtenidos por Blasco 2008 [2] donde explica que el solvente de extracción con valores de recuperación más elevados fue el hexano, esto se puede explicar básicamente porque la matriz vegetal usada por Blasco 2008 [2] fue el líquen *Xanthoria Parietina* empleando ultrasonido dinámico donde indica unos resultados de recuperación que se pueden comparar con los obtenidos en este estudio:

	Porcentajes de recuperación (%)	
	Ibedaca J. 2014	Blasco 2008
Naftaleno	95,44	70
Acenanftileno	81,56	79
Acenafteno	82,51	69
Fluoreno	91,1	74
Fenantreno	92,63	73
Antraceno	93,33	71
Fluoranteno	88,64	88
Pireno	93,71	89
Benzo[a]antraceno	94,4	91
Criseno	93,86	81
Benzo [b]Fluoranteno	85,12	82
Benzo[k] fluoranteno	ND	92
Benzo [a]Pireno	92,62	86
Dibenzo[a,h]antraceno	86,57	87
Benzo [g,h,i]Perileno	84,02	83
Indeno	95,32	ND

Tabla 23. Comparación de porcentajes de recuperación obtenidos vs otra investigación usando matriz vegetal y análisis por GC-MS.

Como se puede observar los resultados de recuperación obtenidos por Blasco 2008 [2] son más bajos que los obtenidos en este estudio, esto puede deberse a la eficiencia de extracción en cuanto a las condiciones implementadas, como solvente y tiempo de extracción.

Las pruebas de recuperación fueron efectuadas con la finalidad de evaluar el sesgo o error sistemático en el tratamiento químico de las muestras, teniendo en cuenta que los compuestos analizados se encuentran en concentraciones muy bajas (microcontaminantes), a la inexistencia de una metodología validada para el análisis de este tipo de compuestos en matrices vegetales del tipo bromeliáceas y al amplio rango de propiedades físico-químicas de dichos compuestos.

Los resultados evidencian que los mayores porcentajes de recuperación, para ambas técnicas de extracción (microondas y ultrasonido), fueron obtenidos para los HAP de 4, 5 y 6 anillos aromáticos (un promedio de aproximadamente 84% para microondas y 90% para ultrasonido). Dicho comportamiento evidencia que la volatilidad (incluso con capacidad de sublimar) de los HAP de bajo peso molecular sigue siendo un factor clave en la determinación exacta de estos compuestos. Este comportamiento también fue descrito por Guidotti *et al.* (2003) [39], Domeño *et al.* (2006) [40] y Réquiz (2006) [47], entre otros investigadores. El aumento de temperatura en el caso de la técnica de microondas, con el posterior empleo del rotoevaporador afecta la recuperación de los HAP. Asimismo, al tratarse la extracción estática asistida por ultrasonido de un sistema abierto, que a pesar de que se optimizó este paso haciendo uso de tubos de vidrio con tapas esmeriladas, permitió hacer una especie de “reflujo” en el envase evitando así la pérdida de los analitos por evaporación.

La filtración simple empleando papel de filtro convencional constituye otra potencial fuente de pérdida de dichos compuestos. García *et al.* (1999) [77] señalan algunas ventajas de la técnica de centrifugación y posterior decantación del extracto orgánico, en términos de separación de las fases líquida y sólida, en comparación con la técnica de filtración.

Las sucesivas transferencias y reconstituciones de las fracciones aromáticas purificadas, contribuyen a la pérdida de los compuestos durante el tratamiento químico de las muestras, teniendo en cuenta las bajas concentraciones en las cuales están dichos compuestos en la matriz vegetal.

Guidotti *et al.* (2003) [39] y Réquíz (2006) [40] reportan porcentajes de recuperación entre 43-86 % y 65-96 % respectivamente, por lo que tienden a ser inferiores a los obtenidos en esta investigación. Dichos porcentajes de recuperación son consecuencia de un conjunto de errores aditivos asociados a las distintas etapas del tratamiento químico de las muestras [78].

7.5 Importancia del secado de muestras vegetales.

A continuación se indica una tabla de diversos estudios realizados recientemente en muestras vegetales como punto adicional a esta investigación:

Especie	Lugar	Σ HAP (ng/g)	Metales μ g/g)	Tipo de monitoreo y zona	Secado de muestra	Referencia
<i>Tillandsia recurvata</i> (L.) L	Suroeste Caracas - Venezuela	1,965-1198		P, área urbana	70°C - 2 horas	Ibedaca (2014).
<i>O. europaea</i>	Sureste de Italia	520-1800		A, área industrial	75°C - 2horas	De Nicola (2014) ^[79]
<i>Tillandsia usneoides</i>	Pisa - Italia		Al, Ba, Bi, Cd, Co, Cu, Pb, Sb y Zn (11-155)	A, área urbana	35°C -24horas	Nali (2014) ^[80]
<i>Pinus halepensis</i>	Barcelona - España	60-417		P, ecosistema natural	105°C - 24h	Van Drooge (2014) ^[81]
<i>Tillandsia capillaris</i>	Córdoba - Argentina	231-532		A, área urbana	no menciona	Wannaz (2013) ^[82]
<i>Tillandsia recurvata</i> (L.) L	Suroeste Caracas - Venezuela		Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, V y Zn (2,97-137)	P, aréa urbana	70°C -2 horas	Pinto J. (2013) ^[54]
<i>Tillandsia recurvata</i> (L.) L	Valle del Mezquital - México	143-2568		A, área rural	90°C - 24horas	Zambrano (2009) ^[41]

Tabla 24. Especies de muestras de origen vegetal empleadas como biomonitores de la contaminación atmosférica, área geográfica de estudio, Σ HAP totales o rango de concentraciones, rango de concentraciones de metales, tipo de monitoreo (P)=pasivo, (A)= activo, secado de muestra y tiempo y referencia bibliográfica.

La *Tillandsia Recurvata* (L) L. espécimen en estudio de este trabajo de investigación presenta un alto porcentaje de humedad superior al 70% por cada espécimen, como lo demostró Pinto J 2013 [54] en la misma área de estudio. El alto valor obtenido se explica porque estas plantas absorben la humedad de la atmósfera y la depositan en las células presentes en su epidermis denominados “tricomas”, este es su sistema para captar nutrientes disueltos en la humedad del aire y poder sobrevivir en diferentes ambientes.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden existir en forma gaseosa o sólida (fase partícula), la solubilidad de estos compuestos en agua depende básicamente de su estructura química, la solubilidad en agua decrece a medida que los HAP en estudio aumentan su peso molecular, mientras que su solubilidad en lípidos aumenta, de allí sus propiedades lipofílicas y sus tendencias a acumularse con la materia orgánica dentro de la matriz vegetal , los HAP más volátiles entran en las plantas principalmente a través de la difusión gaseosa por los estomas abiertos, aunque la absorción de la mayoría de los HAP se logra por la intercepción de estos analitos tanto en partículas y fase vapor a través de sus tejidos y los más pesados se acumulan en la superficie. [66] El secado de esta planta permite la desorción de los analitos presentes en las partes más internas de la planta [61] y además se evita la proliferación de microorganismos [83], siempre manteniendo unos rangos de temperaturas que no resulten drásticos para la especie vegetal y evitar pérdidas de los analitos.

7.6 Comparación de las técnicas de extracción asistida por microondas y ultrasonido

En los apartados anteriores se demostró que tanto la extracción asistida por microondas como el método de extracción asistida por ultrasonido tienen parámetros estadísticos de precisión y exactitud aceptables para la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos estudiados en una muestra representativa de *Tillandsia Recurvata* (L) L., por tanto se puede emplear cualquiera de los dos métodos para el análisis, por lo que surge la discusión de cual método es más conveniente al momento de ser aplicado. Al analizar los resultados obtenidos para las condiciones óptimas se pueden resumir como muestra la Tabla 25.

Términos considerados	Extracción asistida por microondas	Extracción asistida por ultrasonido
Σ HAP (ng/g)	1491	2919
Recuperación promedio	83,33	90,05
Volumen (mL)	15	30
Tiempo (min)	30	30
Temperatura (°C)	115	40
N° HAP cuantificados	13	15
Solvente	mezcla hexano: diclorometano (4:1)	diclorometano
HAP no identificados	Acenafteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno	Benzo[k]fluoranteno
HAP	Predomina HAPBPM	Predomina HAPAPM

* HAPBPM =HAP bajo peso molecular

*HAPAPM= HAP alto peso molecular

Tabla 25. Términos considerados de comparación de técnicas en base a muestra óptima

Para la técnica de extracción asistida por microondas muestra una sumatoria de los HAP en ng/g se obtiene (Σ HAP = 1491ng/g), favoreciendo en porcentaje a los HAP de bajo peso molecular, un porcentaje de recuperación promedio de 83,33% y una identificación de 13 de 16 HAP, mientras que para ultrasonido se obtiene (Σ HAP =

2919ng/g) y un porcentaje que favorece a los HAP de alto peso molecular , un porcentaje de recuperación promedio de 90,05% y una identificación de 15 de 16 HAP.

Al momento de discernir que técnica de extracción a usar se puede considerar cada uno de los análisis realizados para las condiciones óptimas para cada una de las técnicas como muestran las tablas resúmenes 11 y 17 dependiendo del analito que se quisiera extraer en mayor proporción trabajando con las condiciones de este trabajo de investigación, serán las adecuadas.

De acuerdo a la Tabla 11 al considerar los términos se puede analizar para microondas el solvente ideal fue la mezcla hexano: diclorometano (4:1) que permitió la desorción más eficiente de los analitos identificados, sin embargo para ultrasonido el más eficiente fue el diclorometano, esto se puede explicar por medio de la técnica que se usa, en el caso de microondas este trabaja a frecuencias bastantes elevadas que inciden mayormente en el corazón de la muestra, que conducen a un calentamiento rápido y a un aumento de la temperatura, seguido por rotura de las paredes y la liberación de los analitos, la naturaleza del disolvente es de suma importancia, los HAPAPM se encuentran en forma de partículas generalmente sobre la superficie del espécimen, de aquí se analiza la diferencia que existe entre los proporciones de HAPBM y HAPAPM.

En cuanto al volumen, para microondas se usa una menor cantidad de volumen que para ultrasonido, esta última exige el doble de la usada en microondas para la interacción del analito, si nos referimos al tiempo para microondas según los últimos análisis realizados en la discusión de los resultados, no resultó relevante el tiempo, al igual que la temperatura, ello indica que usar menores temperaturas y menores tiempos de extracción podemos obtener resultados semejantes. Para ultrasonido las variables tiempo y temperatura fueron claves, por lo que la variación de uno de estos parámetros influenciaría en los resultados en cuanto a eficiencia de extracción.

Para poder escoger una técnica se deberá hacer en base al interés que se tiene como analista y a los recursos disponibles al momento de trabajar con los métodos de extracción, una visualización clara se obtendría de acuerdo a la siguiente tabla 27.

Consideraciones	Aspectos positivos y negativos de las técnicas de extracción.	
	Microondas	Ultrasonido
Costo de la técnica	Costoso (8.000-10.000)\$	Económico (500-1.200)\$
Tiempos de extracción	15-30min	30min
Volúmenes usados	15mL-30mL	30mL
Temperaturas	100-115°C	20-40°C
Solventes	Mezcla de solventes, uno de ellos de características polares	Solventes orgánicos similares a los analitos a extraer
Recipientes de extracción	Extracción asistida por microondas presurizada (PMAE) -greenchem	Recipientes de vidrio con tapas esmeriladas.
Sistema de extracción	Sistema a presión, control de temperatura, evita evaporación del solvente	Presión atmosférica - evaporación de solvente en mayor proporción
Número de extracciones	Hasta 12 extracciones simultáneas bajo las mismas condiciones	Límitadas de acuerdo al tamaño del baño de ultrasonido
Tratamiento pre de muestra	Laborioso, necesita un vaso control y un montaje de cada uno de los envases	Sencillo
Tratamiento post de muestra	Laborioso, necesita filtrado de la muestra y posterior limpieza de los extractos	Laborioso, necesita filtrado de la muestra y posterior limpieza de los extractos

Tabla 27. Aspectos positivos y negativos de las técnicas de extracción de microondas y ultrasonido.

Al momento de discernir que técnica de extracción a usar se puede considerar cada uno de los análisis realizados para las condiciones óptimas para cada una de las técnicas como muestran las tablas resúmenes 11 y 17 dependiendo del analito que se quisiera extraer en mayor proporción trabajando con las condiciones de este trabajo de investigación, así como la técnica que se quiera implementar en base a los pro y los contra de las técnicas descritas en la tabla 27 resultarán las más adecuadas.

8. CONCLUSIONES

Sobre la base de los estudios realizados pueden derivarse las siguientes conclusiones:

- ✓ En la especie *Tillandsia Recurvata* (L). L pudieron determinarse: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo [a,h]antraceno, benzo [g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno. La concentración de Σ HAP varía entre 1491 – 2919 nanogramos por gramo. Lo anterior evidencia el potencial de esta como biomonitor de HAP.
- ✓ El perfil de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (contribución de cada compuesto a la suma de los 16 HAP) en la especie *Tillandsia Recurvata* (L). L, indica la presencia de una gama de compuestos desde bajo hasta alto peso molecular, donde las concentraciones de naftaleno y benzo[a]pireno son las más altas.
- ✓ El diseño experimental por análisis factorial para la técnica de extracción asistida por microondas determinó que la condición óptima corresponde con el uso de una mezcla de solventes hexano:diclorometano (4:1), un volumen de extracción de 15mL.
- ✓ El diseño experimental por análisis factorial para la técnica de extracción asistida por ultrasonido evidenció que la condición óptima corresponde con el uso de un tiempo de 30min y una temperatura de 40°C.
- ✓ Las técnicas de extracción asistida por microondas y ultrasonido resultaron válidas para la extracción de los distintos HAP en esta matriz vegetal, por lo que la elección de alguna de ellas para estudio científico dependerá de los objetivos del estudio.

- ✓ La *Tillandsia Recurvata* (L). L constituyen una especie potencial de control de la calidad del aire alternativo, de bajo costo, de fácil recolección, manipulación y procesamiento, y con su uso es posible continuar evaluando la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos a través del tiempo.

9. RECOMENDACIONES

El presente estudio permite realizar las siguientes sugerencias sobre las posibles aplicaciones de los resultados obtenidos y señalar recomendaciones para investigaciones futuras.

- ✓ Aplicar un muestreo pasivo y activo haciendo uso de la *Tillandsia Recurvata* (L). L para establecer tendencias espaciales de la distribución de HAP y tener una visión completa del sistema bajo estudio (mapas de isoconcentración).
- ✓ Elaborar relaciones expuesto control (relación E/C) en relación a la concentración de HAP en la planta antes y después de ser expuesto a las condiciones de un ambiente urbano a fin de profundizar en las características de la *Tillandsia Recurvata* (L). L como biomonitor y bioacumulador.
- ✓ Para la técnica de extracción asistida por microondas evaluar rangos de temperaturas menores a los usados en este trabajo de investigación a fines de comparar porcentajes de recuperación de los distintos hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- ✓ Realizar estudios en matrices liquénicas haciendo uso de las mismas técnicas y condiciones experimentales a fin de comparar sus capacidades bioacumulativas.
- ✓ Implementar una red de biomonitoreo con el uso de *Tillandsia Recurvata* (L). L para HAP en distintas áreas urbanas a futuro.

- ✓ Desarrollar estudios sistemáticos que permiten la correlación entre datos de biomonitorio de los contaminantes del aire y datos epidemiológicos relativos a las enfermedades respiratorias y cardiovasculares, a fin de establecer mecanismos de control de la contaminación que protejan la salud de los ciudadanos a futuro.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bonet Sánchez, Antonio. Gran enciclopedia educativa. Ediciones Zamora Ltda. México, Panamá, Colombia, España; 1991.
- [2] Blasco Bigatá, María C. Evaluación analítica de líquenes como biomonitores de la contaminación atmosférica en ecosistemas naturales a través de la determinación de PAHs. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. España; 2008.
- [3] Slaski, J.J, Archambault, D.J, Li, X. (Air Research Users Group, Edmonton, Alberta, Canada). [Reporte]. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in plants. The potential use of PAH accumulation as a marker of exposure to air emissions from oil and gas flares. 2000. Disponible en: ISBN 0-7785-1228-2.
- [4] Piñeiro-Iglesias, M, Miñones-Vázquez, M, Vázquez-Blanco, E, Muniategui-Lorenzo, S, López-Mahía, P, Prada-Rodríguez, D. A new method for the simultaneous determination of PAH and metals in samples of atmospheric particulate matter. *Atmospheric Environment*. 2003; 37: 4171–4175.
- [5] Orozco C, Pérez A.; González M.; Rodríguez F.; Alfayate J. Contaminación Ambiental (Una visión desde la Química). 1ª. Ed. Madrid. España. Thomson Editores; 2004. p. 301-326.
- [6] Conde F.J, Ayala J.H, Alfonso A.M, González V. Emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from combustion of agricultural and silvicultural debris. *Atmospheric Environment*. 2005; 39: 6654-6663.

- [7] Lee J.H, Giglotti C.L, Offenbergl J.H, Eisenreich S.J, Turpin B.J. Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons to the Hudson River Airshed. *Atmospheric Environment*. 2004; 38: 5971-5981.
- [8] Boström C-E, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, Rannung A, Törnqvist M, Victorin K, Westerholm R. Cancer risk assessment, indicators and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspective*. 2002; 110: (Supl. 3) 451- 489.
- [9] Rehwagen M, Müller A, Massolo L, Herbarth O, Ronco A. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial area. *The Science of the Total Environment*. 2005; 348:199-210.
- [10] Lehndorff E.; Schwark L. Biomonitoring of air quality in the Cologne Conurbation using pine needles as a passive sampler Part II: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Atmospheric Environment*. 2004; 38: 3703-3808.
- [11] González C.M, Pignata M.L, y Orellana L. Applications of redundancy analysis for the detection of chemical response patterns to air pollution in lichens. *The Science of the Total Environment*. 2003; 312: 245-253.
- [12] Vives L, Grimalt J, Guitart R. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Revista Apuntes de Ciencia y tecnología nº 3*. Asociación para el Avance de la Ciencia y la Tecnología en España (AACTE). 2001. España.
- [13] Ortiz R, Siebe C, Díaz G, Cram S. Fuentes de hidrocarburos en suelos orgánicos. *Revista Terra Latinoamericana*. 2007; 25: (Supl. 2) 105-113.

- [14] Bucheli T, Blum F, Desaulles E, Gustafsson O. Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon, and molecular markers in soils of Switzerland. *Chemosphere*. 2004; 56: 1061-1076.
- [15] Wolterbeek B, Sarmiento S, Verburg T. Is there a future for biomonitoring of elemental air pollution. A review focused on a larger-scaled health-related (epidemiological) context. *J. Radional. Nucl Chem*. 2010; 286: 195-210.
- [16] Conti, M.E, Cecchetti, G. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment – a review. *Environmental Pollution*. 2001; 114: 471-492 pp.
- [17] Bealey W, Long S, Spurgeon D, Leith I, Cape J. Review and Implementation study of biomonitoring for assessment of air quality outcomes. Environment Agency. Science Report. 2008. Disponible en: SC030175/SR2.
- [18] Villanueva Z. Calidad del aire en la Asunción. Informe. Proyecto de cooperación técnico; 2008.
- [19] Weberbauer. “El Mundo Vegetal de los Andes. Peruanos”. Estudio Fitogeográfico- Nueva edición revisada y ampliada, de Die Pflanzenwelt der peruanischen Anden- Leipzig, Wilhelm Engelmann. 1911. Estación Experimental Agrícola de la Molina Dirección de Agricultura Ministerio de Agricultura Lima. Universidad de Michigan; 1945.
- [20] Vivas Y, Holst B. Simposio monocotiledóneas en Venezuela, aspectos taxonómicos y de biodiversidad de la familia Bromeliácea en Venezuela. *Revista Fundación Instituto Botánico de Venezuela*. 2007; 2156.

- [21] Castellanos, Vargas I. et al. Efecto de *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae) Sobre el Éxito Reproductivo de *Fouquieria splendens* Engelm. (Fouquieriaceae). *Revista Ciencia Forestal en México*. 2009; 34: 105.
- [22] Valverde, Bernal. Asincronía demográfica entre poblaciones locales de *Tillandsia recurvata*: evidencias de su funcionamiento metapoblacional. Grupo de Ecología de Poblaciones, Departamento de Ecología y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, México; 2002.
- [23] Silvia Aguilar-Rodríguez. Modificaciones en la corteza de *Prosopis laevigata* por el establecimiento de *Tillandsia recurvata*. *Bol.Soc.Bot.Méx.* 2007; 81:00-00.
- [24] *Tillandsia Recurvata* (L) L. [Internet]. [Consulta el 12 de Diciembre de 2012]. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Tillandsia_recurvata
- [25] Zambrano, A. Estudio de las emisiones de la zona industrial de tula y su impacto en la calidad del aire regional. [Reporte]. Dirección de seguridad y medio ambiente; 2006; No. PS-MA-IF-F21393-1.
- [26] Cámara C, Fernández P, Martín-Esteban A, Pérez-Conde C, Vidal M. Toma y tratamiento de muestras. Ed. Síntesis; 2002.
- [27] Hawthorne S.B, Yang Y, Miller D.J. Extraction of organic pollutants from environmental solids with sub- and supercritical water. *Analytical Chemistry*. 1994; 66: 2912-2920.
- [28] Clark, J, Macquarrie, D. *Handbook of Green Chemistry and Technology*. Gran Bretaña. 1ª edición: Blackwell publishing; 2002.

- [29] Sánchez-Brunete C, Miguel E, Tadeo J.L. Multiresidue analysis of fungicides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and gas chromatography. *Journal of Chromatography*. 2002; 976: 319-327.
- [30] Arrojo S, Nerín C, Benito. Application of salicylic acid dosimetry to evaluate hydrodynamic cavitation as an advanced oxidation process. *Ultrasonic Sonochemistry*. 2007; 14: 343-349.
- [31] Sánchez C, Carlsson H, Colmsjö A, Crescenzi C, Battle R. Determination of nitroaromatic compounds in air samples at femtogram level using C18 membrane sampling and on-line extraction with LC-MS. *Analytical Chemistry*. 2003; 75: 4639-4645.
- [32] Suslick K.S. *Ultrasound. Its chemical, physical and biological effects*. VCH. Publishers, Inc: New York, USA. 1998.
- [33] De los Santos M, Batlle R, Salafranca J, Nerín C. On the extractability of paper samples: Subcritical water and dynamic sonication-assisted solvent extraction of fluorescent whitening agents and azo dyes. *Journal of Chromatography A*. 2005; 1064: 135-141.
- [34] V. Camel, Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Trends Anal. Chem.* 2000; 19: 229.
- [35] Skoog, D.; Holler, F.; Nieman, T. *Principios de Análisis Instrumental*. 5^a edición. Madrid: Mc Graw Hill; 2001.

- [36] Agilent Technologies. Guía de Selección de Columnas Agilent J&W para GC 5989-6159ES. Agilent Technologies Inc. 2007.
- [37] Montgomery Runger. Probabilidad y Estadística Aplicadas a la Ingeniería. 2^{da} ed. Limusa Wiley.
- [38] Brighigna L, Papini A, Mostl S, Cornia A, Bocchini P, Galletti G. The use of tropical bromeliads (*Tillandsia* spp.) for monitoring atmospheric pollution in the town of Florence, Italy. *Revista Biológica Tropical*. 2002; 50(2): 577-84.
- [39] Guidotti, M, Stella, D, Owczarek, M; De Marco, A; De Simone, C. Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *Journal of Chromatography A*. 2003; 985: 185-190.
- [40] Domeño, C; Blasco, M; Sánchez, C; Nerín C. A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichens samples used as biomonitors of air pollution: Dynamic sonication versus other methods. *Analytica Chimica Acta*. 2006; 569: 103-112.
- [41] Zambrano A, Medina C, Rojas A, López D, Chang L, Sosa G. Distribution and sources of bioaccumulative air pollutants at Mezquital Valley, Mexico, as reflected by the atmospheric plant *Tillandsia recurvata* L. *atmospheric chemistry and physics discussions*. 2009. Vol. 9: 5809–5852.
- [42] Vareschi, V. La Influencia de los Bosques y Parques sobre el Aire de la Ciudad de Caracas. *Acta Científica Venezolana*. 1953. 4: (Supl. 3) 89-95.
- [43] Tugues J. Las plantas como indicadores de plomo en la atmósfera. *Acta Botánica de Venezuela*. 1976; 107-173.

- [44] Jaffé R, Carrero H, Cabrera A, Alvarado J. Organic compounds and heavy metals in the atmosphere of the city of Caracas, Venezuela. I Atmospheric particles, water, air and soil pollution. 1992. Vol. 71: 293-313.
- [45] Catriona A. Gordon, Rafael Herrera and Tom C. Hutchinson. The Use of Common Epiphytic Lichen as a Bioindicator of Atmospheric Inputs to Two Venezuelan Cloud Forests. *Journal of Tropical Ecology*. 1995. Vol. 11: (Supl. 1). 1-26.
- [46] Ceballos Á. Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos presentes en partículas atmosféricas de dos sectores de Caracas, Parque del Este y Santa Eduvigis. Tesis de pregrado en Química. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 2002.
- [47] Requíz M. Determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos utilizando líquenes como bioacumuladores en estudios de contaminación atmosférica en el área de la ciudad de Caracas. Tesis de pregrado en Química. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 2006.
- [48] Mendoza K. Desarrollo de una metodología para la determinación de HAP en muestras de partículas atmosféricas utilizando microextracción en fase sólida en espacio confinado. Tesis de pregrado en Química. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 2008.
- [49] Arguello E. Distribución de metales pesados entre la Quebrada Quintero y Altamira- Caracas empleando líquenes y Bromeliáceas como biomonitores de contaminación atmosférica. Tesis de pregrado en Química. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 2009.

- [50] Gómez H. Evaluación de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos, empleando el líquen *Parmotrema sancti-angelii* y aplicando un muestreo de tipo activo en la ciudad de Caracas. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 2010.
- [51] Fernández, Galarraga F, Benzo Z, Márquez G, Fernández A, Requiz M, Hernández J. Lichen as biomonitors for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Caracas Valley, Venezuela. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2011. Vol. 91; 230-240.
- [52] Instituto Nacional de Estadística. [Internet]. Venezuela: Demografía y Vehículos en el Distrito Capital [Consulta 1 de Abril de 2013]. Disponible en: <http://www.ine.gov.ve>.
- [53] MARN-PDVSA. Informe de la calidad del aire en las principales ciudades de Venezuela (periodo enero- agosto). Dirección general de calidad ambiental. 2005.
- [54] Pinto J. Estudio de metales pesados al suroeste del área metropolitana de Caracas empleando *Tillandsia recurvata* (L.) L. como biomonitor de contaminación atmosférica. Caracas, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 2013.
- [55] Observatorio ARVAL. [Internet]. Venezuela: Lluvia y temperatura en Venezuela [Consulta el 14 de Mayo de 2012]. Disponible en: <http://www.oarval.org/PluvVNZ.htm>.

- [56] Shukla, V, Upreti, D. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in lichen, *Phaeophyscia hispidula* of DehraDun City, Garhwal Himalayas. Environment Monitoring Assess. 2008; 149 (1-4):1-7. Disponible en: DOI 10.1007/s10661-008-0225-6.
- [57] Migaszewski, Z, Galuszka, A, Paslawski, P. Polynuclear aromatic hydrocarbons, phenols, and trace metals in selected soil profiles and plant bioindicators in the Holy Cross Mountains, South - Central Poland. Environment International. 2002; 28: 303-313.
- [58] Moreno, E, Sánchez, A, Hernández, J. Guía Ilustrada de Hongos Liquezados en Venezuela. Caracas: Ediciones del Departamento de Publicaciones de la Fundación Instituto Botánico de Venezuela. 2007.
- [59] Yuen Shu, Youn, et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments reference materials by microwave-assisted extraction. Chemosphere. Vol. 41: 1709-1716.2000.
- [60] EPA Protocol, 3630C – 15. Silica Gel Cleanup. Revision 3. December 1.996.
- [61] Guidotti, M, Stella, D, Dominici, C, Blasi, G, Owczarek, M, Vitali, M, Protano, C. Monitoring of Traffic-Related Pollution in a Province of Central Italy with Transplanted Lichen *Pseudovernia furfuracea*. Bull Environmental Contamination Toxicological; 83: 852-858.2009.
- [62] Standard Reference Material SRM 1647e. Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons .National Institute of Standards & technology (NIST).

- [63] Gravimetric Certificate, 16 Priority PAH, EPA method 610, Cocktail 2. Product. N° S-4064-10-5CY. Batch N° 2871. Chiron AS. Trondheim Norway.
- [64] Statpoint technologies inc. Statgraphics ® versión 16.2 32bits, [programa de computadora]. Página web: <http://www.statgraphics.com/statpoint.htm> visitada el 6 de Enero de 2014.[Internet].
- [65] Salas Janeth, Benzo Zully, Rodriguez Leonardo diseño factorial para la optimización de las condiciones experimentales para la determinación de Rutenio por espectroscopia de absorción atómica por llama [Trabajo Especial de Grado] mayo 1995 Universidad del Zulia.
- [66] Slaski, J.J., Archambault, D.J., Li, X.,. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in plants. The potential use of PAH accumulation as a marker of exposure to air emissions from oil and gas flares. ISBN 0-7785-1228-2. Report prepared for the Air Research Users Group, Alberta Environment, Edmonton, Alberta.2000.
- [67] Brunialti, G., Frati, L. Biomonitoring of nine elements by the lichen *Xanthoria parietina* in Adriatic Italy: A retrospective study over a 7- year time span. *The Science of the Total Environment*, 387:1-3, 289-300. 2007.
- [68] Thompson, Michael; Ellison, Steven; Fajgel, Aleo; Willett, Paul y Wood, Roger Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC, Septiembre reporte técnico IUPAC/ISO/AOAC INTERNATIONAL/EUROCHEM

como resultado del symposium on harmonization of quality assurance, Orlando, USA.1996.

- [69] Souza Pereira M. Persistent organic pollutants in atmospheric deposition and biomonitoring with *Tillandsia usneoides* (L.) in an industrialized area in Rio de Janeiro state, southeast Brazil--Part II: PCB and PAH. *Chemosphere*. Vol 67{9}. 1736-45. 2007.
- [70] Douben, P. PAHs: An ecological perspective. Chichester: John Wiley & Sons, Inc. pp. 399. 2003.
- [71] Mochida I.; Song C.; Hsu, C. Chemistry of diesel fuels. Londres: Francis & Taylor. 297 pp. Monnet, F., F. Bordas, V. Deluchat, P. Chatenet, M. Botineau & M. Baudu. 2005. Use of the aquatic lichen *Dermatocarpon luridum* as bioindicator of copper pollution. Accumulation and cellular distribution tests. *Environmental Pollution*. Vol. 138: 456-462.2000.
- [72] Simonich S; Hites R. Organic Pollutant Accumulation in Vegetation. *Environment Science Technology*. Vol.{29} 12 pp. 2905 – 2914. 1995.
- [73] KIPOPOULOU A.M., MANOIL E. y SAMARA C. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environmental Pollution*. Vol. 106: 369-380.1999.
- [74] Shukla, V., Upreti, D., Patel, D., Tripathi, R. Accumulation of PolycyclicAromatic Hydrocarbons in some lichens of Garhwal Himalayas, India. *International Journal of Environment and Waste Management*. Vol. 5 {1-2}, 104-113.2010.

- [75] Bergamaschi , L. , Rizzio , E., Giaveri, G., Profumo, A., Loppi , S., Gallorini ,M .
Determination of baseline element composition of lichens using samples from
high elevations.Chemosphere. Vol. 55, 933–939 .2004.
- [76] Blasco M; Domeño C, Nerín C. Behaviour of different lichen species as
biomonitors of air pollution by PAHs in natural ecosystems. J. Environmental.
Monitoring. Vol. 13{9} 2588-2599.2011.
- [77] García, A.; Bonen, M.; Ramirez-Vick, J.; Sadaka, M.; Vuppu, A. Bioseparation
Process Science. USA: Blackwell Science, Inc. 425 pp.1999.
- [78] Linsinger T. Use of recovery and bias information in analytical chemistry and
estimation of its uncertainty contribution. Trends in Analytical Chemistry. Vol. 27
{10}: 916-923.2008.
- [79] De Nicola; Air biomonitoring of heavy metals and polycyclic aromatic
hydrocarbons near a cement plant. Atmospheric Pollution Research. Vol. 5. 2014.
- [80] Nali C. Evaluation of the suitability of *Tillandsia usneoides* (L.) L. as biomonitor
of airborne elements in an urban area of Italy, Mediterranean basin. Atmospheric
Pollution Research. Vol. 5. 2014.
- [81] Barend van Drooge. Polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles (*Pinus
halepensis*) along a spatial gradient between a traffic intensive urban area
(Barcelona) and a nearby natural park. Atmospheric Pollution Research. Vol. 5.
2014.

- [82] Wannaz ED. M.L Pignata. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial and urban areas using passive air samplers and leaves of *Tillandsia capillaries*. Journal of Environmental Chemical Engineering. Vol.1 1028-1035. 2013.
- [83] Secado de hierbas aromáticas y medicinales [Internet]. [Consulta el 19 de Marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.herbotecnia.com.ar/poscosecha-secadoMetodos.htm>.
- [84] Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ta. Edición. Prentice Hall. Capítulo 5, pág. 112.2002.
- [85] Agudo, A. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP): Acercamiento a su Problemática Laboral como Riesgo Laboral. España: Instituto Catalán de Oncología.2010.
- [86] EPA. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Compendium Method TO-13A , Segunda Edición . Cincinnati.1999.
- [87] Fernández, A. Las Sustancias Tóxicas Persistentes . México: Secretaría de Ambiente y Recursos Naturales.2005.

11. APÉNDICE

11.1 Tablas de concentraciones HAP– Técnica de extracción asistida por microondas

Experimento	NAF	ACI	ACE	FLU	FEN	ANT
	Concentraciones ng/g					
1	180,7	27,89	36,56	16,78	10,57	9,365
2	444,2	27,37	ND	17,40	12,94	6,882
3	261,5	27,69	ND	18,67	10,78	16,60
4	128,4	28,18	ND	14,69	8,12	4,546
5	412,4	28,74	ND	19,44	12,06	12,83
6	112,3	26,02	ND	16,78	6,506	1,920
7	47,59	26,08	37,89	13,02	12,58	6,193
8	49,79	23,10	ND	13,00	12,56	2,756
9	83,10	31,44	ND	15,76	14,44	9,594
10	59,60	26,25	ND	15,10	13,39	5,917
11	53,67	30,82	37,19	19,33	18,83	41,94
12	50,82	ND	ND	ND	7,112	2,906
13	910,1	41,78	ND	24,65	25,63	30,93
14	46,11	25,94	35,64	11,36	6,698	1,965
15	45,58	25,41	ND	13,32	7,604	2,889
16	49,50	25,19	ND	13,79	10,04	5,554

ND: No detectado.

Experimento	NAF	ACI	ACE	FLU	FEN	ANT
	Concentraciones ng/g					
1R	190,6	38,23	35,64	21,51	18,87	15,02
2R	436,8	26,97	ND	16,14	13,99	6,461
3R	245,7	25,85	ND	12,43	8,384	4,574
4R	140,3	27,13	ND	14,29	8,851	3,839
5R	443,2	26,95	ND	20,23	19,65	17,62
6R	126,4	26,95	ND	17,38	18,09	8,271
7R	59,95	34,00	38,28	20,84	21,66	46,34
8R	58,34	26,10	ND	11,95	7,796	2,581
9R	166,1	27,99	ND	17,49	10,63	10,17
10R	50,55	26,10	ND	12,56	10,29	5,786
11R	48,05	25,45	37,30	13,41	7,939	4,692
12R	47,40	ND	ND	ND	8,089	2,365
13R	908,0	36,87	ND	20,98	16,16	20,06
14R	43,20	26,11	37,60	12,83	24,78	1,854
15R	50,55	26,57	ND	13,52	9,012	4,828
16R	41,80	23,21	ND	12,56	6,487	2,644

R: réplica, ND: No detectado.

Experimento	FLT	PIR	BaA	CRI
	Concentraciones ng/g			
1	23,14	28,08	17,71	17,47
2	23,08	28,02	18,35	16,01
3	28,58	42,92	23,53	20,05
4	22,57	29,70	19,68	15,44
5	24,64	31,27	20,80	17,81
6	26,87	25,61	ND	ND
7	23,66	33,66	15,29	15,38
8	27,63	ND	ND	14,50
9	27,54	31,38	22,24	17,15
10	23,96	29,20	16,88	15,46
11	70,06	35,37	18,88	21,85
12	21,45	ND	15,39	13,64
13	31,65	43,08	23,65	26,62
14	21,46	26,35	17,01	16,48
15	22,52	27,94	15,32	14,17
16	22,62	27,77	14,48	15,15

ND: No detectado.

Experimento	FLT	PIR	BaA	CRI
	Concentraciones ng/g			
1R	26,41	31,73	21,63	20,76
2R	24,22	30,31	19,82	16,42
3R	23,34	29,40	18,10	14,95
4R	22,72	31,45	25,24	14,45
5R	26,78	35,49	21,81	18,37
6R	27,53	34,74	ND	ND
7R	78,68	37,98	21,81	20,44
8R	22,49	ND	ND	13,80
9R	23,25	27,96	18,32	16,25
10R	22,09	26,18	15,75	13,24
11R	22,92	28,55	16,04	15,13
12R	21,58	ND	15,68	13,45
13R	26,73	40,12	27,05	22,75
14R	23,33	29,06	17,27	16,67
15R	23,34	28,94	17,05	15,89
16R	19,59	23,51	14,58	13,15

R: Réplica, ND: No detectado.

Experimento	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	IcdP
	Concentraciones ng/g					
1	13,15	17,10	47,51	ND	ND	54,51
2	13,60	15,48	40,91	ND	ND	35,32
3	14,87	18,37	126,27	ND	ND	34,21
4	32,15	ND	121,57	ND	ND	14,89
5	14,12	17,58	84,84	ND	ND	24,58
6	85,42	ND	101,0	ND	ND	14,56
7	13,91	18,76	33,37	ND	ND	17,80
8	29,68	ND	43,34	ND	ND	ND
9	15,15	17,76	86,95	ND	ND	22,91
10	ND	ND	69,47	ND	ND	ND
11	16,59	20,51	85,50	ND	ND	34,51
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	15,48	20,18	163,9	ND	ND	33,21
14	ND	ND	39,65	ND	ND	16,75
15	13,26	ND	33,21	ND	ND	ND
16	ND	ND	32,14	ND	ND	15,68

ND: No detectado.

Experimento	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	IcdP
	Concentraciones ng/g					
1R	13,76	16,77	68,49	ND	ND	61,60
2R	14,53	16,89	113,7	ND	ND	36,16
3R	13,43	16,71	115,7	ND	ND	101,6
4R	62,01	ND	138,9	ND	ND	15,70
5R	14,48	17,44	184,1	ND	ND	97,37
6R	87,26	ND	105,1	ND	ND	14,93
7R	16,87	18,21	138,8	ND	ND	48,67
8R	28,51	ND	42,37	ND	ND	ND
9R	13,71	16,95	44,55	ND	ND	14,98
10R	ND	ND	63,13	ND	ND	ND
11R	13,46	16,73	30,64	ND	ND	25,21
12R	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13R	15,78	22,55	343,0	ND	ND	110,1
14R	ND	ND	30,28	ND	ND	16,41
15R	13,72	ND	34,06	ND	ND	ND
16R	ND	ND	35,69	ND	ND	10,94

R: Réplica, ND: No detectado.

11.2 Tablas de concentraciones HAP – Técnica de extracción asistida por ultrasonido

Experimento	NAF	ACI	ACE	FLU	FEN	ANT
	Concentraciones ng/g					
1	144,6	26,37	ND	14,52	13,89	8,364
2	47,85	27,80	ND	16,40	16,10	8,910
3	118,2	28,64	ND	15,40	14,82	7,858
4	753,1	27,56	ND	15,05	43,33	4,270
5	47,88	26,31	ND	16,25	22,04	10,83
6	49,52	28,80	ND	15,08	17,58	9,850
7	580,5	26,76	35,70	17,97	16,16	14,27
8	79,55	26,52	ND	14,13	13,19	5,479
9	73,67	27,33	ND	16,22	14,83	8,649
10	47,45	28,15	ND	14,47	10,41	5,227
11	366,2	29,77	ND	19,43	31,06	22,34
12	48,50	26,13	ND	12,39	10,09	1,966
13	1014	28,26	ND	19,30	24,13	12,47
14	47,81	25,67	ND	13,44	11,70	3,915
15	271,2	27,05	ND	16,33	12,63	15,25
16	281,8	38,06	43,17	44,56	8,358	1,922

ND: No detectado.

Experimento	NAF	ACI	ACE	FLU	FEN	ANT
	Concentraciones ng/g					
1R	140,2	26,67	ND	14,46	11,94	6,827
2R	50,29	26,38	ND	14,92	12,95	4,436
3R	125,6	83,42	ND	39,03	37,79	131,1
4R	603,8	27,51	ND	17,83	11,58	7,838
5R	48,21	26,21	ND	13,77	11,01	3,903
6R	48,79	26,00	ND	13,82	12,10	5,404
7R	596,1	28,06	36,81	18,98	22,16	14,88
8R	54,77	25,36	ND	14,78	11,52	5,872
9R	49,24	26,12	ND	13,77	9,10	5,509
10R	49,52	27,42	ND	14,40	13,90	4,172
11R	249,1	28,04	ND	17,36	13,37	10,90
12R	50,21	28,08	ND	16,99	14,43	5,618
13R	1152	28,12	ND	17,23	17,00	11,40
14R	42,66	24,79	ND	62,08	115,7	49,42
15R	258,4	28,89	ND	17,62	32,03	10,32
16R	291,3	37,55	44,21	11,81	8,288	1,952

R: Réplica, ND: No detectado.

Experimento	FLT	PIR	BaA	CRI
	Concentraciones ng/g			
1	23,22	28,12	18,04	13,16
2	26,71	46,48	17,58	18,17
3	27,12	35,22	17,42	17,87
4	29,07	36,43	22,78	27,36
5	30,11	38,85	16,97	17,75
6	23,46	30,64	14,45	14,56
7	28,09	32,41	22,11	30,90
8	22,87	27,09	21,51	13,80
9	23,80	28,42	16,55	20,26
10	22,14	25,48	15,34	13,55
11	31,37	40,44	23,07	29,84
12	23,12	26,99	15,64	14,08
13	25,46	26,77	17,38	13,93
14	23,29	28,67	18,18	14,65
15	25,49	30,57	28,38	21,04
16	20,52	14,07	47,07	2243

ND: No detectado.

Experimento	FLT	PIR	BaA	CRI
	Concentraciones ng/g			
1R	23,57	27,10	15,65	14,78
2R	24,53	30,00	15,97	15,56
3R	19,35	36,83	18,65	191,1
4R	22,85	28,83	19,88	15,80
5R	23,75	26,46	15,88	17,47
6R	24,89	27,44	15,11	14,71
7R	35,65	50,70	18,00	20,41
8R	22,04	26,40	16,31	14,66
9R	22,81	28,64	15,29	15,11
10R	22,72	25,92	15,02	12,65
11R	26,18	29,71	23,68	26,82
12R	23,28	28,07	17,22	16,17
13R	26,47	31,08	18,57	19,98
14R	20,31	62,19	17,98	58,23
15R	28,86	33,07	28,38	23,07
16R	21,41	13,96	15,03	13,12

R: Réplica, ND: No detectado.

Experimento	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	IcdP
	Concentraciones ng/g					
1	13,10	16,25	61,58	ND	ND	31,22
2	14,57	19,22	101,9	ND	ND	19,97
3	69,14	ND	812,4	20,69	ND	39,32
4	17,64	16,60	146,6	ND	ND	47,59
5	14,32	18,66	153,7	ND	ND	32,95
6	104,4	ND	33,21	ND	ND	ND
7	17,26	18,08	136,4	ND	ND	37,64
8	38,53	ND	94,43	ND	ND	24,55
9	13,58	17,40	30,16	ND	ND	21,23
10	ND	ND	31,44	ND	ND	ND
11	16,70	19,87	347,6	ND	ND	91,24
12	ND	ND	33,51	ND	ND	ND
13	14,23	16,31	40,51	ND	ND	13,43
14	13,08	16,85	60,68	ND	ND	49,16
15	15,32	17,52	122,2	165,9	ND	20,95
16	508,3	ND	1210	166,2	310,0	210,6

ND: No detectado.

Experimento	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	IcdP
	Concentraciones ng/g					
1R	22,69	16,00	64,18	ND	ND	18,56
2R	14,48	17,69	67,52	ND	ND	14,10
3R	61,69	ND	801,6	21,65	ND	40,16
4R	14,31	17,03	76,38	ND	ND	35,16
5R	15,99	16,69	39,72	ND	ND	12,70
6R	100,5	ND	33,99	ND	ND	ND
7R	13,82	16,62	142,7	ND	ND	21,65
8R	38,57	ND	54,90	ND	ND	23,85
9R	13,31	16,71	26,71	ND	ND	20,42
10R	ND	ND	29,87	ND	ND	ND
11R	15,61	17,03	84,52	ND	ND	67,51
12R	ND	ND	50,23	ND	ND	ND
13R	14,10	17,94	70,70	ND	ND	40,70
14R	14,04	16,52	330,9	ND	ND	45,99
15R	16,9	22,82	291,5	177,3	ND	80,68
16R	514,4	ND	1190	154,8	300,0	201,5

R: Réplica, ND: No detectado.

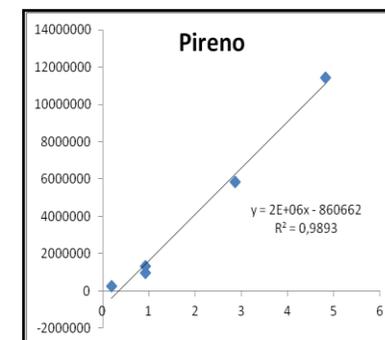
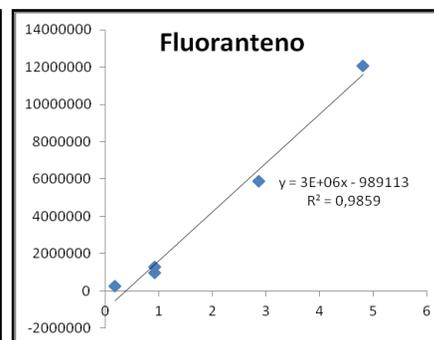
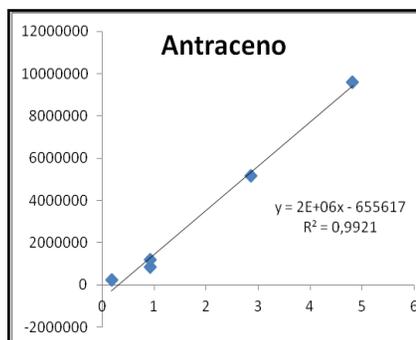
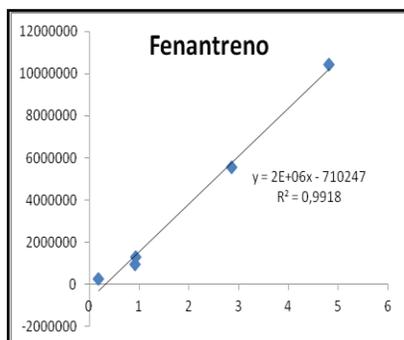
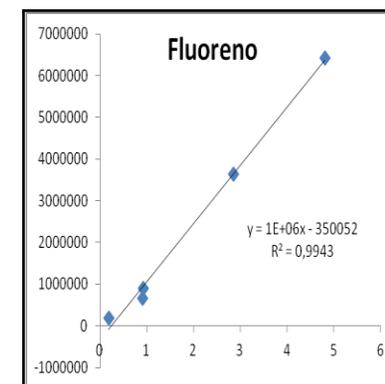
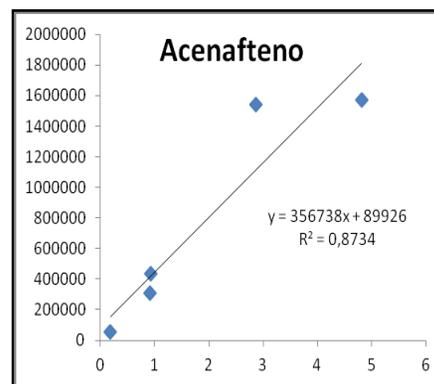
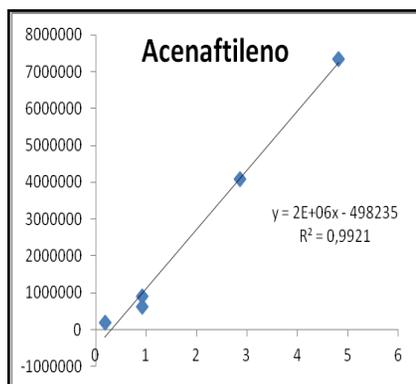
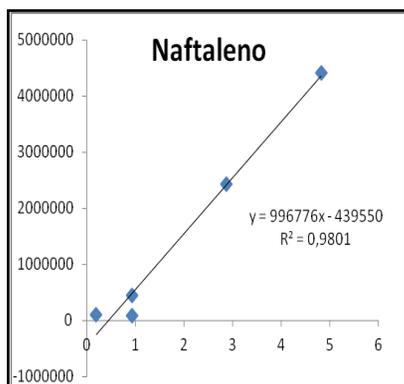
11.3 Curvas de calibración de la mezcla estándar y figuras de mérito.

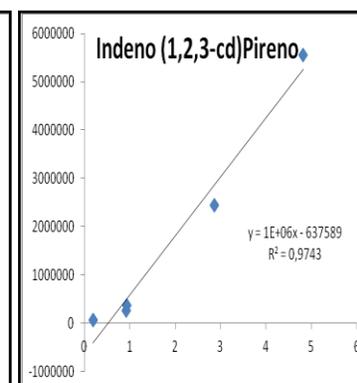
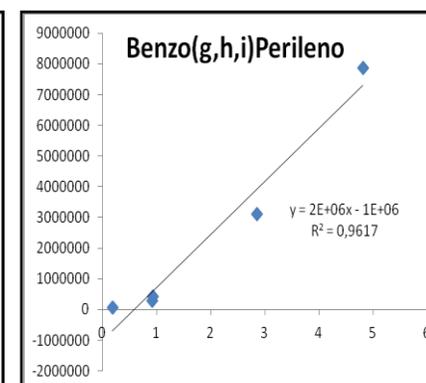
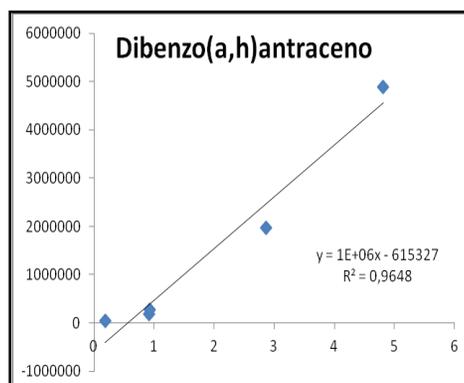
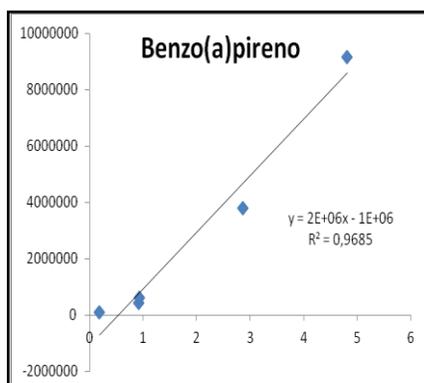
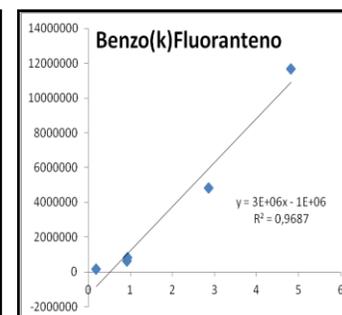
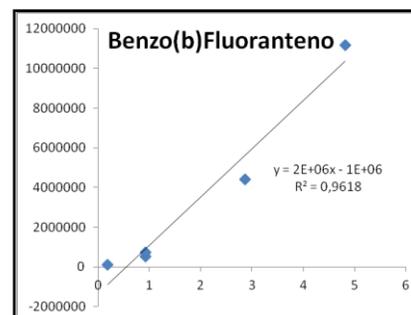
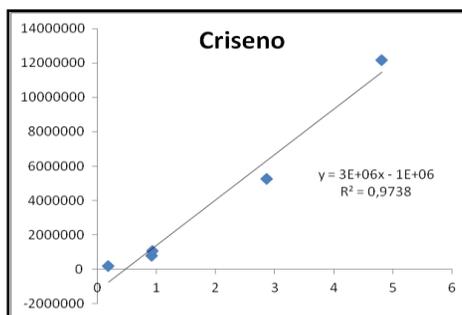
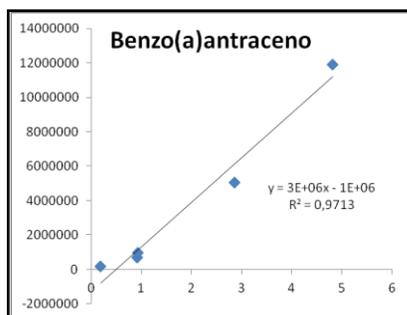
	Ecuaciones	R²	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Naftaleno	y= 1327655x - 94564	0,9984	38,06	44,33
Acenanftileno	y= 1704365x - 103706	0,9988	18,81	24,12
Acenafteno	y= 715220x - 53839	0,9990	31,28	42,08
Fluoreno	y= 1258594x - 23465	0,9989	7,544	11,45
Fenantreno	y= 1845467x - 25995	0,9989	5,604	18,68
Antraceno	y= 1480216x - 3078	0,9977	1,232	1,697
Fluoranteno	y= 2293972x - 88404	0,9969	18,36	20,59
Pireno	y= 2459579x - 105465	0,9968	19,86	25,23
Benzo[a]antraceno	y= 1168099x - 29889	0,9926	10,20	12,89
Criseno	y= 1201987x - 26961	0,9945	5,231	7,002
Benzo [b]Fluoranteno	y= 843252x - 22271	0,9925	9,561	11,39
Benzo[k] fluoranteno	y= 737713x - 24706	0,9901	9,715	13,15
Benzo [a]Pireno	y= 694737x - 25458	0,9886	20,15	22,36
Dibenzo[a,h]antraceno	y= 319071x - 6678	0,9919	15,24	19,43
Benzo [g,h,i]Perileno	y= 245428x - 4203	0,9899	17,88	59,58
Indeno	y= 323917x - 7845	0,9946	10,63	14,56

11.4 Concentraciones de los 16 HAP contenidos en la mezcla estándar.

HAP	Mezcla Estándar
	Concentración (mg/L)
Naftaleno	19,85 ± 0,45
Acenaftileno	15,34 ± 0,37
Acenafteno	20,5 ± 0,47
Fluoreno	4,74 ± 0,11
Fenantreno	3,52 ± 0,09
Antraceno	0,79 ± 0,02
Fluoranteno	7,58 ± 0,16
Pireno	8,47 ± 0,17
Benzo(a)Antraceno	4,09 ± 0,09
Criseno	3,60 ± 0,08
Benzo(b)Fluoranteno	4,19 ± 0,09
Benzo(k)Fluoranteno	4,69 ± 0,10
Benzo(a)Pireno	4,87 ± 0,12
Dibenzo(a,h)Antraceno	3,49 ± 0,20
Benzo(ghi)Perileno	3,67 ± 0,13
Indeno(1,2,3-cd)Pireno	4,27 ± 0,13

11.5 Curvas de calibración de la mezcla estándar 16 Priority PAH, EPA method 610, Cocktail 2 usadas para el análisis de recuperación.





11.6 Condiciones experimentales de cada ensayo de acuerdo al diseño 2⁴ para la técnica de extracción asistida por microondas

CONDICIONES EXPERIMENTALES TÉCNICA DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICRONDAS				
Ensayo	Solvente	Volumen (mL)	Tiempo (min)	Temperatura (T°C)
1	HEX:DCM(4:1)	15	15	100
2	DCM	15	15	100
3	HEX:DCM(4:1)	30	15	100
4	DCM	30	15	100
5	HEX:DCM(4:1)	15	30	100
6	DCM	15	30	100
7	HEX:DCM(4:1)	30	30	100
8	DCM	30	30	100
9	HEX:DCM(4:1)	15	15	115
10	DCM	15	15	115
11	HEX:DCM(4:1)	30	15	115
12	DCM	30	15	115
13	HEX:DCM(4:1)	15	30	115
14	DCM	15	30	115
15	HEX:DCM(4:1)	30	30	115
16	DCM	30	30	115

NOTA: A este número de experimentos se adiciona una réplica por cada ensayo experimental.

11.7 Condiciones experimentales de cada ensayo de acuerdo al diseño 2⁴ para la técnica de extracción asistida por ultrasonido

CONDICIONES EXPERIMENTALES TÉCNICA DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO				
Ensayo	Solvente	Volumen (mL)	Tiempo (min)	Temperatura (T°C)
1	HEX:DCM(4:1)	15	15	20
2	DCM	15	15	20
3	HEX:DCM(4:1)	30	15	20
4	DCM	30	15	20
5	HEX:DCM(4:1)	15	30	20
6	DCM	15	30	20
7	HEX:DCM(4:1)	30	30	20
8	DCM	30	30	20
9	HEX:DCM(4:1)	15	15	40
10	DCM	15	15	40
11	HEX:DCM(4:1)	30	15	40
12	DCM	30	15	40
13	HEX:DCM(4:1)	15	30	40
14	DCM	15	30	40
15	HEX:DCM(4:1)	30	30	40
16	DCM	30	30	40

NOTA: A este número de experimentos se adiciona una réplica por cada ensayo experimental.

11.8 Fórmulas usadas en el análisis de datos [84]

En esta sección presentan las ecuaciones que se emplearon para los análisis de los datos, así como para los análisis estadísticos. Las pruebas estadísticas se basaron en el diseño de experimento por análisis factorial el cual fue hecho directamente por el software Statgraphics,

Los parámetros analíticos de precisión calculados para los métodos de extracción son la desviación estándar (S), desviación estándar relativa (RSD), y el coeficiente de variación (CV).

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Desviación estándar relativa:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$$

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Los parámetros analíticos de exactitud calculados para los métodos de extracción son el porcentaje de recuperación (%R) y el error absoluto (Ea).

$$\text{Porcentaje de Recuperación: } \% R = \frac{C_{bya} - C_b}{C_s} \times 100$$

C_{bya} = cantidad de analito en la muestra + cantidad de analito añadido

C_b = cantidad de analito en un blanco de muestra

C_s = concentración esperada

$$\text{Error absoluto: } E_a = \text{Valor agregado} - \text{Valor recuperado}$$

Los parámetros analíticos de calidad instrumental calculados son límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

$$\text{Límite de detección: } LOD = Y_0 + 3SB$$

$$\text{Límite de cuantificación: } LOQ = Y_0 + 10SB$$

11.9 Otros compuestos presentes.

Además de los HAP determinados en las muestras de *Tillandsia Recurvata* (L) L.se realizó una búsqueda en la librería del detector de masas para dar una lista de compuestos que posiblemente se encontraron en los especímenes

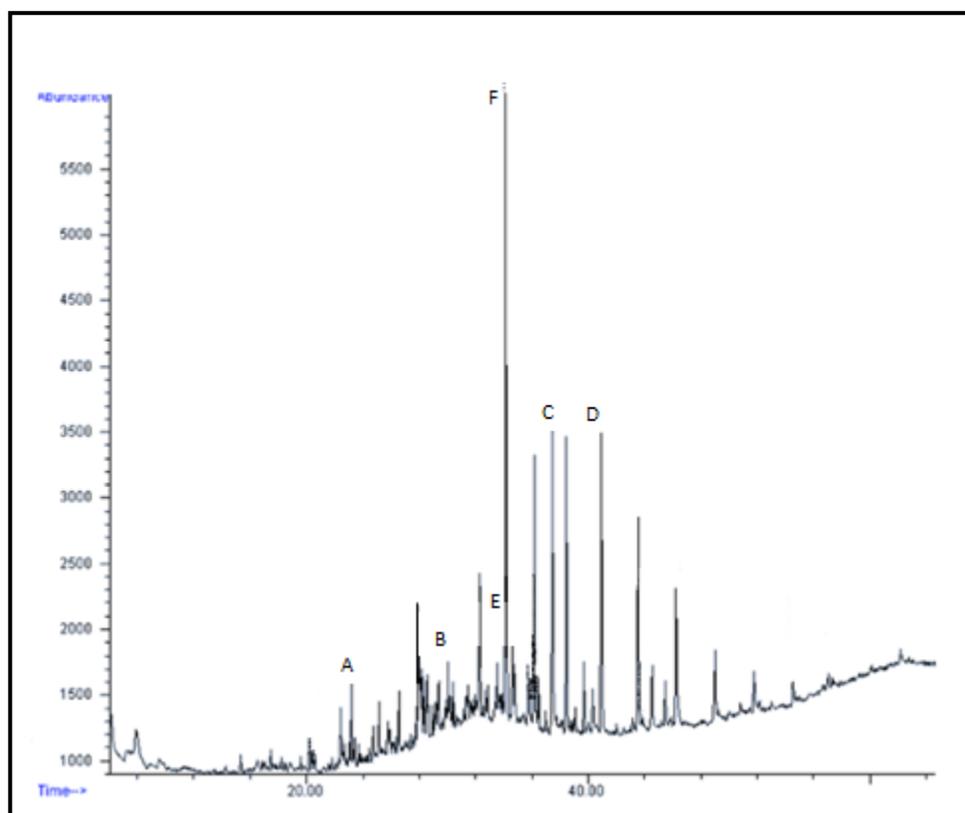


Figura 79. Cromatograma correspondiente a experimento 5 de microondas.

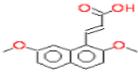
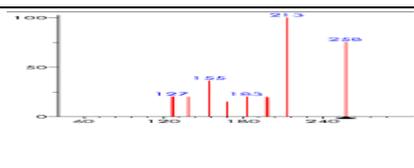
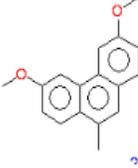
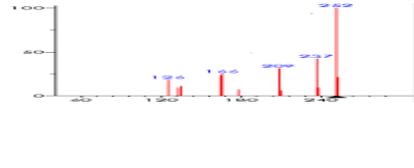
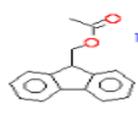
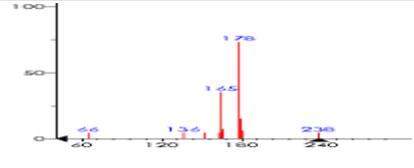
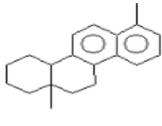
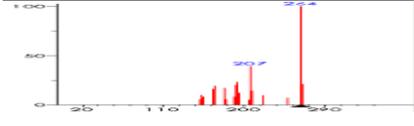
Letra	Nombre	Estructura	Espectro de masas
A	Ácido 3-(2,7-dimetoxi-1-naftil)acrílico		
B	3,6-dimetoxi-9-metil-fenantreno		
C	Acetato de 9-fluoreno-9-metanol		
D	7,12a-dimetil-1,2,3,4,4a,11,12,12a-octahidrocriseno		

Tabla 27. Compuestos posiblemente identificados adicionales a los 16 HAP prioritarios.

El motivo por el cual se encontraron posiblemente HAP sustituidos (compuestos A, B, C y D) se debe a que en general estos hidrocarburos se emiten al ambiente unidos a otros compuestos, y una vez en el aire pueden sufrir rápidamente procesos de oxidación o degradación, favorecidos por la presencia de otros contaminantes y de la radiación ultravioleta solar [85]. Es por esta razón que se detectó la posible presencia de HAP sustituidos principalmente con grupos polares.

La temperatura de combustión, es otro factor importante para la formación de los diferentes HAP sustituidos, ya que a temperaturas por debajo de los 700°C los productos de combustión van teniendo además de los HAP padres cada vez más HAP alquilados (compuesto E), muchas veces derivados metilados [86].

Los picos E y F corresponde a los ftalatos identificados a partir del cromatograma correspondiente: Los ftalatos han sido utilizados ampliamente en la industria como plastificantes. Se adicionan a ciertos polímeros, principalmente el PVC, para aumentar su flexibilidad y suavidad [87], infiriéndose que estos compuestos resultaron de la naturaleza de las tapas de los viales utilizados.

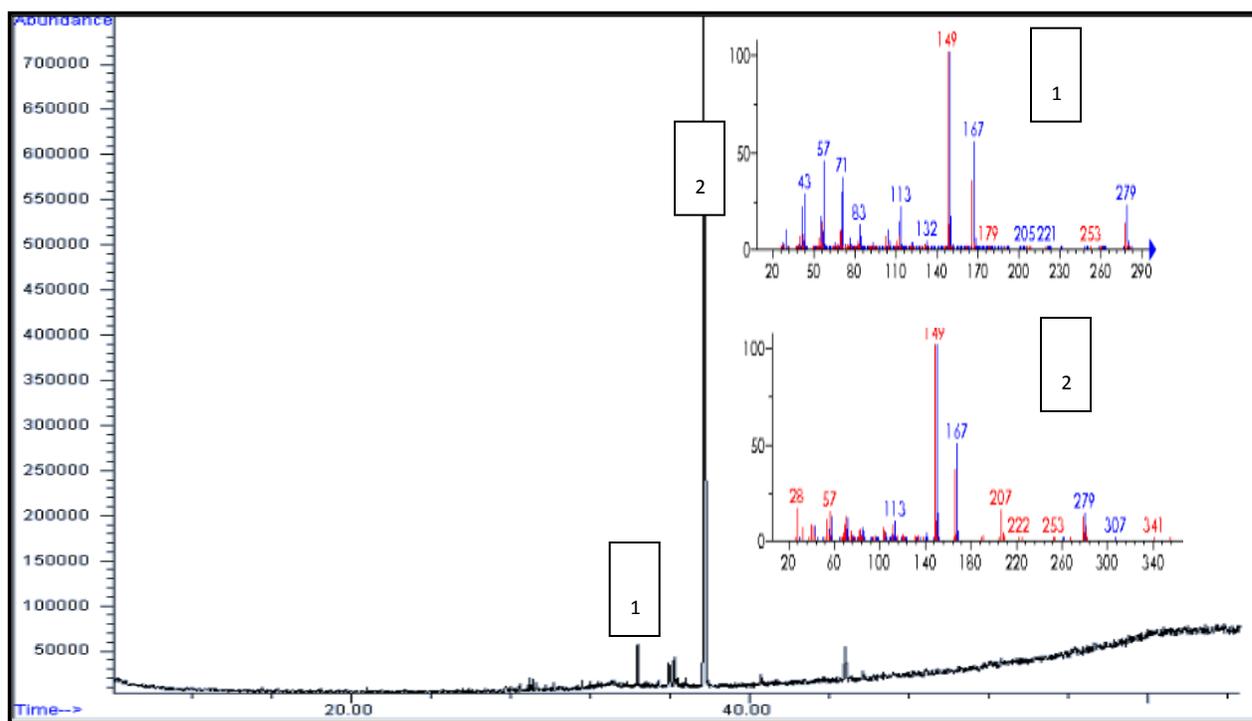


Figura 80. Cromatograma de un blanco

11.10 Tabla de propiedades físicoquímicas de los HAP.

Nombre HAP	Fórmula	Peso Molecular (g.mol ⁻¹)	Presión de vapor (mmHg)	Solubilidad en agua (mg.L ⁻¹)	Log Kow (PE)
BAJO PESO MOLECULAR					
(2 anillos) Naftaleno	 C ₁₀ H ₈	128,17	7,5x10 ⁻¹	31	3,36
(3 anillos) Acenaftileno	 C ₁₂ H ₈	152,20	2,9x10 ⁻²	16	4,03
(3 anillos) Acenafteno	 C ₁₂ H ₁₀	154,21	4,5x10 ⁻³	3,8	3,55
(3 anillos) Fluoreno	 C ₁₃ H ₁₀	166,20	3,2x10 ⁻⁴	1,98	4,18
(3 anillos) Fenantreno	 C ₁₄ H ₁₀	178,20	6,8x10 ⁻⁴	1,20	4,57
(3 anillos) Antraceno	 C ₁₄ H ₁₀	178,20	1,7x10 ⁻⁵	7,6x10 ⁻²	4,54
MEDIANO PESO MOLECULAR					
(4 Anillos) Fluoranteno	 C ₁₆ H ₁₀	202,26	5,0x10 ⁻⁶	0,26	5,22
(4 anillos) Pireno	 C ₁₆ H ₁₀	202,30	2,5x10 ⁻⁶	7,7x10 ⁻²	5,18
(4 anillos) Benzo[a] antraceno	 C ₁₈ H ₁₂	228,29	2,2x10 ⁻⁸	1,0x10 ⁻²	5,91
(4 anillos) Criseno	 C ₁₈ H ₁₂	288,30	6,3x10 ⁻⁷	2,8x10 ⁻³	5,91
ALTO PESO MOLECULAR					
(5 anillos) Benzo [b] Fluoranteno	 C ₂₀ H ₁₂	252,30	5,0x10 ⁻⁷	1,2x10 ⁻³	6,50
(5 anillos) Benzo [k] Fluoranteno	 C ₂₀ H ₁₂	252,30	9,6x10 ⁻¹¹	7,6x10 ⁻⁴	6,20
(5 anillos) Benzo [a] pireno	 C ₂₀ H ₁₂	252,30	5,6x10 ⁻⁹	2,3x10 ⁻³	6,50
(5 anillos) Dibenzo[a,h] antraceno	 C ₂₂ H ₁₄	276,35	1,0x10 ⁻¹⁰	5,0x10 ⁻⁴	6,20
(6 anillos) Benzo[g,h,i] perileno	 C ₂₂ H ₁₂	276,34	1,0x10 ⁻¹⁰	2,6x10 ⁻⁴	7,10
(6 anillos) Indeno [1,2,3-cd] pireno	 C ₂₂ H ₁₂	276,30	1,0x10 ⁻¹¹	6,2x10 ⁻²	6,50

11.11 Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas



Marca	Agilent Technologies Inc.	
Modelo	6890N	
Detecto de Masas	5975-MS	
Automuestreador	7683B Series	
Software	Chem Station Agilent	
Performance	Tiempo de retención y repetibilidad	<0,008% o < 0,008 min
	Área repetibilidad	< 1% RSD
Altura	50cm (19,7 inch)	
Ancho	58cm (22,8inch) con EPC inlets y detectores	
Profundidad	54cm (21,6inch)	
Peso	49kg (108lb)	
Programación	Programador de tiempo 4 conexiones internas 24 V (150mA) 2 conexiones externas 24V (75mA)	

11.12 Microondas CEM Mars 5



- CEM® Mars 5 Microwave Accelerated Reaction System. International Equipment Trading Ltd 960 Woodlands Parkway Vernon Hills, Illinois 60061 USA.
- Montaje de envase control (HP-Greenchem Glass Control Vessel Assembly N° parte: 431762).
- Termoposo con punta de safiro 326280.
- Sensores de Temperatura y Presión.
- Envases de reacción (HP-Greenchem Plus Glass Vessel Assembly 431761).

El sistema consta de:

- Un sistema de energía de microondas con niveles de potencia seleccionables por el usuario (0 a 1200 Watts).
- Una cavidad de microondas recubierta de fluoropolímero (interior del horno).
- Un extractor de aire cavidad y tubería para ventilar los humos.
- Un microordenador programable que controla y monitorea la potencia, temperatura, y la presión dentro de los recipientes de reacción, y es capaz de almacenar 100 programas con un máximo de cinco etapas de reacción por programa.
- Recipientes de reacción a prueba de explosión.
- Buque especializado para la vigilancia temperatura y presión.
- Placa giratoria alterna que convierte las muestras de 360 grados en el horno de microondas campo.
- Un sistema de bloqueo de seguridad de la puerta que evita las emisiones de microondas con la puerta está abierta.
- MARSlink Software.

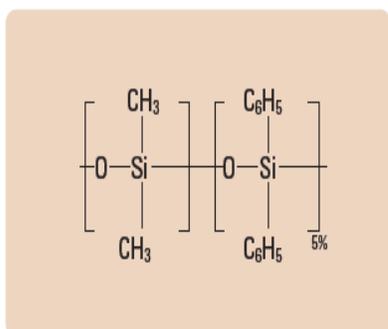
11.13 Baño de ultrasonido



Cole-Parmer® Stainless Steel Baño de Ultrasonido con regulador de Calor y control de Tiempo, 3 1/2 gal, 115 VAC

Especificaciones	
Tipo de Producto	Ultrasonic Cleaner
Capacidad (gal.)	3.5
Dimensiones del Tanque (" L)	11.5
Dimensiones Tanque (" W)	9.5
Dimensiones Tanque (" H)	8
Frecuencia output (Hz)	40000
Potencia (Amps)	4.2
Potencia (VAC)	115
Marca	Cole-Parmer
Número de Manufactura	CPN-956-651

11.14 Especificaciones columna GC-MS [36]



Estructura de difenildimetilpolisiloxano

HP-5ms

- (5%-fenil)-metilpolisiloxano
- Idéntica selectividad a HP-5
- No polar
- Muy bajo sangrado, ideal para GC/MS
- Excelente inercia frente a compuestos activos, incluyendo compuestos ácidos y básicos
- Mejor relación señal/ruido para una mayor sensibilidad e integridad de los espectros de masas
- Ligadas y entrecruzadas
- Lavable con disolvente
- Equivalente a la fase USP G27

Fases similares: Rtx-5MS, Rtx-5 Amine, DB-5ms, PTE-5, CP-Sil 8CB Low Bleed/MS, BPX-5, ZB-5ms

11.14a Masas Características (m/z) de cada uno de los HAP analizados [2]

PAHs	m/z		PAHs	m/z	
	Primer ión	Segundo ión		Primer ión	Segundo ión
Naftaleno	128	129	Pireno	202	201
Acenaftileno	152	153	Benzo[a]antraceno	228	229
Acenafteno	153	154	Criseno	228	229
Dibenzofurano	168		Benzo[b]fluoranteno	252	126
Fluoreno	166	165	Benzo[k]fluoranteno	252	126
Fenantreno	178	179	Benzo[a]pireno	252	126
Antraceno	178	179	Dibenzo[a,h]antraceno	278	276
Fluoranteno	202	201	Benzo[g,h,i]perileno	276	277

11.15 Temperaturas de fusión y ebullición de 16 HAP [50]

HAP	Temperatura de fusión (°C)	Temperatura de ebullición (°C)
Bajo peso molecular		
Naftaleno	80,2-82,5	218
Acenaftileno	92	270
Acenafteno	95	279
Fluoreno	117	294
Fenantreno	101	338
Antraceno	215,8	340
Mediano peso molecular		
Fluoranteno	111	380
Pireno	151,2	393
Benzo[a]antraceno	160	425
Criseno	255-256	431
Alto peso molecular		
Benzo[b]fluoranteno	168,3	481
Benzo[k]fluoranteno	215,7	480
Benzo[a]pireno	178	496
Dibenzo[ah]antraceno	266	535
Benzo[ghi]perileno	278,3	542
Indeno[1,2,3-cd]pireno	163,6	536

