

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE GEOQUÍMICA

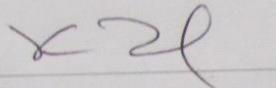


OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICRO-EXTRACCIÓN
EN FASE SOLIDA PARA EL ANÁLISIS DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
MUESTRAS DE AGUA

Presentado ante la ilustre
Universidad Central de
Venezuela por el Br. Luis
Omaña, para optar por el
título de Licenciado en
Geoquímica

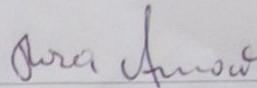
ACTA

Los abajo firmantes, designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "**Optimización de la Técnica de Micro-Extracción en Fase Sólida para el Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Muestras de Agua**", presentado por el Br. Luis Enrique Omaña Guevara, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciada en Geoquímica.



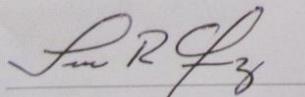
Dra. Katia Reategui

Tutor

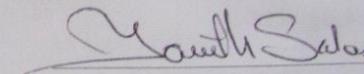


Dra. Rosa Amaro

Tutor



Dr. Luis Gómez
Jurado



Dra. Janeth Salas
Jurado

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE GEOQUÍMICA

PROYECTO GEOQUÍMICO



OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICRO-EXTRACCIÓN
EN FASE SOLIDA PARA EL ANÁLISIS DE
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
MUESTRAS DE AGUA

Br. Luis Omaña

Tutoras:

Dra Katya Reategui; Dra Rosa Amaro

Caracas, Abril 2016

Dedicatoria

Para Esquisa, mi mejor amiga.

AGRADECIMIENTOS

Al CDCH, por financiar este proyecto, a través del Proyecto de Grupo N° 0387382013.

A los profesores del Instituto de Ciencias de la Tierra de la Universidad Central de Venezuela, y al grupo de técnicos encargado del Cromatógrafo de Gases.

A los profesores del Laboratorio de Métodos Cromatográficos del Centro de Química Analítica, de la Escuela de Química.

Deseo expresar mi más grande agradecimiento a mis tutoras, las profesoras Katya y Rosa. Por darme la oportunidad de participar activamente en este proyecto de grupo. Por enseñarme a esperar. Por protegerme y no permitir que los eventos sucedieran, sino hasta que las condiciones fueran nada menos que las perfectas. Por darme la confianza que necesitaba para atender al trabajo con el Cromatógrafo de Gases.

RESUMEN

Para este trabajo, fueron optimizadas tres variables involucradas en el proceso de extracción de seis Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en soluciones acuosas, operando con la técnica de Micro-extracción en Fase Sólida, seguido por el análisis con cromatografía de gases. Para ello, fue diseñado y ejecutado un experimento factorial, que pretendió evaluar condiciones contrastantes de las tres variables: tipo de fibra, temperatura del agua durante la extracción, y tiempo de extracción; en sus distintas combinaciones, utilizando soluciones preparadas en agua destilada. Una vez que fue estudiado el efecto que cada variable ejerce sobre el proceso de extracción, fue propuesta una metodología de trabajo que permitiera cuantificar a los seis compuestos de manera simultánea. Finalmente, fue evaluada la efectividad del método para el análisis cuantitativo, generando medidas de reproducibilidad, linealidad, límites de detección y cuantificación, y respuesta ante una muestra de agua de río.

Fue confirmado que el cambio de tipo de fibra, y de la temperatura del agua, ejercen efectos estadísticamente significativos en la extracción. Así, el proceso se favorece utilizando fibras con un recubrimiento de Poli(dimetil-siloxano), en comparación a las fibras con Poli(acrilato), y aplicando temperaturas de 40 °C para el Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno, y Antraceno; y de 70 °C, para análisis global. Trabajando con este método, fueron alcanzado valores de límite de detección que van de 0,01 µg/L, para el Fenantreno, a 0,07 µg/L, para el Pireno; y coeficientes de variación que van desde 6%, para el Fluoreno, y 11%, para el Criseno.

Finalmente, el método propuesto fue aplicado a una muestra de agua de río. El análisis de dicha muestra sugiere que los componentes de la matriz inciden en la eficiencia de la extracción. Los valores de porcentaje de recuperación de este análisis van desde 76% a 5%.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pag
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	3
2.1.1. ORIGEN DE LOS HIDORCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	4
2.1.2. CLASIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	6
2.1.3. TOXICIDAD DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	8
2.1.4. COMPORTAMIENTO DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN EL AMBIENTE SUPERFICIAL	10
2.1.5. SISTEMAS DE DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	11
2.2. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LA CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS PRESENTES EN LA FASE ACUOSA	13
2.2.1. LAS VENTAJAS DE LA MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON FIBRAS	14
2.2.2. EL FUNDAMENTO TEÓRICO DEL PROCESO DE REPARTO	15
2.2.3. MODOS DE EXTRACCIÓN CON FIBRAS REVESTIDAS	18
2.2.4. EL REVESTIMIENTO DE LAS FIBRAS	20
2.2.5. LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES	21

3. PARTE EXPERIMENTAL	25
3.1. INSTRUMENTACIÓN	25
3.1.1. SISTEMA DE EXTRACCIÓN	26
3.1.2. CROMATÓGRAFO DE GASES	26
3.1.3. REACTIVOS	29
3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	29
3.2.1. EXPERIMENTO FACTORIAL PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES	32
3.2.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ACUOSAS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	32
3.2.3. PREPARACIÓN DE LAS FIBRAS DE MEFS	34
3.2.4. PROTOCOLO DE EJECUCIÓN PARA LAS OPERACIONES DE EXTRACCIÓN	36
3.2.5. EJECUCIÓN DEL EXPERIMENTO FACTORIAL CON TRES VARIABLES	38
3.2.6. ENSAYOS DE PUNTO CENTRAL	41
3.2.7. OPTIMIZACIÓN UNIVARIADA DE LA TEMPERATURA	42
3.2.8. ESTABLECIMIENTO DE LAS FIGURAS DE MÉRITO DEL PROTOCOLO PROPUESTO	44
3.2.9. BLANCO	44
3.2.10. REPRODUCIBILIDAD	45
3.2.11. LINEALIDAD	46
3.2.12. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	48

3.2.13. CÁLCULO DE RECUPERACIÓN DE HAP EN AGUAS DE RÍO CON EL MÉTODO PROPUESTO	49
4. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN	52
4.1. ANÁLISIS DEL EXPERIMENTO FACTORIAL COMPLETO, CON TRES VARIABLES	52
4.1.1. NAFTALENO, FLUORENO, FENANTRENO, Y ANTRACENO	54
4.1.2. PIRENO Y CRISENO	64
4.2. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD DE LOS RESULTADOS EN EL INTERVALO DE TRABAJO	71
4.2.1. NAFTALENO, FLUORENO, FENANTRENO, Y ANTRACENO	72
4.2.2. PIRENO Y CRISENO	76
4.3. OPTIMIZACIÓN UNIVARIADA DE LA TEMPERATURA Y ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE TRABAJO	79
4.4. ESTABLECIMIENTO DE LAS FIGURAS DE MÉRITO PARA EL MÉTODO PROPUESTO	82
4.4.1. BLANCO	82
4.4.2. REPRODUCIBILIDAD	84
4.4.3. LINEALIDAD	89
4.4.4. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	93
4.5. CÁLCULO DE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE HAP EN LA MUESTRA REAL DE AGUA DE RÍO	95

5. CONCLUSIONES	99
6. RECOMENDACIONES	101
7. BIBLIOGRAFÍA	102

APÉNDICES:

APÉNDICE A

Datos de área obtenidos durante la ejecución del experimento factorial de combinación tipo 2³, y ensayo de punto central

APÉNDICE B

Análisis factorial de los resultados obtenidos a partir del experimento

APÉNDICE C

Datos de área obtenidos durante el experimento de optimización uni- variada de la temperatura del agua.

APÉNDICE D

Cálculo de concentración de soluciones de HAP

APÉNDICE E

Datos obtenidos para la construcción de las curvas de calibración y cálculo de LD y LC.

APÉNDICE F

Datos obtenidos para el cálculo de recuperación en la muestra de agua de río

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Estructuras químicas de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Prioritarios	6
Figura 2. Posible mecanismo de formación de un metabolito cancerígeno del Benzo[a]pireno	9
Figura 3. Dispositivo y fibras de MEFS	26
Figura 4. Cromatógrafo de Gases marca THERMO QUEST, con detector de ionización a la llama	28
Figura 5. Cromatógrafo de Gases marca Agilent Technologies, con detector de Espectrometría de masas.	28
Figura 6 Esquema general del trabajo experimental	30
Figura 7. . Esquema general del trabajo experimental para la determinación de las figuras de mérito del método	31
Figura 8. Inyección directa de la aguja del dispositivo de MEFS dentro del puerto de inyección de un cromatógrafo de gases	35
Figura 9. Montaje para los ensayos: dispositivo de MEFS, cuya fibra es expuesta dentro de la fase líquida de la muestra, contenida en un vial, sobre una plancha de calentamiento.	36
Figura 10. Ejemplo de cromatograma obtenido a partir de la separación de 6 HAP, utilizando un sistema de detección de FID	50
Figura 11. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Naftaleno	58
Figura 12. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Fluoreno	59
Figura 13. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el	60

Fenantreno	
Figura 14. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Antraceno	60
Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Naftaleno.	61
Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Fluoreno.	62
Figura 17. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Fenantreno.	63
Figura 18. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Antraceno	64
Figura 19. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Pireno	68
Figura 20. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Criseno	68
Figura 21. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Pireno.	69
Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Criseno.	70
Figura 23. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Naftaleno.	73
Figura 24. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Fluoreno.	73
Figura 25. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Fenantreno	75
Figura 26. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de	75

tiempo), resultado del análisis de datos del Antraceno.

Figura 27. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Pireno	77
Figura 28. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Criseno	74
Figura 29. Ejemplo de Cromatograma de seis HAP, obtenido utilizando un sistema de detección de espectrometría de masas	80
Figura 30. Resultados promediados de la optimización uni-variada de la temperatura.	81
Figura 31. Cromatograma obtenido a partir del análisis del blanco, por MEFS-CG	83
Figura 32. Curva de Calibración obtenida para el Naftaleno.	90
Figura 33. Curva de Calibración obtenida para el Fluoreno.	90
Figura 34. Curva de Calibración obtenida para el Fenantreno	91
Figura 35. Curva de Calibración obtenida para el Antraceno	91
Figura 36. Curva de Calibración obtenida para el Pireno	92
Figura 37. Curva de Calibración obtenida para el Criseno.	92
Figura 38. Ejemplo de cromatograma obtenido a partir del análisis de la muestra de agua recolectada	95

INDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Propiedades Físicoquímicas de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	7
Tabla 2. Características instrumentales del equipo de CG-FID	27
Tabla 3. Características instrumentales del equipo de CG-EM	27
Tabla 4. Concentración de las soluciones madres de los 6 HAP utilizados	33
Tabla 5. Concentraciones de la solución acuosa de 6 HAP, utilizada para el experimento factorial.	34
Tabla 6. Condiciones de separación y detección del Cromatógrafo de Gases- con detección de foto-ionización a la llama	38
Tabla 7. Condiciones de operación de MEFS-ID para cada ensayo del experimento factorial de tres variables	39
Tabla 8. Matriz del experimento factorial de tres variables	39
Tabla 9. Condiciones de separación y detección del Cromatógrafo de Gases- con detección de espectrometría de masas	43
Tabla 10. Concentraciones de una solución acuosa de 6 HAP, para la optimización univariada de la temperatura	43
Tabla 11. Concentraciones de las soluciones ($\mu\text{g/L}$) utilizadas para la calibración	41
Tabla 12. Concentraciones de la solución acuosa c de 6 HAP, utilizando el espécimen de agua de río.	51
Tabla 13. Valores de Tiempo de retención por compuesto, obtenidos mediante la realización de corridas de patrones individuales	53
Tabla 14. Resultado del cálculo de efectos de cada factor (y de interacción de factores), en la eficiencia de la extracción por compuesto.	55
Tabla 15. Resultados del análisis de varianza para la prueba de significancia de los efectos	57

de cada factor, por compuesto

Tabla 16. Resultado del cálculo de efectos de cada factor (y de interacción de factores), en la eficiencia de la extracción por compuesto.	65
Tabla 17. Resultados del análisis de varianza para la prueba de hipótesis sobre la significancia de los efectos de cada factor por compuesto	67
Tabla 18. Resumen de las condiciones óptimas para la extracción de seis HAP	71
Tabla 19. Resumen de las condiciones óptimas, dentro del intervalo del experimento factorial, para la extracción de seis HAP, utilizando fibras de PDMS	78
Tabla 20. Tiempos de retención por compuesto para este método cromatográfico	80
Tabla 21. Datos obtenidos a partir del análisis del blanco	84
Tabla 22. Resultados de las pruebas F para la relación entre varianzas, por compuesto, para un nivel de significancia de $\alpha=0,05$	86
Tabla 23. Resultados de las pruebas t para la diferencia de medias, por compuesto, para un nivel de significancia de $\alpha=0,05$	87
Tabla 24. Resultados de concentración obtenida en los ensayos de reproducibilidad, y parámetros estadísticos	88
Tabla 25. Límites de detección y Cuantificación para la calibración del método	94
Tabla 26. Resultados del análisis de la muestra de agua de río	96
Tabla 27. Resultados del análisis de la muestra de agua de río con cantidades conocidas de patrón, y cálculo de % de recuperación.	97

1. INTRODUCCIÓN

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) conforman un grupo de especies químicas orgánicas que representa un peligro potencial para la vida en el planeta. Sus propiedades fisicoquímicas les confieren la capacidad de persistir por largos períodos de tiempo en el ambiente. Si bien pueden originarse durante procesos bio-geoquímicos que ocurren naturalmente, su fuente más importante está vinculada a la quema incompleta de combustibles orgánicos, durante el desarrollo de diversas actividades humanas. Estos compuestos son liberados a la atmósfera, y luego distribuidos en cada sección del ambiente, respondiendo a su comportamiento individual. Algunos son depositados en las aguas superficiales, hábitat de millones de especies y fuente de consumo para los seres humanos, donde persisten en la fracción acuosa, o son acumulados en los sedimentos, y en los tejidos grasos del cuerpo de los organismos vivos.

Por su toxicidad inmediata y sus propiedades cancerígenas y mutanogénicas, existe una necesidad de determinar su concentración en cada uno de los elementos ambientales presentes en los sistemas superficiales, especialmente en la fracción acuosa de sistemas fluviales, donde tienen un mayor potencial para distribuirse a gran escala, y de existir en formas disponibles para la bio-acumulación. Numerosas técnicas han sido desarrolladas para monitorear contaminantes en muestras de aguas naturales (Branislav 2005). Para los HAP, presentes en concentraciones traza y ultra traza, es necesaria una técnica de extracción que garantice la realización de un análisis sensible, y capaz de detectar diferencias en la concentración de los analitos, en el orden de los $\mu\text{g/L}$.

La Micro-extracción en fase sólida (MEFS) ha sido utilizada internacionalmente como una técnica de captura de HAP en aguas, para su posterior cuantificación. Presenta ventajas sobre otras técnicas de extracción, tales como: el mínimo consumo de solventes, la mínima producción de desechos, y la capacidad de analizar pequeños volúmenes de muestra. Sin embargo, la

eficiencia de la operación de extracción está determinada por un conjunto de variables experimentales, ambientales, y operacionales, que deben ser optimizadas. Diversas condiciones de extracción han sido reportadas por trabajos que han antecedido a esta investigación. Sin embargo, todavía es necesario plantear un estudio de optimización detallado para cada compuesto, con miras a establecer la condición de máxima eficiencia de extracción, para la cuantificación en muestras de aguas superficiales venezolanas.

En este sentido, se ha planteado como objetivo general de este proyecto de investigación:

Optimizar las variables de la técnica de Micro-extracción en fase sólida por Inmersión directa (MEFS-ID) aplicada al análisis de seis (6) Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en solución acuosa.

Para lograrlo, será necesario cumplir con los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar las condiciones óptimas de operación de la técnica de Micro-extracción en fase sólida por Inmersión directa (MEFS-ID), en términos de las variables: tipo de fibra, tiempo de extracción, y temperatura del agua durante la extracción.
2. Proponer un protocolo de operación que permita analizar a los seis compuestos simultáneamente.
3. Establecer los valores correspondientes a las figuras de mérito del método propuesto, tales como: reproducibilidad, linealidad, y límites de detección y cuantificación.
4. Estudiar la respuesta al protocolo de operación en una muestra de agua de río.

2. MARCO TEÓRICO

En esta sección son presentados los fundamentos teóricos que sirven de bases para la construcción de este proyecto de investigación, entre los cuales se incluyen los correspondientes a la estructura química y propiedades de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, y a la utilidad del método de micro-extracción en fase sólida para su cuantificación. Finalizando con la información obtenida de las investigaciones que antecedieron a este proyecto.

2.1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Entre la variedad de contaminantes químicos que actualmente se encuentran dispersos en los distintos compartimientos del sistema superficial, existe un grupo que resalta por sus propiedades físico-químicas. Es conocido como el grupo de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Está conformado por más de 100 compuestos, y todos se caracterizan por presentar una estructura química basada en la fusión de dos o más anillos bencénicos, que comparten dos o más átomos de carbono (ATSDR, 1995; Baird, 2001; Nollet, 2007). Sus propiedades son inusuales entre los compuestos orgánicos. Presentan condiciones de estabilidad a la alteración química, que aumenta con el número de anillos, y que determina sus tiempos de persistencia en el ambiente superficial (Nollet, 2007). Y sin embargo, la mayoría de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos no tienen una aplicación práctica en la industria. Su creación no es planificada. Son parte del producto secundario de un conjunto de procesos que involucran transformaciones químicas de sustancias que contienen carbono e hidrógeno (ATSDR, 1995; Baird, 2001; Doong, 2004; King, 2004).

2.1.1 ORIGEN DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los procesos que dan origen a los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos son variados, y pueden estar asociados a eventos, tanto naturales, como antropogénicos. Diversas teorías han intentado explicar los mecanismos involucrados en la creación de estos compuestos durante distintos tipos de procesos (Richert, 2000), siendo establecida la siguiente clasificación: los pirogenéticos, los diagenéticos, y los petrogenéticos (Baird, 2001).

Los procesos pirogenéticos originan Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos como un subproducto de la quema incompleta de combustibles orgánicos. Pueden ocurrir durante eventos naturales; como los incendios forestales; o durante el desarrollo de actividades humanas que involucren la combustión de materia orgánica: como la incineración de madera o desechos sólidos, y la quema de combustibles fósiles para el transporte y los procesos industriales. En la actualidad, este tipo de proceso es considerado como la fuente más importante de contaminantes orgánicos en la atmósfera (Baird, 2001; Nollet, 2007).

Estos procesos de combustión incompleta, que incluyen a las reacciones químicas de creación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, están divididos en dos fases. En la primera fase, un aumento inicial de temperatura (alrededor de 400 °C) en presencia de un agente comburente (oxígeno), inicia la serie de reacciones de pirólisis. Entonces, los constituyentes originales del material orgánico, a pesar de presentar una importante diversidad estructural relacionada a su fuente, son, en alguna medida, craqueados, perdiendo cadenas alifáticas. Como resultado, es creada una mezcla de compuestos orgánicos volátiles y combustibles, disponibles para la oxidación o para una segunda etapa de craqueo. Esta pérdida también genera un residuo sólido, cuyo re-arreglo estructural resulta en un aumento de la aromaticidad (Straka & Hevelcová, 2012).

La segunda fase del proceso de combustión se inicia con la oxidación de los compuestos orgánicos volátiles producidos en la primera fase. La temperatura aumenta violentamente, y supera a los 400°C. Si no hay suficiente oxígeno para quemar a todos los constituyentes de la mezcla, reacciones de pirolisis vuelven a ocurrir, generando moléculas de menor peso molecular: hidrocarburos lineales, cíclicos, y aromáticos de uno, dos o tres anillos bencénicos, en forma de radicales libres. Rápidamente, estos radicales pasan por un conjunto de reacciones de re-polimerización, de mecanismos variados, que resultan en el crecimiento progresivo del tamaño las moléculas aromáticas, hasta generar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de alto peso molecular.

Al mismo tiempo, el residuo sólido aumenta en aromaticidad, hasta convertirse en un material carbonizado. Luego de ser creados, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos son sorbidos, acumulados y preservados dentro del espacio poroso de este material carbonizado, o en secciones de materia orgánica original, inerte al proceso de combustión, y rodeada por una superficie carbonizada (Richert, 2000; Baird, 2001; Straka & Hevelcová, 2012).

Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos que tienen un origen diagenético son parte de los productos secundarios de las reacciones de transformación de materiales orgánicos, ocurridas durante los procesos geológicos que también están involucrados en la generación de rocas sedimentarias. Cuando la materia orgánica producida en ambientes superficiales es acumulada, preservada, y soterrada, reacciones de alteración química y biológica resultan en la pérdida de grupos funcionales y átomos de hidrógeno, y en un aumento de la aromaticidad de las moléculas remanentes, entre ellas, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (Baird, 2001; López, 2013). Por último, aquellos que tienen un origen petrogenético, son parte de los productos secundarios de los procesos de producción, refinación y transporte del petróleo y sus derivados, (Baird, 2001; Orozco, 2004; Nollet, 2007).

2.1.2. CLASIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

A pesar de que existe una importante diversidad de estructuras químicas dentro del grupo de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, la comunidad científica internacional ha decidido orientar los estudios de monitoreo hacia un grupo de 16 compuestos representativos, considerados como prioritarios por su abundancia y toxicidad (Nollet, 2007). Por el contraste que existe entre sus propiedades físico-químicas, tres grupos han sido diferenciados: aquellos que poseen tres o menos anillos, conocidos como Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Livianos, aquellos que poseen cuatro anillos, conocidos como Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos medianos, y aquellos que poseen más de cuatro anillos, conocidos como Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Pesados (ATSDR, 1995; Baird, 2001; Nollet 2007). Esta variabilidad determina el comportamiento de cada compuesto en los distintos compartimientos del sistema superficial, así como su respuesta a los distintos procedimientos de pre-concentración para el análisis químico (ATSDR, 1995; Baird, 2001; Doong, 2004; Cheng, 2013). Sus estructuras químicas correspondientes se encuentran expuestas en la figura 1, y sus propiedades fisicoquímicas, en la Tabla 1.

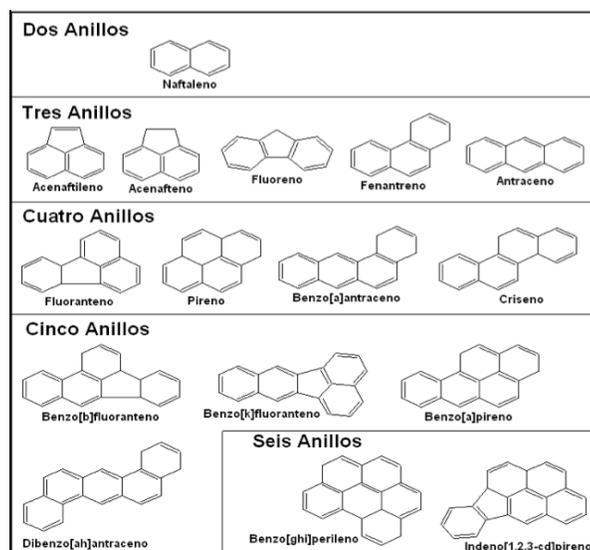


Figura 1. Estructuras químicas de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Prioritarios.

Tomado de USAEPA, 2010

Tabla 1. Propiedades Físicoquímicas de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, considerados prioritarios para el monitoreo. Tomado de ATSDR, 1995.

HAP	Fórmula Química	Número de anillos	Peso Molecular (g/mol)	Presión de Vapor (mmHg)	Solubilidad en agua (mg/L)	Log Ko/w
HAP de bajo peso molecular (livianos)						
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	2	128,17	7,5 x 10 ⁻¹	31	3,36
Antraftaleno	C ₁₂ H ₈	3	152,20	2,9 x 10 ⁻²	16	4,03
Acenaftaleno	C ₁₂ H ₁₀	3	154,21	4,5 x 10 ⁻³	3,8	3,55
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	3	166,20	3,2 x 10 ⁻⁴	1,98	4,18
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	3	178,20	6,8 x 10 ⁻⁴	1,20	4,57
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	3	178,20	1,7 x 10 ⁻⁵	7,6 x 10 ⁻²	4,45
HAP de medianos peso molecular (medianos)						
Fluoreteno	C ₁₆ H ₁₀	4	202,26	5,0 x 10 ⁻⁶	0,26	5,22
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	4	202,26	2,5 x 10 ⁻⁶	7,7 x 10 ⁻²	5,18
Benzo[a]antraceno	C ₁₈ H ₁₂	4	228,29	2,2 x 10 ⁻⁸	1,0 x 10 ⁻²	5,91
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	4	228,30	6,3 x 10 ⁻⁷	2,8 x 10 ⁻³	5,91
HAP de alto peso molecular (pesados)						
Benzo[b]fluoretano	C ₂₀ H ₁₂	5	252,30	5,0 x 10 ⁻⁷	1,2 x 10 ⁻³	6,50
Benzo[k]fluoretano	C ₂₀ H ₁₂	5	252,30	9,6 x 10 ⁻¹¹	7,6 x 10 ⁻⁴	6,20
Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂	5	252,30	5,6 x 10 ⁻⁹	2,3 x 10 ⁻³	6,50
Dibenzo[a,h]antraceno	C ₂₂ H ₁₄	5	278,35	1,0 x 10 ⁻¹⁰	5,0 x 10 ⁻⁴	6,20
Benzo[g,h,i]perileno	C ₂₂ H ₁₂	6	276,34	1,0 x 10 ⁻¹⁰	2,6 x 10 ⁻⁴	7,10
Indeno[1,2,3-cd]pireno	C ₂₂ H ₁₂	6	276,30	1,0 x 10 ⁻¹¹	6,2 x 10 ⁻²	6,50

2.1.3. TOXICIDAD DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Ensayos en animales han demostrado que los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos son potencialmente tóxicos. La exposición aguda, proveniente de fuentes puntuales, tiene efectos negativos directos en la salud humana. Concentraciones pequeñas, de unas pocas partes por millón, son capaces de incidir negativamente en distintos procesos metabólicos, y causar un estrés físico que puede ser letal. Sin embargo, es más común la ocurrencia de intoxicación por exposiciones crónicas: largos períodos de tiempo en concentraciones pequeñas, en el orden de unas pocas partes por billón, por debajo del límite de toxicidad, pero acumulativas. De esta forma, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos son potencialmente cancerígenos y mutanogénicos (ATSDR, 1995; Baird, 2001; Doong, 2004, Nollet, 2007).

Esta afirmación, en la actualidad, está sujeta a un conjunto de consideraciones: primero, la comunidad humana en general casi siempre está expuesta a cantidades pequeñas, en el orden concentración de partes por billón, por debajo del límite de toxicidad. Tampoco suele estar expuesto únicamente a un contaminante específico, sino a una compleja mezcla de ellos, dificultando establecer relaciones claras entre su presencia en el ambiente con la ocurrencia de cáncer y mutaciones (USDHHD, 1995; Nollet, 2007; Séralini, 2013). Además, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos no son propiamente tóxicos, sólo acumulativos. Las especies cancerígenas y mutanogénicas son sus correspondientes metabolitos, con grupos moleculares polares, capaces de interaccionar con moléculas de ácidos grasos, como las de ácido desoxirribonucleico (ADN), en el núcleo celular (Baird, 2001).

Los mecanismos involucrados en la formación de metabolitos a partir de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos originales son específicos para cada compuesto. Sin embargo, casi todos se basan en la conformación de grupos epóxidos en uno o más anillos aromáticos, que luego son hidroxilados. Entonces, estos derivados pueden comportarse como especies electrofílicas, capaces de

establecer interacciones electrostáticas con los grupos amino de la molécula de ADN, que actúan, a su vez, como centros nucleofílicos. Esta interacción resulta en la alteración de la estructura química del ADN (Baird, 2001; Nollet, 2007). Un posible mecanismo correspondiente a la creación de un metabolito del Benzo[a]pireno es presentado en la figura 2.

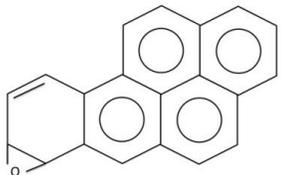
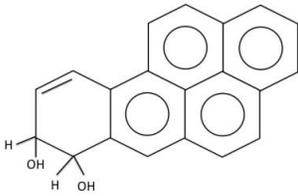
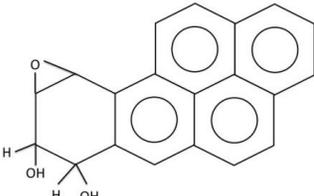
	<p>Primera transformación química del HAP original: formación de un Grupo epóxido en un enlace C=C.</p>
	<p>Segunda transformación: reacción del epóxido con moléculas De agua, para formar el metabolito hidroxilado</p>
	<p>El proceso continúa repetidas veces</p>

Figura 2. Posible mecanismo de formación de un metabolito cancerígeno del Benzo[a]pireno.

Tomado de Baird, 2001.

El proceso carcinogénico ocurre cuando esta alteración es remanente durante los procesos de división celular en el propio individuo afectado, originando tumores. El proceso mutanogénico ocurre cuando esta alteración resulta en cambios en los cromosomas y afectación de procesos reproductivos (incluyendo malformaciones generadas durante el desarrollo embrionario). Ensayos en ratones han confirmado el potencial cancerígeno y mutanogénico de los siguientes Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos: Benzo[a]pireno (mayor potencial cancerígeno) benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoretano, benzo[k]fluoretano, benzo[g,h,i]perileno; criseno, dibenzo[a,h]antraceno, e indeno[1,2,3-cd]pireno (Nollet, 2007). El máximo nivel de control de Benzo[a]pireno (HAP con mayor

potencial cancerígeno), reportado por la Agencia de Protección ambiental de los Estados Unidos, es de sólo 0,2 µg/L

El peligro de la dispersión de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en el ambiente es su potencialidad para ser acumulados en los tejidos grasos de los organismos vivos. Por su carácter hidrófobo, las pequeñas concentraciones en el ambiente pueden aumentar exponencialmente en niveles superiores de la cadena trófica, en un proceso conocido como bio-magnificación (Carson, 1960; Baird, 2001; Séralini, 2013).

2.1.4. COMPORTAMIENTO DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN EL AMBIENTE SUPERFICIAL

Una vez que son liberados, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos se distribuyen en los distintos compartimientos del ambiente superficial, respondiendo a sus propiedades fisicoquímicas individuales. Su presión de vapor y su solubilidad en agua determinará su movilidad, mientras que su afinidad por fases orgánicas determinará su potencial para ser acumulado en la superficie de matrices sólidas. Mezclas complejas de contaminantes orgánicos han sido detectadas, en concentraciones significativas, en muestras de gas, partículas atmosféricas (ATSDR, 1995; Fernández, 2011), aguas, suelos, sedimentos (Doong, 2004; Guerra, 2013), y dentro de los tejidos de los organismos vivos (ATSDR, 1995; Mujica, 2010).

En el caso de los sistemas fluviales, el comportamiento de estas especies está determinado, además, por las propiedades fisicoquímicas del agua y del resto de las fases presentes: especies orgánicas disueltas, material coloidal, sólidos suspendidos, y sedimentos de fondo. Por su carácter hidrófobo, que resulta en bajos valores de solubilidad en agua, y altos valores de coeficientes de partición, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos presentan una afinidad significativa con la superficie de las partículas sólidas, especialmente aquellas compuestas por

material orgánico (materia orgánica particulada), y aquella perteneciente a la fracción fina de los sedimentos de fondo.

Sólo limitadas porciones de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos permanecen en la fase acuosa. Estas, a su vez, pueden diferenciarse en: la fracción disuelta libre, la fracción asociada al material coloidal que pasa a través de los poros de un filtro de 45 μm , y la fracción asociada a la materia orgánica disuelta, compuesta principalmente por sustancias húmicas (Doong, 2004; King, 2004; Xia, 2012).

En el año 2012, Xia y colaboradores determinaron las concentraciones de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras de agua del río Yongding, en China, con miras a diferenciar la contribución de la fracción disuelta libre, de la contribución de otras fracciones. Los resultados de su investigación sugieren que sólo la fracción disuelta libre es disponible para ser asimilada por los organismos vivos, y por eso determina al verdadero riesgo eco-toxicológico. En este sentido, Xia resalta la importancia de diferenciar la fracción disuelta de las fracciones asociadas al material húmico y a las partículas coloidales, y demostró, mediante ensayos simulados, que la concentración distribuida en la fase acuosa disminuye progresivamente con el aumento de la cantidad de sólidos suspendidos.

2.1.5. SISTEMAS DE DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Autores que han antecedido a este trabajo reportan que el instrumento de análisis más utilizado para determinar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, entre otros compuestos orgánicos, luego de haber realizado extracciones con dispositivos de MEFS, es el Cromatógrafo de Gases (Doong, 2000; Havenga & Rohwer, 2002; Doong, 2004; King, 2004; Reinawati, 2009; Cheng, 2013). Este versátil sistema se basa en la separación de una mezcla de analitos entre una fase móvil (gas de arrastre), y una fase estacionaria líquida, fija sobre la superficie interna de una columna capilar (Skoog, 2008). Este instrumento cuenta con

diversos tipos de sistemas de detección. Para efectos de este trabajo, sólo serán discutidos los sistemas utilizados durante el trabajo experimental: el sistema de detección de ionización a la llama, y el sistema de detección de espectrometría de masas.

En el sistema de detección por ionización a la llama (F.I.D), los analitos pasan por una llama, donde son pirolizados por efecto de la temperatura. Los iones producidos son separados por una diferencia de potencial, y la corriente se mide con un amplificador operacional de alta impedancia. Este sistema de detección responde al número de átomos de carbono que se reducen en la llama, por unidad de tiempo, y por eso es sensible a la masa del analito (no a su concentración). Los gases no combustibles, como el agua, no generan ninguna respuesta ante este sistema. Por eso, es ideal para determinar compuestos orgánicos (como Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) en muestras posiblemente contaminadas con agua (Skoog, 2008).

. Por otro lado, en el sistema de detección por Espectrometría de masas moleculares (E.M.), los analitos son analizados por un espectrómetro de masas, a medida en que van saliendo de la columna capilar. En este sistema, las moléculas son ionizadas al vacío (por impacto de electrones, o bien, por ionización química), generando fragmentos de relaciones masa/carga particulares. Este barrido es realizado repetidas veces durante toda la corrida cromatográfica. La información obtenida puede manifestarse de tres formas: En la primera, se puede reportar el espectro de masas de un momento específico de la corrida, para identificar con certeza las especies químicas que aparecen en este momento. En la segunda, conocida como el modo de Iones Totales, se suman las abundancias de iones de todos los espectros generados durante la corrida y se grafican en función al tiempo. El resultado es un cromatograma, que contiene señales cuya intensidad (o área) es proporcional a la abundancia del analito en la muestra. La tercera, conocida como el modo de supervisión de un ion selecto (o iones individuales, S.I.M, por sus siglas del inglés), se selecciona un único valor de relación masa/carga, para ser monitoreado durante la corrida cromatografía. Éste último es

particularmente útil al analizar contaminantes en muestras de agua, porque reduce la intensidad de las señales de cualquier otro componente que no corresponda a los analitos de interés, mejorando significativamente la relación señal-ruido. (Skoog, 2008).

2.2. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LA CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS PRESENTES EN LA FASE ACUOSA

El trabajo de cuantificación de especies químicas dispersas en matrices ambientales, mediante cualquier técnica analítica, requiere de un procedimiento previo de preparación de muestras. Esto, aunado con la responsabilidad que implica reportar un dato analítico en un compartimiento específico del ambiente, determina la necesidad de desarrollar métodos sensibles, selectivos, y capaces de detectar cantidades ínfimas del analito, en el orden de los $\mu\text{g/L}$ (Doong, 2000).

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, por sus cualidades hidrófobas, existen sólo en concentraciones traza dentro la fracción acuosa (Doong, 2000; Cheng, 2013). Por eso, para ser cuantificados, es necesario primero pre-concentrarlos, o extraerlos, y así generar un nuevo objeto de análisis, que los contenga en cantidades detectables por medio de una técnica instrumental (para el caso, cromatografía de gases, acoplado a espectrometría de masas). La Micro-extracción en Fase Sólida (MEFS), conocida internacionalmente por sus siglas del inglés (SPME), es una técnica que ha demostrado ser capaz de cumplir con esta tarea (Doong, 2000). Fue desarrollada en sus inicios por Belardi y Pawliszyn, en 1989, y se fundamenta en la repartición del analito entre la matriz de la muestra, y una capa fina de un material capaz de sorberlo: una fase de extracción, dispersa sobre un pequeño soporte sólido. Esta fase es expuesta al contacto con la muestra durante un tiempo definido. Luego, el analito extraído es desorbido térmicamente en el interior del instrumento de análisis químico (Lord y Pawliszyn, 2000).

La naturaleza de este proceso de reparto estará determinada, en primer lugar, por la afinidad química que existe entre el analito y el componente de fase de extracción. Relación que compite con aquella que existe entre el analito y los componentes de la matriz de la muestra (Doong, 2000; Lord y Pawliszyn, 2000; Reinawati, 2009; Cheng, 2013).

Así mismo, el proceso de reparto es capaz de alcanzar una condición de equilibrio en un tiempo determinado. Esta condición se alcanza cuando las concentraciones del analito, tanto en matriz de la muestra, como en la fase de extracción, se mantienen constantes, independientemente del incremento del tiempo de exposición (Louch, 1992; Lord y Pawliszyn, 2000). Sin embargo, en la práctica, es posible aplicar la técnica de MEFS, sin alcanzar el tiempo de equilibrio (condición de pre-equilibrio). En esta modalidad, las cantidades de analito capturadas por la fase de extracción, pueden variar en función del tiempo de exposición, y de otras condiciones experimentales, ambientales, y operacionales (Lord y Pawliszyn, 2000).

2.2.1. LAS VENTAJAS DE LA MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON FIBRAS

La simplicidad de la operación de extracción con fibras es la razón por la cual la MEFS es una alternativa muy eficiente en el análisis de contaminantes químicos ambientales. No requiere el uso de solventes tóxicos, como la extracción líquido-líquido, o la extracción en fase sólida, y por eso, su práctica es consecuente con la intención de los operadores que pretendan reportar datos sobre la dispersión de contaminantes químicos en el ambiente (Louch 1992, Doong, 2000; Lord y Pawliszyn, 2000; Havenga y Rohwe, 2002; Cheng, 2013). La operación transcurre en poco tiempo, y garantiza la cuantificación de analitos que se encuentran en concentraciones traza. A demás, puede ser aplicada a muy pequeños volúmenes de muestra (Doong 2000). Ello reduce la necesidad de transportar y preparar objetos de gran volumen, desde el campo, hasta el espacio

de análisis. De hecho, puede aplicarse directamente en el sitio de muestreo. Las fibras acumularán analitos, y estos no serán desorbidos hasta la realización del análisis químico (Lord y Pawliszyn, 2000). Distintos tipos de dispositivos han sido desarrollados para hacer de esta una operación sencilla. La fibra, muy pequeña, ha sido adaptada al interior de la punta de una jeringa, que la protege del entorno, pero que la expone a la solución cuando es requerido (Lord y Pawliszyn, 2000).

Lo relevante es que, una vez finalizada la operación y guardada la fibra dentro de la jeringa, ésta puede introducirse directamente al interior de un instrumento de análisis químico. El instrumento más utilizado luego de realizar MEFS es el cromatógrafo de gases (Louch, 1992), cuyo puerto de inyección, un sistema aislado y termostataado, hace que los analitos sean desorbidos térmicamente de la fibra, y arrastrados al interior de la columna cromatográfica (Lord y Pawliszyn, 2000; Cheng, 2013). Por medio del cromatógrafo de gases, los analitos son separados, identificados, y cuantificados, utilizando cualquier dispositivo de detección. En el caso de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, los detectores comúnmente utilizados son el espectrómetro de masas y el detector de ionización a la llama. Por otra parte, en el caso de la cromatografía líquida, los analitos son arrastrados desde la fibra por el paso de un solvente (Lord y Pawliszyn, 2000; Cheng, 2013).

2.2.2. EL FUNDAMENTO TEÓRICO DEL PROCESO DE REPARTO

La ley de difusión de Graham señala que la velocidad de difusión de las moléculas en los fluidos es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su densidad, o bien, de su masa molecular. Moléculas más densas y de mayor masa, tendrán un menor coeficiente de difusión (Maron y Prutten, 1980). Y es precisamente la capacidad de difusión de los analitos, tanto en la muestra como en el revestimiento de la fibra (fase de extracción), el primer parámetro limitante del proceso de reparto en la MEFS, desde el punto de vista cinético (Louch, 1992;

Lord, 2000). El proceso inicia cuando la fibra es expuesta a la muestra, pero el tiempo necesario para alcanzar la condición de equilibrio dependerá de los coeficientes de difusión de los analitos. Ellos requieren ser movilizados, desde el seno del fluido, hasta los límites de la fibra, para ser sorbidos. Por eso se esperan menores intervalos de tiempo para extraer componentes livianos en la condición de equilibrio, que para extraer componentes pesados (Doong, 2000; Lord y Pawliszyn, 2000; King, 2004).

Luego, se inician los procesos de intercambio de masa del analito, desde la matriz de la muestra, hasta el recubrimiento de la fibra. Se describe lo ocurrido como un proceso de sorción, que incluye tanto al proceso de adsorción, como a la absorción (Cheng, 2013). Cuando el recubrimiento es un sólido, con una estructura cristalina definida, predominan los procesos de adsorción, porque la difusión de los analitos en el interior del material está limitada sólo a los espacios porosos superficiales. Cuando el recubrimiento es un líquido, las moléculas de la fase extracción son capaces de solvatar moléculas del analito. Además, en la fase líquida, el analito tiene mayor potencial para la difusión, y puede penetrar todo el volumen del revestimiento en poco tiempo. (Lord y Pawliszyn, 2000).

Las concentraciones en el equilibrio estarán influenciadas por la afinidad química que exista entre las moléculas del analito y los componentes del borde del recubrimiento de la fibra, en competencia con la relación análoga que existe entre las moléculas del analito y los componentes de la matriz de la muestra. Así, si las moléculas del analito son de carácter hidrófobo, pero se encuentra en una matriz acuosa, tienen posibilidades limitadas de establecer interacciones intermoleculares con las moléculas de agua, de alta polaridad. Pero si estas moléculas entran en contacto con una fibra recubierta con una fase de extracción de componente polimérico, lipófilo, ambos componentes podrán establecer una interacción intensa. Entonces, el analito se repartirá entre la matriz y la fase de extracción (Doong, 2000; Lord y Pawliszyn, 2000).

Esta relación de reparto puede expresarse en términos de un valor de Kf/m , o coeficiente de reparto, que es el cociente del valor de concentración (en la condición de equilibrio) del analito en la fibra, entre el valor de concentración (en la condición de equilibrio) del analito en la muestra (Louch, 1992). A mayores valores del coeficiente, más intensas serán las relaciones que existan entre el analito y el recubrimiento de la fibra, y mayor será la eficiencia de la extracción. Una vez alcanzada la condición de equilibrio, la cantidad de analito extraída permanece constante (Lord y Pawliszyn, 2000). Louch, en 1992, desarrolló, a partir de ensayos de extracción con fibras de revestimientos líquidos, una ecuación matemática que permite describir esta condición (Ecuación 1).

$$n = \frac{Kf/m \times Vf \times Vm \times Co}{Kf/s \times Vf + Vm} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

n , es la cantidad en moles de analito extraídos por la fibra en la condición de equilibrio.

Kf/m , es el coeficiente de reparto en condiciones de equilibrio.

Vf , es el volumen de la fase de extracción (volumen del revestimiento de la fibra).

Vm , es el volumen de la muestra

Co , es la concentración del analito en la muestra antes de la extracción.

Obsérvese la dependencia que tiene en el proceso de extracción las variables: tipo y tamaño de la fibra en relación al analito, volumen del recipiente que contenga la muestra, y la concentración inicial del analito. Todas ellas afectan al proceso desde el punto de vista termodinámico, y, como las características de las fibra, así como las condiciones específicas de cada ambiente de operación, pueden variar, son necesarias de optimizar. (Louch, 1992).

La ecuación 1 sólo puede ser utilizada en la condición de equilibrio. Una segunda ecuación deriva de ella, cuando se asume que el volumen de la fase de extracción es despreciable en comparación al volumen de la muestra. La ecuación 2 es el resultado de esta asunción. En ella resalta la dependencia directa que tiene el valor de la concentración inicial del analito en la muestra, en la cantidad de analito extraída (los valores de volumen de la fase de extracción, y coeficiente de reparto, son constantes) (Lord y Pawliszyn, 2000).

$$n = (Kf / s \times Vf \times Co) \quad \text{Ecuación 2.}$$

2.2.3. MODOS DE EXTRACCIÓN CON FIBRAS REVESTIDAS

En la reseña histórica publicada por Lord y Pawliszyn en el año 2000, son presentadas tres formas de realizar micro extracción con fibras: La extracción directa, la extracción en el espacio confinado, y la extracción con una membrana protectora. En la primera, la fibra es expuesta directamente en la matriz de la muestra. Si es una muestra en fase gaseosa, entonces la fibra es expuesta a un volumen del gas. Si es una solución líquida, la fibra es sumergida en el seno del líquido. Como los gases tienen un muy alto coeficiente de difusión (Maron y Prutten, 1980), no es necesario ningún tipo de estímulo para alcanzar la condición de equilibrio. Pero en matrices acuosas la difusión es limitada. En consecuencia, es necesaria la realización de operaciones que estimulen los procesos de transferencia de masas, desde el punto de vista cinético. Para ello, las variables temperatura y agitación deben ser optimizadas. Un incremento de ambas estimula la difusión de los analitos, pero también pueden promover su expulsión de la fase de extracción (Louch, 1992; Lord y Pawliszyn, 2000; King, 2004).

En la segunda, el modo de espacio confinado, el analito es extraído indirectamente. No desde la matriz de la muestra, si no desde su fase de vapor. Para ello, los analitos necesitan primero ser transportados al espacio confinado, por encima del límite de la fase líquida, antes de alcanzar el revestimiento de la fibra. Esta modalidad presenta muchas ventajas, las cuales justifican su aplicación en todas las oportunidades posibles: protege a las fibras, a largo plazo, de los daños que puedan generar los componentes de la matriz. En los muestreos individuales, inhibe el agotamiento de la capacidad de sorción de las fibras causado por componentes interferentes, de alto peso molecular, y no volátiles (muy abundantes en muestras reales de aguas de río). A demás, permite realizar modificaciones de las condiciones fisicoquímicas de la solución sin afectar a la fibra (Lord y Pawliszyn, 2000, Cheng, 2013).

Entre ambas técnicas expuestas, existen diferencias importantes, que tienen una relación directa con la volatilidad del analito, y una influencia significativa en la eficiencia de la extracción, desde el punto de vista cinético. Por eso es tan importante escoger la adecuada. En el modo de espacio confinado, la extracción del analito está limitada por el proceso de transferencia de masa desde la fase líquida a la fase de vapor, de modo que los volátiles alcanzarán un equilibrio de reparto en un tiempo menor. De un modo similar, las concentraciones mayores del analito en la fase líquida generarán una contribución mayor a la fase de vapor. La temperatura y la agitación también influyen en la presión de vapor (Lord y Pawliszyn, 2000; King, 2004).

De manera general, la difusión de analitos volátiles es más eficiente, tanto en la fase líquida para la extracción directa, como en la extracción en el espacio confinado (Doong, 2000; Lord y Pawliszyn, 2000; Cheng, 2013). La tercera configuración implica una extracción indirecta, en la cual los analitos pasan a través de una membrana, que protege a la fibra de los daños, y que permite analizar muestras con alto contenido de contaminación, impregnadas de sustancias que podrían saturar a la fibra, y agotar así su capacidad de sorción

(Lord y Pawliszyn, 2000). Para efectos de este proyecto de investigación, sólo la primera modalidad será aplicada y discutida.

2.2.4. EL REVESTIMIENTO DE LAS FIBRAS

La ecuación 1 (Louch 1992), describe la dependencia de las propiedades del revestimiento de las fibras en el proceso de extracción. Con el paso del tiempo, fases de extracción de composición variada han sido desarrolladas para aplicaciones específicas. Un ejemplo es el empleo de fases poliméricas líquidas no polares, representadas por el poli(dimetil-siloxano), mejor conocido por sus iniciales del inglés: PDMS.

Doong, en el 2000, realizó experimentos comparativos de extracción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en fase acuosa, sobre muestras sintéticas y reales, demostrando que el método es aplicable a muestras de agua de río. Reportó que los revestimientos de PDMS, de PDMS-DVB (poli(dimetilsiloxano) revestido con divinilbenzeno) y poliacrilato (PA), muestran una fuerte afinidad con los analitos no polares. Pero destaca la eficiencia de los revestimientos de PDMS en la extracción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, y sugiere que los de PA, sean utilizados para compuestos de mayor polaridad. Havenga & Rohwer, en el 2002, King, en el 2004, Reinawati, en el 2009, y luego Cheng, en el 2013 también demostraron la aplicabilidad de la técnica en aguas superficiales, observando extracciones eficientes de HAP en fase acuosa sobre fibras revestidas con PDMS.

El volumen del revestimiento también es un factor determinante en la ecuación de Louch. Pero también tiene influencia en la cinética de la reacción, porque un analito tardará más tiempo en distribuirse en una fase de extracción de mayor espesor (Doong, 2000). Existe, además, un espesor activo específico para cada proceso de reparto, definido como “Espesor de borde... δ ” (Traducido de Lord y Pawliszyn, 2000). Este valor corresponde a la región del revestimiento donde el analito fluye, hasta alcanzar el límite marcado por la condición de

equilibrio. Su valor depende del coeficiente de difusión de cada analito en la fase de extracción, y de las propiedades físicas específicas de cada revestimiento. Así, pueden existir distintos valores de espesor de borde para distintos analitos, incluso en una misma fase de extracción, en las mismas condiciones experimentales; o distintos valores para un mismo analito, utilizando revestimientos distintos (Lord y Pawliszyn, 2000).

2.2.5. LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES

Para aplicar la técnica de micro extracción en fase sólida a la cuantificación de especies químicas, es necesario antes optimizar un conjunto de variables experimentales, y generar un protocolo de análisis reproducible, sensible, que garantice la obtención de datos confiables y de calidad, de acuerdo a parámetros estadísticos (Reinawati, 2009). Para ello, será utilizada toda la teoría desarrollada en torno al proceso de extracción. En este sentido, existen dos tipos de variables experimentales: las que afectan al proceso de extracción desde el punto de vista termodinámico, y que de alguna forma están involucradas en la ecuación de Louch, y las que afectan la cinética del proceso (Lord y Pawliszyn, 2000).

Las que afectan la eficiencia del proceso extracción (número de moles extraídos) desde el punto de vista termodinámico, son:

- El tipo de recubrimiento de la fibra (fase de extracción), en relación a la identidad química del analito. Dos variables contribuyen a esta relación: el componente del recubrimiento, y el volumen del recubrimiento. Luego, la magnitud de la interacción que se establece entre la fase de extracción, y el analito, se expresa en términos del valor de coeficiente de reparto.
- El volumen de la muestra.
- La concentración inicial del analito en la muestra (que también influye en la cinética, cuando las concentraciones son elevadas).

Lord y Pawliszyn, en el 2000, establecieron una lista con el resto de las variables, que afectan únicamente a la cinética del proceso. Ellas determinan el mecanismo implicado en el proceso de reparto, desde el inicio de la exposición, hasta el fin de la extracción, así como el tiempo necesario para que el sistema alcance la condición de equilibrio. Cuando el punto final de la extracción no corresponda al tiempo de equilibrio, estas variables tendrán una influencia importante en el número de moles de analito extraído. Estas variables son:

- El tiempo de exposición, que permitirá alcanzar la condición de equilibrio, o una condición de pre equilibrio. Han sido reportados en trabajos anteriores distintos valores de tiempo de exposición, todos optimizados para condiciones específicas de volumen de muestra, tipo de fibra, y método de agitación. Métodos de agitación más eficientes en muestras de menor volumen, permitieron extraer eficientemente Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de alto y bajo peso molecular en tiempos relativamente cortos (Doong, 2000; Havenga & Rohwer, 2002; Doong, 2004; King, 2004; Reinawati, 2009; Cheng, 2013). En el 2004, Doong reportó valores de concentración de HAP en muestras de agua del Río Gao-Ping, en Taiwan, utilizando tiempos de exposición de 90 minutos, determinando eficientemente HAP de dos, tres, cuatro, y cinco anillos.
- El espesor de borde de la fibra, que depende de las propiedades físicas de la fase de extracción.
- La Temperatura estimula la difusión del analito en la matriz de la muestra, siendo un factor limitante en el proceso de transferencia de masas. Cuando se utiliza la configuración de espacio confinado, la temperatura determina la presión de vapor de los analitos, y permite a sus moléculas desplazarse a la fase gaseosa. Doong, en el 2004, utilizó la temperatura ambiente para extraer HAP de las muestras de agua del Río Gao-Ping, aplicando microextracción en fase sólida de inmersión directa. En el 2009, Reinawati

reportó valores razonables de linealidad, límites de detección, y reproducibilidad, para la operación de extracción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, tanto de bajo, como de alto peso molecular, cuando la temperatura fue de 65°C. Cheng, en el 2013, estableció una condición óptima de 65°C. Sin embargo, demostró que el incremento de la temperatura también genera un decrecimiento el coeficiente de reparto, influyendo en la sensibilidad del método (menores cantidades de analito extraído). Por lo cual, es necesario determinar la condición térmica que conlleve a una extracción eficiente, en tiempos de extracción razonables (Lord y Pawliszyn, 2000; Reinawata, 2009; Cheng, 2013).

- La agitación también estimula la difusión de analito, tanto en la matriz de la muestra, como en el espacio confinado. Favorece su transporte desde el seno de la matriz hasta las zonas vecinas a la fibra, o a la inter-fase con el espacio confinado. Reduce el efecto de agotamiento producido cerca de la fibra por las moléculas del solvente: desplaza las moléculas de solvente que ocupan espacios en la superficie de la fase de extracción (Lord y Pawliszyn, 2000; King, 2004; Reinawata, 2009).
- La concentración de sales, que comprometen las interacciones entre solventes polares y analitos hidrófobos, pero que pueden dañar al recubrimiento de la fibra, o inducir a la floculación del analito (Doong, 2000; Lord y Pawliszyn, 2000; Reinawata, 2009).
- El pH, que es controlado mediante el uso de soluciones amortiguadoras. Determina la abundancia de protones (iones hidronio) en la fracción acuosa, que pueden ocupar espacios en la superficie de revestimientos sólidos, disminuyendo la eficiencia de la extracción (Lord y Pawliszyn). Sin embargo, para revestimientos líquidos donde no intervienen procesos de sorción, el efecto del pH en la eficiencia de la extracción es menor.

En el 2004, King y colaboradores estudiaron la eficiencia de la extracción ante cada una de las variables anteriores, utilizando la modalidad de micro-

extracción en fase sólida de Inmersión directa. Adicionalmente, estudiaron el efecto ejercido por la variable concentración de material coloidal orgánico, a través de la adición de ácidos húmicos. Reportaron una disminución de la eficiencia, y sugirieron que, en muestras reales, la técnica podría sólo ser sensible a la fracción bio-disponible. Reinawati, en el 2009, recomienda realizar una operación de filtrado previa, utilizando papel de filtro policarbonatado, de 0,22 μm .

...

Con esto, finaliza la sección correspondiente al marco teórico de este trabajo. En la próxima sección, serán descritos los procedimientos realizados durante la parte experimental, que permitieron obtener los resultados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental, en sus distintas etapas, pretendió generar datos cuyo análisis ayudara a comprender el comportamiento de un sistema compuesto por fibras de micro-extracción, y soluciones acuosas de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, en el modo de inmersión directa. La interacción entre ambos elementos, durante un tiempo definido, daría lugar a una extracción de los componentes hidrófobos, desde la matriz acuosa de la muestra, hasta el revestimiento de la fibra. La respuesta del sistema ante esta interacción representa la cantidad de analito que es capturado por la fibra, una vez finalizado el tiempo de extracción. Ésa fue la variable dependiente que permitió comprender al comportamiento del sistema.

Sin embargo, durante la búsqueda del método más adecuado para la extracción (la etapa de optimización, paso previo a la cuantificación), esta variable no se presenta en términos de masa de analito, si no en valores de unidades de área, correspondiente a la señal reportada por un cromatógrafo de gases, para cada compuesto. Por eso es necesario comprender que, durante la ejecución de todo el trabajo experimental, luego de ser realizada cada operación de extracción en una muestra de agua utilizando fibras de micro-extracción, la fracción de analito capturada fue analizada por cromatografía de gases.

3.1. INSTRUMENTACIÓN

Para empezar esta sección, se presenta una lista de la instrumentación utilizada durante la ejecución del trabajo experimental. Primero, del sistema de extracción, seguido de los equipos para la determinación. Luego, se presenta la información correspondiente a los reactivos utilizados.

3.1.1. SISTEMA DE EXTRACCIÓN

- Plancha de calentamiento marca CORNING; MODELO pc-420
- Fibras de MEFS para CG de Poliacrilato (PA) de 85 μ m de espesor de la película, y de Poli-dimetilsiloxano (PDMS) de 100 μ m de espesor de la película, obtenidos de la casa comercial Supelco. Ver figura N.
- Dispositivo contenedor de fibras: Holder SPME-CG (Supelco)
- Viales ámbar de 15 mL con septum de silicona con tope de PTFE para MEFS (supelco).
- Agitador magnético recubierto de teflón, de 1 cm de longitud.

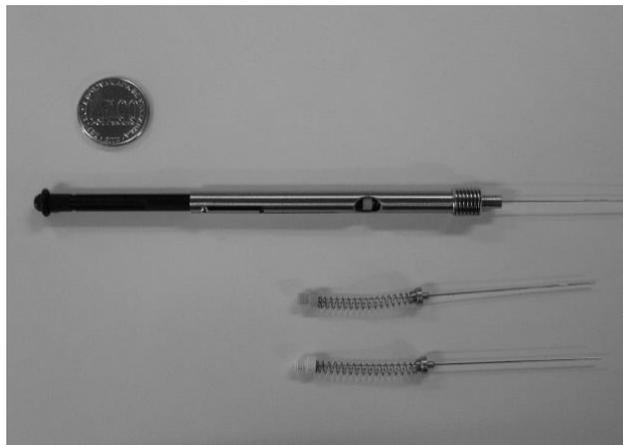


Figura 3. Dispositivo y fibras de MEFS

3.1.2. CROMATÓGRAFO DE GASES

Para la determinación de la fracción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos extraída de las muestras de agua utilizando fibras de MEFS, fueron empleados dos equipos de Cromatografía de Gases distintos, cuyas características se resumen en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Características instrumentales del equipo de CG-FID

Marca	THERMO QUEST
Modelo	TRACE CG 2000
Columna Capilar	DB-5: Modelo J&W SCIE 122-5032 (60,0 m x 0.25 nm x 0.25 μ m)
Gas de Arrastre	Nitrógeno
Inyector	Splitless (Sin división de flujo)
Detector	Detector de Ionización a la llama (FID) Gases: Hidrógeno Aire Maque-up: Nitrógeno

Tabla 3. Características instrumentales del equipo de CG-EM

Marca	AGILENT TECNILIGIES	
Modelo	CG 6890	
Columna Capilar	DB-5: Modelo J&W SCIE 122-5032 (30,0 m x 0.25 nm x 0.25 μ m)	
Gas de Arrastre	Helio	
Inyector	Splitless (Sin división de flujo)	
Detector	Espectrómetro de masas Modo S.I.M.	
Parámetros del Espectrómetro de masas		
Compuesto	Ión de Cuantificación	Ión de Confirmación
Naftaleno	128	127
Fluoreno	166	165
Fenantreno	178	176
Antraceno	178	176
Pireno	202	101
Criseno	228	114



Figura 4. Cromatógrafo de Gases marca THERMO QUEST, con detector de ionización a la llama



Figura 5. Cromatógrafo de Gases marca Agilent Technologies, con detector de Espectrometría de masas.

3.1.3. REACTIVOS

-Agua destilada y desionizada, obtenida con un sistema de marca Pobel

-Acetonitrilo (C_2H_3N), de grado HPLC, de 99,8% de pureza. Casa comercial Lichrosolv.

-Metanol (CH_3OH), grado HPLC, de 99% de pureza. Casa comercial Hupkins & Williams.

-Naftaleno ($C_{10}H_8$) de 98 % de pureza. Aldrich Chemical Company.

-Fluoreno ($C_{13}H_{10}$) de 99 % de pureza. Aldrich Chemical Company.

-Fenantreno ($C_{14}H_{10}$) de 97 % de pureza. Se desconoce la casa comercial.

-Antraceno ($C_{14}H_{10}$) de 95 % de pureza. Aldrich Chemical Company.

-Pireno ($C_{16}H_{10}$) de 98 % de pureza. Casa comercial Sigma.

-Criseno ($C_{18}H_{12}$) de 95 % de pureza. Aldrich Chemical Company.

3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A continuación se presenta un esquema gráfico de las etapas del trabajo experimental para la optimización del método (figura 6). Una vez establecidas las condiciones de trabajo se procedió a estudiar las figuras de mérito, según el esquema mostrado en la figura 7.

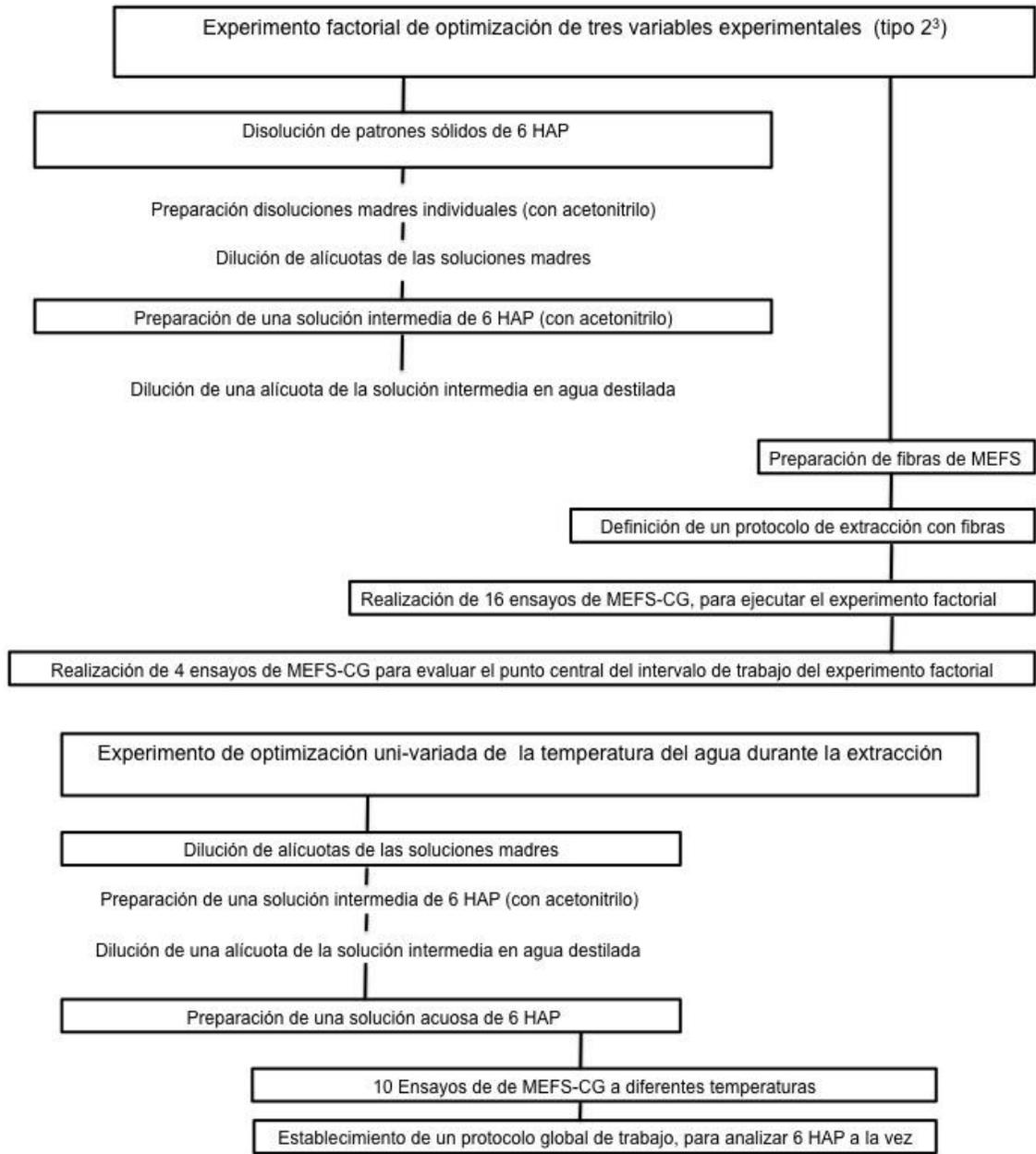


Figura 6. Esquema general del trabajo experimental para el estudio estadístico

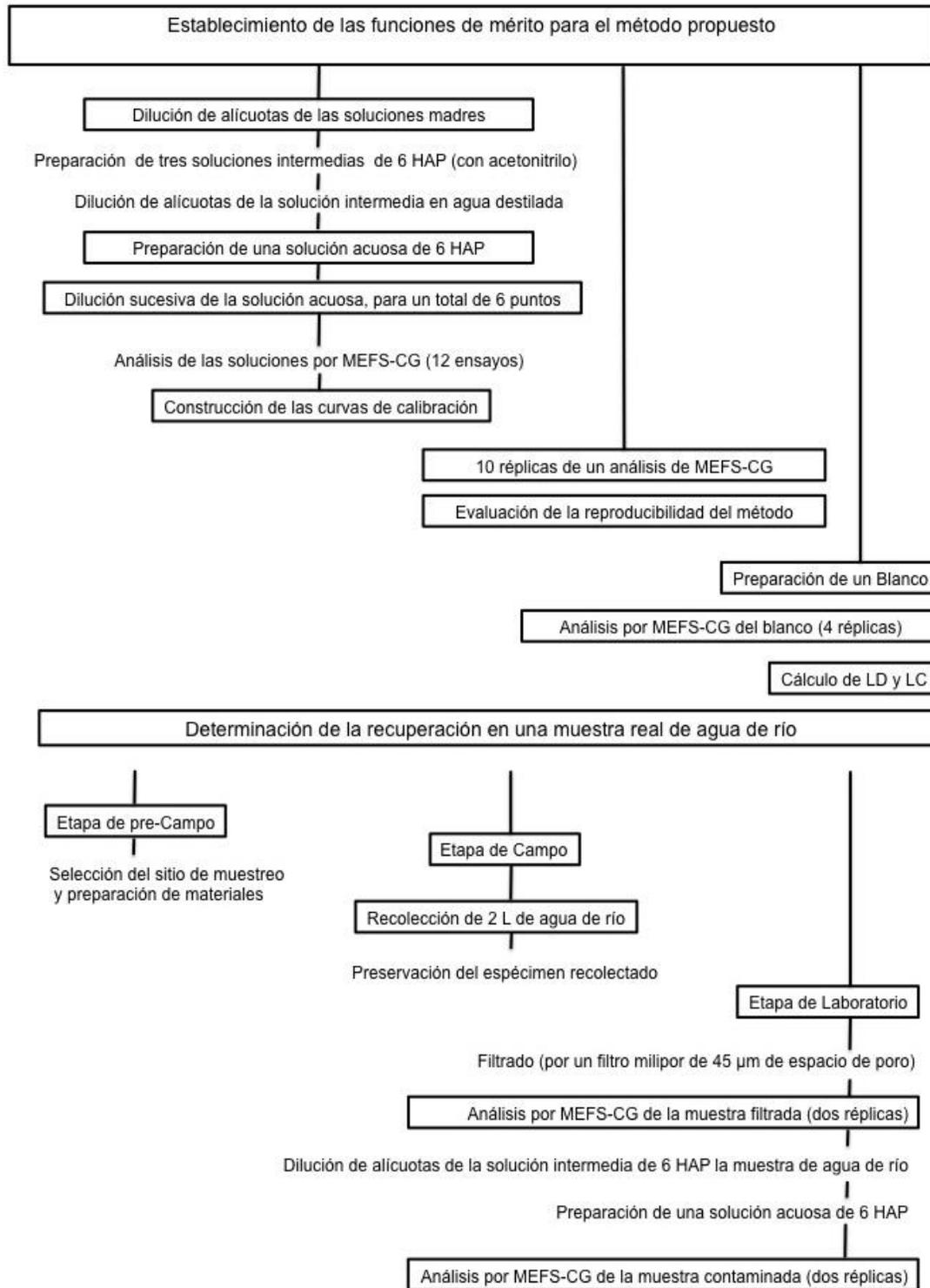


Figura 7. Esquema general del trabajo experimental para la determinación de las figuras de mérito del método

3.2.1. EXPERIMENTO FACTORIAL PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES

Doong, en el 2000; Lord y Pawliszyn, en el 2000; King, en el 2004; y luego Reinawata, en el 2009, demostraron que, a un valor de concentración fija, la eficiencia de la extracción depende de las condiciones con las cuales la extracción fue realizada. Reportaron que el tipo de fibra, la temperatura del agua durante la extracción, y el tiempo de extracción, generaban los efectos más importantes. Éstas serían, durante la realización de este trabajo, las variables independientes, cuya optimización daría lugar al protocolo de extracción más adecuado para analizar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en aguas, utilizando micro-extracción en fase sólida, en el modo de inmersión directa.

El primer paso para optimizar las variables fue la realización de un experimento factorial de combinación. Este experimento permitió estudiar simultáneamente el efecto de las tres variables (denominadas factores), y de su interacción, en la eficiencia del proceso de extracción, en un corto número de ensayos (Daniels, 1995; Montgomery 2010). Dos niveles contrastantes para cada factor fueron evaluados, en todas sus combinaciones posibles: 2^3 , para 8 condiciones de extracción en total.

3.2.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ACUOSAS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Durante el proceso de optimización de las variables experimentales, fue utilizada una misma solución acuosa de seis Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, en una matriz compuesta por agua destilada. Estuvieron disponibles seis patrones sólidos de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos: Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno y Antraceno; en representación de los compuestos semi-volátiles de bajo peso molecular, y Pireno y Criseno; en representación de los

compuestos de alto peso molecular. A partir de ellos, fueron preparadas seis soluciones madres individuales, todas en acetonitrilo de grado HPLC, como solvente (ver tabla 2). Estas soluciones fueron preparadas en las instalaciones del laboratorio de Geoquímica Orgánica I, del Instituto de Ciencias de la Tierra, de la Universidad Central de Venezuela, y fueron utilizadas durante la ejecución del resto del trabajo experimental. Toda la información correspondiente a la preparación de estas soluciones se encuentra en el apéndice D. Como todos los compuestos tienen solubilidades distintas, fueron planteados distintos valores para la relación entre la masa del patrón y el volumen de solvente, durante la preparación de cada solución. Como resultado, fueron preparadas soluciones madres de distintas concentraciones (ver tabla 4).

Tabla 4. Concentración de las soluciones madres de los 6 HAP utilizados

Compuesto	Concentración de la solución (mg/L)
Naftaleno	10042 ± 19
Fluoreno	19705 ± 29
Fenantreno	650 ± 3
Antraceno	3968 ± 7
Pireno	5528 ± 12
Criseno	1145 ± 5

Para preparar una solución acuosa de los seis compuestos, fueron realizadas diluciones sucesivas en serie, a partir de alícuotas de las soluciones madres. Primero, fue preparada una solución de concentración intermedia, de los seis compuestos, en acetonitrilo de grado HPLC. Las alícuotas captadas fueron pesadas en una balanza analítica y su volumen correspondiente fue calculado asumiendo una densidad global de todas las soluciones de 0,786 g/mL ± 0.001 (densidad reportada para el acetonitrilo utilizado).

Para llevar esta solución intermedia al medio acuoso, una alícuota fue captada, pesada, y disuelta en metanol de grado HPLC, en una relación de volumen de 1:10. El metanol serviría como solvente intermediario. La solución final, de 500 mL, fue aforada con agua destilada (en una relación de volumen de 1:50), y expuesta al efecto de agitación por ultrasonido por diez minutos. Luego de finalizar la preparación, el balón fue envuelto en papel aluminio, refrigerado. Las concentraciones de esta solución se resume en la tabla 5, y toda la información correspondiente a su preparación, se encuentra en el apéndice D.

Tabla 5. Concentraciones de la solución acuosa de 6 HAP, utilizada para el experimento factorial.

Compuesto	Concentración de la solución ($\mu\text{g/L}$)
Naftaleno	$13,77 \pm 0,05$
Fluoreno	$15,9 \pm 0,1$
Antraceno	$17,4 \pm 0,1$
Fenantreno	$17,4 \pm 0,1$
Pireno	$23,4 \pm 0,1$
Criseno	$21,3 \pm 0,1$

3.2.3. PREPARACIÓN DE LAS FIBRAS DE MEFS

Los dispositivos de MEFS utilizados durante la ejecución de este trabajo fueron adquiridos de la casa comercial Supelco, por el Centro de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la UCV. Fueron seleccionados dos tipos de fibra: la primera, con revestimiento de PDMS (poli-dimetilsiloxano), de $100\mu\text{m}$ de espesor de la película, y la segunda, con revestimientos de PA (poliacrilato), de $85\mu\text{m}$ de espesor de la película.

Antes de iniciar los ensayos correspondientes al experimento de optimización, fue preciso realizar una operación de preparación de las fibras. Para ello, las agujas de cada dispositivo fueron introducidas directamente dentro el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, como se muestra en la figura 8, y luego, sus fibras correspondientes fueron expuestas en el interior del *Liner*. Cada fibra fue expuesta durante 60 minutos, a una temperatura de 250 °C, para eliminar por desorción térmica cualquier componente añadido al revestimiento, que podría incidir en la eficiencia de la extracción.

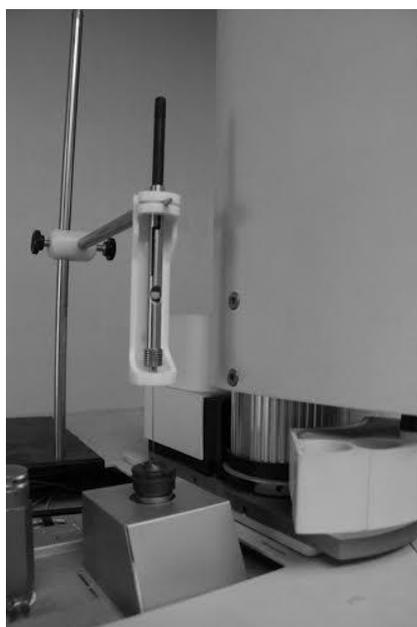


Figura 8. Inyección directa de la aguja del dispositivo de MEFS dentro del puerto de inyección de un cromatógrafo de gases

La operación de preparación debió repetirse antes de cada ensayo de extracción, exponiendo la fibra en el puerto de inyección por 5 minutos, a una temperatura de 280 °C, para evitar el efecto memoria de extracciones anteriores.

3.2.4. PROTOCOLO DE EJECUCIÓN PARA LAS OPERACIONES DE EXTRACCIÓN

Las operaciones de extracción se realizaron en el modo de inyección directa, sumergiendo la fibra en un volumen fijo de la muestra líquida, en viales de vidrio ámbar de 15 mL de capacidad, previamente lavados y secados, y sellados con un septum blando de silicona con topo de PTFE, como se ilustra en la figura 9.



Figura 9. Montaje para los ensayos: dispositivo de MEFS, cuya fibra es expuesta dentro de la fase líquida de la muestra, contenida en un vial, sobre una plancha de calentamiento.

Para generar la condición de máxima difusión de los analitos en la matriz de la muestra, y así favorecer la ocurrencia del proceso de extracción desde el punto de vista cinético, los viales fueron colocados sobre la superficie de una plancha de calentamiento. En su interior fue añadido un agitador magnético cubierto de teflón, de 1 cm de largo. Como Doong, en el 2000, y luego Rianawati, en el 2009, demostraron que la agitación siempre generaba un efecto positivo en la eficiencia de la extracción, fue establecido un valor de agitación fijo, válido para todos los

ensayos en este trabajo, correspondiente a la máxima velocidad de agitación, tal que no generara remolinos de aire en los alrededores de la fibra: aproximadamente 90 rpm. Este valor fue medido de manera empírica: realizando una grabación del agitador magnético en movimiento. Luego, en la pantalla de una computadora, se procedió al conteo cuidadoso del número de revoluciones por minuto.

Se estableció que el volumen de muestra también sería fijo. El valor fue de 12 mL para la primera sección del trabajo experimental: los ensayos del experimento factorial. Luego de observar los resultados de esta primera sección, se presumió que los compuestos más volátiles podrían abandonar el medio acuoso, y escapar al espacio confinado. Para prevenir este fenómeno, en las secciones siguientes, fue añadido un volumen de muestra mayor, de 15 mL. Un segundo vial fue colocado sobre la plancha, para monitorear la temperatura del primero, utilizando un termómetro. Cuando la temperatura del líquido se estabilizaba en el valor deseado, la fibra se exponía en su interior. La fibra fue sumergida a una profundidad de 1,5 cm dentro del líquido en todos los casos. Esta profundidad fue medida con una regla, tomando en cuenta a la superficie de la fase líquida, cuando esta estaba bajo los efectos de la agitación magnética.

Inmediatamente luego de haber sido finalizado el tiempo de extracción, la fibra era retraída en el interior del dispositivo. La aguja del dispositivo era entonces introducida directamente dentro del puerto de inyección del cromatógrafo de gases. Allí, se expuso la fibra por 5 minutos, a una temperatura de 270 °C, para que los componentes previamente extraídos de la muestra fueran desorbidos térmicamente. Esta sección del trabajo fue realizada en las instalaciones del Laboratorio de Métodos Cromatográficos, del Centro de Química Analítica, de la Facultad de Ciencias de la UCV, utilizando un equipo de C.G, que contó con un sistema de detección de Ionización a la Llama (F.I.D, por sus siglas del inglés). Todas las condiciones de la separación y detección de los analitos por CG-FID, están expuestas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de separación y detección del CG-FID

Condiciones del Inyector				
Temperatura (°C): 270		Presión del gas de arrastre (He) (psi) 18		
Condiciones del Horno				
Temperatura inicial (°C)	Tiempo inicial (min)	Temperatura máxima (°C)	Tiempo de Equilibrio (min)	
110	0,00	320	0,5	
Rampa de Calentamiento				
Número	Rampa (°C/min)	Temperatura Final (°C)	Tiempo Final (min)	
1	15	155	0,0	
2	25	275	0,0	
3	10	310	5,0	
Condiciones del Detector				
Temperatura (°C)	Presión de Hidrógeno (psi)	Presión de Aire (psi)	Presión de nitrógeno (psi)	Rango:
250	35	350	30	10

3.2.5. EJECUCIÓN DEL EXPERIMENTO FACTORIAL CON TRES VARIABLES

Para optimizar las variables, fue diseñado un experimento factorial de tres variables, con el fin de comprobar cuál era su efecto en la eficiencia de la extracción de cada compuesto, y determinar si dicho efecto era estadísticamente significativo. Dos niveles contrastantes fueron seleccionados para cada una de las tres variables. Dicha selección estuvo basada en la información reportada por investigadores que antecedieron a este proyecto (Doong, 2000; Havenga & Rohwer, 2002; Doong, 2003; King, 2004; Reinawati, 2009; Cheng, 2013). El resumen de las condiciones utilizadas para los niveles de cada variable, o factor, se encuentra en la tabla 7. La matriz del experimento factorial se encuentra en la tabla 8.

Tabla 7. Condiciones de operación de MEFS-ID para cada ensayo del experimento factorial de tres variables

Factores	Niveles	
Factor A: Temperatura del agua durante la extracción (°C)	Nivel a1	50
	Nivel a2	70
Factor B: Tiempo de exposición de la fibra en el seno del líquido (minutos)	Nivel b1	30
	Nivel b2	60
Factor C: Tipo de fibra	Nivel c1	Fibras de Poli(Acrilato)
	Nivel c2	Fibras de Poli(dimetilsiloxano)

Tabla 8. Matriz del experimento factorial de tres variables

Número de ensayo	Combinación	Número de ensayo	Combinación
1	a1b1c1	5	a2b2c1
2	a2b1c1	6	a2b1c2
3	a1b2c1	7	a1b2c2
4	a1b1c2	8	a2b2c2

Cada ensayo fue realizado por duplicado, con el fin de asegurar la validez del análisis de los datos. Al final, fue generada una matriz de 16 datos, en términos de área, para cada compuesto. Los datos fueron analizados a través del software Minitab 17.

Los resultados que fueron reportados por el software, y que fueron tomados en cuenta durante la optimización, fueron: el valor de los efectos de cada factor, los resultados reportados por la tabla de análisis de varianza, el diagrama de Pareto, y los diagramas de superficie. Los resultados experimentales obtenidos para cada compuesto fueron analizados como matrices de datos individuales. Todos estos resultados se complementan, y por eso se presentan en conjunto.

El valor del cálculo del efecto por factor es indicativo de la magnitud del efecto. Mientras mayor sea el valor absoluto (en unidades) del efecto, mayor será su influencia en la eficiencia del proceso. Más importante aún es el signo de este valor. Un signo positivo del efecto de un factor específico revela que, con el cambio de nivel (del 1 al 2), hay un aumento en la eficiencia del proceso. En contraste, un valor negativo sugiere una disminución de la eficiencia con el cambio del nivel (Daniels, 1995; Montgomery 2010).

El análisis de varianza se realiza a modo de resolución de una serie de pruebas de hipótesis que pretenden determinar si el efecto de un factor (o de combinación de factores) es estadísticamente significativo. Para la resolución de estas pruebas, es aplicado un modelo estadístico basado en los siguientes supuestos: que todas las poblaciones de datos tienen una distribución normal, que los valores utilizados representan una muestra aleatoria e independiente, y que todas las poblaciones de las cuales fueron extraídos los datos tienen la misma varianza (Daniels 1995). La hipótesis que fue planteada, por factor (o combinación de factores) para todos los compuestos, fue:

$$H_0: \alpha_i = 0$$

Ec 3. Hipótesis nula

$$H_1: \alpha_i \neq 0.$$

Ec 4. Hipótesis alternativa

La hipótesis nula (Ecuación 3) establece que no existe un efecto significativo del factor evaluado, para el nivel de significancia seleccionado. La hipótesis alternativa establece, en cambio, que sí existe un efecto, estadísticamente significativo (distinto de cero), para el nivel de significancia seleccionado. En todos los casos, el análisis fue realizado con un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

El estadístico de prueba para la resolución de todas las hipótesis es la función R.V (razón de varianzas), y, si se cumplen todas las suposiciones del modelo, estos valores se adaptan a una población de distribución F . Por eso, el dato más resaltante de la tabla de análisis de varianza es el valor F . Al comparar

este valor, en unidades, con el correspondiente valor de F del nivel de significancia escogido (0,05), también conocido como valor crítico, es posible tomar la decisión determinante de la prueba de hipótesis. Si el estadístico de prueba es mayor o igual que el nivel crítico, entonces se rechaza la hipótesis nula. Si el estadístico de prueba es menor que el nivel crítico, se establece que no existe información suficiente como para rechazar la hipótesis nula. Finalmente, se debe tomar en cuenta el valor p , que define la veracidad de la toma de decisión en la prueba, en términos de la probabilidad de haber cometido un error tipo I (Daniels, 1995; Montgomery 2010). La información reportada por la tabla de análisis de varianza aparece también en el diagrama de Pareto, de manera gráfica. Por su parte, los diagramas de superficie indican la zona óptima de trabajo, a modo de conclusión del trabajo de optimización.

3.2.6. ENSAYOS DE PUNTO CENTRAL

El experimento factorial descrito en la sección anterior estaría incompleto sin un ensayo que demostrara la linealidad del comportamiento de los datos en el intervalo escogido para los niveles de cada factor. Por eso, fue necesario hacer un ensayo en el punto central, la condición intermedia para cada nivel (temperatura de 60 °C, y tiempo de 45 minutos). Desafortunadamente, uno de los factores no correspondía a una variable continua, si no categórica: el tipo de fibra. Como no existe una condición intermedia entre dos tipos de fibra, el punto central para las variables Temperatura y Tiempo, fueron analizados por duplicado para cada tipo de fibra.

3.2.7. OPTIMIZACIÓN UNIVARIADA DE LA TEMPERATURA

Luego de haber realizado el experimento factorial, se procedió a analizar los resultados. Esta discusión se expone en la sección 4. El análisis de aquellos resultados que relacionan la respuesta del sistema, en términos de eficiencia de la extracción, con la variación de la temperatura del agua, demostraron que había una necesidad de continuar los experimentos de optimización de esta variable, para la extracción de los compuestos más volátiles. Por eso, fue planteado un nuevo experimento de optimización uni-variada de la temperatura, evaluando la respuesta del sistema a temperaturas menores del rango establecido en el experimento factorial (a 30, 40, y 50, °C). Fueron repetidos los ensayos de 60 y 70 °C, para establecer una comparación gráfica.

Con el análisis de estos nuevos resultados, se pretendió proponer una condición global de trabajo, que favoreciera la extracción de los compuestos semivolátiles de bajo peso molecular (Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno y Antraceno), pero que no comprometiera gravemente a la eficiencia de la extracción de los compuestos de alto peso molecular (Pireno y Criseno). Al final, fue posible definir una condición definitiva, a modo de protocolo de extracción de los seis compuestos. Este protocolo fue utilizado en el resto del trabajo experimental. Esta sección del trabajo se realizó en las instalaciones del Instituto de Ciencias de la Tierra, utilizando un cromatógrafo de gases con sistema de detección de espectrometría de masas. Todas las condiciones de separación y detección de los analitos se encuentran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de separación y detección del Cromatógrafo de Gases- con detección de espectrometría de masas.

Condiciones del Inyector			
Temperatura °C		Presión del gas de arrastre (He) (psi)	
290		11,06	
Condiciones del Horno			
Temperatura inicial (°C)	Tiempo inicial (min)	Temperatura máxima (°C)	Tiempo de Equilibrio (min)
110	0,00	320	0,5
Rampa de Calentamiento			
Número	Rampa (°C/min)	Temperatura Final (°C)	Tiempo Final (min)
1	15	135	0,0
2	10	275	0,0
3	10	310	5,0

Para esta sección del trabajo experimental, fue preparada una nueva solución acuosa, contenedora de los seis compuestos de interés, a partir de las soluciones madres originales. Las concentraciones de esta solución se resumen en la tabla 8, y la información correspondiente a su preparación se encuentra en el apéndice D.

Tabla 10. Concentraciones de una solución acuosa de 6 HAP, para la optimización uni-variada de la temperatura

Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)
Naftaleno	28,6 ± 0,1
Fluoreno	54,6 ± 0,2
Fenantreno	12,5 ± 0,1
Antraceno	11,67 ± 0,03
Pireno	19,1 ± 0,1
Criseno	2,76 ± 0,01

3.2.8. ESTABLECIMIENTO DE LAS FIGURAS DE MÉRITO DEL PROTOCOLO PROPUESTO

Para validar el protocolo optimizado de análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en aguas, fue necesario establecer las correspondientes figuras de mérito, que revelaran información sobre la calidad analítica de los datos generados. Las funciones determinadas fueron: linealidad, límites de detección y de cuantificación, reproducibilidad, y cálculo de recuperación. Es importante resaltar que estas funciones se aplican sólo a las condiciones de la cromatografía expuestas en la tabla 8, utilizando espectrometría de masas (en el modo de detección de iones individuales), como sistema de detección.

3.2.9. BLANCO

Para obtener los valores de las señales del blanco, fue preparada una solución acuosa de matriz semejante a los especímenes analizados durante el desarrollo del trabajo experimental (Skoog, 2008). Esta solución contenía fracciones de acetonitrilo y metanol, de grado HPLC (en las mismas proporciones descritas en la sección 3.1.1), en agua destilada, sin ningún tipo de adición intencional de ninguno de los analitos estudiados.

Luego, para analizar dicha solución, una fibra nueva de PDMS fue preparada. Los viales para la extracción fueron expuestos por 20 minutos a temperaturas de 400 °C, en una mufla, para asegurar la ausencia de especies orgánicas. Así mismo, los septum, y los agitadores magnéticos fueron lavados en diclorometano de grado HPLC. 15 mL de la solución preparada fue añadida entonces a los viales, para proceder con el protocolo de extracción definido en la sección anterior, seguido por el correspondiente análisis por CG-EM. Este ensayo fue repetido cuatro veces, con la finalidad de obtener un valor promedio, y el correspondiente valor de desviación estándar para las réplicas.

3.2.10. REPRODUCIBILIDAD

Para establecer una medida de reproducibilidad del método de análisis propuesto, a modo de estudio de la heterogeneidad natural de los datos generados (heterogeneidad propia del método), fue necesario realizar, en una única jornada laboral, 10 réplicas del análisis, a una misma muestra. La solución descrita en la tabla 10 serviría también para estos ensayos.

El trabajo estuvo limitado por el número de horas de la jornada laboral. Por eso, tampoco fueron evaluadas las medidas del efecto memoria entre réplicas. Luego, se asumiría este error como una fuente de dispersión de los datos obtenidos. Para poder realizar las 10 extracciones en una misma jornada, fueron utilizadas dos fibras (del mismo tipo de revestimiento, pero en dispositivos efectivamente distintos). Cinco réplicas fueron realizadas con cada fibra. Una prueba estadística de diferencia de medias muestrales, utilizando la distribución t , fue realizada para determinar si existían diferencias significativas entre ambos grupos de datos. Si el resultado indicaba que ambos grupos correspondían a una misma población, en relación a sus valores promedios, entonces las fibras podían utilizarse para cualquier réplica, independientemente de las diferencias entre dispositivos. Si el resultado indicaba que entre ambos grupos existían diferencias estadísticamente significativas, entonces las diferencias entre dispositivos resultarían una fuente importante de heterogeneidad de la data, y no podrían ser utilizados como réplicas de una misma muestra, sino que, tendrían que operar por separado.

Cabe mencionar que el paso previo a la realización de dicha prueba de diferencia de medias, fue una prueba de relación entre varianzas (para seleccionar el tipo de prueba apropiado para la diferencia de medias). Los resultados finales sobre la dispersión de los datos fueron expresados en términos de la desviación estándar, varianza, y coeficiente de variación.

3.2.11. LINEALIDAD

Para estudiar la eficiencia del protocolo de análisis propuesto, en términos de la linealidad de los datos que generase, en un intervalo de concentraciones definido, fueron preparadas, para cada analito, curvas que relacionaran la concentración de los analitos, con la respuesta generada por el cromatógrafo de gases (área de los picos). Estas curvas también servirían posteriormente como curva de calibración (Skoog, 2008).

Seis Curvas fueron preparadas, una por cada analito. Para ello, fue preparada una solución acuosa, contenedora de los seis compuestos, que representaría el punto de mayor concentración de todas las curvas de calibración (punto 1). Luego, 5 nuevas soluciones fueron preparadas, mediante diluciones sucesivas. Las concentraciones de estas soluciones se resumen en la tabla 11, y la información de su preparación, en el apéndice D. Naturalmente, el intervalo de concentraciones seleccionado para la construcción de la curva de calibración es distinto para cada compuesto. Esta selección responde a los siguientes criterios:

Primero, la relación señal-ruido que presentaban los picos de cada compuesto. El protocolo de extracción, y luego, el sistema de detección del cromatógrafo de gases, no genera respuestas de igual magnitud para todos los compuestos. Por eso, para aquellos analitos que presentaron relaciones señal-ruido menos contrastantes, fueron escogidos intervalos de concentración más altos, en comparación a aquellos que presentaron relaciones señal-ruido más contrastantes. Luego, se pretendió que las curvas estuvieran limitadas por intervalos de concentración similares a los valores promedio reportados para muestras de agua de río, por Doong, en el 2004, por Xia, en el 2012, y por Cheng, en 2013. Finalmente, se pretendió que las curvas estuvieran contenidas dentro de los rangos de linealidad para la técnica, reportados por Doong, en el 2004, King, en el 2004, Reinawati, en el 2009, y Cheng, en el 2013.

Tabla 11. Concentraciones de las soluciones ($\mu\text{g/L}$) utilizadas para la calibración

Compuesto	Punto 1	Punto 2	Punto 3
Naftaleno	$14,36 \pm 0,05$	$7,18 \pm 0,03$	$3,59 \pm 0,02$
Fluoreno	$1,60 \pm 0,01$	$0,800 \pm 0,005$	$0,400 \pm 0,002$
Fenantreno	$0,901 \pm 0,004$	$0,451 \pm 0,002$	$0,226 \pm 0,001$
Antraceno	$5,94 \pm 0,02$	$2,97 \pm 0,01$	$1,485 \pm 0,005$
Pireno	$7,01 \pm 0,03$	$3,50 \pm 0,02$	$1,75 \pm 0,01$
Criseno	$1,68 \pm 0,01$	$0,840 \pm 0,005$	$0,420 \pm 0,003$
Compuesto	Punto 4	Punto 5	Punto 6
Naftaleno	$1,80 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,01$	$0,450 \pm 0,005$
Fluoreno	$0,200 \pm 0,001$	$0,100 \pm 0,001$	$0,050 \pm 0,001$
Fenantreno	$0,113 \pm 0,001$	$0,057 \pm 0,001$	$0,029 \pm 0,001$
Antraceno	$0,743 \pm 0,003$	$0,372 \pm 0,002$	$0,186 \pm 0,001$
Pireno	$0,88 \pm 0,01$	$0,440 \pm 0,005$	$0,220 \pm 0,002$
Criseno	$0,21 \pm 0,002$	$0,105 \pm 0,001$	$0,052 \pm 0,001$

Luego de preparar las soluciones, se procedió a realizar en ellas el protocolo de extracción definido, seguido de los correspondientes análisis por CG-EM. Cada punto fue analizado por duplicado. Y como todas las extracciones de la curva tenían que ser realizadas en un mismo día, no fueron realizadas las corridas cromatográficas correspondientes al efecto memoria, que se manifiesta luego de cada extracción. Para evitar que dicho efecto incidiera negativamente en el proceso de construcción de las curvas, los puntos fueron analizados desde la menor, a la mayor concentración. Finalizado el ejercicio de análisis, los datos de integración de área fueron recolectados, y graficados, en relación a los valores de concentración. La linealidad de la respuesta pudo estudiarse a partir de los valores de coeficiente de determinación.

3.2.12. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Para establecer los valores de límites de detección y cuantificación fue utilizada la propia curva de calibración, incluyendo dos puntos nuevos, correspondientes a la dilución de la solución de menor concentración de la curva de calibración, con agua destilada. El resultado serían soluciones de concentración cercana a los valores de límites de cuantificación y detección, reportados por Doong, en el 2004, King, en el 2004, Reinawati, en el 2009, y Cheng, en el 2013. Las concentraciones de estas soluciones se encuentran en la tabla el apéndice D

También fue incluido el promedio calculado para la señal blanco, cuya concentración fue aproximada, para efectos de la construcción de las curvas, a 0 µg/L (Miller, 1993). Con estas nuevas curvas, fueron calculadas, para cada compuesto, ecuaciones de regresión lineal. El valor de importancia para el cálculo de LD y LC, fue el punto de corte en el eje Y de estas ecuaciones (denotado como b). El criterio seleccionado para el cálculo se reporta en las ecuaciones 5 y 6:

$$LD = b + 3 \times SB \quad \text{Ec 5. Cálculo de LD}$$

$$LC = b + 10 \times SB \quad \text{Ec 6. Cálculo de LC}$$

Donde SB corresponde a la desviación estándar calculada para la señal blanco, en la sección 3.2.9.

3.2.13. CÁLCULO DE RECUPERACIÓN DE HAP EN AGUAS DE RÍO CON EL MÉTODO PROPUESTO

Para finalizar el trabajo experimental, fue evaluado el rendimiento del método propuesto durante el análisis de un espécimen real, de agua de río. Primero, fue seleccionado el sitio recolección de la muestra de agua superficial, que luego sería utilizado durante el experimento. Como la optimización del método de extracción propuesto estuvo dirigida hacia su futura aplicación en la

cuantificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras reales de agua superficial, fue planificada la recolección de una muestra que cumpliera con las siguientes características: Primero, el agua en el sitio debía correr en forma de escorrentía superficial, en contacto con un cuerpo de roca y con acumulaciones de materia orgánica de origen natural. Así, se aseguró que la matriz de la muestra tratada representara las características generales de las aguas superficiales continentales, en términos de salinidad y contenido de materia orgánica disuelta.

Un punto de recolección en la Quebrada Anauco, del Parque Nacional Guaraira Repano, en las proximidades de la estación de guardabosques de Los Venados, fue seleccionado para el muestreo. Todos los materiales de vidrio que serían llevados al campo fueron lavados con jabón, curados con agua destilada y con acetona, y luego secados en una estufa a 40 °C durante 30 minutos. Siguiendo las recomendaciones de la Norma COVENIN 2079:2002, sobre las técnicas de muestreo de aguas naturales, industriales y residuales, para el análisis químico y microbiológico, un envase de vidrio ámbar de dos litros de capacidad fue preparado para recolectar la muestra.

En el sitio de recolección, un volumen de 2L de agua de escorrentía superficial fue introducido manualmente en el interior del recipiente recolector, colocando a éste en contacto directo con el agua que corre por centro del canal. Este tipo de muestra representa las características momentáneas de un cuerpo de agua que se desplaza en un caudal relativamente constante. La selección del punto exacto de recolección estuvo condicionado por los criterios de escogencia propuestos en la norma COVENIN 2079:2002. Estos criterio responden a la necesidad de recolectar una muestra representativa del objeto (las aguas que corren por ése sitio), en términos de su composición química. El recipiente fue llenado hasta el tope, evitando la permanencia de burbujas de aire en su interior. La muestra recolectada fue refrigerada en hielo para su preservación durante el traslado (de nuevo, acorde a los lineamientos planteados por la norma COVENIN).

El volumen de agua recolectada en campo fue llevado al Laboratorio de Geoquímica Orgánica I, en la Universidad Central de Venezuela. Allí, fue pasado por un filtro millipor, a través de una membrana de Silicona-éster, de 45 µm de diámetro del espacio poroso. El líquido filtrado fue trasladado a envases de vidrio ámbar de 100 mL, llenados hasta el tope, para luego ser refrigerados en una nevera a temperaturas no menores de los 4°C (COVENIN 2079:2002). Así, fue garantizada la preservación de las muestras durante el desarrollo del proyecto, inhibiendo la ocurrencia de procesos de alteración bacteriana. Todo el material de vidrio utilizado fue curado con agua destilada y con acetona, y luego secado en la estufa a 40 °C durante 30 minutos.

La muestra adquirida fue analizada por triplicado, utilizando el protocolo de MEFS-CG definido anteriormente. Los resultados de dichos análisis revelarían la identidad y abundancia de los componentes originales inmersos en la muestra de agua, y en especial, de alguno de los seis analitos estudiados con anterioridad. Los viales para la extracción fueron expuestos por 20 minutos a temperaturas de 400 °C, en una mufla. Los septum, y los agitadores magnéticos fueron lavados en diclorometano de grado HPLC. Esta operación fue realizada por duplicado.

Luego, utilizando las mismas soluciones intermedias descritas en la tabla 9, fue preparada una nueva solución, con cantidades de los seis Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Esta vez, para llevar la solución al medio acuoso, fueron utilizados 500 mL de la muestra de agua de río recolectado. Esta muestra fue analizada por duplicado. Las concentraciones resultantes fueron calculadas por gravimetría (tabla 12). Los valores teóricos fueron comparados con la respuesta del análisis por MEFS-CG-EM, utilizando las curvas de calibración para el cálculo de la concentración experimental. Esta comparación sirvió para el cálculo del porcentaje de recuperación, a modo de estudio del efecto de la matriz en la extracción de los analitos, para muestras reales, de acuerdo a la ecuación 7:

$$\% \text{ de Recuperación} = 100 \times (\text{Concentración experimental} / \text{Concentración teórica})$$

Ec 7.

Tabla 12. Concentraciones de la solución acuosa de 6 HAP, utilizando el espécimen de agua de río.

Compuesto	Concentración de la solución ($\mu\text{g/L}$)
Naftaleno	$15,23 \pm 0,05$
Fluoreno	$0,661 \pm 0,002$
Fenantreno	$0,372 \pm 0,002$
Antraceno	$2,59 \pm 0,01$
Pireno	$8,04 \pm 0,03$
Criseno	$1,93 \pm 0,01$

...

Con esto, finaliza la sección de descripción del trabajo experimental. En la siguiente sección, se presentan los resultados obtenidos, y el planteamiento de la discusión, que surgió a partir de ellos.

4. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN

Todos los resultados fueron obtenidos y analizados, como se describe en la sección 3. El trabajo fue acumulativo. Es decir, las conclusiones de los primeros experimentos fueron determinantes para el diseño de los siguientes. Los resultados del experimento factorial (originalmente diseñado para analizar el efecto de tres variables) tuvieron que ser reinterpretados, para analizar el efecto de sólo dos variables: las únicas dos variables continuas. La razón de esto fue la necesidad de añadir un punto central, y así estudiar el comportamiento del sistema dentro del rango de trabajo escogido. Como la variable tipo de fibra no es una variable continua, fue imposible generar un punto central (intermedio), entre los dos niveles establecidos. Por eso, esta discusión comienza analizando un mismo grupo de datos, de dos maneras distintas: un experimento factorial de tipo 2^3 , y un experimento factorial de tipo 2^2 .

4.1. ANÁLISIS DEL EXPERIMENTO FACTORIAL COMPLETO, CON TRES VARIABLES

El proceso de reparto, que ocurría durante el tiempo de exposición de la fibra en soluciones acuosas de seis HAP, dio lugar a una extracción, con señales que se diferenciaron del ruido, para todos los compuestos, en todas las condiciones de extracción. Un ejemplo de los cromatogramas obtenidos en esta etapa, utilizando un sistema de detección de foto-ionización a la llama, utilizando las condiciones de trabajo expuestas en la tabla 4, se expone en la figura 10. Así mismo, los tiempos de retención se resumen en la tabla 13.

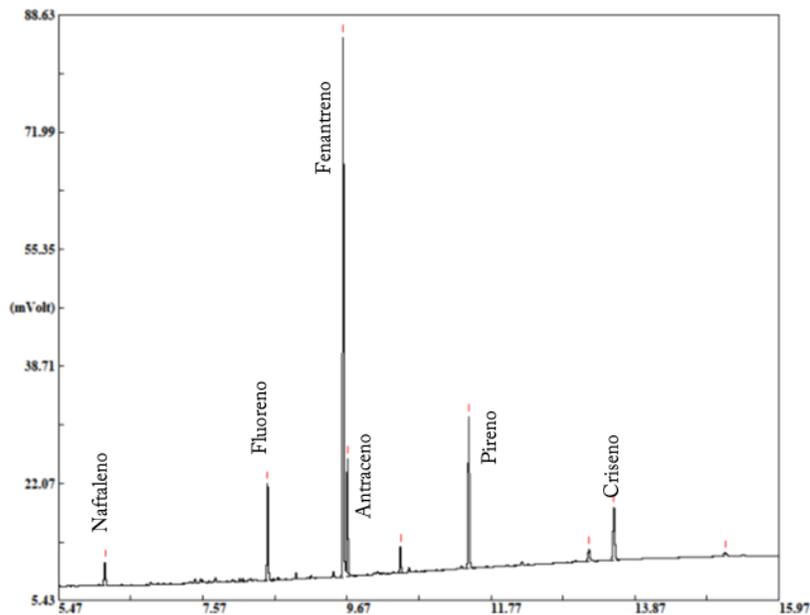


Figura 10 Ejemplo de cromatograma obtenido a partir de la separación de 6 HAP, utilizando un sistema de detección de FID y las condiciones resumidas en la tabla 6.

Tabla 13. Valores de Tiempo de retención por compuesto, obtenidos mediante la realización de corridas de patrones individuales, utilizando las condiciones resumidas en la tabla 4

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (MINUTOS)
NAFTALENO	6,16
FLUORENO	8,56
FENANTRENO	9,62
ANTRACENO	9,69
PIRENO	11,46
CRISENO	13,42

Todos los ensayos del experimento factorial arrojaron resultados distintos, a partir de la combinación de niveles de las tres variables, o factores, seleccionados: tipo de fibra, temperatura del agua durante la extracción, y tiempo de extracción. Luego, con estos resultados, fue realizado el análisis del experimento factorial, para responder las hipótesis planteadas en la sección 4.1.4, sobre la significancia estadística del efecto de las variables en la eficiencia de la extracción.

Los datos de cada analito fueron analizados como experimentos factoriales individuales. Sin embargo, para efectos de esta discusión de resultados, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos cuyo análisis de datos llevaron a conclusiones similares, fueron agrupados. Obsérvese que esta clasificación no es aleatoria. Claramente responde a la clasificación original de estos compuestos en relación a su peso molecular, expuesta en la tabla 1. Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno y Antraceno; todos pertenecen al grupo de compuestos de bajo peso molecular. Y tiene mucho sentido que presenten un comportamiento similar ante el proceso de extracción. Por la similitud estructural de sus moléculas (ver figura 1), todos tienen propiedades fisicoquímicas similares, específicamente su volatilidad, y su medida de afinidad química con el componente del revestimiento de las fibras. Lo mismo pasa con el Pireno y el Criseno, que forman parte del grupo de compuestos de mediano peso molecular, menos volátiles y menos solubles en agua.

4.1.1. NAFTALENO, FLUORENO, FENANTRENO, Y ANTRACENO

El primer grupo de datos generado por el software Minitab a partir del análisis estadístico de los resultados se presentan la tabla de efectos por factor. Esta tabla incluye: los valores de los efectos que cada factor (y sus interacciones) genera en el proceso, los valores de coeficientes codificados por factor, su correspondiente valor P, y el error reportado para cada valor (Daniels, 1995; Montgomery 2010). Todas las tablas se encuentran reportadas en el apéndice B. A modo de síntesis, fue elaborada una tabla contenedora del valor de los efectos por factor, para los cuatro compuestos de interés (Tabla 14).

Tabla 14. Resultado del cálculo de efectos de cada factor (y de interacción de factores), en la eficiencia de la extracción por compuesto.

Término	Efecto del Factor en la Extracción de cada Compuesto			
Compuesto	Naftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno
Efectos Principales				
Temperatura del Agua	-13330	-61743	-279752	-28653
Tiempo de Extracción	-716	-11349	77166	25955
Tipo de Fibra	20666	85526	348612	66309
Efectos de interacción entre factores				
Temperatura // Tiempo	1866	5011	-42394	-3482
Temperatura // Tipo de fibra	-8191	-417185	-173369	-37646
Tiempo // Tipo de Fibra	5430	-8439	-31571	3324
Tres factores	-4656	-550	-81685	-18911

La primera observación resaltante de la tabla 14 es que, en general, el valor absoluto de los efectos principales Temperatura y Tipo de fibra, predominan sobre los demás, en varios órdenes de magnitud. La mayoría de los compuestos presentan el mismo comportamiento en cuanto a su respuesta a estos dos factores. El efecto del aumento de la temperatura del agua siempre es negativo, es decir, incide negativamente en la eficiencia de la extracción. Y, por el contrario, el efecto del cambio de tipo de fibra siempre es positivo, es decir, la extracción se favorece con el uso de fibras de PDMS, sobre el uso de las fibras de PA.

Al ser estos compuestos de menor peso molecular, presentan menores valores de temperatura de ebullición (mayor volatilidad, ver tabla 1). Especialmente el Naftaleno y el Fluoreno. El aumento de temperatura podría incidir negativamente en el proceso de extracción, porque favorece la desorción térmica de los analitos desde el recubrimiento de la fibra, hacia la matriz de la muestra, y, además, favorece la pérdida de los compuestos más volátiles, hacia el espacio confinado (espacio aéreo fuera del límite de la fase líquida, que no está en contacto con la fibra), especialmente el Naftaleno.

El efecto del tipo de fibra puede explicarse si se toma en cuenta la afinidad química que se presenta entre cada tipo de recubrimiento y los analitos. El PDMS presenta un carácter polar menor que el PA (Doong, 2000), y, por lo tanto, captura de una manera más eficiente a los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. Incluso a aquellos de menor peso molecular.

En cuanto a la variable Tiempo, el efecto en la extracción de Naftaleno y Fluoreno parece ser insignificante, en términos de magnitud, al compararlo con los otros efectos principales. Sin embargo, el Fenantreno y el Antraceno presentan valores altos, y, además, positivos. Para estos dos compuestos, el aumento del tiempo parece favorecer la extracción. Esto puede explicarse si se plantea que, mientras más largo sea el tiempo de extracción, habrá mayor probabilidad de alcanzar el equilibrio de reparto. Para explicar las diferencias que se presentan entre ambos pares de compuestos, para este aspecto, fueron tomados en cuenta los siguientes criterios: la molécula de Naftaleno apenas cuenta con dos anillos aromáticos. La molécula de Fluoreno cuenta con dos anillos aromáticos, y un anillo alifático. En cambio, las moléculas de Fenantreno y Antraceno cuentan con tres anillos aromáticos, y por eso su carácter polar es menor. Luego, presentan mayor afinidad química por el recubrimiento de las fibras (Doong, 2000). Con el paso del tiempo, la cantidad de moléculas capturadas por la fibra sólo aumentará hasta alcanzar el equilibrio de reparto. En cambio, para el caso del Naftaleno y el Fluoreno, de mayor carácter polar, las moléculas capturadas pueden ser desorbidas térmicamente con el paso del tiempo.

Por último, se observa que, para casi todos los casos, los efectos de interacción entre factores son poco importantes, en relación con los efectos principales. La interacción Temperatura // Tipo de fibra parece resaltar para el Fluoreno, el Fenantreno, y el Antraceno. Sin embargo, es posible que la magnitud de cada efecto principal sea individualmente tan importante, que ambas variables aparenten interaccionar entre ellas (Daniels, 1995; Montgomery 2010). Es importante aclarar que las interpretaciones realizadas a partir de los datos reportados en la tabla 14 sólo sirven como una primera aproximación al análisis

del experimento factorial. Para confirmar la significancia estadística de los efectos fue necesario evaluar los resultados del análisis de varianza.

Para responder a las hipótesis planteadas en la sección 3.1.4, el software Minitab generó una tabla de análisis de varianza por compuesto, contenedora del resultado de la suma de cuadrados, los grados de libertad por planteamiento, los valores del estadístico de prueba (la razón de varianzas, o valor F), y el valor P correspondiente a cada planteamiento. Las tablas de análisis de varianza completas aparecen en el apéndice B. De nuevo, a modo de síntesis, se presenta una tabla resumen, sólo contenedora de los resultados del valor F, y del valor P, correspondientes los efectos que resultaron ser estadísticamente significativos, es decir, para aquellos en los cuales la hipótesis nula fue rechazada, en cuanto al criterio de la toma de decisión, para un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. La tabla 15 contiene dicha información.

Tabla 15. Resultados del análisis de varianza para la prueba de significancia de los efectos de cada factor, por compuesto

Compuesto	Estadístico de prueba	Tipo de Fibra	Temperatura del Agua durante la Extracción	Interacción Temperatura // Tipo de Fibra	Tiempo de extracción
Naftaleno	Valor <i>F</i>	42,42	17,65	6,66	0,05
	Valor p	0,001	0,003	0,033	0,827
Fluoreno	Valor <i>F</i>	26,30	13,71	8,00	0,46
	Valor p	0,001	0,006	0,022	0,515
Fenantreno	Valor <i>F</i>	84,46	54,39	20,89	4,14
	Valor p	0,001	0,001	0,002	0,076
Antraceno	Valor <i>F</i>	39,79	7,43	12,83	6,10
	Valor p	0,001	0,026	0,007	0,039

En la tabla 15 queda en evidencia que los únicos valores de F que superaron el límite marcado por el valor crítico, con valores de p menores a 0,05, fueron los estadísticos correspondientes a las pruebas de la significancia para los efectos de la temperatura del agua, del tipo de fibra, y de interacción entre estas dos últimas; para todos los compuestos. Y del tiempo de extracción, para el Antraceno. Luego, se rechaza la hipótesis nula para estas pruebas, y se confirma la significancia estadística del efecto de estos factores en la extracción. Los

valores p son muy pequeños en magnitud, menores a 0,05 (van desde 0,001 a 0,033). Ello sugiere que la probabilidad de haber cometido un error tipo I durante la toma de la decisión de la prueba de hipótesis (haber rechazado la hipótesis nula, siendo esta cierta), es muy baja. Y que, por lo tanto, las conclusiones son confiables, desde el punto de vista de este criterio estadístico. Para el resto de los términos (interacciones de dos y tres factores, y tiempo de extracción para Naftaleno, Fluoreno y Fenantreno), al nivel de significancia escogido, se concluye que no existe información suficiente como para rechazar la hipótesis nula. Es decir, sus efectos en la extracción no fueron estadísticamente significativos, y por eso los valores de F de estas pruebas no fueron expuestas en la tabla. Tampoco se expone el dato del valor crítico, porque es distinto para cada prueba. Todos estos datos pueden encontrarse en el apéndice B.

A demás de la tabla 15, el software Minitab también generó un gráfico que resume la información reportada por la tabla de análisis de varianza: el diagrama de Pareto. A continuación serán discutidos los correspondientes diagramas para cada compuesto.

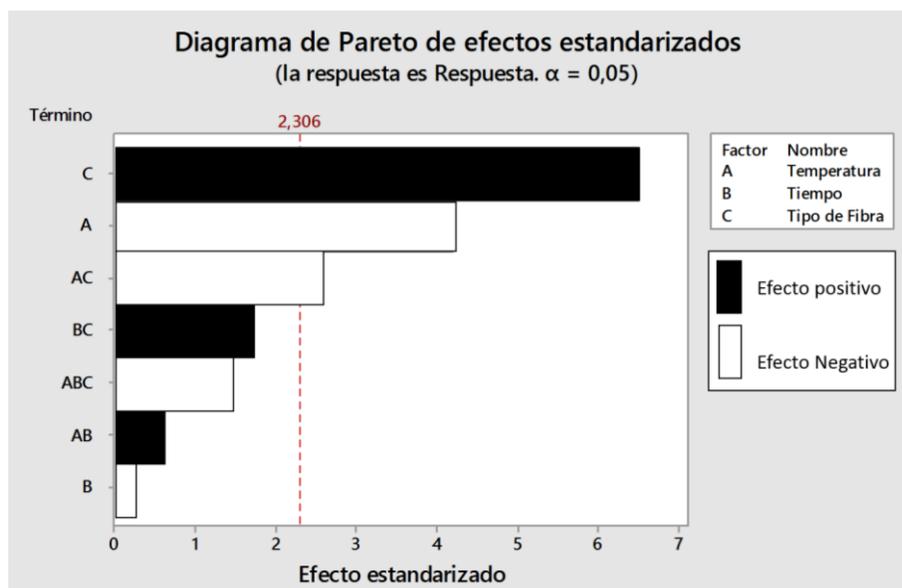


Figura 11. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Naftaleno

En la figura 11 se presenta el diagrama de Pareto resultado del análisis de datos para el Naftaleno. En él, es posible apreciar de manera gráfica cuáles

valores del estadístico de prueba superaron el valor crítico. Sólo los correspondientes a los efectos del tipo de fibra, la temperatura del agua, y la interacción entre ambas, fueron significativos. El gráfico sugiere, además, que el efecto del tipo de fibra, es más importante que los otros dos factores. Confirma la utilidad de las fibras de PDMS, sobre las fibras de PA. También se confirma que la eficiencia de la extracción disminuye con el aumento de la temperatura (por las razones que fueron expuestas anteriormente). Se confirma, además, que la situación de interacción entre ambos factores es significativa. Esto puede explicarse si se toma en cuenta que ambas, tanto la temperatura, como el componente del revestimiento de las fibras, interaccionan activamente en el proceso de reparto. A mayores temperaturas, la velocidad de difusión de los analitos en el revestimiento de la fibra aumenta, favoreciendo así al proceso de desorción, e inhibiendo la extracción. Esta inhibición se manifiesta en la tabla 14, porque los valores del efecto de combinación de estos dos factores presentan datos negativos, para todos los compuestos. Adicionalmente, como ambas fibras tienen componentes distintos, posiblemente la temperatura afecte al proceso de difusión de los analitos en el revestimiento de cada fibra de manera distinta.

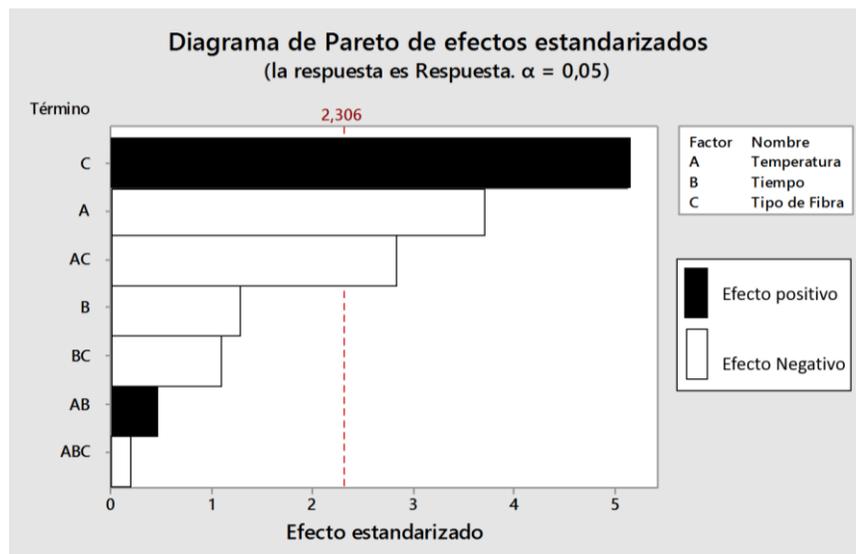


Figura 12. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Fluoreno

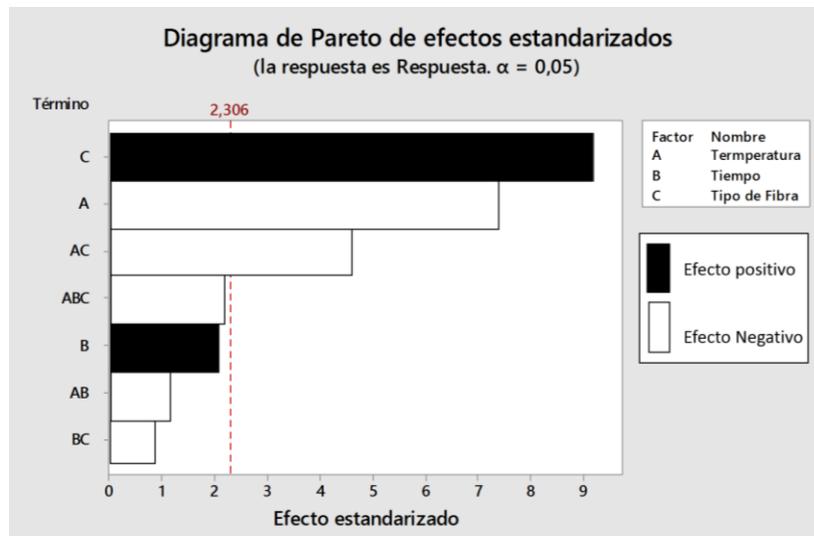


Figura 13. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Fenantreno

Las figuras 12 y 13 muestran el diagrama de Pareto correspondiente al análisis de datos del Fluoreno y el Fenantreno. Y las conclusiones son precisamente las mismas que para el naftaleno: fue rechazada la hipótesis nula, y confirmada la significancia de los efectos del tipo de fibra, la temperatura del agua, y la interacción entre ambos factores. Es importante destacar la similitud del comportamiento de estos tres compuestos, en relación a su similitud estructural. Sin embargo, para el Fenantreno (el más pesado de los tres), el efecto del tiempo parece aumentar, aunque todavía su valor F correspondiente no alcance el límite del valor crítico.

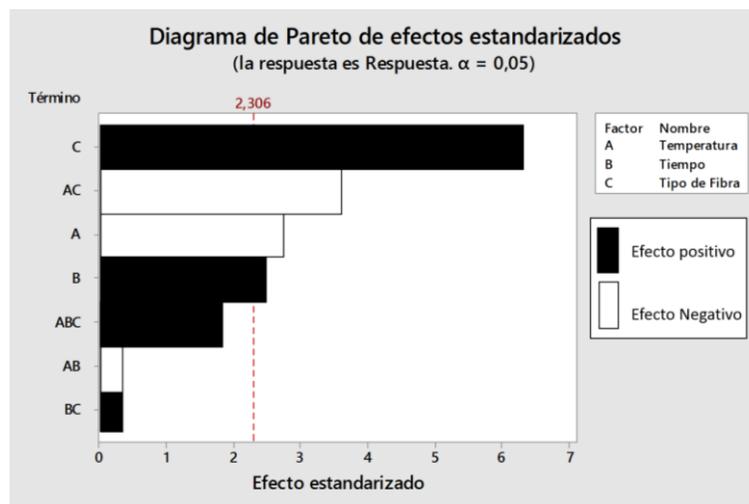


Figura 14. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Antraceno

La figura 14 muestra el diagrama de Pareto correspondiente al análisis de datos del Antraceno. En general, tiene el mismo comportamiento que los compuestos anteriores. Sin embargo, el tiempo comienza a tener un efecto significativo (fue rechazada la hipótesis nula sobre la significancia del efecto de este factor en la eficiencia de la extracción). Se confirma que la extracción de este compuesto se ve favorecida con el paso del tiempo. Se diferencia del Fenantreno, porque tiene una temperatura de ebullición ligeramente mayor (por sus diferencias estructurales), y una afinidad por las fases orgánicas mucho mayor (ver tabla 1). Por eso, con el paso del tiempo, el proceso de extracción se verá favorecido, hasta que se alcance la condición de equilibrio de reparto.

Por último, con el software Minitab se construyó los gráficos de superficie de respuesta correspondiente a cada compuesto, que muestra la tendencia general de su comportamiento en el rango de trabajo establecido para cada factor. Estos fueron utilizados, a modo de conclusión, para definir la condición óptima de trabajo de extracción, en cuanto al nivel de cada variable. Como los resultados del análisis de varianza sugieren utilizar siempre fibras de PDMS, sobre las de PA, sólo serán reportados los gráficos de superficie para valores fijos de la variable tipo de fibra correspondientes a las fibras con recubrimiento de PDMS.

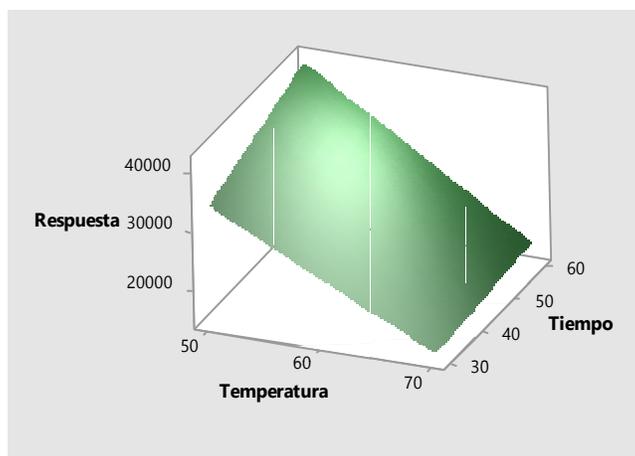


Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Naftaleno.

El gráfico de superficie para el Naftaleno (figura 15), revela que la condición óptima para su extracción en aguas, en el rango de trabajo para del experimento factorial, utilizando fibras de PDMS, es a bajas temperaturas (50 °C). Este resultado concuerda con lo establecido en la tabla 14, que había reportado un valor negativo para el efecto del aumento de la temperatura en la extracción de Naftaleno. El grafico confirma, además, que el efecto del tiempo es poco importante, en comparación con el efecto de la temperatura. No existe una diferencia apreciable en el rango establecido, lo que sugiere que la extracción ocurre de la misma manera, independientemente del tiempo de extracción. Esto significa que, durante la extracción de Naftaleno, ambos valores de tiempos de trabajo de extracción son aceptables.

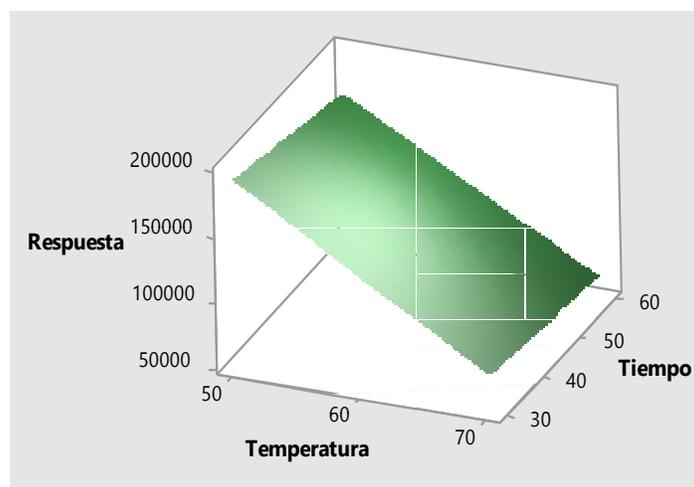


Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Fluoreno.

El gráfico de superficie para el Fluoreno (figura 16) revela que el comportamiento de este compuesto coincide con el Naftaleno. Este resultado era de esperarse, por la similitud química entre las propiedades fisicoquímicas de compuestos (ver tabla 1). Su extracción se optimiza al menor valor de temperatura (50°C). En cuanto al tiempo, no existen diferencias e en el rango establecido, para el experimento factorial. El proceso de extracción parece ser independiente del valor de tiempo de extracción (en este rango).

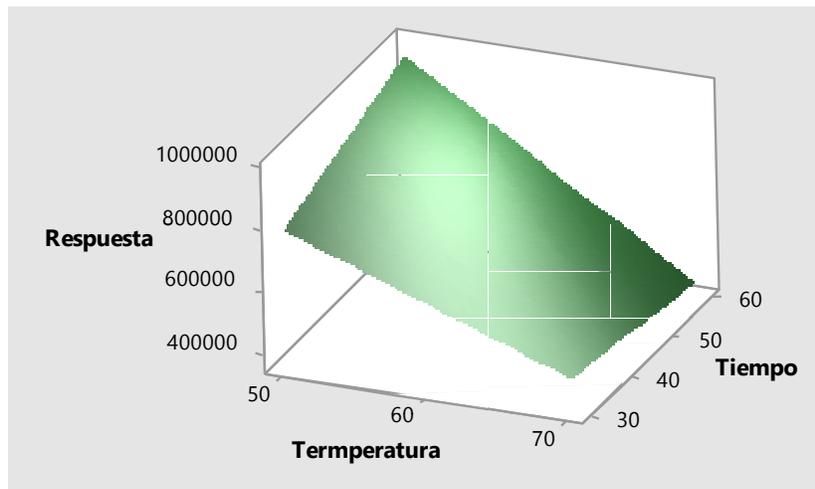


Figura 17. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Fenantreno.

Las figura 17 y 18 muestran el diagrama de superficie de respuesta para el Fenantreno y el Antraceno, respectivamente. Las figuras generadas son muy similares, en geometría, a las reportadas para el Naftaleno y el Fluoreno. Por lo tanto, conclusiones similares pueden realizarse. Ambos compuestos son extraídos eficientemente a menores temperaturas (50°C), resultado que está en concordancia con lo reportado por los correspondientes diagramas de Pareto, y el cálculo del efecto del aumento de la temperatura en la extracción de cada compuesto (tabla 14). Y, aunque sólo para el caso del Antraceno fue demostrado un efecto estadísticamente significativo del aumento del tiempo de extracción (tabla 15), los gráficos de superficie revelan que tanto para el Fenantreno como para el Antraceno, este efecto parece ser positivo. La extracción de estos dos compuestos parece ser favorecida cuando se emplea un valor de tiempo de 60 minutos.

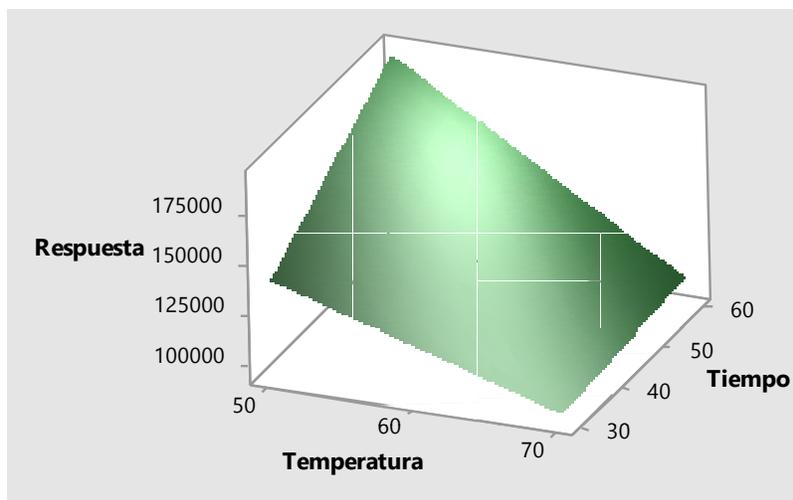


Figura 18. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Antraceno.

A modo de conclusión de esta sección, se establece que la extracción del grupo de compuestos de bajo peso molecular, Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno y Antraceno, se favorece, dentro de los límites seleccionados para este experimento factorial, a condiciones de temperatura del agua de 50°C, y de 60 minutos de tiempo de extracción, con fibras de PDMS.

4.1.2. PIRENO Y CRISENO

Como en la sección anterior, el primer grupo de datos generado por el software Minitab corresponde a los efectos de los factores principales, y de la interacción entre factores, en la eficiencia de la extracción. La tabla 16 presenta un resumen de estos datos. Los valores de coeficientes codificados por factor, su correspondiente valor P, y el error asociado a cada valor, se encuentran en el apéndice B.

Tabla 16. Resultado del cálculo de efectos de cada factor (y de interacción de factores), en la eficiencia de la extracción por compuesto.

Compuesto	Pireno	Criseno
Efectos Principales		
Temperatura del Agua	25837	97337
Tiempo de Extracción	63008	30616
Tipo de Fibra	167012	101595
Efectos de interacción entre factores		
Temperatura // Tiempo	45660	-28400
Temperatura // Tipo de fibra	-38380	30736
Tiempo // Tipo de Fibra	2335	-4250
Tres factores	-48150	-51778

El primer elemento que resalta de la tabla 16 es la predominancia del efecto del tipo de fibra en la extracción de ambos compuestos, cuyos valores son mucho mayores en orden de magnitud, en comparación al resto de los efectos, y, además, de signo positivo. Ambos, el Criseno y el Pireno, pertenecen al grupo de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de mediano peso molecular, con cuatro anillos aromáticos en su estructura molecular (ver figura 1). Poseen una afinidad por las fases orgánicas lipofílicas mucho más importante que cualquier compuesto del grupo discutido en la sección 4.1.1 (ver tabla 1). Por eso, el cambio del componente del revestimiento de la fibra tiene en su extracción un efecto tan importante. Las fibras de PA, manifiestan mejor afinidad química con sustancias más polares. Las de PDMS, en cambio, presentan mejor afinidad con sustancias lipofílicas, como los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, y especialmente los de mayor peso molecular. Esto coincide con los resultados que fueron reportados por Doong, en el 2002.

Para el Pireno, la importancia de los otros efectos parece ser eclipsada por el efecto del tipo de fibra. Todos, incluso los efectos de interacción entre factores, son mucho menores a éste. Posiblemente, la extracción de este compuesto con fibras de PDMS sea tan eficiente, que la variabilidad de los otros factores

experimentales es poco importante. Aparentemente, a un tiempo de 30 minutos en adelante, y en el intervalo de tiempo de 50 a 70°C, la cantidad de analito extraída permanece constante, y no se ocurren procesos de desorción.

Para el Criseno, en cambio, el efecto de la temperatura del agua tiene un valor importante, en comparación al resto de los efectos. Pero se manifiesta un cambio, en relación al comportamiento presentado por los compuestos de menor peso molecular. El efecto tiene un valor positivo. El aumento de temperatura favorece a la extracción. Esto puede explicarse al comparar los valores de presión de vapor del Criseno, en relación a los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de dos y tres anillos (ver tabla 1). El Criseno es mucho menos volátil. A pesar del aumento de la temperatura, no se manifestarán procesos de pérdida a la fase gaseosa, ni tampoco desorción térmica del analito capturado por la fibra. Especialmente con la fibra de PDMS. En cambio, el aumento de la temperatura del agua aumentará la difusión del analito en la muestra, favoreciendo los procesos de transporte, desde la matriz, hacia la superficie de la fibra. Este fenómeno coincide con lo reportado por Rianawati, en el 2009.

Los datos de la tabla 16 sólo sirven como primera aproximación al entendimiento de los efectos. De nuevo, fue necesaria la realización de las pruebas de hipótesis correspondientes a la significancia estadística de dichos efectos, planteada en la Ecuación 3. La tabla 16 reporta el resumen de resultados de dichas pruebas. A modo de síntesis, sólo son presentados los resultados correspondiente a los factores cuyo efecto resultó ser estadísticamente significativo (rechazo de la hipótesis nula), con valores de p menores que 0,05. El resto de los datos que fueron calculados por Minitab, en la tabla de Análisis de Varianza, se encuentran en el apéndice B.

Tabla 17. Resultados del análisis de varianza para la prueba de hipótesis sobre la significancia de los efectos de cada factor por compuesto

Compuesto	Estadístico de prueba	Tipo de Fibra	Temperatura del Agua durante la Extracción	Interacción Temperatura // Tipo de Fibra //Tiempo de Extracción
Pireno	Valor F	14,31	0,34	2,04
	Valor p	0,005	0,574	0,191
Criseno	Valor F	35,78	32,84	9,29
	Valor p	0,001	0,001	0,016

Como se reporta en la tabla 17, los únicos valores de F que superaron el valor crítico fueron los correspondientes a las pruebas de hipótesis sobre la significancia del efecto del tipo de fibra, para ambos compuestos, y de la temperatura, y la interacción triple de las variables, para el Criseno. Para estos casos, se rechaza la hipótesis nula. Para el resto de los efectos, se concluye que no se dispone de la información suficiente como para rechazar la hipótesis nula.

En cuanto al tipo de fibra, se confirma el proceso discutido anteriormente. El PDMS es definitivamente el tipo de fibra que establece una mejor afinidad con los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de mediano peso molecular. Tan importante es el efecto de esta fibra en la eficiencia de la extracción, que, para el caso del Pireno, ninguna otra variable es significativa.

Igualmente, la importancia del aumento de la temperatura en la eficiencia de la extracción de Criseno fue confirmada. A mayores temperaturas, mejor difusión molecular, sin posibilidad de ser volatilizado. También, para el Criseno, un nuevo efecto resalta en la tabla de análisis de varianza: el efecto triple, producido por la interacción de todos los factores. Es importante destacar que el valor p de esta prueba es mucho mayor que el resto de los valores. Por lo tanto, es la prueba menos confiable de la tabla 17: existe una mayor probabilidad de haber cometido un error tipo I en la toma de la decisión, y haber rechazado la hipótesis nula siendo esta cierta (Daniels, 1995; Montgomery 2010). Toda esta información está

expuesta de manera gráfica en los diagramas de Pareto correspondientes al Pireno y al Criseno (figuras 19 y 20).

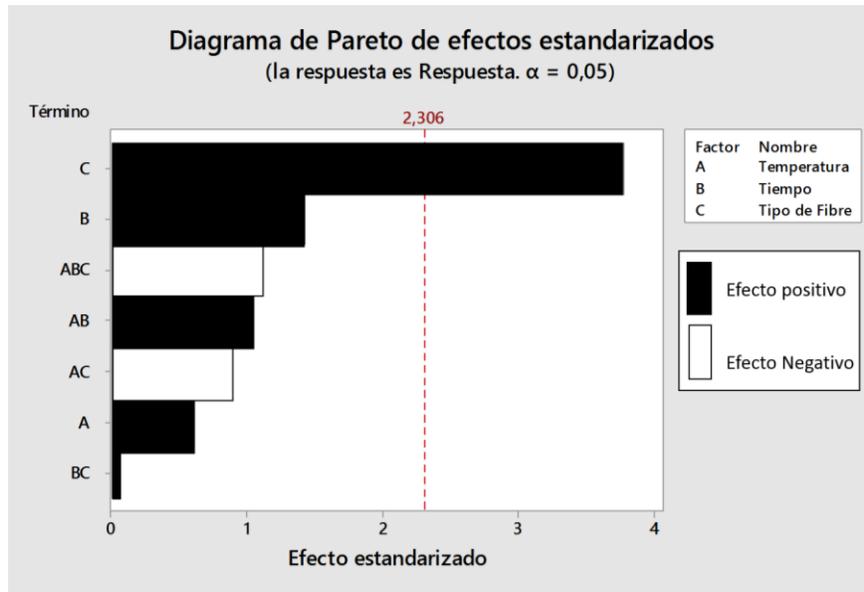


Figura 19. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Pireno

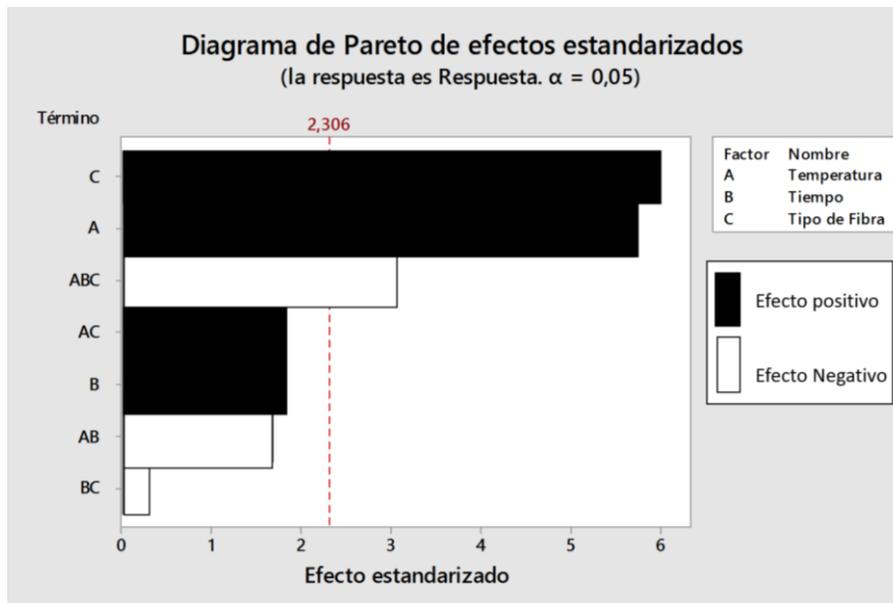


Figura 20. Diagrama de Pareto resultado del análisis del experimento factorial para el Criseno

Por su parte, la observación de los gráficos de superficie de respuesta generados por el software Minitab fueron analizados, a modo de establecer la zona óptima de trabajo para la extracción de Pireno y Criseno. Como los resultados del cálculo de los efectos, y los de la prueba de hipótesis, indicaron un aumento significativo en la eficiencia de la extracción siempre que se utilizaban fibras de PDMS, sobre las fibras de PA, sólo serán reportados los gráficos de superficie correspondiente a los valores obtenidos con PDMS. La figura 21 muestra dicho gráfico para el Pireno, e indica que las condiciones óptimas de extracción corresponde a altos valores de tiempo. Según este gráfico, el aumento del tiempo favorece a la extracción, coincidiendo con la tabla 16, en la cual el efecto de este factor está representado por un valor positivo, a pesar de no haber resultado estadísticamente significativo. Tal parece que, en el intervalo de tiempo establecido (30 a 60 minutos), no ocurren procesos de desorción (seguramente, por su medida de afinidad química con el componente del revestimiento de la fibra y su baja volatilidad). El efecto de la temperatura es menos importante. Básicamente presenta una tendencia lineal.

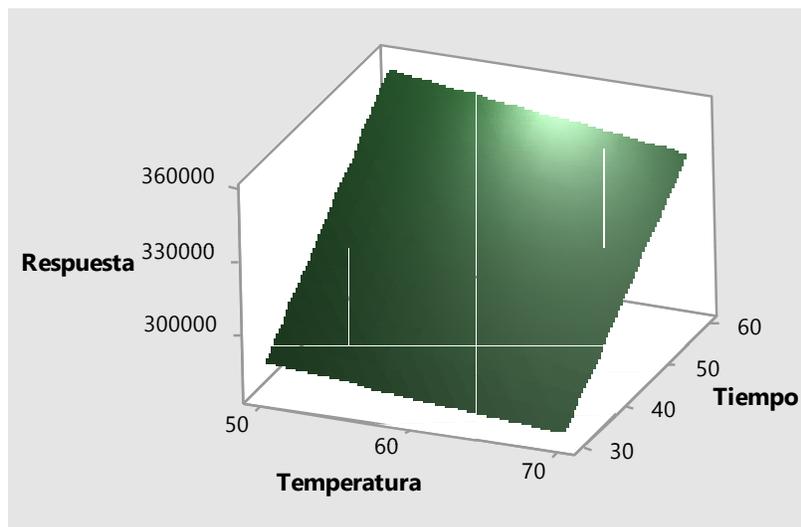


Figura 21. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Pireno.

La figura 22 muestra el gráfico de superficie de respuesta para la extracción de Criseno, utilizando los datos obtenidos con fibras de PDMS. Indica que las condiciones óptimas de trabajo son: mayores valores de Temperatura (70 °C), coincidiendo con lo discutido a partir de la tabla 16, sobre el efecto positivo de la temperatura en la extracción de este compuesto. El efecto del tiempo parece ser menos importante.

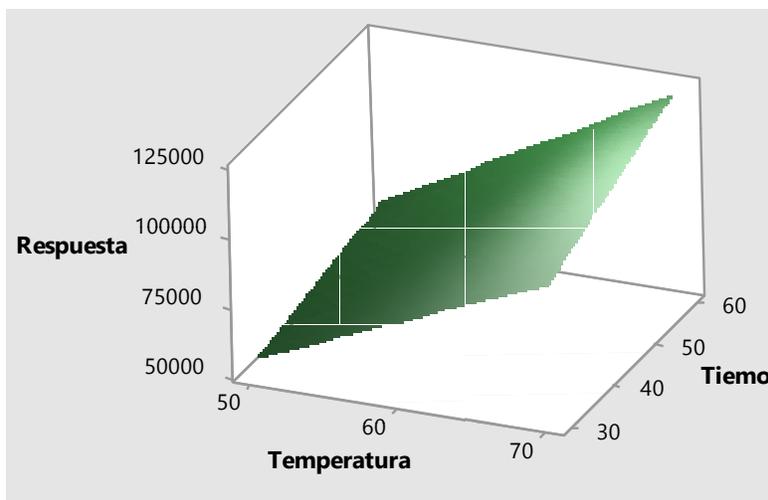


Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta ante la variación de tiempo y temperatura, para valores fijos del tipo de fibra (PDMS), resultado del análisis de datos del Criseno.

Para concluir esta sección, fue construida una tabla que resume, en función a lo discutido anteriormente, las posibles condiciones óptimas para la extracción de los seis Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos estudiados, según el análisis de datos del experimento factorial. La tabla 18 presenta dicho resumen.

Tabla 18. Resumen de las condiciones óptimas para la extracción de seis HAP, empleando fibras de PDMS

	Temperatura del agua (± 1 °C)	Tiempo de extracción (± 1 min)
Naftaleno	50	30 ó 60
Fluoreno	50	30 ó 60
Fenantreno	50	30 ó 60
Antraceno	50	60
Pireno	50 ó 70	30 ó 60
Criseno	70	30 ó 60

4.2. DETERMINACIÓN DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA EN EL INTERVALO DE TRABAJO

A partir del análisis del experimento factorial con tres variables, o factores, pudo determinarse el efecto de cada factor dentro del intervalo de trabajo establecido para el experimento. Sin embargo, no arrojó información sobre la tendencia de la respuesta dentro del intervalo. ¿Qué pasaría si la condición óptima de trabajo no era realmente una de los dos extremos, sino un punto intermedio entre ambos, para alguna de las variables? Las conclusiones sobre la optimización que se habían propuesto a partir del análisis del experimento factorial serían erróneas. Y, al contrario, si la tendencia resultaba lineal, el punto óptimo podría estar incluso fuera del intervalo de trabajo seleccionado (a mayores o menores valores de temperatura, por ejemplo).

A fin de aclarar esta nueva incógnita, los resultados generados a partir del experimento fueron analizados con otro enfoque: como un experimento factorial, de dos variables, añadiendo dos réplicas de un punto central. Como la variable tipo de fibra corresponde a una variable categórica, no fue tomada en cuenta para este análisis. Sin embargo, como el análisis de tres factores reveló para todos los casos una mejor eficiencia de la extracción usando fibras de PDMS, fueron

seleccionados los datos que fueron generados con la utilización de esta fibra, para una nueva matriz.

La tabla 17 reporta que la extracción de todos los compuestos se favorece a altos valores de tiempo (60 minutos), o bien, la variación del tiempo no tiene un efecto significativo. Mayores valores de tiempo (como aquellos reportados por Rianawati, en el 2009, de alrededor de 90 minutos) no son convenientes, desde el punto de vista operacional, porque no permiten realizar un número de réplicas aceptable durante una única jornada de trabajo. Menores valores tampoco son convenientes, porque fue confirmado el efecto positivo del aumento del tiempo para la extracción de Antraceno. Por otro lado, de ser seleccionada una condición de trabajo con baja temperatura del agua, para asegurar la eficiencia de la extracción de los compuestos más volátiles (Naftaleno y Fluoreno), una disminución del tiempo comprometería a la eficiencia de la extracción de Pireno y Criseno. 60 minutos parece ser el valor más aceptable. Por eso, sólo fue necesario evaluar la linealidad de la respuesta en función a la variación de la temperatura del agua dentro del intervalo seleccionado para el experimento factorial. El resultado que fue utilizado para evaluar esta tendencia fue la gráfica de efectos de interacción, que reporta en una línea recta la relación entre la respuesta y la variación de la temperatura, en dos condiciones de tiempo distintas; en conjunto con la ubicación del punto central.

4.2.1. NAFTALENO, FLUORENO, FENANTRENO Y ANTRACENO

La figura 23 muestra la gráfica de interacción del efecto de la temperatura en dos condiciones de tiempo para los datos de Naftaleno. La primera observación de interés es que ambas rectas son paralelas, lo cual sugiere que estos efectos no manifiestan interacción dentro del intervalo de trabajo (Daniels, 1995; Montgomery 2010). Por otro lado, la recta correspondiente a la respuesta en un tiempo de extracción de 60 minutos se encuentra por encima de la recta correspondiente un tiempo de trabajo de 30 minutos.

Finalmente, se observa que la ubicación del punto central no representa un un máximo de la tendencia, si no un punto intermedio entre ambas condiciones extremas. Se establece, entonces, que la tendencia de la respuesta para el Naftaleno es lineal dentro del intervalo de trabajo establecido para el experimento, y que la extracción se favorece con la disminución de la temperatura. Tanto que sería necesaria la realización de una optimización uni-variada para este factor. Se debía evaluar si, a menores valores de temperatura, por debajo del límite inferior seleccionado para el experimento, mejoraba la eficiencia de la extracción para este compuesto.

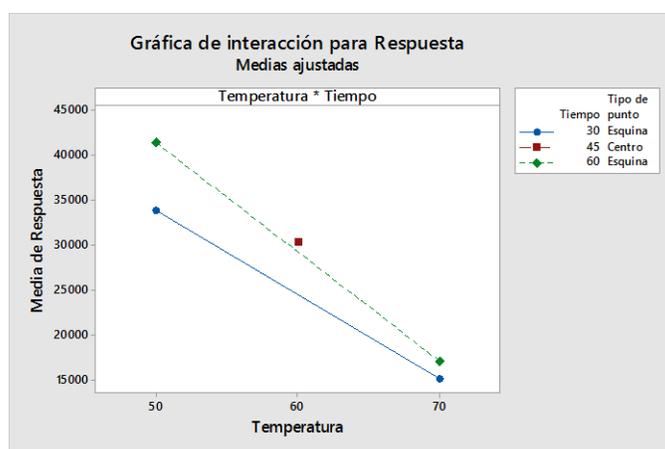


Figura 23. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Naftaleno.

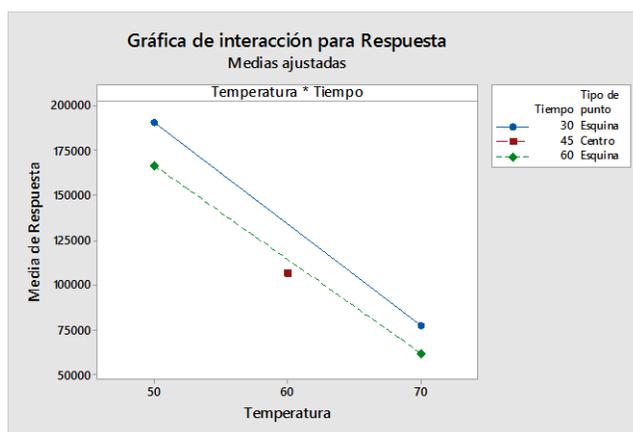


Figura 24. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Fluoreno.

La figura 24 muestra la gráfica correspondiente a los datos de Fluoreno. Sugiere un resultado muy similar al manifestado por el Naftaleno: rectas paralelas, indicativas de ausencia de interacción entre efectos; y un punto central que está en la zona intermedia de la tendencia global. Para este compuesto, la tendencia de la respuesta también es lineal, y también se favorece a menores temperaturas. Al igual que el Naftaleno, es necesaria la realización de una optimización univariada, para definir la verdadera condición óptima para la temperatura. La diferencia con el Fluoreno es que la recta correspondiente al menor valor de tiempo (30 minutos), se encuentra por encima de la correspondiente al mayor valor de tiempo (60 minutos). Sin embargo, ya fue confirmado que el efecto del tiempo no es estadísticamente significativo, y por eso, un protocolo de 60 minutos de tiempo de extracción también funciona para el Fluoreno.

La figura 25 muestra la gráfica correspondiente a los datos de Fenantreno. La primera observación de interés es que ambas rectas se cruzan. Ello sugiere que existe interacción entre las variables tiempo y temperatura. Sin embargo, ya se había demostrado que este efecto de interacción no era estadísticamente significativo (tabla 15). Además, en la zona de mejor eficiencia de la extracción (menor temperatura), la recta de mayor tiempo (60 minutos) supera al nivel de la recta de menor tiempo (30 minutos). Esto confirma que la extracción de este compuesto ocurre de manera más eficiente a 60 minutos. Por otro lado, el punto central no representa un mínimo, o un máximo, sino una condición intermedia entre ambos. Por eso, al igual que en los casos anteriores, se confirma la linealidad de la respuesta, la mejora de la eficiencia de extracción con la disminución de la temperatura, y la necesidad de realizar una optimización univariada de este último factor, (para determinar si la condición óptima se encuentra a temperaturas menores de 50 °C).

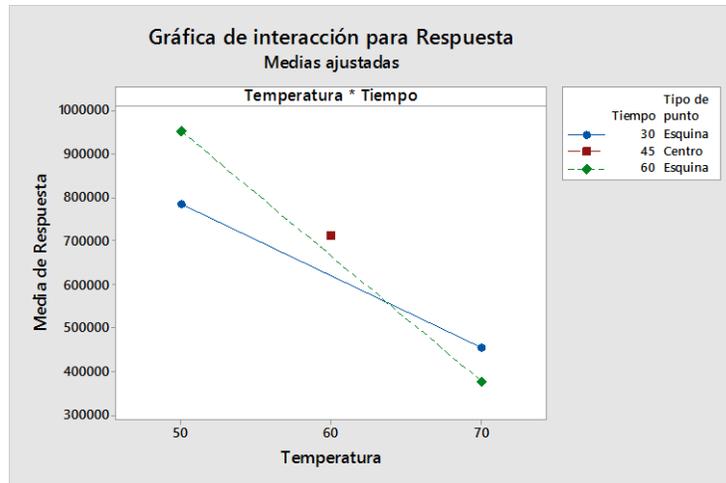


Figura 25. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Fenantreno.

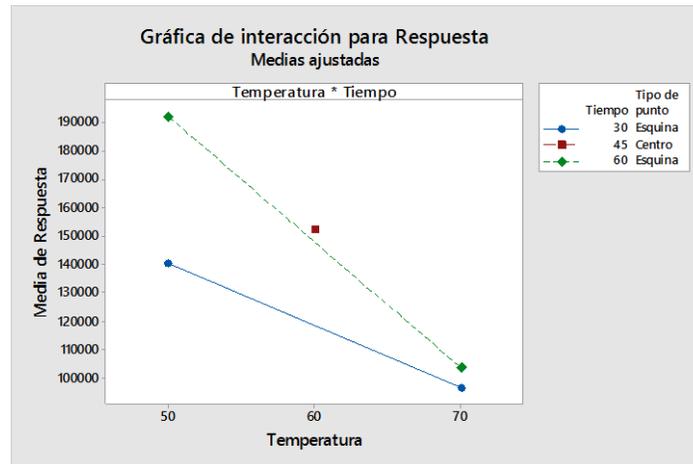


Figura 26. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Antraceno.

El último analito estudiado para este grupo es el Antraceno, y su correspondiente gráfica de interacción entre los efectos se muestra en la figura 26. La tendencia es similar a los análisis anteriores. No existe interacción entre los efectos en el intervalo seleccionado. La recta correspondiente al tiempo de extracción de 60 minutos está por encima de la correspondiente a los 30 minutos, confirmando que la condición óptima se manifiesta a un tiempo de 60. Además, la recta de 60 minutos tiene una pendiente mucho más importante, en comparación a la de 30 minutos; esto es indicativo de la importancia del efecto de aumento del

tiempo en la eficiencia de la extracción de este compuesto, y coincide con los resultados del experimento factorial estudiado en la sección 4.1, que reporta un efecto estadísticamente significativo para este factor.

A modo de síntesis, la evaluación del experimento con punto central para Naftaleno, Fenantreno y Antraceno revelaron que la condición óptima corresponde efectivamente con un tiempo fijo de 60 minutos, y 30 minutos para el Fluoreno. Más importante aún, revelaron la necesidad de realizar una optimización uni-variada de la temperatura, para determinar la ubicación verdadera de la condición óptima, a valores menores de 50 °C.

4.2.2. PIRENO Y CRISENO

La figura 27 muestra la gráfica de interacción del efecto de la temperatura en dos condiciones de tiempo para los datos de Pireno. La misma presenta dos curvas paralelas, lo cual sugiere que no hay interacción entre los efectos. A diferencia de los compuestos de menor peso molecular, el punto central (tiempo de 45 minutos y temperatura de 60 °C) representa un máximo de eficiencia de la extracción, por encima de las dos condiciones extremas. Como en el estudio factorial anterior fue demostrado que para el resto de los compuestos la temperatura tiene un efecto significativo, se asume que este máximo de eficiencia para el punto central es producto del efecto del aumento de la temperatura. Por eso, para este compuesto, también surge la necesidad de realizar un experimento de optimización uni-variada de la temperatura, para confirmar la observación anterior.

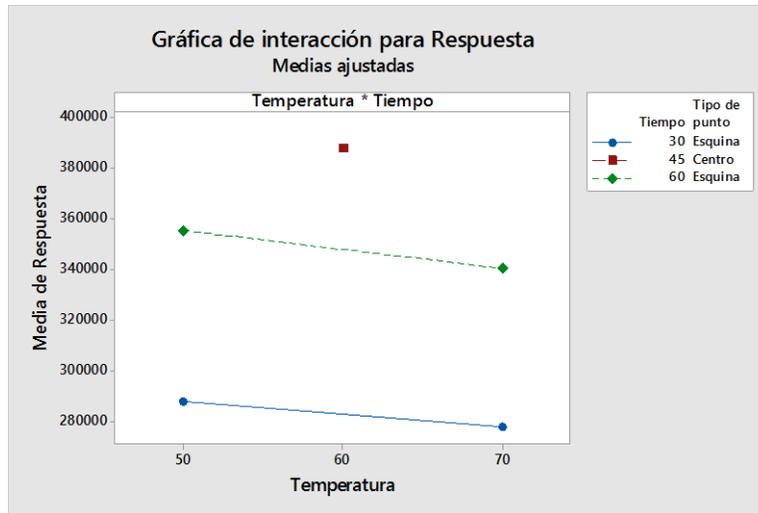


Figura 27. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Pireno.

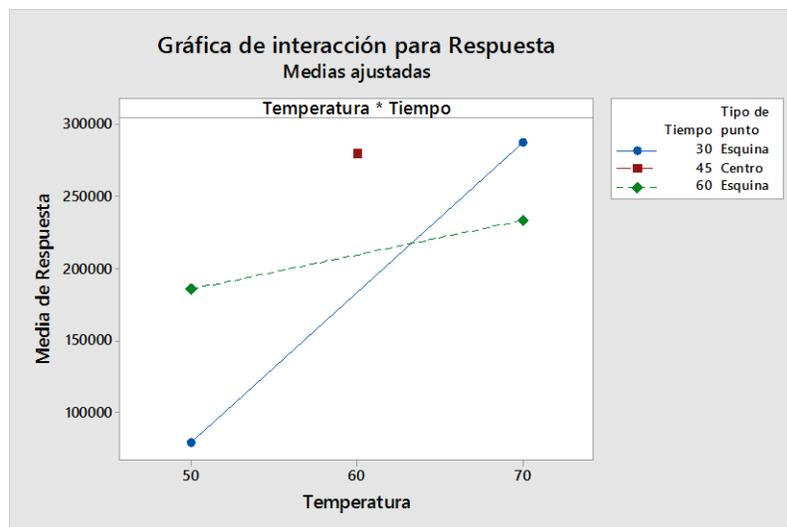


Figura 28. Gráfica de interacción de efectos (Temperatura en distintos valores de tiempo), resultado del análisis de datos del Criseno.

La figura 28 muestra la gráfica de interacción del efecto de la temperatura en dos condiciones de tiempo para los datos de Criseno. La primera observación de interés es que las rectas se cruzan, lo cual sugiere que existe interacción entre ambos factores. Pero, para el punto de máxima eficiencia de la extracción, a la mayor temperatura (70 °C) la curva que se encuentra en el nivel superior es la

generada a partir de los datos obtenidos con extracciones de 30 minutos. Esto sugiere que el tiempo óptimo para analizar este compuesto es realmente 30 minutos. Esto confirma lo expuesto en la tabla 17, sobre la disminución de la eficiencia de la extracción con el efecto combinado de todas las variables. A pesar de que el punto central sea un máximo aparente, realmente el valor de respuesta máxima corresponde a las condiciones de 70 °C, y 30 minutos. Para la extracción de este compuesto, no fue planteada la necesidad de una optimización uni-variada de la temperatura, porque, a temperaturas mayores del extremo superior (80 °C, por ejemplo), la presión de vapor del agua, que es la matriz de la muestra, comienza a aumentar. Esto, según el trabajo realizado por Rianawati, en el 2009, disminuye la eficiencia de la extracción de todos los compuestos.

Para finalizar esta sección, es presentada una tabla que funciona a modo de resumen sobre la confirmación de las condiciones óptimas de trabajo de extracción de los seis Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos estudiados, haciendo énfasis es aquellos que requieran una optimización uni-variada de la temperatura, fuera del intervalo seleccionado. La Tabla 19 recopila esta información.

Tabla 19. Resumen de las condiciones óptimas, dentro del intervalo del experimento factorial, para la extracción de seis HAP, utilizando fibras de PDMS.

	Temperatura del agua (°C)	Tiempo de extracción (minutos)
Naftaleno	50•	30 ó 60
Fluoreno	50•	30 ó 60
Fenantreno	50•	30 ó 60
Antraceno	50•	60
Pireno	60•	45
Criseno	70	30
• Necesidad de realizar una optimización uni-variada de la temperatura		

4.3. OPTIMIZACIÓN UNI-VARIADA DE LA TEMPERATURA DEL AGUA

Antes dar por culminada la etapa de optimización de las variables experimentales, se requería presentar un protocolo de trabajo que generara una respuesta satisfactoria para los seis Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos estudiados. Todos juntos, analizados con un mismo método (por motivos de practicidad operacional). Para ello, fue necesario optar por la selección de una condición que englobara lo reportado en la tabla 19, y que garantizara la eficiencia de la extracción de los compuestos más volátiles, ya que generaban señales más cercanas al ruido. Fue tomado en cuenta que, con estas condiciones, la eficiencia de la extracción de los compuestos de mayor peso molecular podía verse comprometida.

Primero, fue seleccionado un valor de tiempo de extracción para este protocolo de trabajo de 60 minutos, tomando en cuenta los siguientes criterios:

- 60 minutos corresponde al tiempo óptimo de extracción de la mayoría de los compuestos de menor peso molecular, a excepción del Fluoreno.
- Para los compuestos que presentaron condiciones óptimas de tiempo distintas a 60, no fue confirmada la significancia estadística del efecto del tiempo. Es decir, su variación no debería afectar significativamente a la eficiencia de la extracción.
- La eficiencia de la extracción de los compuestos de mayor peso molecular, Pireno y Criseno, estaría comprometida. Sin embargo, ambos compuestos manifestaron señales bien separadas del ruido, incluso cuando la condición de extracción no correspondía a su condición óptima (a diferencia del Naftaleno). La figura 26 muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos en esta sección, utilizando un sistema de detección de espectrometría de masas, en el modo SIM. Así mismo, en la tabla 20 se reportan los tiempos de retención obtenidos por compuesto.

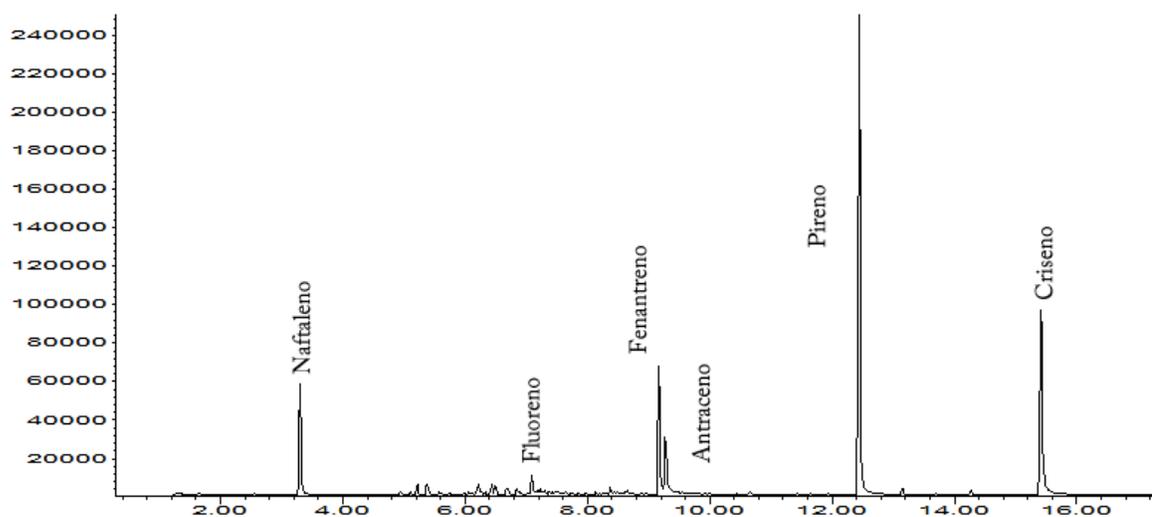


Figura 29. Ejemplo de Cromatograma de seis HAP, obtenido utilizando un sistema de detección de espectrometría de masas, con las condiciones resumidas en la tabla 9

Tabla 20. Tiempos de retención por compuesto para este método cromatográfico (resumido en la tabla 9)

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (MINUTOS)
NAFTALENO	3,31
FLUORENO	7,10
FENANTRENO	9,18
ANTRACENO	9,28
PIRENO	12,45
CRISENO	15,44

Luego, a un valor fijo de 60 minutos, fue evaluada la respuesta de la extracción de todos los compuestos en relación a la modificación de la temperatura del agua, desde 30 °C, el menor valor reproducible que se puede obtener utilizando una plancha de calentamiento, hasta 70 °C. Los resultados de cada réplica fueron promediados, y graficados. Este gráfico se muestra en la figura 30.

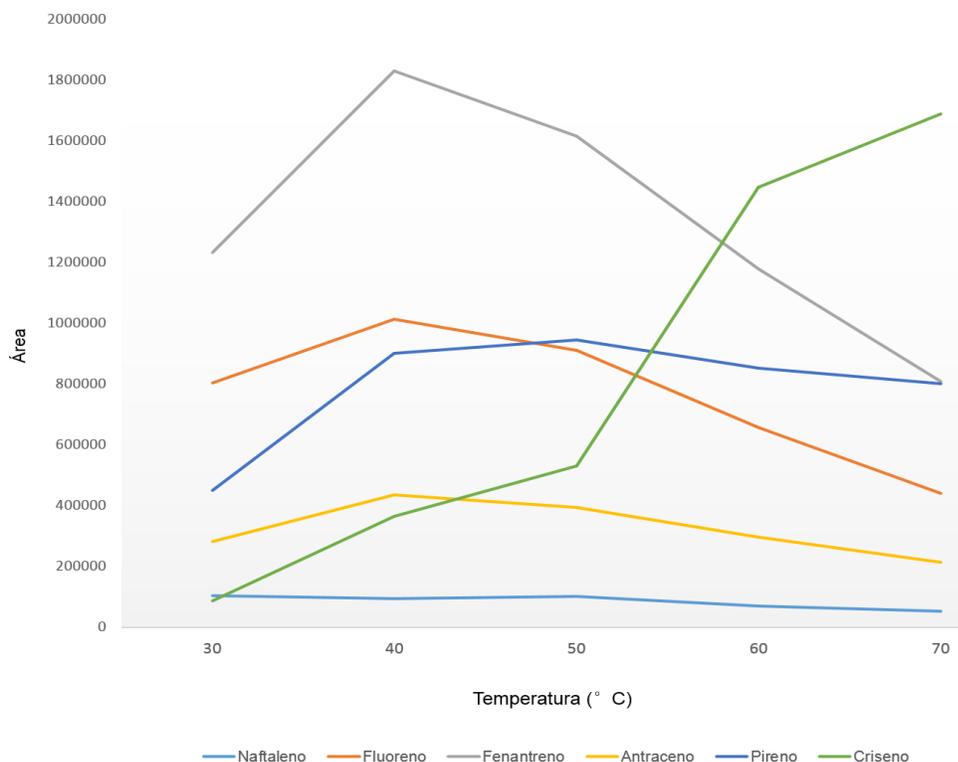


Figura 27. Resultados promediados de la optimización uni-variada de la temperatura.

El resultado de la optimización (figura 30), revela que el efecto de la temperatura es diferente para cada compuesto. Para interpretar este gráfico, no se deben comparar la magnitud de la respuesta entre distintos compuestos, ya que, como se había explicado anteriormente, en la solución todos tienen concentraciones distintas. Además, todos generan respuestas en distinta magnitud ante la técnica de MEFS, y ante el sistema de detección del CG (EM). En líneas generales, todos los compuestos de bajo peso molecular: presentaron un máximo de respuesta a los 40 °C, a excepción del Naftaleno, que presentó un máximo aparente a los 30 °C. Por ser el más volátil de todos, esta respuesta particular parece lógica. A menor valor de temperatura, su pérdida al espacio confinado disminuye, así como los procesos de desorción térmica de la fracción capturada por la fibra. El Pireno manifestó un máximo a 50 °C, coincidiendo con lo expuesto en la tabla 17. El Criseno, por su parte, manifestó un máximo de 70 °C, de nuevo, coincidiendo con lo expuesto en la tabla 19.

Considerando que los compuestos que presentaron señales más cercanas al ruido en el sistema de detección del instrumento de análisis fueron los de menor peso molecular, fue seleccionado un valor de temperatura de trabajo, para el protocolo definitivo, de 40 °C. Entonces, el protocolo de extracción con fibras de PDMS, para seis Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, consiste en aplicar condiciones de temperatura del agua de 40 °C, y 60 minutos de tiempo de extracción. Estas condiciones fueron empleadas como método de trabajo en el resto del procedimiento experimental.

4.4. ESTABLECIMIENTO DE FIGURAS DE MÉRITO PARA EL PROTOCOLO PROPUESTO

Una vez establecido el protocolo de trabajo, a partir de la información obtenida de los experimentos de optimización, se procedió a calcular sus correspondientes funciones de mérito, o parámetros de calidad. Dicha información sirve para evaluar el desempeño del método durante un procedimiento de análisis cuantitativo (Skoog, 2008). Luego, en futuros trabajos, estos parámetros numéricos serán de gran importancia para aquellos operadores que pretendan aplicar este método al análisis Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras de agua.

4.4.1. BLANCO

En cromatografía, al trabajar con inyecciones directas de muestras líquidas, la respuesta de análisis de un blanco suele ser una línea base conformada por las fluctuaciones naturales del ruido reportado por el detector. No suelen manifestarse señales correspondientes a los analitos, a menos que haya ocurrido algún tipo de contaminación. Sin embargo, cuando el paso previo al análisis consiste en una operación de Micro-extracción en Fase Sólida, la respuesta es muy distinta. La figura 31 muestra un cromatograma que sirve como ejemplo del resultado del análisis del blanco.

La primera observación de importancia es la diversidad de señales. Aunque, en escala de abundancia, presenten niveles muy inferiores (por lo menos 150 veces más pequeños), que aquellas señales reportadas por cualquier otro cromatograma (ver figura 29), esta diversidad es resaltante. La explicación propuesta consta de dos aspectos. El primero es la capacidad de las fibras de MEFS para capturar compuestos químicos diversos, magnificando así las señales que estos producen en el instrumento de análisis. El segundo, es la capacidad del sistema de detección (Espectrómetro de masas, en su modo S.I.M), para generar picos con relaciones señal-ruido contrastantes, incluso para concentraciones muy pequeñas de analito (Skoog, 2008).

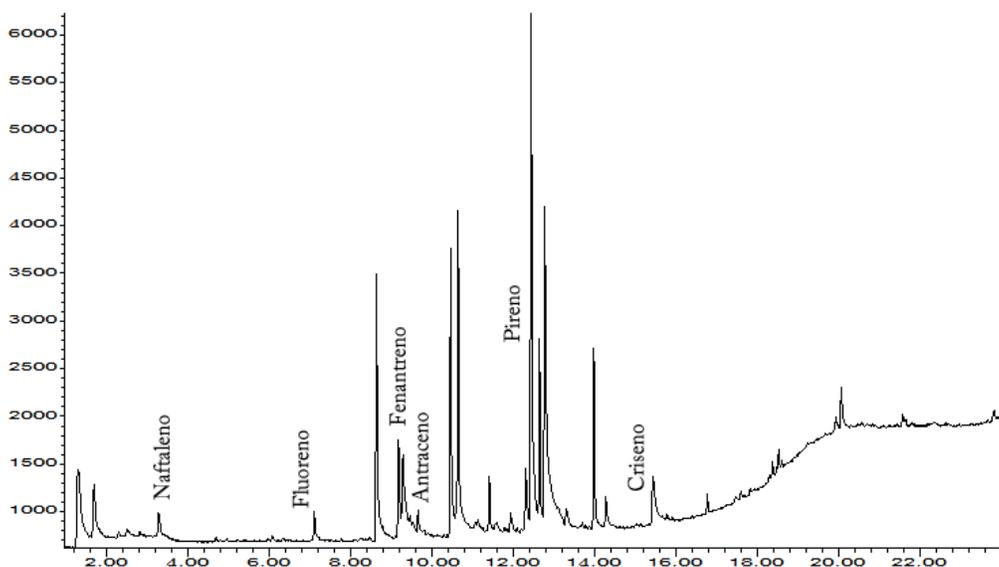


Figura 31. Cromatograma obtenido a partir del análisis del blanco, por MEFS-CG con las condiciones resumidas en la tabla 9

Es este modo de detección, los compuestos diversos no pudieron ser identificados. Sólo aquellas señales que correspondieron en valores de tiempo de elusión, con los seis Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de interés, fueron

integradas. Esta información, para las cuatro réplicas, así como el valor promedio, desviación estándar, y coeficiente de variación, se encuentra en la tabla 21.

Tabla 21. Datos obtenidos a partir del análisis del blanco

Área por compuesto (en unidades de área)							
Compuesto	R1	R2	R3	R4	MEDIA	SD	CV
Naftaleno	1485	1608	1776	1589	1615	120	7
Fluoreno	924	869	728	673	799	116	15
Fenantreno	3168	1976	2425	3290	2715	623	23
Antraceno	2075	1379	1067	1259	1445	439	30
Pireno	5644	6505	7676	4094	5980	1508	25
Criseno	3403	7797	7909	6313	6356	2098	33

Estos análisis fueron realizados con fibras nuevas. Los viales fueron calentados en la mufla a 400 °C por 30 minutos, y los séptums y agitadores magnéticos fueron lavados repetidas veces con diclorometano, de grado HPLC. Por eso, la presencia de compuestos diversos en la señal del blanco no puede atribuirse al efecto memoria traído de extracciones anteriores. Esta diversidad de compuestos proviene de una fuente distinta. Posiblemente estén contenidos en los envases plásticos, contenedores del agua destilada, en los séptums, o en las fibras. No es posible, en cualquier caso, asegurar que el blanco contiene seis HAP.

4.4.2. REPRODUCIBILIDAD

Al evaluar la reproducibilidad del método, fueron realizados repetidos ensayos con dos dispositivos distintos. Por eso, antes de agrupar todos los datos, fue necesario evaluar la diferencia estadística de ambos grupos. Para ellos, dos pruebas de hipótesis fueron realizadas: una diseñada para determinar si la relación entre las varianzas de ambas muestras era significativamente distinta de 1 (utilizando la distribución F de Fisher), y otra diseñada para determinar si la diferencia entre medias era significativamente distinta de 0 (utilizando la distribución t de Student). Si la respuesta a estas pruebas sugería que ambos dispositivos generaban grupos de datos estadísticamente similares, entonces sería posible agrupar toda la data disponible, y, además, se comprobaría que ambos dispositivos podrían utilizarse de manera indistinta.

Para las pruebas F sobre la relación entre varianzas, las hipótesis planteadas son las escritas en las ecuaciones 7 y 8:

$$H_0: \sigma^2_1 / \sigma^2_2 = 1 \quad \text{Ec 7. Hipótesis nula}$$

$$H_1: \sigma^2_1 / \sigma^2_2 \neq 0. \quad \text{Ec 8. Hipótesis alternativa}$$

El estadístico de prueba es la R.V (relación entre varianzas), que se ajusta a la distribución F . Para la toma de decisión, se compara el valor crítico, con el valor de este estadístico de prueba. Si el valor F supera al valor crítico, entonces se rechaza la hipótesis nula. La tabla 22 muestra un resumen sobre los resultados del cálculo de estos términos, por compuesto. Cabe destacar que, para los casos del Naftaleno, Fluoreno, y Criseno, dos datos fueron descartados, luego de haber confirmado su naturaleza atípica, a partir de una prueba Q (realizada por el software Minitab).

Tabla 22. Resultados de las pruebas F para la relación entre varianzas, por compuesto, para un nivel de significancia de $\alpha=0,05$

	VALOR CRÍTICO	F	P
Naftaleno	19,00	1,35	0,43
Fluoreno	19,00	1,69	0,37
Fenantreno	9,28	3,53	0,16
Antraceno	9,28	2,05	0,29
Pireno	9,28	4,84	0,11
Criseno	19,00	1,46	0,41

Al comparar, en la tabla 23, los resultados de F con los correspondientes valores críticos para cada prueba, se observa que los valores F son, para todos los casos, menores. Por eso, se asume que no existe información suficiente para rechazar la hipótesis nula. Entonces, se sugiere que ambos grupos de datos, para cada compuesto, presentan varianzas similares.

Para las pruebas t sobre la relación entre varianzas, las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

Ec 9. Hipótesis nula

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Ec 10. Hipótesis alternativa

En este caso, para la toma de decisión, se comparó el valor crítico con el estadístico de prueba t , asumiendo varianzas iguales. Si el valor del estadístico supera al valor crítico, se rechaza la hipótesis nula. La tabla 23 muestra un resumen sobre los resultados del cálculo estos términos, por compuesto.

Tabla 23. Resultados de las pruebas t para la diferencia de medias, por compuesto, para un nivel de significancia de $\alpha=0,05$

	VALOR CRÍTICO	/t/	P
Naftaleno	2,45	0,85	0,43
Fluoreno	2,45	1,79	0,11
Fenantreno	2,31	0,11	0,11
Antraceno	2,31	1,30	0,23
Pireno	2,31	1,16	0,28
Criseno	2,45	0,33	0,75

Los resultados que se muestran en la tabla 23 indican que, para todos los casos, el valor / t / es menor que el valor crítico. Entonces, se asume que no existe información suficiente como para rechazar la hipótesis nula, y se sugiere que ambos grupos de datos, para cada compuesto, presentan una media similar.

Los resultados de estas pruebas indican que los grupos de datos generados con distintos dispositivos de MEFS son estadísticamente similares, y, por eso, pueden utilizarse de manera indiscriminada, para réplicas de un mismo experimento. Para expresar los valores de media y desviación estándar, ambos grupos de datos fueron tratados como un mismo conjunto. Para ello, los resultados en área fueron aproximados a valores de concentración de los analitos. Estos resultados se encuentran en la tabla 24.

Tabla 24. Resultados de área (en unidades de área) obtenida en los ensayos de reproducibilidad, y parámetros estadísticos

Réplica	Naftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno	Pireno	Criseno
1	•	•	1827956	388484	924020	•
2	•	•	1710943	355676	819454	•
3	206738	1280734	1774050	384775	875717	282352
4	186705	1249058	1719509	465323	786683	311441
5	197628	1239536	1842362	389143	874864	340366
6	210883	1304276	1709323	467267	813003	362214
7	185482	1233921	1788173	373377	797712	277007
8	205570	1343611	1949969	416649	976791	373418
9	221916	1418960	2040121	447234	985191	331374
10	224987	1425417	2017369	436941	1005079	350348
MEDIA	204989	1311939	1837978	412487	885851	328565
D.S	14607	77136	124274	39807	82565	35562
C.V	7	6	7	10	9	11
• Valores que fueron descartados, por ser clasificados como atípicos, a partir de pruebas Q						

Los datos en la tabla 24 revelaron la información correspondiente a la estadística descriptiva de los datos obtenidos con réplicas agrupadas. El valor de coeficiente de variación (C.V), fue el estadístico utilizado para evaluar la reproducibilidad. Para todos los compuestos, el porcentaje superó el valor de 5%, lo que revela un importante grado de heterogeneidad de los datos, de acuerdo a este parámetro estadístico. Sin embargo, todos los valores de C.V entran dentro del rango reportado para la técnica por Rianawati, en el 2009 (entre 5% y 16 %), y por eso, el rendimiento del método se considera aceptable. La fuente más importante errores aleatorios podría ser el efecto memoria que se manifiesta entre

extracciones sucesivas. Como fue discutido con anterioridad, este efecto no es reproducible. Otra fuente importante es el hecho de haber realizado operaciones de extracción en una situación previa al establecimiento del equilibrio de reparto. Antes de que el sistema alcance este equilibrio, la cantidad de analito capturada por el revestimiento de la fibra es muy variable (Louch, 1992).

Se observa que el Antraceno, Pireno y el Criseno presentaron los valores de C.V elevados, de 10%, 9% y 11% respectivamente. En el caso de estos compuestos, el efecto memoria podría haber generado un impacto más importante, porque, como ha sido discutido anteriormente, manifiestan una mayor afinidad química con el componente del revestimiento de la fibra (PDMS). Entonces, luego de la exposición de la fibra dentro del puerto de inyección del Cromatógrafo de Gases, pequeñas cantidades de analito podrían haber permanecido sorbidos sobre el revestimiento. Además, estos ensayos fueron realizados utilizando condiciones experimentales que comprometieron la eficiencia de la extracción para Pireno y Criseno, y por eso, la variabilidad asociada al avance del proceso de reparto hacia la condición de equilibrio también es más importante, en comparación a los de bajo peso molecular.

4.4.3. LINEALIDAD

Una vez obtenidos los datos correspondientes a cada réplica del análisis de puntos de la curva de calibración, se procedió a ubicar el valor promedio entre réplicas. Estos valores fueron utilizados para construir las gráficas que indicarían la relación entre las señales reportadas por el equipo, y la concentración de los analitos: las curvas de calibración. Las figuras 32, a la 37 muestran los gráficos obtenidos para el Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Pireno y Criseno, respectivamente.

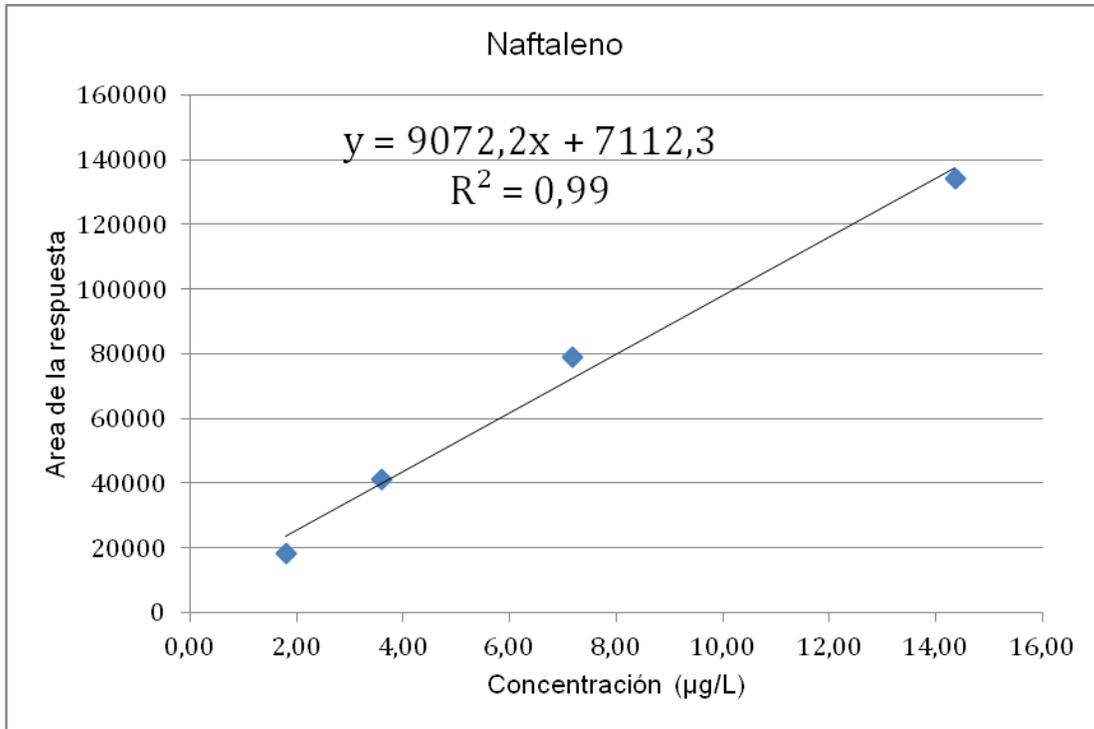


Figura 32. Curva de Calibración obtenida para el Naftaleno.

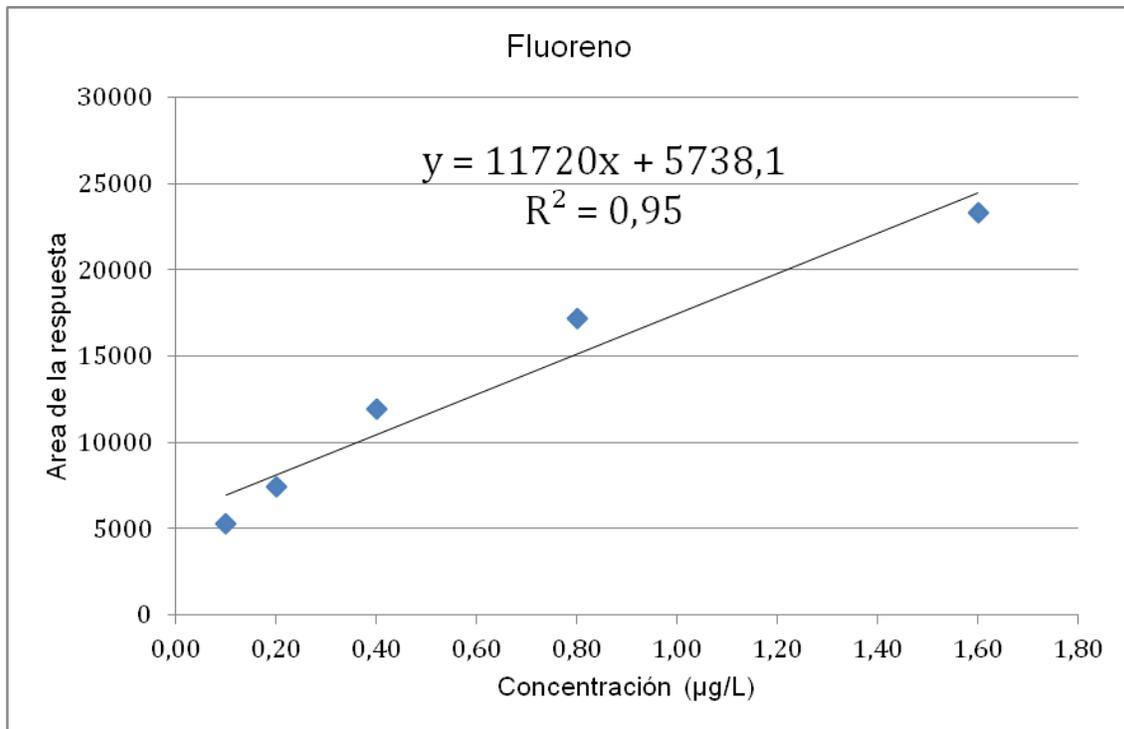


Figura 33. Curva de Calibración obtenida para el Fluoreno.

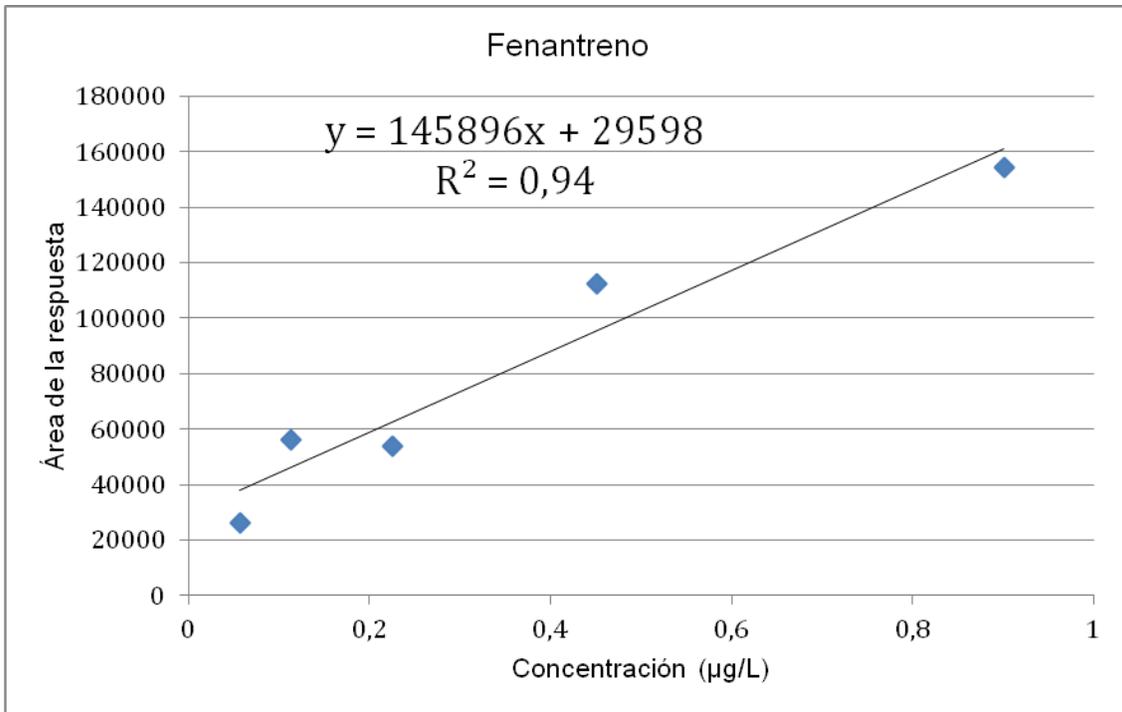


Figura 34. Curva de Calibración obtenida para el Fenantreno.

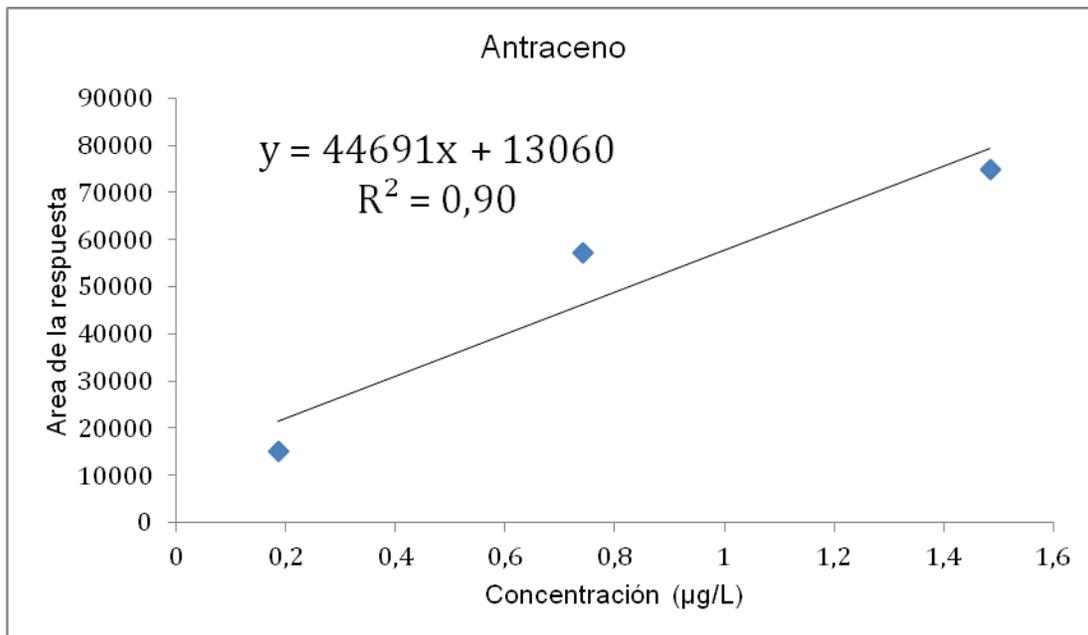


Figura 35. Curva de Calibración obtenida para el Antraceno.

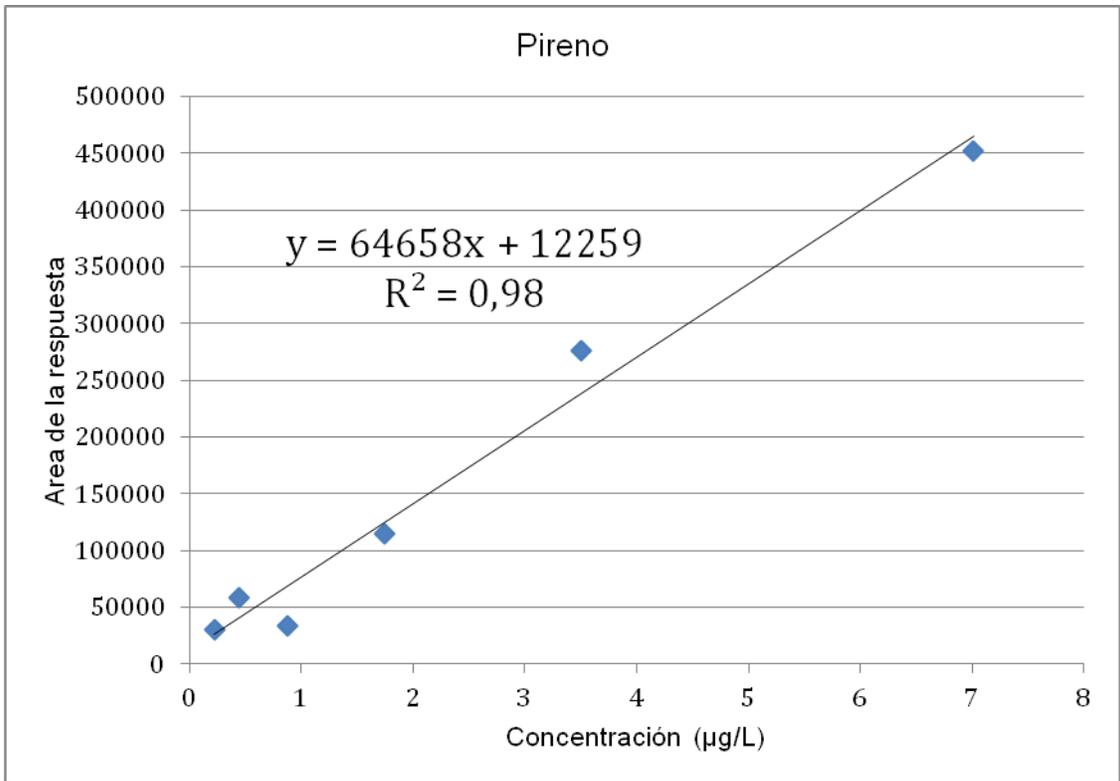


Figura 36. Curva de Calibración obtenida para el Pireno.

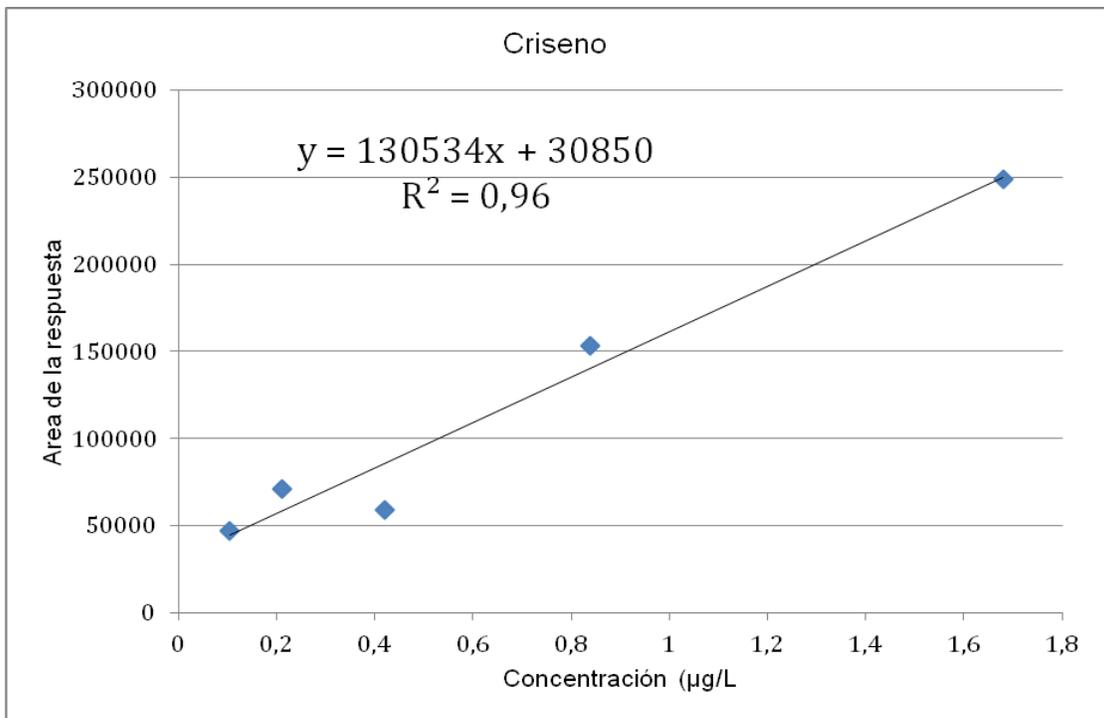


Figura 37. Curva de Calibración obtenida para el Criseno.

Como se puede apreciar, para casi todos los compuestos existe una situación de ajuste lineal entre la respuesta y la concentración de los analitos. Con valores de coeficientes de determinación que van desde 0,99 para el Naftaleno, con una correlación lineal satisfactoria, a 0,94 para el Fenantreno con menor correlación, en relación al Naftaleno (el Antraceno será estudiado aparte). El error aleatorio de estas curvas sería alto, porque, para todos los compuestos, a excepción del Naftaleno, el ajuste lineal no es ideal. Esta situación puede explicarse al tomar en cuenta que, entre extracciones, no fueron realizadas operaciones de preparación de las fibras. Entonces, el efecto memoria pudo haber tenido una influencia importante en la precisión de las determinaciones.

A pesar de que la respuesta en términos de linealidad no representa a la situación ideal, los datos de coeficiente de correlación coinciden con los reportados para la técnica, por King, en el 2004, y por Rianawati, en el 2009, para todos los compuestos, a excepción del Antraceno.

La curva de calibración del Antraceno fue la que presentó el menor valor de coeficiente de correlación (de 0,90). Sólo contiene tres puntos, porque fueron los únicos que manifestaron ajuste lineal. Los puntos extremos fueron descartados. Esta situación sólo se presentó con el Antraceno, y pudo haber deberse a la poca estabilidad que este analito en particular presentó en las soluciones acuosas, o por errores aleatorios durante la integración de las señales. Además de lo anterior, el efecto memoria también pudo haber influido. La gráfica que se muestra en la figura 35 corresponde a un segundo intento de calibración de este compuesto. La gráfica correspondiente al primer intento se encuentra en el apéndice E. Para efectos de esta discusión, la primera gráfica tuvo que ser descartada, debido a la evidente ausencia de linealidad de los datos.

4.4.4. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La tabla 25 muestra los resultados del cálculo de límites de detección y cuantificación para los analitos estudiados. Los valores correspondientes al Naftaleno, Fluoreno, y Fenantreno coinciden con los reportados para la técnica por King, en el 2004, y por Rianawati, en el 2009. El Antraceno presenta valores mayores a los reportados en la bibliografía, y esto puede ser otra consecuencia de los errores en la calibración que fueron discutidos en la sección anterior. El Pireno y el Criseno también presentan valores mayores que aquellos reportados para la técnica, y esto es una consecuencia de que, durante la escogencia del protocolo de trabajo, se decidió emplear una condición que comprometiera a la extracción de los compuestos de alto peso molecular, para asegurar la extracción de los de bajo peso molecular.

Tabla 25. Límites de detección y Cuantificación para la calibración del método

COMPUESTO	L.D (µg/L)	L.C (µg/L)
Naftaleno	0,04	0,1
Fluoreno	0,03	0,08
Fenantreno	0,01	0,04
Antraceno	0,03	0,09
Pireno	0,07	0,2
Criseno	0,04	0,1

A pesar de esto, todos los valores de límites de cuantificación están por lo menos 50 veces por debajo del límite correspondiente al método cromatográfico que emplea inyección directa de muestras líquidas (de alrededor de 10 µg/L). Esta información le otorga al método propuesto cierto mérito, en términos de la capacidad de la operación de extracción con fibras para magnificar las señales de los analitos durante trabajos de cuantificación, cuando estos están presentes en concentraciones por debajo de los 10 µg/L. La Agencia de Protección Ambiental reporta un valor máximo permisible de concentración de Criseno (el analito de

mayor potencial cancerígeno), en aguas naturales de 0,2 µg/L. Utilizando este método, se alcanzó un límite de cuantificación de 0,1 µg/L. Por esta razón, la utilidad del método propuesto para el análisis ambiental de muestras de aguas naturales es reafirmada.

4.5. CÁLCULO DE PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE HAP EN LA MUESTRA REAL DE AGUA DE RÍO

Para iniciar esta sección, se muestra, en la figura 38, un ejemplo del cromatograma obtenido a partir del primer análisis de la muestra de agua recolectada, utilizando las condiciones cromatográficas resumidas en la tabla 7. Al igual que el caso del análisis del blanco, este gráfico presenta señales en los tiempos de retención correspondientes a los analitos de interés (además de una importante diversidad de señales, correspondientes a compuestos que no fueron identificados), sólo que en una proporción que es propia de la naturaleza de la muestra. La geometría de los picos también se ve influenciada por el resto de los componentes de la matriz de la muestra, especialmente para el caso del Fenantreno, cuyo pico presenta asimetría.

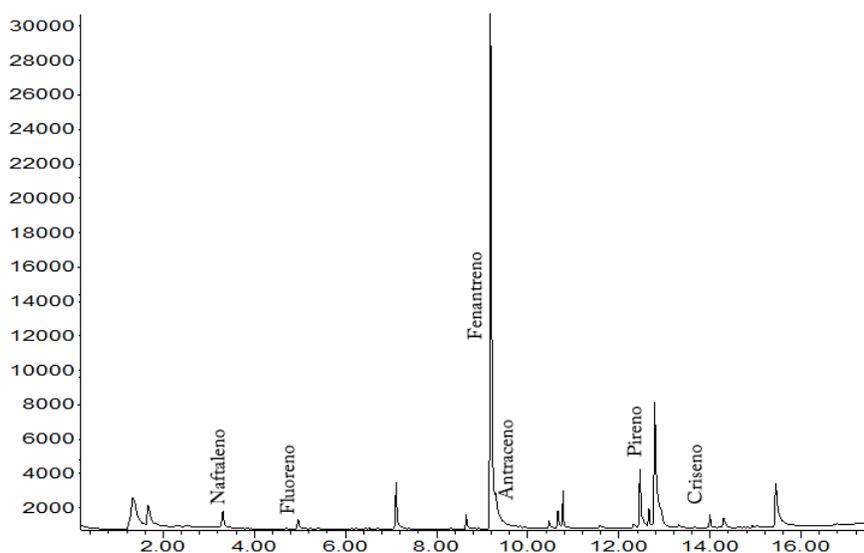


Figura 38. Ejemplo de cromatograma obtenido a partir del análisis de la muestra de agua recolectada, con las condiciones resumidas en la tabla 7

En la tabla 26 se resumen los resultados de área de las señales asociadas a los seis analitos estudiados, para la muestra. Los valores de área corresponden al promedio calculado para dos réplicas.

Tabla 26. Resultados del análisis de la muestra de agua de río

COMPUESTO	ÁREA PROMEDIO	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
Naftaleno	4680	26
Fluoreno	4892	67
Fenantreno	35125	76
Antraceno	8022	13
Pireno	22430	75
Criseno	27953	70

La primera observación importante es la magnitud de los valores de coeficiente de variación, especialmente para Fenantreno, Pireno y Criseno. Esto revela la poca reproducibilidad del método aplicado a la muestra de agua real, bien sea por el efecto de la matriz de la muestra, el efecto memoria, o una combinación entre ambos. Sólo el valor de Fenantreno supera 10 veces el valor del blanco, y el Antraceno y Pireno lo superan 3 veces. A partir de esta información, es posible advertir sobre la presencia de estos compuestos en la muestra recolectada.

El análisis de la muestra de agua de río tuvo la finalidad de estudiar el efecto que los componentes de la matriz de una muestra real tendrían en la eficiencia de la extracción: específicamente las especies iónicas disueltas, y la materia orgánica disuelta. Por eso, el análisis se repitió para la muestra de agua a la cual fue añadida una cantidad conocida de los analitos. Los valores de área dos réplicas fueron promediados. El valor promedio para cada compuesto fue corregido con los valores de área correspondiente a la muestra, antes de ser contaminada con los patrones, por diferencia. Así, fue establecido el valor de área

correspondiente únicamente a la fracción de patrón añadida. Luego, a partir de las curvas de calibración, fue estimada la concentración asociada a dichos valores corregidos.

Para establecer el porcentaje de recuperación, se calculó la relación entre los valores corregidos, y los valores calculados. La tabla 27 muestra los resultados de estos cálculos.

Tabla 27. Resultados del cálculo de % de recuperación.

COMPUESTO	% de recuperación
Naftaleno	76
Fluoreno	45
Fenantreno	27
Antraceno	31
Pireno	31
Criseno	5

Los datos más importantes de la tabla 27 corresponden a los valores de porcentaje de recuperación. Este parámetro funciona como una medida del efecto matriz en la eficiencia de la extracción. El Naftaleno presenta el valor mayor (y más aceptable), de 76 %. El Fluoreno, Fenantreno, Antraceno y Pireno presentan valores que van desde 27 %, a 45%. Estos valores indican una importante disminución de la eficiencia de la extracción de estos compuestos. Xia, en el 2012, y Cheng, en el 2013, reportaron una disminución en la eficiencia de la extracción asociada a la presencia de materia orgánica disuelta, que presenta afinidad química por las especies hidrófobas, como los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, comprometiendo así su disponibilidad para la participar en el proceso de reparto implicado en la extracción con fibras.

El caso del criseno es crítico. El porcentaje de recuperación es de 5%. Posiblemente estén ocurriendo procesos de precipitación, o captura por especies orgánicas disueltas. Para mejorar la recuperación en muestras reales, algunos autores recomiendan evaluar el efecto de la salinidad, y el pH, en la eficiencia de la extracción (King, 2004; Rianawati, 2009).

...

Antes de finalizar, es necesario reafirmar que, para efectos de los objetivos planteados, relacionados a la optimización de la técnica de Micro-extracción en fase sólida para analizar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras de agua, se puede decir lo siguiente:

Primero, no solo fueron optimizadas tres de las variables experimentales más importantes, si no que se produjo un material teórico que permitió entender cómo estas variables operan, y cuáles generan los efectos más importantes en la eficiencia de la extracción. En el futuro, esta información permitirá controlar estas variables para mejorar la recuperación de un analito en específico.

Luego, se comprobó que es posible determinar las figuras de mérito para el análisis de muestras preparadas en agua destilada. La ventaja más importante de la técnica, desde el punto de vista analítico, parecen ser los bajos valores de límite de detección que fueron obtenidos. Esto comprueba que la técnica opera correctamente en el orden de concentración en los que los contaminantes orgánicos persistentes suelen manifestarse en muestras de aguas naturales.

La desventaja es la ausencia de reproducibilidad y poca eficiencia de la recuperación al aplicar el método a una muestra de agua real, por el efecto de los componentes de la matriz. Sin embargo, esto abre la oportunidad a futuras investigaciones, que pretendan establecer una mejor estrategia para aplicar esta técnica a aguas reales, basándose en la información que fue reportada sobre el efecto de las variables estudiadas en este trabajo, en conjunto con el estudio de nuevas variables.

5. CONCLUSIONES

A partir del trabajo de optimización y ejercicio del método de cuantificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras de agua, aplicando la técnica de Micro-extracción en Fase Sólida, fueron establecidas las siguientes conclusiones:

1. La operación de MEFS-ID mejora significativamente, en términos de la eficiencia de la extracción, utilizando fibras de PDMS, en comparación con las fibras de PA, para todos los compuestos estudiados.

2. La operación de MEFS-ID mejora significativamente, en términos de la eficiencia de la extracción, aplicando condiciones de temperatura del agua menores a 50 °C, para Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno, y Antraceno; y 70°C, para Criseno.

3. La operación de MEFS-ID mejora significativamente, en términos de la eficiencia de la extracción, aplicando condiciones de tiempo de 60 minutos, para el Antraceno.

4. La operación de MEFS-ID manifiesta una respuesta relativamente constante para el Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno, Pireno, y Criseno independientemente de la selección del valor de tiempo de extracción (en el intervalo escogido para el experimento factorial).

5. La optimización uni-variada de la temperatura reveló que la operación de MEFS-ID mejora, en términos de la eficiencia de la extracción, aplicando la condición temperatura del agua de 40°C, para Naftaleno, Fluoreno, Fenantreno, y Antraceno.

6. Como existe variabilidad en la respuesta de los diversos analitos estudiados ante los cambios en las condiciones de la operación de extracción, la decisión de establecer una condición global para el análisis de todos a la vez, implica

comprometer la eficiencia de la extracción de un grupo, para asegurar la eficiencia de la extracción del otro.

7. La operación de MEFS-ID, en las condiciones establecidas, produce una importante magnificación de la intensidad de la señal producida por el análisis de una muestra por CG-EM, en comparación al método de inyección directa de muestras líquidas, alcanzando límites de detección que de los 0,01 $\mu\text{g/L}$, para el Fenantreno, a 0,07 $\mu\text{g/L}$, para el Pireno.

8. El efecto memoria, que se manifiesta entre extracciones sucesivas, podría ser el elemento generador de errores aleatorios más importante.

9. La composición de la matriz de la muestra de agua de río recolectada tuvo una influencia importante en los valores de porcentaje de recuperación que van desde 76% para el Naftaleno, a 5%, para el Criseno.

6. RECOMENDACIONES

A partir de las conclusiones y observaciones realizadas luego de haber finalizado el trabajo de discusión de resultados, se proponen las siguientes recomendaciones, para ser abordada en el futuro, en miras al desarrollo de la línea de investigación planteada en este escrito:

1. Establecer las figuras de mérito de un método de extracción que opere a condiciones de tiempo de 30 minutos, para así generar un mejor rendimiento, en términos del número de extracciones posibles para una única jornada laboral, y poder evaluar de manera eficiente el efecto memoria entre extracciones sucesivas.
2. Establecer las figuras de mérito de un método de extracción que opere a condiciones de temperatura de 70 °C, en miras a mejorar el valor de porcentaje de recuperación de Criseno y otros Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de alto peso molecular, en muestras de agua de río.
3. Estudiar la estabilidad de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos disueltos en muestras de agua de río.
4. Evaluar los efectos del cambio de salinidad, pH, y adición de solventes orgánicos en la estabilidad de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos disueltos en muestras de agua de río, en miras a mejorar la recuperación de la operación de MEFS-ID
5. Evaluar el rendimiento de la operación de MEFS en el espacio confinado para este tipo de analitos, para evadir el efecto de la matriz sobre la fibra.
6. Una vez optimizado el método para aguas naturales, diseñar y realizar una campaña de muestreo intensiva para los sistemas fluviales superficiales ubicados en las cercanías de la ciudad de Caracas, para confirmar, con un nivel de confianza establecido, la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sus aguas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1995). Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Department of Health and Human Services Public Health Service. EEUU. 4-60 pp.

Baird, C. (2001) Química Ambiental. Editorial Reverté S.A. Primera edición. España. 305-310 pp.

Branislav V. (2005) Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 24, No. 10. 845-868 pp.

Cheng, X*; Forstythe, J; Peterkin, E. (2013) Some factors affecting SPME analysis and PAHs in Philadelphia's urban waterways. Water Research 47. 2331-2340 pp.

Carson, R. (1962) Primavera Silenciosa. Editorial Crítica. Madrid, España. 34-60 pp.

Daniels, W (1995) Bioestadística. Cuarta Edición. Editorial Limusa S.A. España. 1-915 pp.

Doong, R; Chang, S; Sun;Y (2000) Solid-phase microextraction for determining the distribution of sixteen US Environmental Protection Agency polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. Journal of Chromatography A. 879. 177-188 pp.

Doong, R; Lin, Y (2004) Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. Water Research 38. 1733-1744 pp.

Fernandez, R (2011) Lichens as biomonitors for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Caracas Valley, Venezuela. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 91-3. 230–240 pp.

Guerra, J (2003) Estudio de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos asociados a los sedimentos de fondo de la Cuenca del Río Tuy, Venezuela. Trabajo especial de grado. Departamento de Geoquímica. Escuela de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 14-82 pp.

Havenga, W. (2002) The Determination of Trace-Level PAHs and Diagnostic Ratios for Source Identification in Water Samples Using Solid-Phase Microextraction and GC/MS. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 22:3-4. 327-338 pp.

King, A (2004) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 523. 259–267 pp.

López, L. (2013) Biomarcadores. Aplicación en la Geoquímica del Petróleo. Ediciones de la Biblioteca – EBUC. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 15-18 pp.

Louch, D*; Motlagh, S; Pawliszyn, J. (1992) Dynamics of Organic Compound Extraction from Water Using Liquid-Coated Fused Silica Fibers *Analytical Chemistry*. 64. 1187-1199 pp.

Lord, H; Pawliszyn, J. (2000) Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*. 885. 153-193 pp.

Maron, S; Prutton, C. (1980) *Fundamentos de Fisicoquímica*. Editorial Limusa. México. 306-311 pp.

Mendoza, K. (2007) Desarrollo de una metodología para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP,s) en muestra de particulado

atmosférico utilizado Micro-extracción en fase sólida en espacio confinado (EC-MEFS) por cromatografía de gases. Trabajo especial de grado. Escuela de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 14-82 pp.

Miller, J.N; Miller, J.C. (1993) Estadística para Química Analítica. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. 1-179 pp

Montgomery, D; Runger, G. (2010) Probabilidad y Estadística Aplicada a la Ingeniería. Editorial Limusa Wiley. España. 1-817 pp

Nollet, L. (2007). Handbook of Water Analysis. Secound Edition. Taylor & Francis Group. Unaited States of America.

Norma Venezolana COVENIN 2709:2002. Aguas Naturales, Industriales y Residuales. Guía para las técnicas de muestreo. Primera revisión. 2-10 pp.

Orozco,C.; Pérez, A.; González, M.; Rodríguez, F.; Alfayate, J. (2004). Contaminación Ambiental (Una visión desde la Química). Primera edición. Madrid: Thomson Editores. 680 pp.

Rianawati, E. (2009) Optimization and validation of solid phase micro-extraction (SPME) methodfor analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and stormwater. Physics and Chemistry of the Earth 34. 857–865 pp.

Richter, H; Howard, J.B. (2000) Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth soot-a review of chemical reaction pathways. Progress in Energy and combustions science. 26. 565-608 pp.

Skoog, D; Holler F.J; Crouch, S. (2008) Principios del Análisis Instrumental. Sexta edición. Editorial Cengage Learning, Mexico. 1-805 pp

Séralini, G. (2013) ¿Nos Envenenan? Primera edición. Nuevos Emprendimientos Editoriales S.L. Barcelona, España. 160-162 pp.

Straka, P; Havelcov, M. (2012) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and others organic compounds in ashes from biomass combustion. Acta Geodyn. Geomater. Vol 9. 4. 481-490 pp.

Xia X. (2012) Contribution ratio of freely to total dissolved concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in natural river waters. Chemosphere. 90. 1785-1793 pp

APÉNDICE A

Datos de área obtenidos durante la ejecución del experimento factorial de combinación tipo 2^3 , y ensayo de punto central

Tabla 1: Matriz del experimento factorial

Factores						
Corrida	Nivel	A	Nivel	B	Nivel	C
1	-1	50	-1	30	-1	PA
2	1	70	-1	30	-1	PA
3	-1	50	1	60	-1	PA
4	1	70	1	60	-1	PA
5	-1	50	-1	30	1	PDMS
6	1	70	-1	30	1	PDMS
7	-1	50	1	60	1	PDMS
8	1	70	1	60	1	PDMS

Tabla 2: Condiciones para cada factor del experimento: niveles

Factor	Niveles del Factor	
	Bajo (-1)	Alto (1)
A: Temperatura	50	70
B: Tiempo	30	90
C: Tipo de Fibra	PA	PDMS

Tabla 3: Resultados en unidades de área por compuesto por ensayo

	Naftaleno		Fluoreno		Fenantreno	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	8696	7395	47086	52961	295111	327307
2	2265	4505	25991	33818	307142	230928
3	2834	1921	37439	45667	361375	399934
4	3883	3638	33282	31828	339006	288121
5	31634	35999	125409	255837	760807	805345
6	18324	11847	78925	75544	463365	444702

7	51479	31161	178631	154118	958363	947138
8	17931	16087	60220	63596	342718	408383
Central (PDMS)	29033	31623	101535	111745	678836	741536
	Antraceno		Pireno		Criseno	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1	56882	60588	87585	177207	35365	75655
2	57614	46984	122559	83048	114418	83048
3	59018	72855	92444	106075	61524	72472
4	63463	117254	179467	335107	179840	134114
5	119844	161066	222882	351724	92764	64918
6	100164	92934	257530	296970	312385	261798
7	186206	198046	307463	402809	143348	227422
8	81251	125620	466067	214139	204810	261748
Central (PDMS)	144514	160229	312112	463212	313451	246197

APÉNDICE B

Análisis factorial de los resultados obtenidos a partir del experimento

Tabla 1. Coeficientes codificados por compuesto. Los datos resaltados corresponden a los efectos cuya significancia estadística fue confirmada mediante el análisis de varianza.

Naftaleno						
Término	Efecto	Coef	coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		16475	1587	10,38	0,000	
Temperatura	-13330	-6665	1587	-4,20	0,003	1,00
Tiempo	-716	-358	1587	-0,23	0,827	1,00
Tipo de Fibra	20666	10333	1587	6,51	0,000	1,00
Temperatura*Tiempo	1866	933	1587	0,59	0,573	1,00
Temperatura*Tipo de Fibra	-8191	-4096	1587	-2,58	0,033	1,00
Tiempo*Tipo de Fibra	5430	2715	1587	1,71	0,125	1,00
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	-4656	-2328	1587	-1,47	0,180	1,00

Fluoreno						
Término	Efecto	Coef	coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		81272	8339	9,75	0,000	
Temperatura	-61743	-30872	8339	-3,70	0,006	1,00
Tiempo	-11349	-5674	8339	-0,68	0,515	1,00
Tipo de Fibra	85526	42763	8339	5,13	0,001	1,00
Temperatura*Tiempo	5011	2505	8339	0,30	0,771	1,00
Temperatura*Tipo de Fibra	-47185	-23592	8339	-2,83	0,022	1,00
Tiempo*Tipo de Fibra	-8439	-4219	8339	-0,51	0,627	1,00
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	-550	-275	8339	-0,03	0,975	1,00

Fenantreno						
Término	Efecto	Coef	coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		467047	18967	24,62	0,000	
Temperatura	-279752	-139876	18967	-7,37	0,000	1,00
Tiempo	77166	38583	18967	2,03	0,076	1,00
Tipo de Fibra	348612	174306	18967	9,19	0,000	1,00
Temperatura*Tiempo	-42394	-21197	18967	-1,12	0,296	1,00
Temperatura*Tipo de Fibra	-173369	-86685	18967	-4,57	0,002	1,00
Tiempo*Tipo de Fibra	-31571	-15785	18967	-0,83	0,429	1,00
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	-81685	-40843	18967	-2,15	0,063	1,00

Tabla 1 (continuación). Coeficientes codificados por compuesto. Los datos resaltados corresponden a los efectos cuya significancia estadística fue confirmada mediante el análisis de varianza.

Antraceno						
Término	Efecto	Coef	coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		99987	5256	19,02	0,000	
Temperatura	-28653	-14326	5256	-2,73	0,026	1,00
Tiempo	25955	12977	5256	2,47	0,039	1,00
Tipo de Fibra	66309	33155	5256	6,31	0,000	1,00
Temperatura*Tiempo	-3482	-1741	5256	-0,33	0,749	1,00
Temperatura*Tipo de Fibra	-37646	-18823	5256	-3,58	0,007	1,00
Tiempo*Tipo de Fibra	3324	1662	5256	0,32	0,760	1,00
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	-18911	-9455	5256	-1,80	0,110	1,00

Pireno						
Término	Efecto	Coef	coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		231442	22072	10,49	0,000	
Temperatura	25837	12919	22072	0,59	0,574	1,00
Tiempo	63008	31504	22072	1,43	0,191	1,00
Tipo de Fibre	167012	83506	22072	3,78	0,005	1,00
Temperatura*Tiempo	45660	22830	22072	1,03	0,331	1,00
Temperatura*Tipo de Fibre	-38380	-19190	22072	-0,87	0,410	1,00
Tiempo*Tipo de Fibre	2335	1167	22072	0,05	0,959	1,00
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibre	-48150	-24075	22072	-1,09	0,307	1,00

Criseno						
Término	Efecto	Coef	coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		145352	8492	17,12	0,000	
Temperatura	97337	48668	8492	5,73	0,000	1,00
Tiempo	30616	15308	8492	1,80	0,109	1,00
Tipo de Fibra	101595	50797	8492	5,98	0,000	1,00
Temperatura*Tiempo	-28400	-14200	8492	-1,67	0,133	1,00
Temperatura*Tipo de Fibra	30736	15368	8492	1,81	0,108	1,00
Tiempo*Tipo de Fibra	-4250	-2125	8492	-0,25	0,809	1,00
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	-51778	-25889	8492	-3,05	0,016	1,0

Tabla 2. Tablas de Análisis de Varianza por Compuesto. Los datos resaltados corresponden a los casos donde fue comprobada la significancia estadística de los efectos.

Naftaleno					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	2908014200	415430600	10,31	0,002
Lineal	3	2421067269	807022423	20,04	0,000
Temperatura	1	710742270	710742270	17,65	0,003
Tiempo	1	2052773	2052773	0,05	0,827
Tipo de Fibra	1	1708272227	1708272227	42,42	0,000
Interacciones de 2 términos	3	400238243	133412748	3,31	0,078
Temperatura*Tiempo	1	13925958	13925958	0,35	0,573
Temperatura*Tipo de Fibra	1	268378115	268378115	6,66	0,033
Tiempo*Tipo de Fibra	1	117934170	117934170	2,93	0,125
Interacciones de 3 términos	1	86708688	86708688	2,15	0,180
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	1	86708688	86708688	2,15	0,180
Error		8	322201005	40275126	

Fluoreno					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	54314752936	7759250419	6,97	0,007
Lineal	3	45022755406	15007585135	13,49	0,002
Temperatura	1	15248792196	15248792196	13,71	0,006
Tiempo	1	515176506	515176506	0,46	0,515
Tipo de Fibra	1	29258786704	29258786704	26,30	0,001
Interacciones de 2 términos	3	9290788630	3096929543	2,78	0,110
Temperatura*Tiempo	1	100430462	100430462	0,09	0,771
Temperatura*Tipo de Fibra	1	8905508161	8905508161	8,00	0,022
Tiempo*Tipo de Fibra	1	284850006	284850006	0,26	0,627
Interacciones de 3 términos	1	1208900	1208900	0,00	0,975
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	1	1208900	1208900	0,00	0,975
Error		8	8900385272	1112548159	
Total			15	63215138208	

Fenantreno					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	9,81078E+11	1,40154E+11	24,35	0,000
Lineal	3	8,22985E+11	2,74328E+11	47,66	0,000
Temperatura	1	3,13044E+11	3,13044E+11	54,39	0,000
Tiempo	1	23818597723	23818597723	4,14	0,076
Tipo de Fibra	1	4,86122E+11	4,86122E+11	84,46	0,000
Interacciones de 2 términos	3	1,31403E+11	43801151989	7,61	0,010
Temperatura*Tiempo	1	7188877763	7188877763	1,25	0,296
Temperatura*Tipo de Fibra	1	1,20228E+11	1,20228E+11	20,89	0,002
Tiempo*Tipo de Fibra	1	3986817452	3986817452	0,69	0,429

Interacciones de 3 términos	1	26689838585	26689838585	4,64	0,063
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	1	26689838585	26689838585	4,64	0,063
Error		8	46046332890	5755791611	
Total		15	1,02712E+12		

Tabla 2 (continuación). Tablas de Análisis de Varianza por Compuesto. Los datos resaltados corresponden a los casos donde fue comprobada la significancia estadística de los efectos.

Antraceno					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	30757967503	4393995358	9,94	0,002
Lineal	3	23566062146	7855354049	17,77	0,001
Temperatura	1	3283891678	3283891678	7,43	0,026
Tiempo	1	2694570236	2694570236	6,10	0,039
Tipo de Fibra	1	17587600233	17587600233	39,79	0,000
Interacciones de 2 términos	3	5761458405	1920486135	4,35	0,043
Temperatura*Tiempo	1	48486851	48486851	0,11	0,749
Temperatura*Tipo de Fibra	1	5668772327	5668772327	12,83	0,007
Tiempo*Tipo de Fibra	1	44199228	44199228	0,10	0,760
Interacciones de 3 términos	1	1430446952	1430446952	3,24	0,110
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	1	1430446952	1430446952	3,24	0,110
Error		8	3535992766	441999096	
Total		15	34293960268		

Pireno					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	1,53649E+11	21949826820	2,82	0,085
Lineal	3	1,30122E+11	43373925584	5,56	0,023

Temperatura	1	2670253950	2670253950	0,34	0,574
Tiempo	1	15880158272	15880158272	2,04	0,191
Tipo de Fibre	1	1,11571E+11	1,11571E+11	14,31	0,005
Interacciones de 2 términos	3	14253320990	4751106997	0,61	0,627
Temperatura*Tiempo	1	8339342400	8339342400	1,07	0,331
Temperatura*Tipo de Fibre	1	5892174360	5892174360	0,76	0,410
Tiempo*Tipo de Fibre	1	21804230	21804230	0,00	0,959
Interacciones de 3 términos	1	9273690000	9273690000	1,19	0,307
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibre	1	9273690000	9273690000	1,19	0,307
Error	8	62358593615	7794824202		
Total		15	2,16007E+11		

Criseno					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	1,00734E+11	14390572419	12,47	0,001
Lineal	3	82932872789	27644290930	23,96	0,000
Temperatura	1	37897674266	37897674266	32,84	0,000
Tiempo	1	3749327208	3749327208	3,25	0,109
Tipo de Fibra	1	41285871316	41285871316	35,78	0,000
Interacciones de 2 términos	3	7077237227	2359079076	2,04	0,186
Temperatura*Tiempo	1	3226268400	3226268400	2,80	0,133
Temperatura*Tipo de Fibra	1	3778714577	3778714577	3,27	0,108
Tiempo*Tipo de Fibra	1	72254250	72254250	0,06	0,809
Interacciones de 3 términos	1	10723896914	10723896914	9,29	0,016
Temperatura*Tiempo*Tipo de Fibra	1	10723896914	10723896914	9,29	0,016
Error	8	9231452192	1153931524		
Total		15	1,09965E+11		

APÉNDICE C

Datos de área obtenidos durante el experimento de optimización uni- variada de la temperatura del agua.

Tabla 1: Datos de área obtenidos durante el experimento de optimización uni- variada de la temperatura del agua

T (°C)	30	30	40	40	50	50
área por compuesto	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Naftaleno	107797	97772	147026	41615	134094	66277
Fluoreno	976328	632666	1181154	846165	1002855	820652
Fenantreno	1513972	949564	2074111	1587047	1837733	1393030
Antraceno	345629	216064	503813	366770	447885	341091
Pireno	564199	333803	1041698	731041	1014414	874844
Criseno	112896	59934	391555	336319	527923	531109
T (°C)	60	60	70	70		
área por compuesto	R1	R2	R1	R2		
Naftaleno	112086	25774	80736	25091		
Fluoreno	824891	490066	545068	336390		
Fenantreno	1281370	1075949	828322	788828		
Antraceno	329367	263031	222872	205432		
Pireno	854031	852243	664773	936896		
Criseno	1314689	1576982	1636306	1742657		

APÉNDICE D

Cálculo de concentraciones de soluciones de HAP

D.1. Cálculo de concentraciones de soluciones madres de 6 HAP

1. Preparación de la solución madre de Naftaleno		
Atributo	Medida	Error asociado
Masa del vial vacío (g)	14,9023	0,0001
Masa del vial y adición de patrón de (g)	15,0047	0,0001
Adición del Patrón (g)	0,1024000	0,0001414
Pureza del Patrón (%)	98	No se cuenta con el dato
Masa del compuesto puro (g)	0,1003520	0,0001414
Determinación de la masa del solvente		
masa del beaker vacío (g)	22,9896	0,0001
Masa del beaker y solvente (g)	30,7416	0,0001
Masa de Acetonitrilo (g)	7,75	0,0001414
Masa de la solución (g)	7,8544000	0,0002000
Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)	0,7860000	0,0010000
Volumen de la solución (mL)	9,9928753	0,0127161
Concentración de la solución (mg/L)	10042,35	19,0680485
Concentración de la solución, valores redondeados (mg/L)	10042	19

2. Preparación de la solución madre de Fluoreno		
Atributo	Medida	Error asociado
Masa del vial vacío (g)	15,0397	0,0001
Masa del vial y adición de patrón de (g)	15,2445	0,0001
Adición del Patrón (g)	0,2048000	0,000141421
Pureza del Patrón (%)	99	No se cuenta con el dato
Masa del compuesto puro (g)	0,202752	0,000141421
Determinación de la masa del solvente		
masa del beaker vacío (g)	22,9896	0,0001

Masa del beaker y solvente (g)	30,8724	0,0001
Masa de Acetonitrilo (g)	7,8828	0,000141421
Masa de la solución (g)	8,0876000	0,0002
Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)	0,786	0,001
Volumen de la solución (mL)	10,28956743	0,013093525
Concentración de la solución (mg/L)	19704,61843	28,59402698
Concentración de la solución, valores redondeados (mg/L)	19705	29

3. Preparación de la solución madre de Fenantreno		
Atributo	Medida	Error asociado
Masa del vial vacío (g)	10,08012	0,00001
Masa del vial y adición de patrón de (g)	10,08345	0,00001
Adición del Patrón (g)	0,00333	1,41421356E-05
Pureza del Patrón (%)	97	No se cuenta con el dato
Masa del compuesto puro (g)	0,0032301	1,41421356E-05
Determinación de la masa del solvente		
masa del beaker vacío (g)	22,9896	0,0001
Masa del beaker y solvente (g)	26,8894	0,0001
Masa de Acetonitrilo (g)	3,8998	0,000141421
Masa de la solución (g)	3,90313	0,000142127
Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)	0,786	0,001
Volumen de la solución (mL)	4,965814249	0,006320417
Concentración de la solución (mg/L)	650,4673429	2,965797384
Concentración de la solución, valores redondeados (mg/L)	650	3

4. Preparación de la solución madre de Antraceno		
Atributo	Medida	Error asociado
Masa del vial vacío (g)	15,1213	0,0001
Masa del vial y adición de patrón de (g)	15,2462	0,0001
Adición del Patrón (g)	0,124900	0,000141421
Pureza del Patrón (%)	95	No se cuenta con el dato
Masa del compuesto puro (g)	0,118655	0,000141421
Determinación de la masa del solvente		
masa del beaker vacío (g)	22,9896	0,0001
Masa del beaker y solvente (g)	46,3676	0,0001
Masa de Acetonitrilo (g)	23,378	0,000141421
Masa de la solución (g)	23,502900	0,0002
Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)	0,786	0,001
Volumen de la solución (mL)	29,9019084	0,038043991
Concentración de la solución (mg/L)	3968,141378	6,917876353
Concentración de la solución, valores redondeados (mg/L)	3968	7

5. Preparación de la solución madre de Pireno		
Atributo	Medida	Error asociado
Masa del vial vacío (g)	15,2626	0,0001
Masa del vial y adición de patrón de (g)	15,3476	0,0001
Adición del Patrón (g)	0,085000	0,000141421
Pureza del Patrón (%)	98	No se cuenta con el dato
Masa del compuesto puro (g)	0,083300	0,000141421
Determinación de la masa del solvente		
masa del beaker vacío (g)	22,9896	0,0001
Masa del beaker y solvente (g)	34,7483	0,0001
Masa de Acetonitrilo (g)	11,7587	0,000141421
Masa de la solución (g)	11,843700	0,0002
Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)	0,786	0,001
Volumen de la solución (mL)	15,06832061	0,01917258
Concentración de la solución (mg/L)	5528,154209	11,7286118
Concentración de la solución, valores redondeados (mg/L)	5528	12

6. Preparación de la solución madre de Criseno		
Atributo	Medida	Error asociado
Masa del vial vacío (g)	15,2970	0,0001
Masa del vial y adición de patrón de (g)	15,3330	0,0001
Adición del Patrón (g)	0,0360	0,000141421
Pureza del Patrón (%)	95	No se cuenta con el dato
Masa del compuesto puro (g)	0,0342	0,000141421
Determinación de la masa del solvente		
masa del beaker vacío (g)	22,9896	0,0001
Masa del beaker y solvente (g)	46,4366	0,0001

Masa de Acetonitrilo (g)	23,447	0,000141421
Masa de la solución (g)	23,4830	0,0002
Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)	0,786	0,001
Volumen de la solución (mL)	29,87659033	0,038011781
Concentración de la solución (mg/L)	1144,708938	4,952504639
Concentración de la solución, valores redondeados (mg/L)	1145	5

7. Resumen de Concentraciones de soluciones madres, con valores redondeados

	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Naftaleno	10042	19
Fluoreno	19705	29
Fenantreno	650	3
Antraceno	3968	7
Pireno	5528	12
Criseno	1145	5

D.2. Cálculo de concentración de solución acuosa de 6 HAP utilizada para el experimento factorial

1. Preparación de la solución intermedia en Acetonitrilo								
Masa del vial vacío (g)	Error asociado	Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)			Error asociado	Volumen Final de la solución (mL)	Error asociado	
12,838	0,00001	0,786			0,001	10	0,02	
Compuesto	Masa del vial y alícuota de la madre (g)	Error asociado	Masa de alícuota de la madre (g)	Error asociado	Volúmen de la alícuota (mL)	Error asociado	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Naftaleno	12,8495	1E-05	0,0116	1,4142E-05	0,01472	2,59705E-05	14,78192621	0,048336146
Fluoreno	12,8563	1E-05	0,0068	1,4142E-05	0,008677	2,11092E-05	17,09772265	0,059436439
Antraceno	12,8935	1E-05	0,0371	1,4142E-05	0,047239	6,27362E-05	18,74450891	0,055844238
Fenantreno	13,1196	1E-05	0,2261	1,4142E-05	0,287723	0,000366501	18,70197201	0,097042049
Pireno	13,1553	1E-05	0,0357	1,4142E-05	0,045369	6,04606E-05	25,07995929	0,081222541
Criseno	13,3128	1E-05	0,1575	1,4142E-05	0,200433	0,000255637	22,94952926	0,114047303

2. Resumen de Concentraciones de la solución intermedia, con valores redondeados

Compuesto	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Naftaleno	14,78	0,05
Fluoreno	17,1	0,1
Antraceno	18,7	0,1
Fenantreno	18,7	0,1
Pireno	25,1	0,1
Criseno	22,9	0,1

3. Preparación de la solución acuosa de 6 HAP para el experimento factorial

Masa del vial vacío (g)	Error asociado	Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)	Error asociado
16,15886	0,00001	0,786	0,001
Masa del vial y alícuota de la solución intermedia (g)	Error asociado	Volmuen final (mL)	Error asociado
16,52513	0,00001	500	0,25
Masa de la alícuota de la solución intermedia (g)	Error asociado		
0,36627	1,41421E-05		
Volúmen de la alícuota (mL)	Error asociado		
0,465992366	0,000593139		
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	
Naftaleno	13,77473435	0,050262679	
Fluoreno	15,93693893	0,095712836	
Antraceno	17,4281145	0,096197675	
Fenantreno	17,4281145	0,096197675	
Pireno	23,39281679	0,098536009	
Criseno	21,34245038	0,097661703	

4. Resumen de concentración de la solución acuosa de 6 HAP para el experimento factorial, con valores redondeados

Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	13,77	0,05
Fluoreno	15,9	0,1
Antraceno	17,4	0,1
Fenantreno	17,4	0,1
Pireno	23,4	0,1
Criseno	21,3	0,1

D.3 Cálculo de concentración de solución acuosa de 6 HAP utilizada para el experimento de optimización uni-variada de la temperatura, y para la determinación de la reproducibilidad

1. Preparación de la solución intermedia en Acetonitrilo

Compuesto	Masa del vial y alícuota de la madre (g)	Error asociado	Masa de alícuota de la madre (g)	Error asociado	Volúmen de la alícuota (mL)	Error asociado	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Naftaleno	10,49279	0,00001	0,02167	1,41421E-05	0,027569975	3,94218E-05	27,68576845	0,085890284
Fluoreno	10,51388	0,00001	0,02109	1,41421E-05	0,026832061	3,85888E-05	52,87257634	0,151719727
Fenantreno	10,66055	0,00001	0,14667	1,41421E-05	0,186603053	0,000238089	12,12919847	0,062943096
Antraceno	10,68298	0,00001	0,02243	1,41421E-05	0,028536896	4,05203E-05	11,3234402	0,034211565
Pireno	10,70936	0,00001	0,02638	1,41421E-05	0,033562341	4,63361E-05	18,55326209	0,092720105
Criseno	10,72775	0,00001	0,01839	1,41421E-05	0,023396947	3,47824E-05	2,678950382	0,01346931

2. Resumen de Concentraciones de la solución intermedia, con valores redondeados

Compuesto	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Naftaleno	27,7	0,1
Fluoreno	52,9	0,2
Fenantreno	12,1	0,1
Antraceno	11,32	0,03
Pireno	18,6	0,1
Criseno	2,68	0,01

3. Preparación de la solución acuosa de 6 HAP para el experimento factorial

Masa del vial vacío (g)	Error asociado	Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)	Error asociado
9,55019	0,00001	0,786	0,001
Masa del vial y alícuota de la solución intermedia (g)	Error asociado	Volmuen final (mL)	Error asociado
9,95548	0,00001	500	0,25
Masa de la alícuota de la solución intermedia (g)	Error asociado		
	0,40529	1,41421E-05	
Volúmen de la alícuota (mL)	Error asociado		
	0,515636132	0,000656272	
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)		Error asociado
Naftaleno	28,56624173		0,110277374
Fluoreno	54,5543028		0,219330729
Fenantreno	12,4783944		0,104529344
Antraceno	11,67400204		0,034813807
Pireno	19,18166412		0,106410618
Criseno	2,763809669		0,010983422

4. Resumen de concentración de la solución acuosa de 6 HAP, con valores redondeados

Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	28,6	0,1
Fluoreno	54,6	0,2
Fenantreno	12,5	0,1
Antraceno	11,67	0,03
Pireno	19,1	0,1
Criseno	2,76	0,01

D.4. Cálculo de la concentración de soluciones utilizadas para la construcción de la curva de calibración

1. Preparación de una solución intermedia de Naftaleno y Antraceno, en acetonitrilo

Masa del vial vacío (g)	Error asociado	Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)		Volumen Final de la solución (mL)		Error asociado
11,33881	0,00001	0,786	0,001	10		0,02

Compuesto	Masa del vial y alícuota de la madre (g)	Error asociado	Masa dealícuota de la madre (g)	Error asociado	Volúmen de la alícuota (mL)	Error asociado	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Naftaleno	11,3952	0,00001	0,05642	1,41421E-05	0,07178117	9,30802E-05	72,0826514	0,219365319
Antraceno	11,4195	0,00001	0,02426	1,41421E-05	0,03086514	4,31944E-05	12,24728753	0,036885632

2. Preparación de una solución intermedia de Fluoreno y Fenantreno, en acetonitrilo

Masa del vial vacío (g)	Error asociado		Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)		Volumen Final de la solución (mL)			Error asociado
11,1175	0,00001		0,786		0,001	10		0,02
Compuesto	Masa del vial y alícuota de la madre (g)	Error asociado	Masa dealícuota de la madre (g)	Error asociado	Volúmen de la alícuota (mL)	Error asociado	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Fluoreno	11,1246	0,00001	0,00714	1,41421E-05	0,009083969	2,13846E-05	17,89996183	0,061247483
Fenantreno	11,2465	0,00001	0,12188	1,41421E-05	0,155063613	0,000198101	10,07913486	0,05230857

3. Preparación de una solución intermedia de Pireno y Criseno, en acetonitrilo

Masa del vial vacío (g)	Error asociado	Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)			Volumen Final de la solución (mL)	Error asociado		
10,68832	0,00001		0,786	0,001	10	0,02		
Compuesto	Masa del vial y alícuota de la madre (g)	Error asociado	Masa de alícuota de la madre (g)	Error asociado	Volumen de la alícuota (mL)	Error asociado	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Pireno	10,699	0,00001	0,01065	1,41421E-05	0,013549618	2,4918E-05	7,490229008	0,026048563
Criseno	10,7114	0,00001	0,01238	1,41421E-05	0,015750636	2,69312E-05	1,803447837	0,009194514

4. Resumen de Concentraciones de soluciones intermedias, con valores redondeados

Compuesto	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Naftaleno	72,1	0,2
Fluoreno	17,90	0,06
Fenantreno	10,08	0,05
Antraceno	12,28	0,04
Pireno	7,49	0,03
Criseno	1,80	0,01

5. Preparación de la solución acuosa que serviría como punto 1 de la curva de calibración

Masa del vial vacío (g)	Error asociado	Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)			
16,8379	0,00001		0,786	0,001	
Masa del vial y alícuota de la solución intermedia (Naftaleno y Antraceno) (g)	Error asociado	Masa del vial y alícuota de la solución intermedia (Fluoreno y Fenantreno) (g)	Error asociado	Masa del vial y alícuota de la solución intermedia (Pireno y Criseno) (g)	Error asociado
16,8692	0,00001	16,88328	0,00001	17,03038	0,00001
Masa de la alícuota de la solución intermedia (Naftaleno y Antraceno) (g)	Error asociado	Masa de la alícuota de la solución intermedia (Fluoreno y Fenantreno) (g)	Error asociado	Masa de la alícuota de la solución intermedia (Pireno y Criseno) (g)	Error asociado
0,0313	1,4E-05	0,01406	1,41421E-05	0,1471	1,41421E-05

Volúmen de la alícuota (Naftaleno y Antraceno) (mL)	Error asociado	Volúmen de la alícuota (Fluoreno y Fenantreno) (mL)	Error asociado	Volúmen de la alícuota (Pireno y Criseno) (mL)	Error asociado
0,03982	5,4E-05	0,017888	2,90116E-05	0,187150127	0,000238783
Volmuen final (mL)		Error asociado			
200		0,15			

Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	14,3558	0,04558
Fluoreno	1,60098	0,00608
Fenantreno	0,90156	0,00475
Antraceno	2,44506	0,00881
Pireno	7,00877	0,02993
Criseno	1,68435	0,00968

6. Resumen de Concentraciones solución acuosa que sirve como punto 1 de la curva de calibración, con valores redondeados

Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	14,36	0,05
Fluoreno	1,60	0,01
Fenantreno	0,901	0,004
Antraceno	2,45	0,01
Pireno	7,01	0,03
Criseno	1,68	0,01

7. Diluciones sucesivas del punto 1 para la construcción de las curvas de calibración

Protocolo para las diluciones:			
Volúmenes de las alícuotas (mL)	Error asociado	Volúmen Final (mL)	Error asociado
50	0,05	100	0,08

	Punto 2		Punto 2 valores redondeados	
	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
	7,18	0,026637303	7,18	0,03
	0,800	0,005103881	0,800	0,005
	0,4505	0,002081547	0,451	0,002
	1,225	0,005240327	1,225	0,005
	3,505	0,015657185	3,50	0,02
	0,84	0,005114409	0,840	0,005
	Punto 3		Punto 3 valores redondeados	
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	3,59	0,015688737	3,59	0,02
Fluoreno	0,4	0,00255194	0,400	0,002
Fenantreno	0,2255	0,001040862	0,226	0,001
Antraceno	0,6125	0,002620163	0,612	0,003
Pireno	1,75	0,010248049	1,75	0,01
Criseno	0,42	0,002557205	0,420	0,003
	Punto 4		Punto 4 valores redondeados	
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	1,795	0,010260805	1,80	0,01

Fluoreno	0,2	0,001032279	0,200	0,001
Fenantreno	0,113	0,00052052	0,113	0,001
Antraceno	0,306	0,001550343	0,306	0,002
Pireno	0,875	0,005124024	0,88	0,01
Criseno	0,21	0,001523917	0,21	0,002
	Punto 5		Punto 5 valores redondeados	
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	0,9	0,005131121	0,90	0,01
Fluoreno	0,1	0,00051614	0,100	0,001
Fenantreno	0,0565	0,000505208	0,057	0,001
Antraceno	0,153	0,001019015	0,153	0,001
Pireno	0,44	0,00503165	0,440	0,005
Criseno	0,105	0,001009	0,105	0,001
	Punto 6		Punto 6 valores redondeados	
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	0,45	0,0050331	0,450	0,005
Fluoreno	0,05	0,000504083	0,050	0,001
Fenantreno	0,0285	0,00050133	0,029	0,001
Antraceno	0,0765	0,000509507	0,077	0,001
Pireno	0,22	0,002515825	0,220	0,002
Criseno	0,0525	0,0005045	0,052	0,001

D.5. Cálculo de la concentración de soluciones utilizadas para el segundo intento de calibración del Antraceno

1. Preparación de una solución intermedia de Antraceno, en acetonitrilo

Masa del vial vacío (g)	Error asociado	Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)			Volumen Final de la solución (mL)	Error asociado		
10,17693	0,00001		0,786	0,001	10,00		0,02	
Compuesto	Masa del vial y alícuota de la madre (g)	Error asociado	Masa dealícuota de la madre (g)	Error asociado	Volúmen de la alícuota (mL)	Error asociado	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Antraceno	10,24205	0,00001	0,06512	1,4142E-05	0,082849873	0,000106932	32,87482952	0,097400051

2. Concentración de solución intermedia, con valores redondeados

	Concentración de la solución (mg/L)	Error asociado
Antraceno	32,9	0,1

3. Preparación de la solución acuosa

Masa del vial vacío (g)	Error asociado	Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)	
36,30230	0,00001	0,786	0,001
Masa del vial y alícuota de la solución intermedia (g)	Error asociado	Volmuen final (mL)	
36,44417	0,00001	100,000	0,08

Masa de la alícuota de la solución intermedia (g)		Error asociado
0,14187		1,414E-05
Volúmen de la alícuota (mL)		Error asociado
0,180496183		0,0002303
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Antraceno	59,38324427	0,2014417

4. Resumen de Concentraciones solución acuosa de Antraceno

	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Antraceno	59,4	0,2

5. Protocolo para las diluciones: para el punto 1 de la curva de calibración			
Volúmenes de las alícuotas (mL)	Error asociado	Volúmen Final (mL)	Error asociado
10	0,02	100	0,08
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)		Error asociado
Naftaleno	5,94		0,0237427
Resumen	Solución acuosa		
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)		Error asociado
Antraceno	5,94		0,02
Protocolo para las diluciones:			
Volúmenes de las alícuotas (mL)	Error asociado	Volúmen Final (mL)	Error asociado
50	0,05	100	0,08
Punto 2		Punto 2 valores redondeados	
Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado

2,97	0,01069889	2,97	0,01
Punto 3		Punto 3 valores redondeados	
Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
1,485	0,00534945	1,485	0,005
Punto 4		Punto 4 valores redondeados	
Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
0,7425	0,00267472	0,743	0,003
Punto 5		Punto 5 valores redondeados	
Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
0,3715	0,00157364	0,372	0,002
Punto 6		Punto 6 valores redondeados	
Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
0,186	0,00102798	0,186	0,001

D.6. Cálculo de la concentración de soluciones utilizadas para el cálculo de LD y LC

Protocolo para las diluciones:				
	Volúmenes de las alícuotas (mL)	Error asociado	Volúmen Final (mL)	Error asociado
	50	0,05	100	0,08
	Punto 7		Punto 7 valores redondeados	
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	0,225	0,00251655	0,225	0,003
Fluoreno	0,025	0,000501024	0,0250	0,0005
Fenantreno	0,0145	0,000500345	0,0145	0,0005
Antraceno	0,0385	0,000502425	0,0385	0,0005
Pireno	0,11	0,001009873	0,110	0,001
Criseno	0,026	0,000501107	0,0260	0,0005
Protocolo para las diluciones:				
	Volúmenes de las alícuotas (mL)	Error asociado	Volúmen Final (mL)	Error asociado
	10	0,02	100	0,08
	Punto 8		Punto 8 valores redondeados	
Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	0,0225	0,00030389	0,0225	0,0003
Fluoreno	0,0025	5,02892E-05	0,00250	0,00005
Fenantreno	0,00145	5,00975E-05	0,00145	0,00005
Antraceno	0,00385	5,06831E-05	0,00358	0,00005
Pireno	0,011	0,000102769	0,011	0,0001
Criseno	0,0026	5,03127E-05	0,00260	0,00005

D.7. Cálculo de la concentración de la solución preparada con la muestra de agua de río

1. Preparación de la solución acuosa utilizando como solvente la muestra de agua de río, utilizando las mismas soluciones intermedias de la sección D.5

Masa del vial vacío (g)	Error asociado	Densidad del Acetonitrilo (se asume como densidad de la solución, g/mL)		Error asociado	
16,90052	0,00001	0,786		0,001	
Masa del vial y alícuota de la solución intermedia (Naftaleno y Antraceno) (g)	Error asociado	Masa del vial y alícuota de la solución intermedia (Fluoreno y Fenantreno) (g)	Error asociado	Masa del vial y alícuota de la solución intermedia (Pireno y Criseno) (g)	Error asociado
16,98356	0,00001	16,99807	0,00001	17,41985	0,00001
Masa de la alícuota de la solución intermedia (Naftaleno y Antraceno) (g)	Error asociado	Masa de la alícuota de la solución intermedia (Fluoreno y Fenantreno) (g)	Error asociado	Masa de la alícuota de la solución intermedia (Pireno y Criseno) (g)	Error asociado
0,08304	1,41421E-05	0,01451	1,41421E-05	0,42178	1,41421E-05
Volúmen de la alícuota (Naftaleno y Antraceno) (mL)	Error asociado	Volúmen de la alícuota (Fluoreno y Fenantreno) (mL)	Error asociado	Volúmen de la alícuota (Pireno y Criseno) (mL)	Error asociado
0,105648855	0,000135612	0,01846056	2,95864E-05	0,536615776	0,000682954
Volmuen final (mL)		Error asociado			
500		0,25			

Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	15,23456489	0,047183692
Fluoreno	0,660888041	0,002477599
Fenantreno	0,372164885	0,001948927
Antraceno	2,594735878	0,009176658
Pireno	8,038504326	0,034021524
Criseno	1,931816794	0,011052623

2. Resumen de concentraciones, con valores promediados

Compuesto	Concentración de la solución (µg/L)	Error asociado
Naftaleno	15,23	0,05
Fluoreno	0,661	0,002
Fenantreno	0,372	0,002
Antraceno	2,59	0,01
Pireno	8,04	0,03
Criseno	1,93	0,01

D.8. Ecuaciones utilizadas para los cálculos de propagación de incertidumbres

1. Para operaciones de sumas o restas:

$$S_y \text{ (de la suma o resta de } a \text{ y } b) = \sqrt{(S_a)^2 + (S_b)^2}$$

2. Para operaciones de multiplicación y división:

$$S_y \text{ (de la multiplicación y división de } a \text{ y } b) = y \times \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2}$$

Fuente: Skoog, 2008.

APÉNDICE E

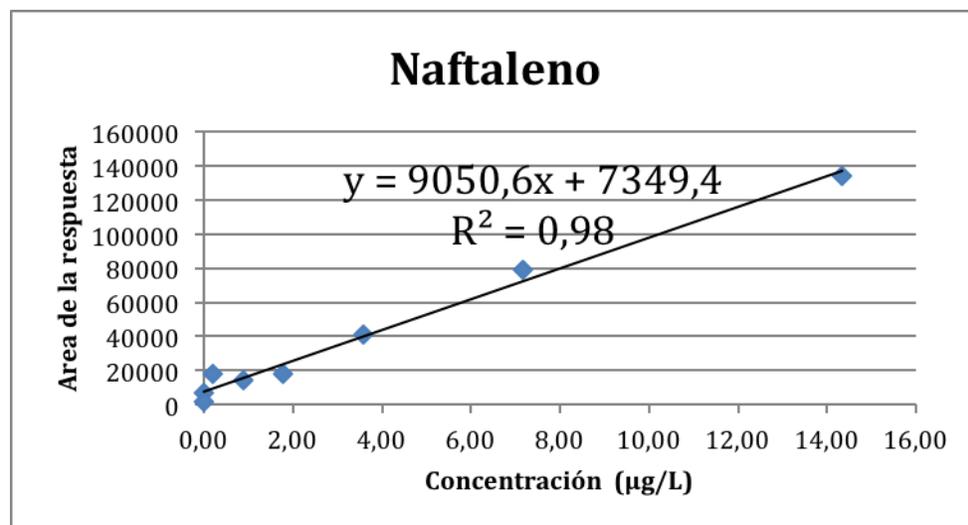
Datos obtenidos para la construcción de las curvas de calibración, y cálculos de LD y LC

Nota: Estas gráficas, a diferencia de las reportadas en el texto, contienen los puntos de menor concentración (sección D.6), y fueron utilizadas para realizar el cálculo de LD y LC, con las ecuaciones 5 y 6, que aparecen en el texto (página 48). Para aplicar estas ecuaciones, fue utilizado el valor de b (punto de corte en el eje y, de las curvas expuestas a continuación)

1. Naftaleno

Concentración (µg/L)	Error asociado	R1	R2	PROMEDIO
14,36	0,05	132285	136370	134327,5
7,18	0,03	80602	77130	78866
3,59	0,02	41354	41213	41283,5
1,80	0,01	19000	17574	18287
0,90	0,01	14508	13392	13950
0,225	0,003	26536	8815	17675,5
0,0225	0,0003		6909	6909
0				1614,50

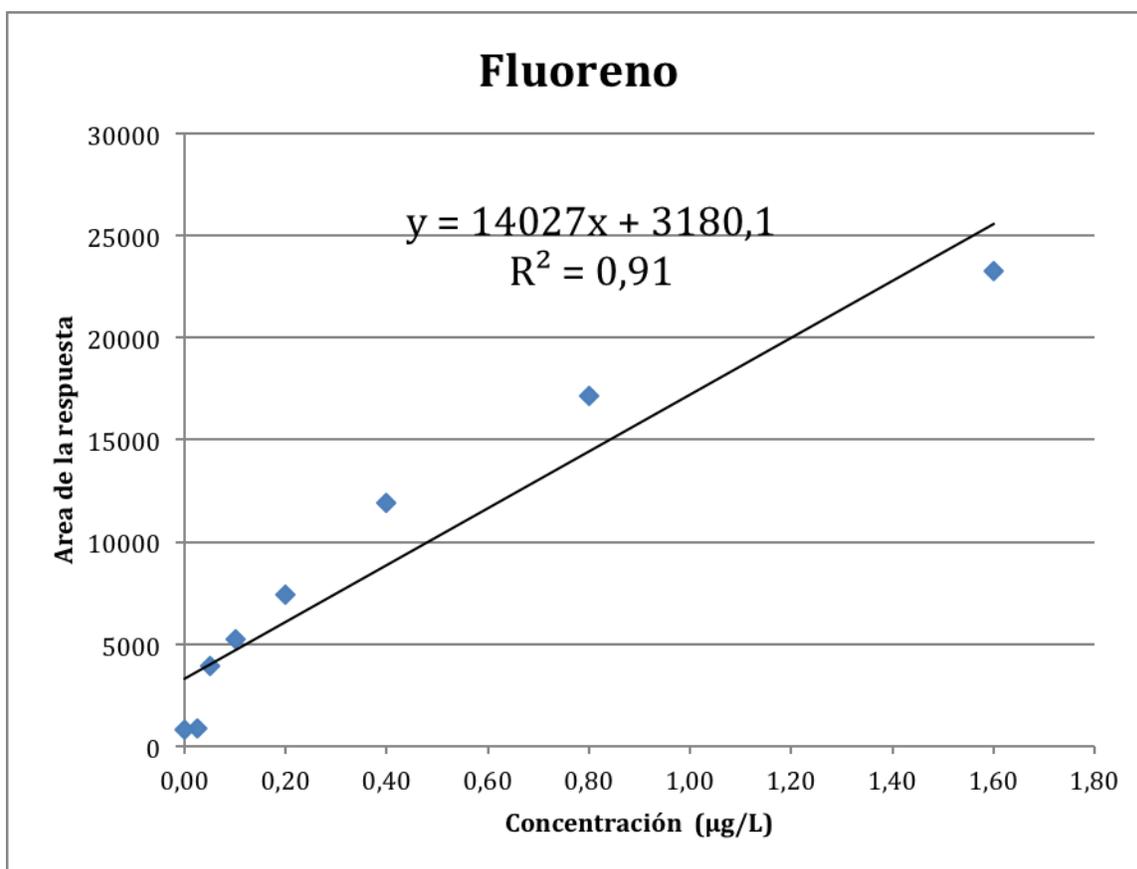
Curva utilizada para el cálculo de LD y LC



2. Fluoreno

Concentración (µg/L)	Error asociado	R1	R2	PROMEDIO
1,60	0,01	21392	25186	23289
0,800	0,005	18336	15948	17142
0,400	0,002	11042	12794	11918
0,200	0,001	6275	8570	7422,5
0,100	0,001	6911	3592	5251,5
0,050	0,001	5086	2805	3945,5
0,0250	0,0005	1402	378	890
0				798,5

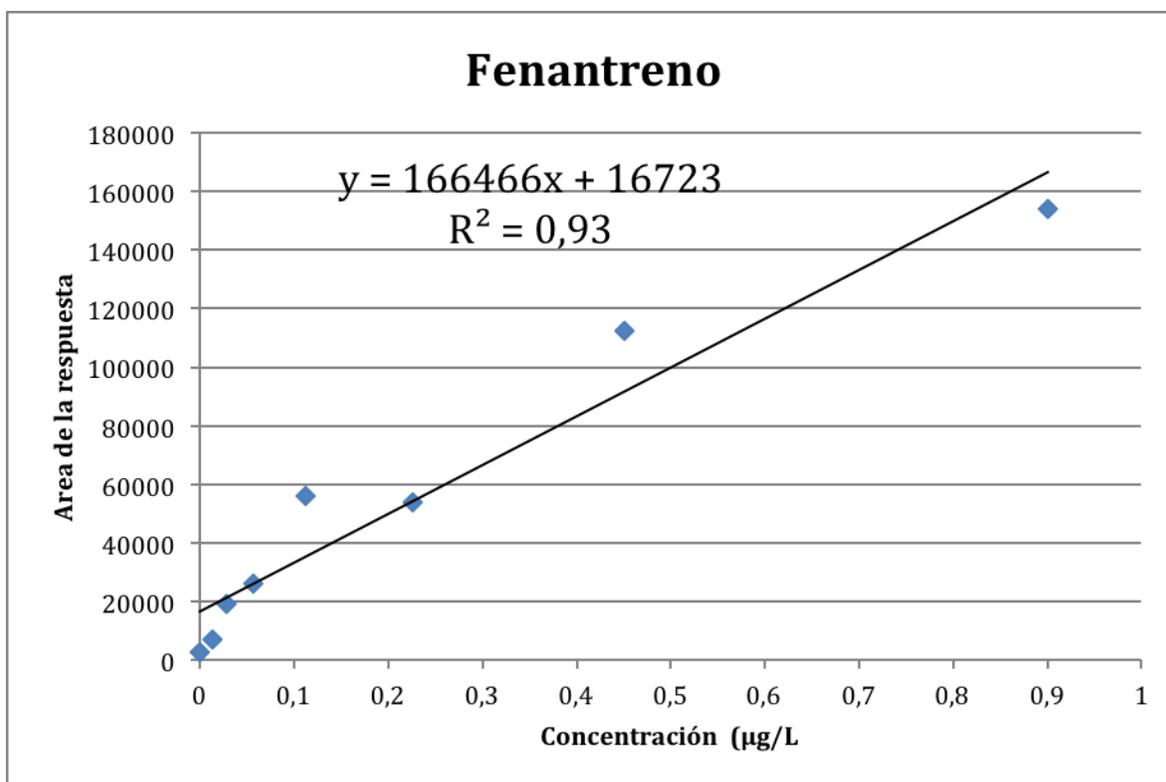
Curva utilizada para el cálculo de LD y LC



3. Fenantreno

Concentración (µg/L)	Error asociado	R1	R2	PROMEDIO
0,901	0,004	157322	151096	154209
0,451	0,002	130085	94674	112379,5
0,226	0,001	60000	47537	53768,5
0,113	0,001	37034	75519	56276,5
0,057	0,001	34512	18256	26384
0,029	0,001	26470	11871	19170,5
0,0145	0,0005	7102		7102
0				2714,75

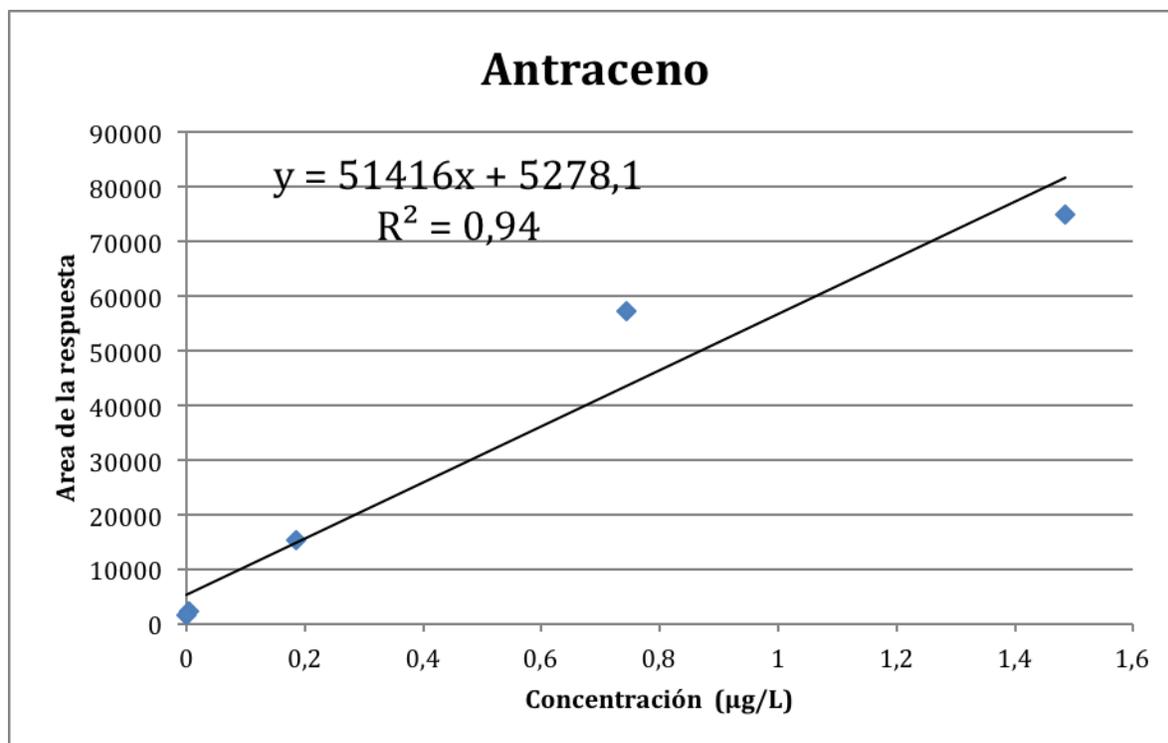
Curva utilizada para el cálculo de LD y LC



4. Antraceno

		Area de la respuesta		
Concentración (µg/L)	Error asociado	R1	R2	PROMEDIO
1,485	0,005	85972	63559	74765,5
0,743	0,003	34983	79289	57136
0,186	0,001	13409	16918	15163,5
0,00358	0,00005	2182		2182
0				1445

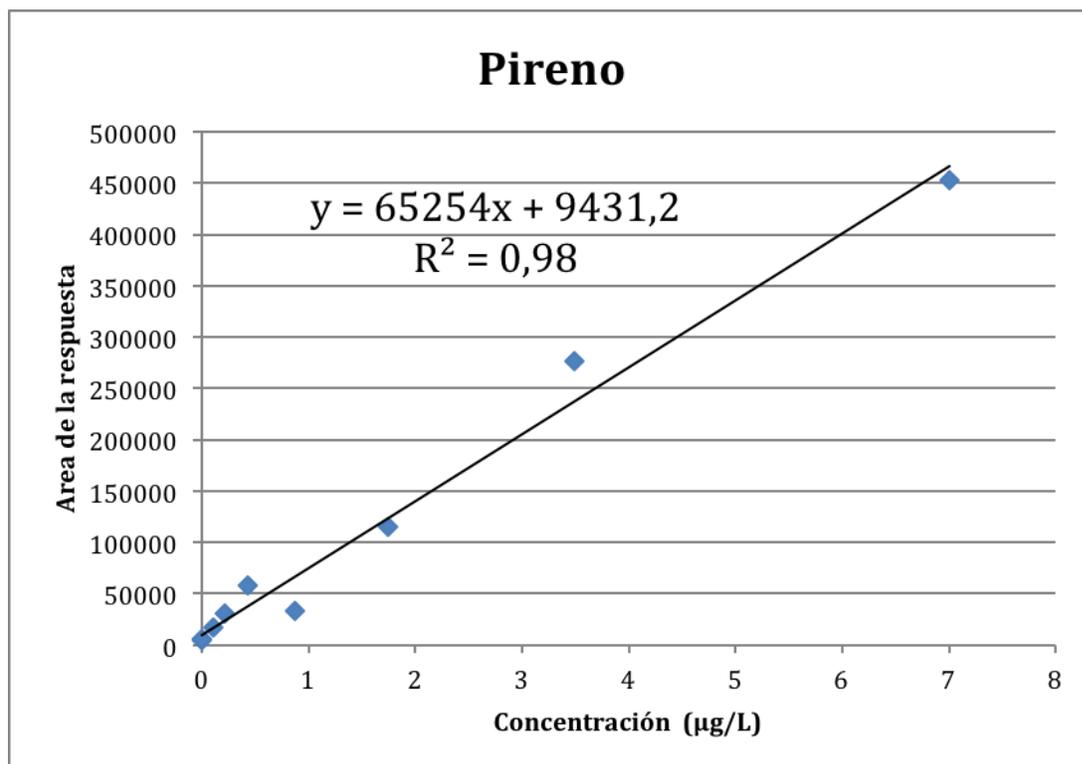
Curva utilizada para el cálculo de LD y LC



5. Pireno

Concentración (µg/L)	Error asociado	Area de la respuesta		PROMEDIO
		R1	R2	
7,01	0,03	410439	494296	452367,5
3,50	0,02	309181	242015	275598
1,75	0,01	126499	103004	114751,5
0,88	0,01	64749	2737	33743
0,440	0,005	77079	39061	58070
0,220	0,002	36576	23822	30199
0,110	0,001	17096		17096
0,011	0,0001	4370		4370
0				5979,75

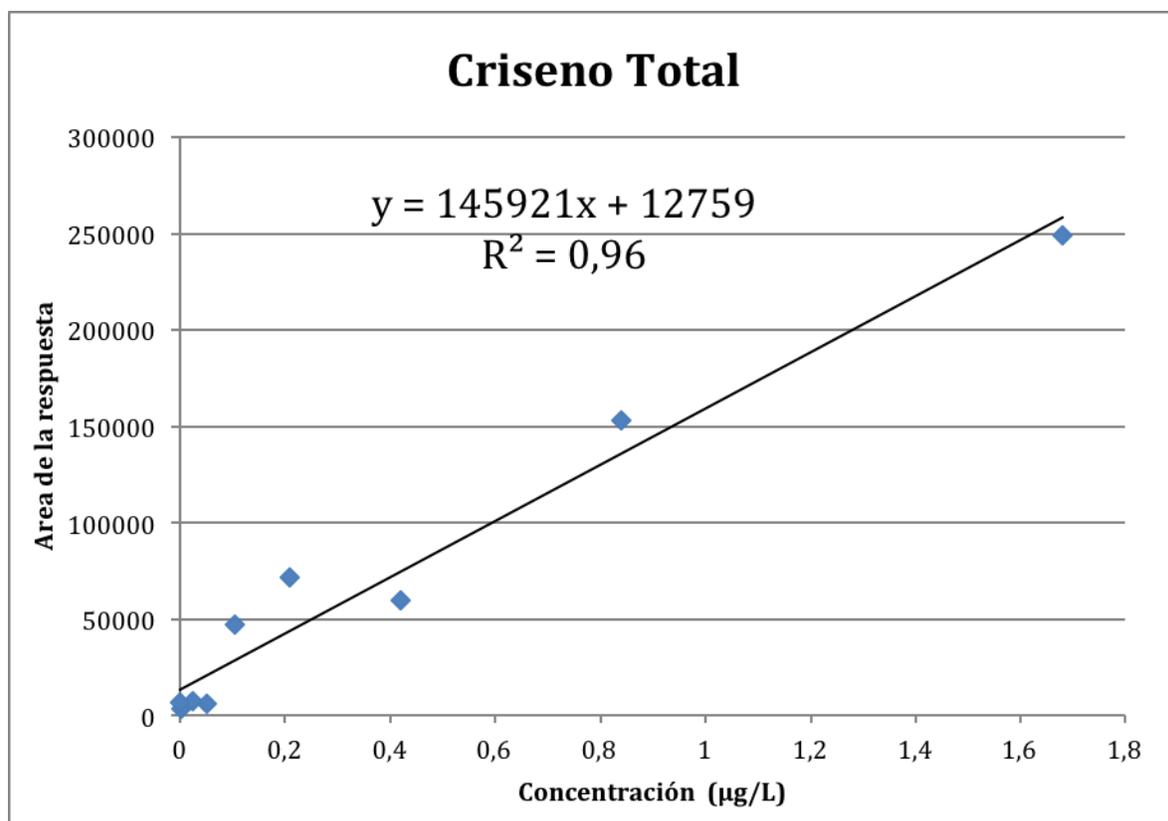
Curva utilizada para el cálculo de LD y LC



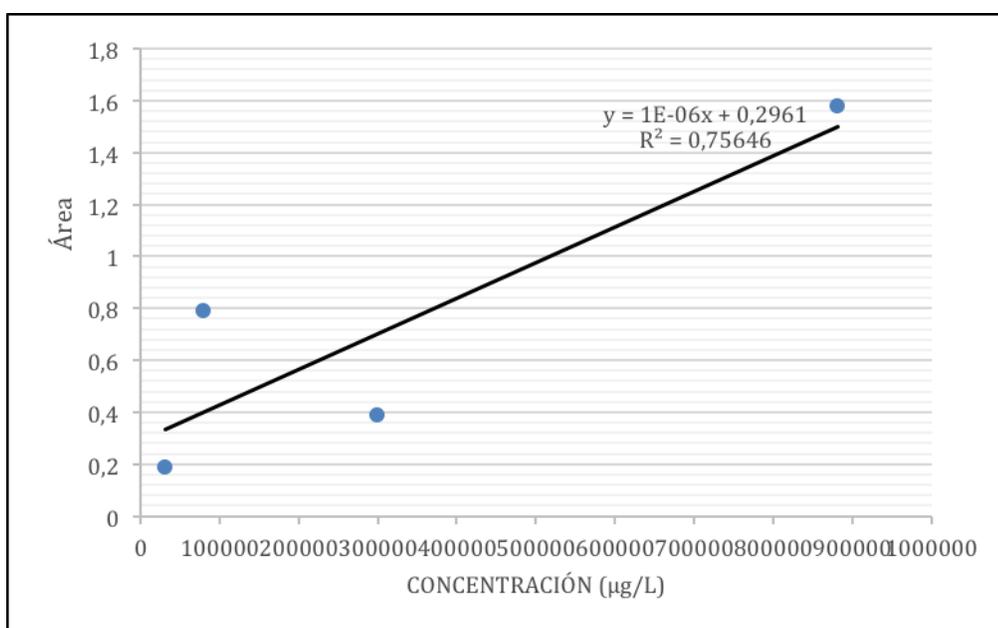
6. Criseno

Concentración (µg/L)	Error asociado	Area de la respuesta		PROMEDIO
		R1	R2	
1,68	0,01	214956	282585	248770,5
0,840	0,005	178466	127439	152952,5
0,420	0,003	77140	41236	59188
0,21	0,002	60734	81653	71193,5
0,105	0,001	78039	16030	47034,5
0,052	0,001	78738	32285	55511,5
0,0260	0,0005	7298		7298
0,00260	0,00005	3260		3260
0		6355,5		6355,5

Curva utilizada para el cálculo de LD y LC



7. Curva generada a partir de los datos de la primera calibración para el Antraceno. Estos datos fueron descartados debido a la evidente ausencia de linealidad de la tendencia.



APÉNDICE F

Datos obtenidos para el cálculo de recuperación en la muestra de agua de río

1. Resultados del Análisis de la muestra de agua de río

Compuesto	R1	R2	Promedio	S.D	CV
NAFTALENO	5553	3806	4679,5	1235,32	26,40
FLUORENO	2620	7163	4891,5	3212,39	65,67
FENANTRENO	16131	54119	35125	26861,57	76,47
ANTRACENO	8772	7272	8022	1060,66	13,22
PIRENO	34300	10560	22430	16786,71	74,84
CRISENO	41972	13934	27953	19825,86	70,93

2. Valores redondeados

Compuesto	Area	S.D
NAFTALENO	4680	1235
FLUORENO	4892	3212
FENANTRENO	35125	26861
ANTRACENO	8022	1061
PIRENO	22430	16787
CRISENO	27953	19826

3. Resultados del Análisis de la muestra de agua de río con patrones de 6 HAP

Compuesto	R1	R2	Promedio	S.D	CV
NAFTALENO	106904	126208	116556	13649,9893	11,71109965
FLUORENO	13876	14226	14051	247,4873734	1,761350604
FENANTRENO	62983	47119	55051	11217,54198	20,37663617
ANTRACENO	66728	42715	54721,5	16979,75514	31,02940368
PIRENO	171324	224534	197929	37625,15183	19,00941844
CRISENO	51240	93225	72232,5	29687,87821	41,10044399

4. Valores redondeados

Compuesto	Area	S.D
NAFTALENO	116556	13650
FLUORENO	14051	247
FENANTRENO	55051	11218
ANTRACENO	54722	16980
PIRENO	197929	37625
CRISENO	72233	29688

5. Corrección: diferencia entre el resultado de ambos análisis

muestra de agua de río			muestra de agua de río con patrones de 6 HAP				
Compuesto	Area	S.D	Compuesto	Area	S.D	Diferencia	Error asociado
NAFTALENO	4680	1235	NAFTALENO	116556	13650	111876,00	32299,50
FLUORENO	4892	3212	FLUORENO	14051	247	9159,00	6015,79
FENANTRENO	35125	26861	FENANTRENO	55051	11218	19926,00	15769,64
ANTRACENO	8022	1061	ANTRACENO	54722	16980	46700,00	15752,27
PIRENO	22430	16787	PIRENO	197929	37625	175499,00	135517,05
CRISENO	27953	19826	CRISENO	72233	29688	44280,00	36298,16

6. Cálculo de la concentración (con curvas de calibración)

Concentración calculada (µg/L)	Concentración redondeada (µg/L)
11,54777232	11,5
0,291885666	0,3

0,066292938	0,1
0,752724262	0,8
2,524668255	2,5
0,102885072	0,1

7. Valor de % de recuperación

Compuesto	% de recuperación calculado	% de recuperación. Valores redondeados
NAFTALENO	75,50886408	76
FLUORENO	45,38577912	45
FENANTRENO	26,88172043	27
ANTRACENO	30,88803089	31
PIRENO	31,09452736	31
CRISENO	5,18134715	5