

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**“EVALUACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ANÁLISIS DE HAP EN AGUAS  
NATURALES POR HPLC-FLUORESCENCIA”**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por el Br. Norielys Herrera, para optar al título de Licenciado en Química.

Caracas, Abril del 2018.

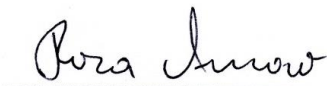
Yo Profesora Rosa Amaro, Investigador del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certifico que el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“EVALUACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ANÁLISIS DE HAP EN AGUAS NATURALES POR HPLC-FLUORESCENCIA”**

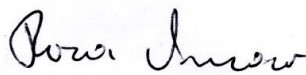
Que presenta el Br. Norielys José Mercedes Herrera Rivas, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio del Centro de Química Analítica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante el año 2017 y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Abril 2018.

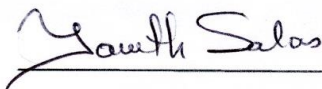


Dra. Rosa Amaro

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **“EVALUACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA EL ANÁLISIS DE HAP EN AGUAS NATURALES POR HPLC-FLUORESCENCIA”**. Presentado por el Br. Norielys José Mercedes Herrera Rivas, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Dra. Rosa Amaro (Tutor)



Profa. Janeth Salas (Jurado)



Prof. Rafael Golding (Jurado)

## RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se encuentran distribuidos en el ambiente producto de diferentes procesos industriales y combustión incompleta de la materia, algunos de los mismos son tóxicos y cancerígenos, por lo que la US EPA ha clasificado a 16 HAP como prioritarios para su control medioambiental y su determinación se hace prioritaria. Los HAP se caracterizan por presentar baja solubilidad en agua y a pesar de esto, ellos se encuentran en mayores concentraciones a las esperadas en lagos y ríos. Debido a este comportamiento se ha encontrado irregularidades en la distribución de los HAP en medios acuosos, por lo que la presente investigación planteo la evaluación del método analítico para el análisis de HAP en matrices acuosas mediante la técnica de HPLC con detección por fluorescencia.

Para la evaluación del comportamiento de las curvas de calibración (linealidad y sensibilidad) con y sin el agregado de solvente orgánico en la matriz acuosa, usando como solvente acetonitrilo, se prepararon patrones de Naftaleno, Acenafteno, Antraceno, Pireno y Criseno. Obteniendo mejoras en la estabilidad de los HAP con el agregado del acetonitrilo hasta el segundo día de análisis, con buena sensibilidad y linealidad, obteniendo  $r^2 > 0,9928$ .

Además se evaluaron 2 tipos de filtro (celulosa y nylon) con diferentes soportes: acero inoxidable y polipropileno, con y sin el agregado de acetonitrilo como solvente orgánico. Se obtuvo mayores recuperaciones para los filtros AP10 (celulosa) y Nylon. Observando para el AP10 recuperaciones mayores al 90% con coeficiente de variación (CV) menor al 5% para los HAP ligeros, mientras que para los pesados mayores al 72% con CV menor al 26%. En el caso de filtro de nylon presentó recuperaciones mayores al

87% para los HAP ligeros y mayores al 26% para los pesados con CV <8% y <9%, respectivamente. También se estudió el acondicionamiento por una hora y lavado del filtro de Nylon con acetonitrilo, presentando mejoras en los porcentajes de recuperación de los HAP por lo que se concluyó que es necesario el acondicionamiento del filtro.

Con un diseño de experimento del tipo factorial se determinó el comportamiento de la estabilidad de los HAP con respecto a las variables: tiempo, solvente, conservante y pH para muestras de agua de grifo y río, encontrando que para los HAP ligeros el factor importante es el tiempo de análisis, mientras que para los HAP pesados, incluyendo el antraceno, el factor determinante es el agregado de solvente orgánico en la matriz acuosa.

**Palabras claves:** Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), método analítico, HPLC, fluorescencia, aguas naturales.

### Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico primeramente a Dios, a mis padres y hermanas por el apoyo que me brindaron. A mi novio por la paciencia y apoyo durante la culminación de este camino.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme el conocimiento y la sabiduría de realizar este trabajo.

A mis padres y hermanas, quienes me han apoyado y ayudado a lo largo de toda mi vida, sin su ayuda mi carrera no hubiese sido posible.

A mi novio Naudi por su apoyo, fortaleza y su gran paciencia y por las noches de desvelo y compañías, muchas gracias.

A mi tutora Rosa Amaro por la dedicación, su amistad, paciencia, llamados de atención, consejos, apoyo y su inigualable confianza en la culminación de este trabajo.

A mis suegros que fueron mis segundos padres, por su gran apoyo y su cariño.

A mis tíos Arnaldo y Maigualida por recibirme como su hija, por su gran cariño y atención, por brindarme su hogar muchas gracias.

Al Centro de Química Analítica por completar mi formación profesional y por el apoyo en la realización experimental de este trabajo.

A la Universidad Central de Venezuela la casa que vence la sombra, por ser el pilar de mi formación como profesional y ciudadano.

A mi gran amiga Mariani Gutiérrez, compañera de vida, risas, ilusiones, tristeza, mucha felicidad y apoyo durante toda mi carrera, por soportar mis ocurrencias.

A mis amigas Omerlin, Zuleima y Yamileth por la ayuda que me brindaron.

## ÍNDICE

	Pág.
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP).....	4
2.2 Propiedades fisicoquímicas.....	5
2.3 Origen de los HAP.....	7
2.4 Toxicidad de los HAP.....	8
2.5 Comportamiento de los HAP en el agua.....	8
2.6 Técnicas de análisis de los HAPs.....	9
2.7 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....	11
2.8 Herramientas Estadísticas.....	22
2.8.1 Exactitud.....	22
2.8.2 Precisión.....	23
2.8.3 Linealidad.....	23
2.8.4 Diseño de experimento por análisis factorial.....	24
2.8.5 El uso de rectas de regresión para comparar métodos analíticos.....	26
III.- ANTECEDENTES.....	29
IV.- OBJETIVOS.....	37
4.1.- Generales.....	37
4.2.- Específicos.....	37
V.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	38
5.1 Materiales y Reactivos.....	38
5.2 Preparación de los patrones.....	39
5.3 Curva de Calibración.....	40
5.4 Análisis de HAP por HPLC-FL.....	41
5.5 Evaluación de los tipos de filtros.....	43
5.6 Recolección de muestras.....	45



5.7 Experimento factorial para el estudio del efecto matriz de las muestras de agua de grifo y de río.....	46
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	48
6.1 Estudio de condiciones de análisis de HAP por HPLC-FL.....	48
6.2 Estudio de la estabilidad de los HAP.....	51
6.3 Estudio de la estabilidad de los HAP con agregado de solvente orgánico.....	59
6.4 Estudio del efecto de los filtros.....	69
6.5 Estudio del efecto matriz de las muestras de agua.....	85
VII.- CONCLUSIONES.....	103
VIII.- RECOMENDACIONES.....	105
IV.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA.....	106
V.- APÉNDICE.....	112

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación y propiedades de los HAP.....	5
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas generales de los 16 HAP considerados como prioritarios por la USA EPA .....	6
Tabla 3. Fases estacionarias polares e inversas comunes.....	17
Tabla 4. Programación del gradiente de elución y de longitud de onda del detector.....	29
Tabla 5. Características instrumentales del equipo HPLC-FLD.....	39
Tabla 6. Concentraciones de las soluciones intermedias para cada HAP.....	40
Tabla 7. Concentraciones de las soluciones de la curva de calibración.....	41
Tabla 8. Condiciones experimentales para separación cromatográfica.....	42
Tabla 9. Longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ) de los HAP.....	42
Tabla 10. Tipos de filtros y sus características.....	44
Tabla 11. Factores y niveles del diseño experimental de agua de grifo.....	46
Tabla 12. Factores y niveles del diseño experimental de agua de río.....	46
Tabla 13. Diseño experimental empleado para las muestras de aguas.....	47
Tabla 14. Tiempos de retención de cada HAP en fase móvil 85/15 %v/v metanol/agua para el sistema HPLC-FLD.....	49
Tabla 15. Programación de la longitud de onda de excitación y emisión de 5 HAP.....	51
Tabla 16. Resultados de Áreas de pico obtenidas con el experimento 2 <sup>3</sup> para cada HAP en la matriz del agua de grifo.....	86
Tabla 17. Resultados de Áreas de pico obtenidas con el diseño de experimento 2 <sup>3</sup> para cada HAP en la matriz del agua de río.....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructuras de los 16 HAP .....	4
Figura 2. Esquema de un HPLC.....	12
Figura 3. Aplicaciones de la HPLC.....	14
Figura 4. Válvula de inyección usada en HPLC en posición de carga e inyección de la muestra.....	16
Figura 5. Celda del detector ultravioleta en HPLC.....	19
Figura 6. Esquema de un detector de fluorescencia.....	20
Figura 7. Longitud de onda de excitación y emisión de algunos fluoróforos.....	20
Figura 8. Matriz de experimentos para los diseños $2^2$ y $2^3$ .....	25
Figura 9. El uso de rectas de regresión para comparar dos métodos analíticos. (a) Concordancia ideal de ambos métodos, (b) a (f) ilustra los resultados de varios tipos de errores sistemáticos.....	27
Figura 10. Piezas del porta filtro de acero inoxidable.....	43
Figura 11. Descripción del filtro de jeringa de plástico.....	43
Figura 12. Esquema del proceso de lavado del filtro.....	45
Figura 13. Cromatograma obtenido para un patrón multicomponente de HAP en el sistema HPLC-FL.....	51
Figura 14. Diagrama de interacción tiempo-solvente para el acenafteno.....	89

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Curvas de calibración de los 5 HAP en el 1 <sup>er</sup> día de análisis.....	53
Gráfico 2. Curvas de calibración de los 5 HAP en el 2 <sup>do</sup> día de análisis.....	54
Gráfico 3. Curvas de calibración de los 5 HAP en el 3 <sup>er</sup> día de análisis.....	55
Gráfico 4. Curvas de calibración de los 5 HAP a la semana de preparación de patrones.....	56
Gráfico 5. Rectas de regresión para comparar los días 1 y 2 de preparación de patrones de HAP de bajo peso molecular en matriz acuosa.....	58
Gráfico 6. Rectas de regresión para comparar los días 1 y 2 de preparación de patrones de los HAP de alto peso molecular en matriz acuosa.....	59
Gráfico 7. Curvas de calibración de los 5 HAP con 10% de acetonitrilo en el 1 <sup>er</sup> día de análisis.....	61
Gráfico 8. Curvas de calibración de los 5 HAP con 10 % de acetonitrilo en el 2 <sup>do</sup> día de análisis. ....	62
Gráfico 9. Curvas de calibración de los 5 HAP con 10% de acetonitrilo en el 3 <sup>er</sup> día de análisis.....	63
Gráfico 10. Curvas de calibración de los 5 HAP con 10% de acetonitrilo análisis a 1 semana de preparación.....	64
Gráfico 11. Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del naftaleno con solvente orgánico.....	66
Gráfico 12. Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del acenafteno con solvente orgánico .....	66
Gráfico 13. Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del antraceno con solvente orgánico .....	67
Grafico 14. Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del pireno....	68
Gráfico 15. Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del Criseno....	68

Gráfico 16. Áreas de réplica del filtro AP10.....	72
Gráfico 17. Áreas de réplicas de la filtración con filtro AP10 con solución multipatrón con 10% de acetonitrilo.....	72
Gráfico 18. Comparación de los %recuperación de los HAP al 10% de acetonitrilo y sin solvente orgánico.....	73
Gráfico 19. Áreas de réplica del filtro Celulosa.....	74
Gráfico 20. Áreas de réplicas del filtro Celulosa con 10% de acetonitrilo.....	75
Gráfico 21. Comparación de los %recuperación de los HAP al 10% de acetonitrilo y sin solvente orgánico.....	76
Gráfico 22. Áreas de réplica del filtro celulosa sin solvente orgánico.....	77
Gráfico 23. Áreas de réplica del filtro de Celulosa con 10% de acetonitrilo.....	77
Gráfico 24. Comparación de los %recuperación de los HAP con 10% de acetonitrilo y sin solvente orgánico.....	78
Gráfico 25. Estudio del efecto del soporte del filtro de celulosa.....	79
Gráfico 26. Áreas de réplica del filtro Nylon.....	80
Gráfico 27. Áreas de réplica del filtro de Nylon con 10% de acetonitrilo.....	80
Gráfico 28. Comparación de los %recuperación de los HAP con 10% de acetonitrilo y sin solvente orgánico.....	81
Gráfico 29. Comparación de los %recuperación de los HAP sin solvente orgánico.	82
Gráfico 30. Comparación de los %recuperación de los HAP con 10% de acetonitrilo.....	83
Gráfico 31. %Recuperación de los HAP con 10% de acetonitrilo.....	84
Gráfico 32. Diagrama de Pareto estandarizada para el naftaleno.....	87
Gráfico 33. Gráfica de efectos principales para el naftaleno.....	88
Gráfico 34. Diagrama de Pareto estandarizada para el acenafteno.....	89
Gráfico 35. Gráfica de efectos principales para el acenafteno.....	90
Gráfico 36. Diagrama de Pareto estandarizada para el antraceno.....	91
Gráfico 37. Gráfica de efectos principales para el antraceno.....	92

Gráfico 38. Diagrama de Pareto estandarizada para el pireno.....	93
Gráfico 39. Gráfica de efectos principales para el pireno.....	93
Gráfico 40. Diagrama de Pareto estandarizada para el criseno.....	94
Gráfico 41. Gráfica de efectos principales para el criseno.....	94
Gráfico 42. Diagrama de Pareto estandarizada para el naftaleno.....	97
Gráfico 43. Gráfica de efectos principales para el naftaleno.....	97
Gráfico 44. Diagrama de Pareto estandarizada para el acenafteno.....	98
Gráfico 45. Gráfica de efectos principales para el acenafteno.....	99
Gráfico 46. Diagrama de Pareto estandarizada para el antraceno.....	100
Gráfico 47. Diagrama de Pareto estandarizada para el pireno.....	100
Gráfico 48. Diagrama de Pareto estandarizada para el Criseno.....	100
Gráfico 49. Gráfica de efectos principales para el antraceno.....	101
Gráfico 50. Gráfica de efectos principales para el pireno.....	101
Gráfico 51. Gráfica de efectos principales para el Criseno.....	101

## I. INTRODUCCIÓN

La sociedad actualmente presenta problemas de deterioro y contaminación de los recursos naturales, por ejemplo las sustancias químicas generadas por las actividades industriales, servicios domésticos, urbanos y agrícolas son los principales causantes de las variaciones en los ecosistemas <sup>[1]</sup>. De estos problemas, el primordial es la contaminación del agua por compuestos orgánicos, muchos de los cuales se conocen que son tóxicos, carcinógenos y mutagénicos, lo que ha causado considerables preocupaciones a nivel mundial <sup>[2,3]</sup>.

La formación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) está asociada a la combustión incompleta de la materia orgánica y se encuentran distribuidos en el medio ambiente, siendo inevitable la exposición humana a los mismos. La población puede estar expuesta a ellos a través de la contaminación de aire, ingestión de alimentos y aguas contaminadas <sup>[4]</sup>. Las propiedades fisicoquímicas de los HAP le confieren la capacidad de permanecer por largo tiempo en el ambiente y se ha demostrado que algunos HAP son cancerígenos, en particular el benzo(a)pireno <sup>[3,4]</sup>. Debido a los conocimientos actuales sobre la carcinogenicidad de este tipo de compuestos se ha visto la necesidad de un mayor control de la presencia de los distintos HAP. Actualmente existen regulaciones estrictas por entes como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (US EPA) y la Unión Europea, que han establecido 16 HAP como contaminantes prioritarios <sup>[4,5]</sup>.

Se han determinado y desarrollado numerosos métodos de análisis para monitorear los HAP en aguas <sup>[6-8]</sup>. En el caso correspondiente a los estudios en aguas destinadas al consumo humano se han aplicado diferentes métodos de pre-concentración de los HAP como extracción en fase sólida (SPE), micro-extracción en fase sólida (SPME) y extracción con sorción en barras magnéticas (SBSE).

La estabilidad de los HAP en solventes orgánicos está claramente definido en la literatura <sup>[8-10]</sup>, sin embargo, en matrices acuosas se ha observado pérdida de la señal de los HAP a los pocos días. Hay autores que han reportado la posibilidad de la absorción de los HAP en el material de vidrio del recipiente que los contiene y la necesidad del uso de pequeñas cantidades de solventes orgánicos para solventar este problema <sup>[11-13]</sup>.

En un estudio reciente <sup>[14]</sup> se determinó seis HAP en muestras de agua utilizando la técnica de SPME con detección por cromatografía de gases (CG). Los resultados obtenidos con respecto a las recuperaciones de los HAP fueron entre el 5-76 %, siendo estos valores muy bajos para la determinación de los mismos. En función a lo dicho anteriormente se desconoce si esta baja recuperación está asociada a la técnica de análisis por SPME o a una posible pérdida de los HAP en la matriz acuosa.

La cromatografía líquida de alta eficiencia cuyas siglas en inglés son HPLC con detector fluorescencia (FLD) es una de las técnicas ampliamente aplicadas para el análisis de muchas familias de compuestos orgánicos como HAP, pesticidas,



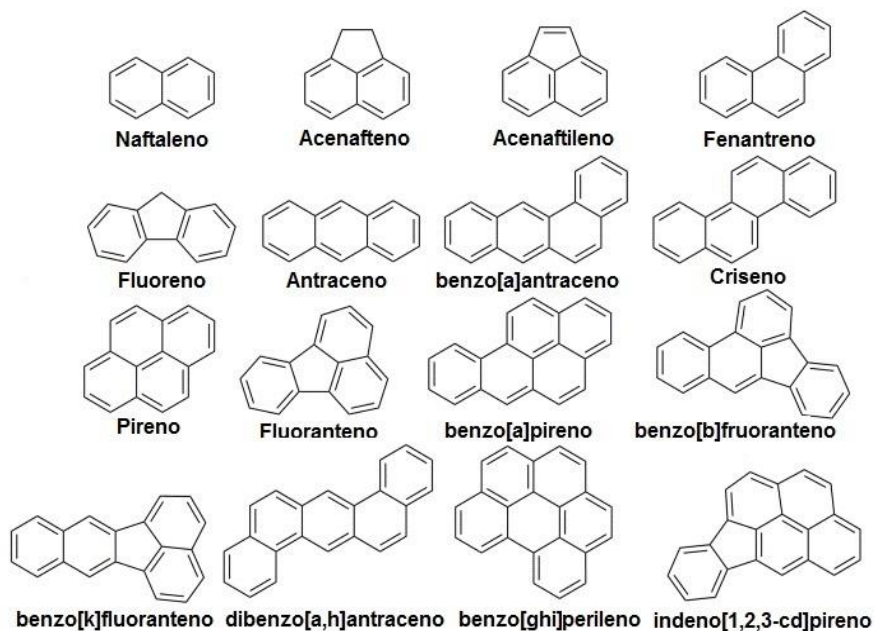
compuestos organoclorados, entre otros. El detector de fluorescencia proporciona una elevada sensibilidad y selectividad, siendo este 1000 veces más sensible que los detectores ultravioleta <sup>[15]</sup>.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, en este trabajo de investigación se planteó la evaluación del método analítico empleado para el análisis de los HAP en aguas naturales, estudiando la estabilidad o comportamiento de los mismos en medios acuosos. Para este análisis se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de fluorescencia como sistema de detección por su alta sensibilidad. Por otra parte se estudió el efecto del filtrado de muestras con y sin agregado de acetonitrilo como solvente orgánico. Finalmente se evaluó el efecto de diferentes variables empleando el diseño factorial 2<sup>n</sup> en muestras de aguas de grifo y de río.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP):

El término HAP engloba un amplio conjunto de compuestos orgánicos que consisten en moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados a través de dos o más átomos de carbono, la molécula resultante está compuesta solo de átomos de carbono e hidrógeno que se encuentra en un mismo plano, la figura 1 muestra los 16 HAP prioritarios de acuerdo a la US EPA. Sin embargo existen algunos HAP basados en estas estructuras, diferenciándose en que átomos de carbono pueden estar sustituidos por heteroátomos como nitrógeno, azufre y oxígeno, o que contienen grupos alquilo [2, 4, 5, 7, 14, 16, 17].



**Figura 1.** Estructuras de los 16 HAP considerados como prioritarios por la USA EPA [5].

La tabla 1 muestra como los HAP pueden clasificarse en dos grupos con propiedades y efectos diferentes <sup>[11]</sup>:

**Tabla 1:** Clasificación y propiedades de los HAP

HAP Bajo peso molecular	HAP alto peso molecular
Dos o tres anillos aromáticos	Cuatro o más anillos aromáticos
Menos hidrofóbicos *log Kow= 3 - 5	Fuertemente hidrofóbicos log Kow > 5,5
Alta toxicidad	Potencialmente mutagénicos y carcinogénicos

\*log Kow = coeficiente de reparto octanol-agua

Estos son identificados por su importancia medioambiental, todos ellos presentan carácter lipofílico, es por ello que son potencialmente bio-acumulados y concentrados en sedimentos o suelos; ya que mientras mayor sea su persistencia en cada medio genera un problema significativo.

## 2.2 Propiedades Físicoquímicas de los HAP

Estos son sólidos a temperatura ambiente, baja presión de vapor y su solubilidad en agua decrece al ir aumentando el peso molecular y el tamaño de la molécula, sin embargo su característica común es su poca solubilidad en agua, en la tabla 2 muestran las propiedades físico-químicas de los HAP, ya que son un factor importante para entender su comportamiento medioambiental. También absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico <sup>[18]</sup>.

**Tabla 2.** Propiedades fisicoquímicas generales de los 16 HAP considerados como prioritarios por la USA EPA <sup>[19]</sup>.

PAH	N° de A.	FM	PM (g/mol)	$P_{\text{vapor}}$ (Pa)	$S_{\text{agua}}$ (mg/L)	Log $K_{\text{ow}}$	$T_{\text{fus}}$ (°C)	$T_{\text{eb}}$ (°C)
Naftaleno	2	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub>	128,12	5,69	30	3,37	80	218
Acenaftileno	3	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	152,2	3,87	3,93	4,07	92	265
Acenafteno	3	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154,21	$5,96 \cdot 10^{-1}$	1,93	3,98	96	279
Fluoreno	3	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166,2	$4,27 \cdot 10^{-2}$	1,68-1,98	4,18	116	293
Fenantreno	3	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,2	$9,07 \cdot 10^{-2}$	1,20	4,45	101	340
Antraceno	3	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,2	$2,27 \cdot 10^{-3}$	0,076	4,45	216	340
Fluoranteno	4	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,26	$6,67 \cdot 10^{-4}$	0,20-0,26	4,90	111	--
Pireno	4	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,3	$3,33 \cdot 10^{-4}$	0,077	4,88	149	360
Benzo[a]antraceno	4	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,29	$2,93 \cdot 10^{-6}$	0,01	5,61	158	400
Criseno	4	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,3	$8,40 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	5,16	255	448
Benzo[k]fluoranteno	4	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,3	$8,79 \cdot 10^{-9}$	$7,8 \cdot 10^{-4}$	6,06	217	480
Benzo[b]fluoranteno	4	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,3	$6,67 \cdot 10^{-5}$	0,0012	6,04	167	---
Dibenzo[a,h]antraceno	4	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278,35	$1,33 \cdot 10^{-8}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	6,84	262	---
Benzo[a]pireno	5	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,3	$7,47 \cdot 10^{-7}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	6,06	179	496
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	6	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276,3	$1,33 \cdot 10^{-9}$	0,062	6,58	---	---
Benzo[g,h,i]perileno	6	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276,34	$1,37 \cdot 10^{-8}$	$2,86 \cdot 10^{-4}$	6,50	222	---

**N° de A.:** Número de Anillos; **FM:** fórmula molecular; **PM:** peso molecular;  **$P_{\text{vapor}}$ :** presión de vapor;  **$S_{\text{agua}}$ :** solubilidad en agua a 25°C;  **$T_{\text{fus}}$ :** temperatura de fusión;  **$T_{\text{eb}}$ :** temperatura de ebullición.

Su solubilidad en agua disminuye a medida que aumenta su peso molecular ya que los valores del coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{\text{ow}}$ ), de estos compuestos orgánicos lipofílico son altos, pero varían según la cantidad de anillos aromáticos y el patrón de enlace de los anillos. A pesar de su baja solubilidad en agua, los HAP están estrictamente regulados en la mayoría de los países debido a los riesgos potenciales para la salud, además su persistencia en el medio ambiente se debe a su carácter lipofílico, se puede acumular y concentrar en sedimentos <sup>[11, 19]</sup>.

Los sistemas conjugados de orbitales  $\pi$  de los HAP son los responsables de su estabilidad química confiriéndoles en su estructura de anillos aromáticos conjugados una particular resistencia a agentes químicos y otro tipo de ataques. La estabilidad de los HAP varía en función de la disposición de los anillos, los que están enlazados linealmente su estabilidad disminuye a medida que incrementa el número de anillos, ya que aumenta el carácter olefínico y el carácter aromático disminuye. Mientras que los HAP fusionados angularmente su estabilidad no disminuye al aumentar el número de anillos, no se ha demostrado que exista un límite máximo de anillos aromáticos fusionados <sup>[19, 20]</sup>.

### **2.3 Origen de los HAP.**

Son producidos de fuentes naturales por combustión a partir de incendios forestales, erupciones volcánicas o de forma antropogénicas por la combustión incompleta de los combustibles del petróleo, pirolisis de la materia orgánica y la biosíntesis directa originada por microbios y plantas, siendo liberados al medio ambiente. En general los HAP son producidos por combustión incompleta <sup>[19-22]</sup>. Sin embargo el naftaleno es de fabricación específica, ya que es empleado como insecticida, pero su producción está en descenso al ser actualmente sustituido por compuestos organoclorados <sup>[23,24]</sup>.

## 2.4 Toxicidad de los HAP

La característica que presentan estos compuestos sobre la salud es su alta toxicidad y capacidad para inducir la formación de cáncer y mutaciones en los organismos expuestos. Especialmente el benzo[a]antraceno tiene una fuerte actividad carcinogénica en animales y el benzo[a]pireno en humanos. No obstante, no existe evidencia para los otros HAP. Sin embargo, es importante señalar que se debe considerar que todos los HAP en general, son sospechosos de ser carcinogénicos en un grado u otro, aunque el nivel sea muy bajo. También la exposición a la luz ultravioleta puede incrementar la toxicidad de ciertos HAP ya que la luz induce a la formación de radicales libres, como consecuencia la alteración de las macromoléculas del organismo afectado <sup>[4, 19, 25]</sup>.

## 2.5 Comportamiento de los HAP en el agua

Los HAP son compuestos lipofílicos que debido a su naturaleza no polar y a su alto peso molecular presentan baja solubilidad en el agua. A pesar de sus propiedades se ha demostrado que su concentración en las aguas de río y potable es variable y a veces mucho mayor a lo esperado. Autores han atribuido este comportamiento a la matriz del agua, ya que dicha matriz está compuesta por una mezcla heterogénea de carbohidratos, ligninas, ácidos orgánicos y sustancias húmicas, todas estas se denominan Materia Orgánica Disuelta (DOM por sus siglas en inglés) <sup>[26, 27]</sup>, cabe destacar que las sustancias húmicas conforman entre el 50 y 80% de la DOM, lo cual aumenta la solubilidad de los HAP en la matriz acuosa <sup>[28]</sup>.

Además existe una relación directa entre las concentraciones de HAP en el agua de los ríos y el grado de industrialización o actividad humana en las adyacencias. Por otra parte el agua potable debe contener solamente de 1 a 10 ppt de cada HAP, siendo el límite máximo (sumatoria de todos los compuestos) 100 ppt <sup>[11, 12, 29, 30, 31]</sup>.

## **2.6 Técnicas de análisis de los HAPs**

En la literatura se pueden encontrar algunos métodos, específicos para el análisis de HAP en aguas, sin embargo son modificaciones del método 610 desarrollado por la US EPA <sup>[8]</sup>. La mayoría de ellos utilizan procedimientos tediosos que consumen mucho tiempo en el tratamiento de la muestra y que son propensos a la contaminación ambiental por la cantidad de solvente orgánico utilizado.

Las técnicas de micro-extracción en fase sólida (SPME) y extracción en fase sólida (SPE) se han aplicado para la extracción de estos contaminantes en las muestras de agua dado que son técnicas que pre-concentran los HAP, permitiendo determinaciones en los órdenes de los ppb.

### **2.6.1 Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction SPE)**

Es un método de tratamiento de muestras cuya finalidad principal es concentrar y purificar los analitos de una solución mediante adsorción en un sólido adsorbente. En general consiste en pasar toda la muestra por una columna, un cartucho, un tubo o un disco que contenga el adsorbente permitiendo retener los analitos; luego estos analitos

retenidos son eluidos con un solvente apropiado (generalmente orgánico) obteniendo un extracto concentrado de los analitos de interés. Durante la extracción se elimina gran parte de la matriz de la muestra y se simplifica de esta manera el análisis <sup>[31]</sup>.

Las primeras aplicaciones experimentales de la extracción en fase sólida (SPE) se iniciaron hace 70 años, sin embargo a mediados de 1970 fue cuando tomó gran auge como método alternativo a la extracción líquido-líquido (LLE) para la preparación de muestras <sup>[33]</sup>. Una de las ventajas de esta técnica de extracción es que es posible automatizarla e incluso acoplarla a sistemas de cromatografía líquida, no obstante en el caso del acoplamiento directo a cromatógrafo de gases es más complejo, ya que es necesario eliminar cualquier rastro de agua si se utiliza detectores de masas.

### **2.6.2 Microextracción en Fase Sólida (Solid Phase Micoextraction SPME)**

La microextracción en fase solida (SPME por sus siglas en inglés) fue desarrollada en 1990 por Pawliszyn para el análisis de compuestos orgánicos volátiles, es una técnica de pre-tratamiento de muestras muy utilizada actualmente, tanto que se ha convertido en la técnica rutinaria en muchos laboratorios. La innovación de la SPME ha jugado un papel importante en el análisis medioambiental <sup>[33]</sup>.

Esta técnica consiste en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante el uso de una fibra de sílice fundida que está recubierta de una fina película (de 10 a 100  $\mu\text{m}$ ) de un líquido no volátil, semejante a las fases estacionarias empleadas en cromatografía de gases, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o uso de disolvente orgánico. La SPME se puede aplicar al



análisis de matrices líquidas y gaseosas, los analitos se pueden extraer por inmersión directa (DI) en el líquido o mediante el análisis del espacio de cabeza (HS, Headspace), durante un tiempo, con agitación y calentamiento de ser necesario. Una vez tomada la muestra, se repliega la fibra y se introduce la aguja dentro de un cromatógrafo de gases. Se saca la misma dentro de la guía caliente del inyector, en el interior del inyector el analito se desorbe térmicamente de la fibra y estos se introducen sin división de flujo a la columna.

Una ventaja de su pequeño tamaño y su geometría cilíndrica es que permite ser incorporada en una jeringa, de esta manera facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la misma cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa.

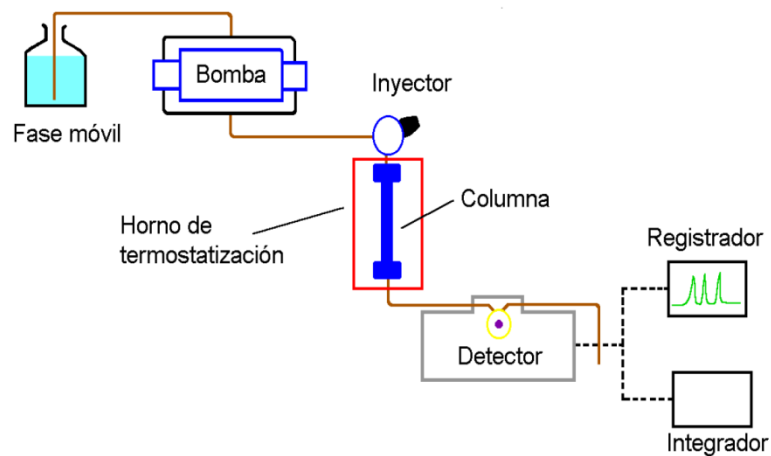
En la etapa de análisis de contaminantes orgánicos fundamentalmente se emplean técnicas cromatográficas como la cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta eficiencia, esta última será discutida en detalle a continuación.

## **2.7 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).**

La cromatografía es fundamentalmente una técnica de separación basada en las diferencias de distribución de la concentración de los analitos de interés entre dos fases, las causas de las desigualdad en la distribución se debe a las diferencias de afinidad de los analitos por ambas fases producto de interacciones de orden fisicoquímico.

La mayoría de los compuestos no son volátiles por lo que la aplicación de la cromatografía de gases es limitada, es por ello que la cromatografía de líquido toma gran importancia. La cromatografía de líquido de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) se caracteriza por precisar elevadas presiones, aproximadamente 7-40MPa (70-400 bar) caudales de 0,5 a 5 mL/min, esto debido a que las columna contienen partículas muy finas, lo que permite la separación con gran resolución <sup>[31, 34]</sup>.

La instrumentación del HPLC consta de un suministro de disolvente (bomba y dispositivo de mezclado de eluentes), una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión (tamaño de partícula de 3-10  $\mu\text{m}$ ), un detector y un ordenador que controle el equipo y se visualizan los resultados. En la figura 2 se aprecia los componentes básicos del equipo HPLC <sup>[34]</sup>.



**Figura 2.** Esquema de un HPLC.

Además de los dispositivos anteriormente mencionados se pueden incorporar en el sistema otros que pueden simplificar el trabajo o bien mejorar algún aspecto concreto de la técnica como:

- Inyectores automáticos
- Colectores de fracciones
- Hornos termostatizados para las columnas

Actualmente la incorporación de un horno que controle la temperatura de la columna mejora aún más la resolución y el tiempo de análisis, ya que al calentar la columna disminuye la viscosidad del disolvente reduciéndose así la presión requerida y permitiendo un mayor caudal. Al aumentar la temperatura disminuyen los tiempos de retención ( $T_R$ ) y mejora la resolución porque aumenta la velocidad de difusión de los solutos, se ha encontrado para la determinación de HAP utilizando un horno con temperatura de 30°C una mejora en los resultados para la separación de los HAP con mayores problemas de resolución <sup>[35]</sup>.

La HPLC es actualmente una de las técnicas más ampliamente utilizada, ya que es sensible, de fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas, su capacidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo por su gran aplicabilidad a sustancias que son de interés industrial, entre algunas aplicaciones están el análisis de: aminoácidos, fármacos, terpenoides, especies organometálicas, entre otros. La figura 3 exhibe la clasificación de la HPLC según el tipo de interacciones del analito con la fase estacionaria siendo: reparto, adsorción o líquido-sólido, iónica y exclusión por tamaño <sup>[34]</sup>.

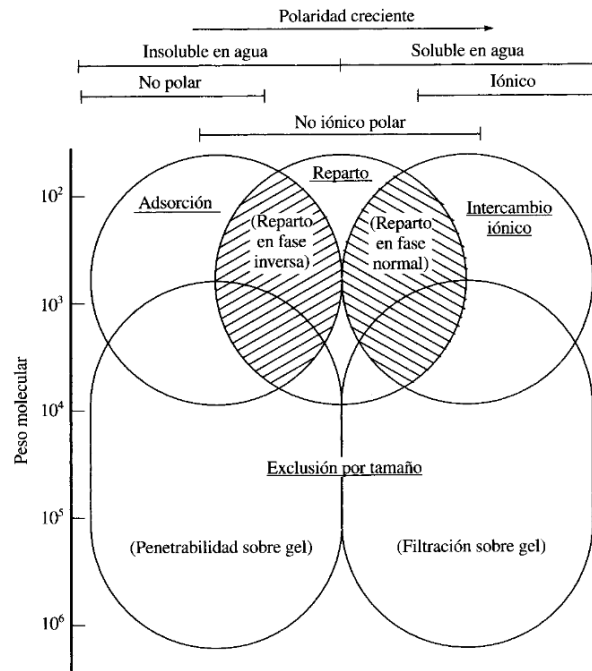


Figura 3. Aplicaciones de la HPLC [34].

**2.7.1 Cromatografía de Reparto:** Se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, siendo esta última unida químicamente a un soporte sólido. Esta fase estacionaria se clasifica en fase reversa y fase normal [31,34].

- **Cromatografía de fase normal:** emplea fases estacionarias polares y la móvil es poco polar.
- **Cromatografía de fase reversa:** La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar (cadenas hidrocarbonadas o grupos fenilo) y las interacciones que se producen no están claramente establecidos (efecto solvóforo).

### 2.7.2 Dispositivo de suministro:

En HPLC los requisitos para el sistema de bombeo son rigurosos, puesto que la reproducibilidad de los tiempos de retención depende de la bomba. El objetivo del sistema de bombeo es suministrar un caudal constante y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna, sin que el flujo sea influido por la presión en cabeza de columna, ya que esta puede variar por obstrucción de las líneas de conducción del filtro de la cabeza de la columna <sup>[31,34]</sup>.

Un sistema de bombeo ideal debe cumplir:

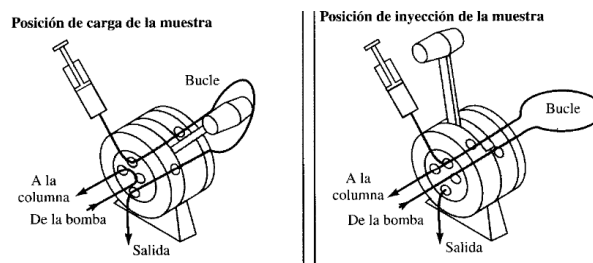
- ✓ Ser capaz de trabajar a presiones elevadas >6000 psi.
- ✓ Suministrar un flujo libre de pulsaciones o incluir un amortiguador, ya que las pulsaciones pueden contribuir al ruido de fondo del detector.
- ✓ Estar construido con materiales químicamente inertes frente a la fase móvil, resistentes a la corrosión.
- ✓ Suministrar flujos adecuados para los diferentes tipos de columnas. El intervalo de caudales varía desde los 0,1 hasta 10 mL/min.
- ✓ El control y la reproducibilidad del caudal debe ser mejor del 0,5% relativo, debe ser constante a lo largo del tiempo para que los tiempo de retención sean reproducibles.

La fase móvil puede trabajarse en dos modalidades: isocrática o en gradiente. La elución **isocrática** se lleva a cabo con un único disolvente o una mezcla de disolvente de composición fija. Mientras que la elución **en gradiente** se basa en cambios continuos de la composición del eluyente en sentido creciente de la fuerza del eluyente.

### 2.7.3 Sistema de inyección:

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un periodo de tiempo corto, para perturbar lo menos posible el régimen de circulación de fase móvil establecido en la columna y el detector; esto significa que el factor limitante en la precisión es la reproducibilidad del sistema de introducción de la muestra en la columna, ya que se generan ensanchamientos en la banda por lo que los volúmenes empleados han de ser pequeños (unos pocos microlitros). En HPLC el sistema más utilizado son las válvulas rotatorias de alta presión de varias vías manuales o automatizadas. Estas válvulas poseen dos posiciones: carga y de inyección como se muestra en la figura 4. En la posición de carga, la bomba y la columna están comunicadas y la muestra se introduce a presión atmosférica con ayuda de una jeringa en un pequeño depósito de forma tubular (bucle). El bucle puede escogerse de diferente volumen (5-500  $\mu\text{L}$ ). Al rotar la válvula, esta entra en posición de inyección y la muestra es arrastrada por el flujo de la fase móvil e introducida en la columna <sup>[31,34]</sup>.

Es importante destacar que se debe filtrar las muestras a través de un filtro de 0,45-0,5  $\mu\text{m}$  antes de inyectarla, para que no se contamine la columna con partículas y así no se obstruyan los conductos y no se dañe la bomba <sup>[31]</sup>.



**Figura 4.** Válvula de inyección usada en HPLC en posición de carga e inyección de la muestra <sup>[34]</sup>.

### 2.7.4 Columna:

Las columnas son tubos rectos de acero que miden por lo general entre 5-30cm de longitud y un diámetro interno entre 1-5 mm. La fase estacionaria se mantiene entre dos discos porosos situados en los extremos de la columna, generalmente filtro de titanio poroso.

El soporte más común son partículas microporosas esféricas entre 3-10  $\mu\text{m}$  de sílice muy pura que son permeables al disolvente y que tienen una superficie de 150-300  $\text{m}^2/\text{g}$ . esta puede utilizarse como fase estacionaria de cromatografía de adsorción, también en la cromatografía de reparto liquido-liquido, que se lleva a cabo con fase estacionaria enlazada covalentemente a la sílice, las fases comunes no polares (fase inversa) y polares se muestra en la siguiente tabla 3. La fase estacionaria de octadecilo ( $\text{C}_{18}$ ) es la más empleada en HPLC. Se denomina con frecuencia como ODS, octadecilsilano <sup>[31,34]</sup>.

**Tabla 3.** Fases estacionarias polares e inversas comunes <sup>[31]</sup>.

Fases polares		Fases inversa	
$\text{R} = (\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	Amino	$\text{R} = (\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$	Octadecil
$\text{R} = (\text{CH}_2)_3\text{CN}$	Ciano	$\text{R} = (\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	Octil
$\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{O CH}_2 \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	Diol	$\text{R} = (\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_6$	Fenil

Estas columnas suelen ser muy costosas y se degradan por las partículas de las muestras, es por ello que es necesario colocar en la entrada de la columna una

precolumna, estas son cortas y deben contener la misma fase estacionaria de la columna analítica.

### **2.7.5 Detectores:**

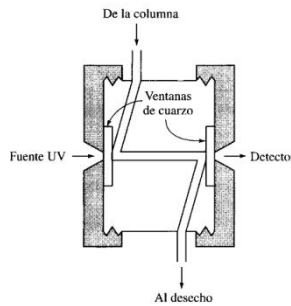
Un detector ideal debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal, poco ruido de fondo y debe tener un volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de los picos cromatográficos. Este no debe ser sensible a variaciones de temperatura y de la composición del disolvente. Algunos detectores más usados en HPLC son el detector UV-visible siendo utilizado en un 71% de los análisis y fluorescencia con 15% <sup>[34]</sup>.

- **Detector UV-visible:**

Estos detectores utilizan una celda de flujo en forma de Z como se muestra en la figura 5, a fin de aumentar el camino óptico y minimizar el ensanchamiento de la banda, los volúmenes de las cubetas son entre 1-10  $\mu\text{L}$  y la longitud es de 2 a 10 mm. Cuando se hace pasar una radiación electromagnética a través de compuestos que presentan determinados grupos funcionales, estos experimentan una excitación electrónica a causa de la absorción de energía (una longitud de onda que será específica para cada grupo funcional); esta energía provoca el paso de un electrón desde el estado fundamental hasta un nivel de energía superior. La absorción de energía se traduce en la disminución de la intensidad del haz luminoso que se ha hecho pasar a través de la muestra, pudiéndose medir esta disminución de intensidad en una fotocélula. En los



detectores de absorción ultravioleta, la línea de base representa la máxima transmisión de luz y cualquier desviación de ella indicara pérdida o absorción de radiación [31,34].



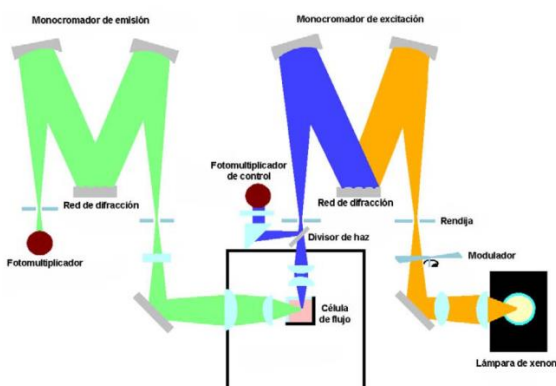
**Figura 5.** Celda del detector ultravioleta en HPLC [34].

La mayoría de los compuestos orgánicos pueden analizarse por cromatografía líquida utilizando detectores de UV-visible. Se considera que el 65% de las muestras analizadas por HPLC presentan alguna absorción en la zona de 254 nm (donde absorben una gran cantidad de compuestos orgánicos) y más del 90% absorben en algún punto del espectro que cubren los más sofisticados detectores de longitud de onda variable. Su sencillez de manejo hace que el detector de UV sea el más útil y ampliamente utilizado de los detectores de HPLC.

- **Detectores de Fluorescencia**

El fenómeno de fluorescencia tiene lugar cuando compuestos que poseen determinados grupos funcionales, se excitan con una radiación (a ciertas longitudes de ondas) y emiten radiación de mayor longitud de onda que la absorbida. La radiación emitida se mide en dirección perpendicular a la incidencia del haz de excitación con el

objetivo de evitar interferencias. En la figura 6 se representa el esquema óptico de un detector típico de fluorescencia para cromatografía líquida. Los diversos detectores accesibles comercialmente difieren fundamentalmente en la forma de controlar las longitudes de onda de excitación y emisión [34, 36, 37].



**Figura 6.** Esquema de un detector de fluorescencia.

La posibilidad de detectar por fluorescencia grupos químicos específicos es función de las longitudes de onda seleccionadas, tanto la de excitación como la de emisión. La figura 7 muestra algunos compuestos que presentan fluorescencia natural denominados fluoróforos.

COMPUESTO	LONGITUD DE ONDA	LONGITUD DE ONDA
	(nm)	(nm)
	EXCITACIÓN	EMISIÓN
Benceno	270	310
Tolueno	270	320
Clorobenceno	275	345
Fenol	285	365
Anilina	210	405
Acido benzoico	310	390
Benzonitrilo	280	360

**Figura 7.** Longitud de onda de excitación y emisión de algunos fluoróforos.

La estructura juega un papel importante, ya que la fluorescencia más intensa y útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia. Por ejemplo la mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación.

Para aumentar la utilidad de estos detectores, los compuestos no fluoróforos pueden convertirse en fluorescente por medio de una derivatización simple, enlazando covalentemente al analito grupos fluorescentes como el cloruro de dansilo y se puede llevar a cabo en la muestra antes de hacer la cromatografía o añadiendo los reactivos al eluato entre la columna y el detector denominado derivatización postcolumna.

Este detector presenta una alta sensibilidad, siendo 1000 veces más sensible que el detector UV <sup>[31]</sup>, además de ser específico lo cual se utiliza ventajosamente para la determinación de especies con fluorescencia en muestras complejas. Una de las ventajas potenciales de la detección por fluorescencia, utilizando instrumentación que permita efectuar tanto barridos de excitación como de emisión, es la posibilidad de proporcionar datos para la identificación de los picos a través de sus espectros de excitación y emisión usando técnicas de registro con paro de flujo.

La HPLC con detección ultravioleta proporciona cierta selectividad, aunque carece de sensibilidad. En contraste, la detección por fluorescencia molecular proporciona elevada selectividad y sensibilidad para compuestos como los HAP, generalmente sin la necesidad de llevar a cabo etapas preliminares de purificación de la muestra. Los

detectores de fluorescencia representan el tercer tipo de detector más utilizado para el análisis en la moderna cromatografía líquida <sup>[15]</sup>.

## **2.8 Herramientas estadísticas.**

### **2.8.1 Exactitud**

La exactitud de un procedimiento analítico está definida por la Organización Internacional de Estándares (ISO) como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado <sup>[38]</sup>, es decir la proximidad entre los resultados obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. Puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida, como un Estándar de Referencia, o comparando los resultados del procedimiento con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza.

En nuestro caso se utilizó como estándar de referencia una solución patrón sin pasar por el proceso experimental que afecta su rendimiento como por ejemplo tiempo

de preparación y uso de filtro. La EPA indica que se considera valores aceptables de exactitud los que se encuentran entre los rangos de 80 a 120 % <sup>[39]</sup>.

### **2.8.2 Precisión**

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea, es decir es una medida de la reproducibilidad de un resultado <sup>[31]</sup> y habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.

En nuestro caso se determinó con la realización de tres réplicas de cada estudio. La EPA indica que se considera valores aceptables de precisión en análisis cromatográficos cuando se obtienen RSD menores al 20% <sup>[39]</sup>.

### **2.8.3 Linealidad**

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado. En esta sección, la “linealidad” se refiere a la relación entre la concentración y la medida de valoración.

Para el estudio de la linealidad la EPA recomienda preparar soluciones de estándar de al menos 5 niveles de concentración de esta manera poder evaluar estadísticamente el comportamiento lineal del sistema.

En este trabajo la regresión lineal fue calculada para cada analito y sus respectivas curvas de calibración fueron construidas trazando el área de la señal cromatográfica en función de la concentración del analito correspondiente. Los datos detallados son exhibidos en el apéndice C. Se establece que las curvas tienen una tendencia lineal cuando los coeficientes de regresión generan valores de  $r \geq 0,999$ ; que corresponden a  $r^2 > 0,998$ .

#### **2.8.4 Diseño de experimento por análisis factorial**

El diseño factorial consiste en establecer cómo influye los variables o factores en un proceso sobre la respuesta del sistema, el diseño factorial  $2^k$  es la estrategia experimental más empleada para establecer efectos de diferentes variables e importante porque proporciona la información buscada con el menor número de experimentos, permitiendo optimizar procesos.

En un diseño factorial los efectos de un número de variables (factores) experimentales son investigados simultáneamente. Las experiencias consisten en todas las posibles combinaciones de los niveles de los diferentes factores. Entendiéndose por niveles los valores que toman las diferentes variables, con un valor mínimo y máximo; asignándole la notación – y + al nivel inferior y superior, respectivamente. El número de unidades experimentales requeridas es el producto del número de niveles por cada

factor por el número de réplicas. En la siguiente figura se muestra la matriz para un estudio  $2^2$  y  $2^3$ , la matriz corresponde a la  $2^k$  filas y k columnas correspondientes a los factores en estudio. El uso de este tipo de diseño requiere un análisis aleatorio <sup>[40,41]</sup>.

	<u>x<sub>1</sub></u>	<u>x<sub>2</sub></u>
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

	<u>x<sub>1</sub></u>	<u>x<sub>2</sub></u>	<u>x<sub>3</sub></u>
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

**Figura 8.** Matriz de experimentos para los diseños  $2^2$  y  $2^3$ .

Este diseño es altamente eficiente a causa de que todas las observaciones dan información sobre todos los factores en el experimento. Además permite determinar si existen interacciones entre factores, evitando así conclusiones erróneas. Este tipo de diseño no puede ser utilizado cuando las unidades experimentales son heterogéneas, es decir cuando existe una variable externa que no puede ser controlada.

En este estudio se empleó el diseño de análisis factorial como una herramienta para determinar los factores que afectaban significativamente la estabilidad de los HAP en muestras de agua de río y de grifo.

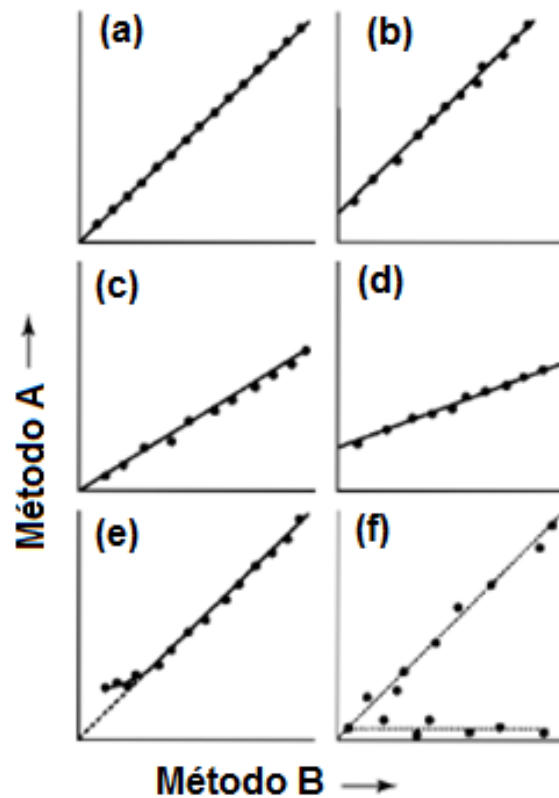
### 2.8.5 El uso de rectas de regresión para comparar métodos analíticos.

Cuando se comparan dos métodos a diferentes concentraciones de analito, se adopta normalmente el procedimiento que ilustra la figura 9. Uno de los ejes de la gráfica de regresión se utiliza para los resultados obtenidos por el nuevo método y el otro para los que se obtienen aplicando el de comparación o referencia a las mismas muestras. (La importancia de asignar un eje a cada método se analiza posteriormente.) Así cada punto de la gráfica representa una única muestra analizada por dos métodos separados. Se calcula la pendiente ( $b$ ), la ordenada en el origen ( $a$ ) y el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de la recta de regresión. Para el caso ideal, si cada muestra conduce a un resultado idéntico con ambos métodos analíticos la recta de regresión tendrá una ordenada en el origen de cero (0) y una pendiente y un coeficiente de correlación de uno (1). En la práctica, esto ocurre muy poco, incluso cuando los errores sistemáticos están completamente ausentes, ya que los errores aleatorios aseguran que los dos procedimientos analíticos no proporcionen resultados que concuerden exactamente en todas la muestras.

Pueden ocurrir desviaciones de la situación "ideal" ( $a = 0$ ,  $b = r = 1$ ) en una serie de circunstancias diferentes. Primero, es posible que la recta de regresión tenga una pendiente de uno (1) pero no una ordenada en el origen de cero (0); es decir que un método de análisis puede producir un resultado más alto o más bajo que el otro en una cantidad fija. Tal error podría ocurrir si se calculó erróneamente la señal de fondo de uno de los métodos (véase la Fig. 9 b). Una segunda posibilidad es que la pendiente de la recta de regresión sea  $>1$  o  $<1$ , lo que indica que puede darse un error sistemático en la pendiente de una de las gráficas de calibración individuales (Fig. 9 c). Desde luego, estos dos errores pueden ocurrir simultáneamente (Fig. 9 d). Otros tipos posibles de error sistemático se manifiestan si la representación gráfica es una curva (Fig. 9 e).



Problemas de especiación pueden proporcionar resultados diferentes (Fig. 9 f), este tipo de representación gráfica se debe a si un analito se encuentra en dos formas químicas distintas, en proporciones que van de una muestra a otra. Uno de los métodos (representado en el eje y) podría solo detectar sólo una forma del analito, mientras que el segundo detectaría ambas formas <sup>[38]</sup>.



**Figura 9.** El uso de rectas de regresión para comparar dos métodos analíticos. (a) Concordancia ideal de ambos métodos, (b) a (f) ilustra los resultados de varios tipos de errores sistemáticos.

Cuando se presenta el segundo caso, con frecuencia se realiza una prueba para contrastar una ordenada en el origen significativamente diferente de cero y una

pendiente significativamente diferente de 1. Tales pruebas se realizan determinando los límites de confianza para  $a$  y  $b$ , generalmente al 95% de nivel de significación. De este modo, se calcula el error de la pendiente y la ordenada de la recta de regresión, es más útil realizarlo utilizando un programa de computador sencillo. Con estos resultados se desprende que la pendiente y ordenada en el origen calculadas no difieren en forma significativa de los valores "ideales" de 1 y 0 respectivamente y por lo tanto no existen diferencias sistemáticas entre las dos series de resultados.

En este estudio se aplicó este método para contrastar la diferencia o no entre los resultados, es decir realizar una comparación que evidencie la diferencia o no entre los resultados de las curvas de calibración del primer día de análisis con respecto a los demás días.

### III. ANTECEDENTES

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) están presentes en el medio ambiente y debido a su alta toxicidad, su estudio es de gran interés. Diferentes autores [9, 16, 42, 43] han reportado la presencia de los HAP en suelos, aguas, alimentos y suspendidos en el aire, en alguno de estos estudios se ha utilizado la técnica de HPLC con detector fluorescencia para su detección a continuación serán expuesto trabajos relacionados al tema de investigación de interés:

#### 3.1 Determinación de HAP en suelos y alimentos mediante HPLC/FLD.

- Ishizaki y colaboradores, en el 2010 determinaron 15 HAP en muestras de alimentos por micro-extracción en fase sólida acoplada a un HPLC con detector de fluorescencia, utilizaron una columna C<sub>18</sub> para HAP de 100 mm de longitud y 2,1 mm de diámetro interno con tamaño de partícula 3,5 µm, fase móvil agua/acetonitrilo con programación de gradiente de elución y de longitud de onda en el detector como se muestra en la tabla 3 con un flujo de 0,4 mL/min.

**Tabla 4.** Programación del gradiente de elución y de longitud de onda del detector.

Tiempo (min)	Fase móvil H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN	Longitud de onda de $\lambda$ (nm)	
		Excitación	Emisión
0,0	45/55	215	330
4,5		220	325
5,5		250	380
7,1		270	450
7,5	0/100	270	390
10,0		260	420
11,7		290	415
13,0	45/55	250	500
15,0		215	300

En dicho análisis obtuvieron curvas de calibración que presentaron  $r^2$  entre (0,9972-0,9998) y desviación estándar relativa (RSD) menor al 8%, además detectaron HAP de bajo peso molecular como naftaleno y pireno en muchos alimentos como arroz y pan. El benzo[a]pireno el cual es carcinógeno se detectó en algunas muestras de té negro en concentraciones relativamente altas <sup>[9]</sup>.

- Yujian Huang y colaboradores, en el 2013 desarrollaron un método para la determinación de bajos niveles de 16 HAP en suelo, utilizando como técnica HPLC con detección por fluorescencia, con un horno de columna modelo CTO-20A de 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno combinada con una pre-columna de 10 mm de longitud y 3 mm de diámetro interno a temperatura constante de 31 °C, fase móvil acetonitrilo/agua con gradiente de elución y programación de longitud de onda en el detector. Los resultados muestran buena linealidad con  $r^2 > 0,9994$  con RSD menor al 3% y fueron identificados 16 HAP con buenas recuperaciones entre 61 y 96%, excepto el naftaleno cuya recuperación fue menor al 40% <sup>[16]</sup>.

### **3.2 Determinación de HAP en agua.**

- Hong-Wen Chen en el 2004 determinó cinco hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en muestras de aguas del Lago Cheng Ching en la ciudad de Kaoshiung al sur de Taiwán fuente importante de agua potable cerca de la zona petroquímica, treinta muestras de agua fueron colectadas en frasco de vidrio ámbar con sus respectivas tapas revestidas de teflón, los frascos previamente lavados fueron curados con acetonitrilo y hexano, luego alícuotas de la muestras

se filtraron a través de un filtro de membrana a vacío y finalmente se refrigeraron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Los HAP se pre-concentraron mediante micro-extracción en fase sólida (SPME) usando fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) a pH 6, temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$ , 900 rpm y 35 min de duración. Para su determinación utilizaron un HPLC acoplado con detector de fluorescencia, columna analítica C18 de dimensiones 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, gradiente de elución con acetonitrilo/cloroacetato de sodio 0,01 M (80:20), flujo de 1,0 mL/min. Los resultados mostraron buenos coeficientes de correlación  $r^2 > 0,9998$ , límites de detección bajos en el rango de 2-6 ppt los cuales son comparables con los reportados por el Método 8270 de la EPA. En la extracción se obtuvo recuperaciones cerca del 88% de los HAP y la concentración total de los HAP fue de (3,01- 4,48) ppb <sup>[44]</sup>.

- Dionex Corporation en el 2009 presentó el método 191 para determinar HAP en agua de grifo de Shanghai en China utilizando extracción en fase sólida acoplado a un HPLC con detector UV y FL con programación de longitud de onda, una columna C<sub>18</sub> para HAP con dimensiones de 250 x 4,6 mm de diámetro interno, una columna de SPE en línea con partículas de 3  $\mu\text{m}$  y dimensiones de 50 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, gradiente de elución con acetonitrilo/agua, volumen de inyección de 2,0 ml en la columna SPE, temperatura a  $20^{\circ}\text{C}$ , flujo variable entre 0,5 y 1,0 mL/min. Los resultados mostraron la presencia de naftaleno en la muestra de agua corriente, sin embargo estaba por debajo del límite de cuantificación calculado de 1,17 ppb para el naftaleno <sup>[45]</sup>.
  
- Jianwang Li y colaboradores, en el 2010 determinaron 15 HAP prioritarios en agua del río Aojiang, las muestras fueron colectadas a 5 cm de la superficie del

agua con frascos de vidrio ámbar de 2 L, se filtraron en fibra de vidrio de 0,7  $\mu\text{m}$  para eliminar las partículas, luego añadieron metanol al 5 % en las muestras de agua (500 mL). Para extraer los HAP del agua utilizaron un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) previamente acondicionada con 5 mL de metanol y secada al vacío por 10-15 s y fue lavado con 6 mL de agua ultra pura. Los HAP se desorbieron con 10 mL de hexano/diclorometano (1:1, v:v) después de la centrifugación. Las muestras fueron analizadas mediante HPLC con detector de fluorescencia utilizando una columna de fase inversa  $\text{C}_{18}$  de dimensiones 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, el volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ , temperatura de la columna de 40  $^{\circ}\text{C}$ , elución isocrático con metanol/agua (75:25 %v/v) y flujo de 0,8 ml/min. De los 15 HAP solo detectaron 12 en las muestras de agua, indicaron que la ausencia de dibenzo[a,h]antraceno, benzo[ghi]pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno en muestras de agua puede deberse a su baja solubilidad en la misma y su propensión a absorberse irreversiblemente sobre el sedimento. La concentración total de HAP osciló entre 910-1520 ppt y las recuperaciones fueron entre 64 y 104% <sup>[22]</sup>.

- Jorge Santana y colaboradores en el 2012 determinaron hidrocarburos aromáticos policíclicos de bajo peso molecular en aguas superficiales del río Almendares en La Habana se realizó mediante la combinación de métodos de extracción solido-líquido, líquido-líquido y la técnica HPLC. Las muestras fueron colectadas en dos frascos de vidrio ámbar de 1 L, limpios, que se mantuvieron previamente a 400  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 h en mufla. A cada frascos se le añadieron 1 mL de HCl concentrado y una vez colectadas las muestras, le añadieron 10 mL de acetonitrilo y 100mg de metabisulfito de sodio. Luego fueron conservadas a 4  $^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis y fue realizado antes de las 48 horas. Se pre-concentraron con un cartucho C-18, previamente activado. Los HAP retenidos fueron eluidos tres veces con 5 mL de n-hexano y colectados, pasados a través de una columna

que contenía 3 g de adsorbente (alúmina al 3% en sílice), seguidamente el extracto fue sometido a cinco extracciones líquido-líquido en embudos de separación de 500 mL con mezcla acetonitrilo/agua 3:10 (v/v), otra extracción con 10:1 (v/v) con respecto a fase orgánica mencionada. Una vez más fue preconcentrado los extractos acuosos en un cartucho en fase sólida, para ser eluido con 3mL de acetonitrilo, esta disolución fue analizada en el HPLC empleando una columna C<sub>18</sub> de dimensiones 120 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula, el detector empleado fue un espectrofotómetro con longitud de onda de trabajo de  $\lambda=254$  nm, elución isocrático con el empleo de una mezcla de acetonitrilo/agua 1:1 (v/v) y el bucle de inyección fue de 100 µL. Los coeficientes de variación obtenidos en este estudio están entre un 5,7 y un 11,2 % y buena linealidad con  $r^2 > 0,997$ . En el análisis de las muestras de agua del río Almedares se evidenció la presencia de: fenantreno ( $0,09 \pm 0,01$ ) ppb, antraceno ( $0,09 \pm 0,04$ ) ppb y pireno ( $20 \pm 5$ ) ppb <sup>[1]</sup>.

### 3.3 Estabilidad de los HAP en medio acuoso.

- **Luz Vera** y colaboradores en el 2002 desarrollaron un método para la determinación de 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua al nivel de ultratrazas mediante HPLC por detección dual: UV a una longitud de 262 nm y fluorescencia con longitud de excitación: 305-395 nm y emisión: 430-470 nm, optimizando un sistema de SPE en línea en dos etapas. Las muestras de agua fortificadas con HAP se colecto en dos frascos de vidrio ámbar con capacidad de 75 mL, la cual fue llenado hasta el inicio de la rosca a fin de separar los HAP en dos grupos: ligeros y pesados. Estas muestras se filtraron con una membrana de Nylon 66 de poro 0,4 µm, para los HAP ligeros se añadió 5 mL de CH<sub>3</sub>CN al

frasco, se tapó y se agito vigorosamente, luego se filtró por la misma membrana, se repitió con 20 mL de agua grado reactivo, mientras que para los HAP pesados se añadió 5 mL de acetonitrilo con 5 extracciones sucesivas (25 mL) en el frasco y se filtraron, con un volumen final de 100 mL. Se tapó con papel aluminio y se agito suavemente para homogeneizar la mezcla. Los compuestos de las muestras de agua fortificadas fueron extraídos y pre-concentrados con una pre-columna empacada de fase reversa de acero inoxidable de 20 mm de longitud y 2 mm de diámetro interno con tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , la columna analítica  $\text{C}_{18}$  de dimensiones 125 mm de longitud y 3,2 mm de diámetro interno, flujo de 0,5 mL/min, con programación de gradiente con fase móvil acetonitrilo/agua 90:10 (v/v) y acetonitrilo 100%. Obtuvieron buena linealidad con  $r^2 > 0,995$  y las recuperaciones fueron mayores al 72% con coeficiente de variación  $< 19\%$ . El método desarrollado lo emplearon en el análisis de agua superficial en muestras colectadas en el Río Seco en Tabasco, lo que permitió detectar mediante fluorescencia la presencia de antraceno y fluoreno con concentraciones de 29 y 26 ppt, respectivamente. Además aplicaron el método para estudiar la estabilidad de los HAP en solución para dos medios diferentes, agua grado reactivo y agua potable, cada tipo de agua fue fortificada con una mezcla estándar de HAP, se prepararon las muestras con el procedimiento para HAP ligero y pesado. Las muestras fortificadas fueron expuestas a la luz y a temperatura ambiente durante 24 horas para luego ser analizadas. Los resultados mostraron que la mayoría de los HAP permanecieron estables por 24 horas en el agua grado reactivo que contenían acetonitrilo (proporciones establecidas en el método) excepto para el antraceno, benzo(k)fluoranteno, benzo(ghi)pireno e indeno(cd)pireno que tuvieron pérdidas significativas. Por el contrario en el agua potable todos los HAP, con excepción del fluoreno y benzo(a)pireno, se degradaron notablemente e incluso algunos de ellos no fueron detectados. Ellos asocian que para el caso del agua potable, el cloro residual presente degrada a la mayoría de los HAP en



ausencia de un solvente orgánico y que la potabilización se presume como un método para eliminar los HAP en agua potable <sup>[11]</sup>.

- M. García y colaboradores en el 2004 determinaron los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en muestras de aguas potables de diferentes localidades de la región de Galicia al noroeste de España, mediante HPLC-FLD con técnicas de pre-concentración como extracción en fase sólida (SPE), micro-extracción en fase sólida (SPME) y extracción con sorción en barras magnéticas (SBSE). Utilizaron una columna C<sub>18</sub> de dimensiones de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, volumen de inyección de 50 µL, gradiente de elución con acetonitrilo/agua (80:20; 97:3 y 100%), flujo de 1 ml/min y temperatura de elución de 33 °C. Evaluaron los parámetros de extracción para maximizar la recuperación y sensibilidad de los HAP en la extracción con SPME, evaluando el efecto de adición de acetonitrilo sobre la estabilidad de los HAP en solución acuosa, modificando el volumen de acetonitrilo (0, 2 y 4 mL en 40 mL de muestra) añadido a la muestra y las condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo). También evaluaron la estabilidad de los HAP en muestras de agua potable agregando acetonitrilo con HAP a niveles 10 veces inferiores a los límites establecidos en las regulaciones, manteniendo las muestras durante 3 h en las siguientes condiciones: 1) a temperatura ambiente y expuestas a la luz diurna, 2) en refrigeración, sin exposición a la luz y con la adición de tiosulfato sódico como conservante de acuerdo con la US EPA. Observaron que las muestras mantenidas a temperatura ambiente, expuestas a la luz y sin ningún tipo de conservante presentó una reducción significativa del contenido de HAP, especialmente para Benzo[a]pireno que alcanzó una reducción del 40%, mientras que los HAP bajo la segunda condición a temperatura ambiente obtuvieron mejoras en la recuperación, un 90% para el benzo(a)pireno, sin embargo protegidos de la luz y refrigerados a 4°C las recuperaciones fueron > 95% para todos los HAP. Por otra parte, obtuvieron que

la proporción óptima de acetonitrilo es 5% para extracción mediante SPME, para evitar la adsorción de HAP en las paredes llenando los viales completamente, eliminando cualquier espacio libre restante; a porciones inferiores a 5% su rendimiento de extracción disminuyó, debido a que su solubilidad en la solución acuosa es más baja especialmente para los HAP de alto peso molecular, mientras que a porcentajes superiores también su rendimiento de extracción disminuyó, debido a que su partición aumenta a favor de la mezcla acuosa. Mediante el uso de acetonitrilo, no es necesario usar surfactante y sugieren que se debe tener en cuenta algunas precauciones para prevenir las pérdidas de HAP a través de la oxidación por aire y luz durante la extracción por SPME <sup>[12, 13]</sup>.

De lo expuesto anteriormente es necesario realizar un estudio de los factores que afectan la estabilidad de los HAP en soluciones acuosas para asegurar y garantizar que el método de análisis a utilizar no afecte los resultados por la falta de estabilidad de los mismos y se pueda calcular el verdadero efecto de la respuesta sobre el método analítico utilizado. Para ellos fue necesario el uso del diseño de experimento 2<sup>3</sup> anteriormente expuesto.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Evaluar el método para el análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en aguas naturales mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FL).

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Optimizar los parámetros operacionales en el equipo de HPLC-FLD.
- Seleccionar los estándares de HAP a estudiar en función de las condiciones de trabajo.
- Realizar curvas de calibración para evaluar la estabilidad de los patrones acuosos con y sin agregado de solvente orgánico.
- Evaluar el comportamiento de los HAP seleccionados en diferentes medios acuosos con y sin agregado de solventes.
- Proponer las mejores condiciones para el trabajo de los HAP en medios acuosos.
- Evaluar el comportamiento de los HAP utilizando diferentes filtros incluyendo soportes con y sin agregado de solvente orgánico.

## V. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se describe la metodología, considerando los equipos y reactivos disponibles en el laboratorio para realizar el análisis de los HAP en aguas.

### 5.1 Materiales y Reactivos

#### 5.1.1 Materiales:

- ✓ Filtros de celulosas 0,45 $\mu$ m
- ✓ Filtros AP10 0,2-0,6  $\mu$ m
- ✓ Filtros Nylon 0,45 $\mu$ m
- ✓ Balones ámbar de (50,0  $\pm$  0,5) mL Pyrex tipo A
- ✓ Balones 10, 50 y 100 mL
- ✓ Pipetas volumétricas de: 1,2 3,4,5,8,10,15,20,30 mL

#### 5.1.2 Reactivos:

- ✓ Acetonitrilo grado HPLC, Fisher Scientific
- ✓ Hexano grado HPLC, Bordick& Jackson
- ✓ Metanol grado HPLC Bordick& Jackson
- ✓ Agua 18M $\Omega$
- ✓ Antracenoal 97%, Aldrich Chemical Company
- ✓ Fenantreno al 97%, Aldrich Chemical Company
- ✓ Pireno al 98%, Sigma Chemical

- ✓ Criseno al 98%, Aldrich Chemical Company
- ✓ Naftaleno al 99%, Aldrich Chemical Company
- ✓ Acenafteno al 99%, Aldrich Chemical Company
- ✓ Fluoreno al 98%, Aldrich Chemical Company

### 5.1.3 Equipo HPLC:

Para el análisis de los HAP se empleó un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) marca Hewlett Packard (*hp*) con las siguientes características instrumentales:

**Tabla 5.** Características instrumentales del equipo HPLC-FLD

<b>Marca</b>	Hewlett Packard ( <i>hp</i> )
<b>Desgasificador</b>	Modelo: G1322A
<b>BombaQuatPump</b>	Modelo: G1311A
<b>Sistema de Inyección, ALS</b>	Modelo: G1313A
<b>Columna</b>	C <sub>18</sub> para HAP, Marca: Merck (longitud: 150 mm, diámetro interno: 4,6 mm; tamaño de partícula: 5 µm)
<b>Detector</b>	Detector de fluorescencia 1260 FLD Modelo: G1321B, Marca: Agilent Technologies

### 5.2 Preparación de los Patrones.

A partir de los estándares de cada HAP se realizó la disolución de cada uno de ellos en acetonitrilo mediante pesada obteniendo las soluciones madres (apéndice A).

Para la preparación de las soluciones intermedias se realizaron las diluciones de cada HAP en acetonitrilo mediante pesada (ver tabla 6). Luego se preparó una solución multipatrón con la toma de una alícuota de la solución intermedia de cada HAP, se diluyó en agua desionizada, este proceso se debe a la baja solubilidad de los HAP en solvente acuoso. Las concentración de los patrones utilizados para las curvas de calibración se determinaron realizando diluciones de los mismo hasta obtener concentraciones cercanas al límite de determinación para cada HAP en evaluación.

**Tabla 6.** Concentraciones de las soluciones intermedias para cada HAP.

HAP	ppm (mg/Kg)	CV %
<b>Naftaleno</b>	9,976 ± 0,008	0,08
<b>Acenafteno</b>	10,002 ± 0,008	0,08
<b>Antraceno</b>	10,001 ± 0,007	0,07
<b>Pireno</b>	10,000 ± 0,007	0,07
<b>Criseno</b>	9,97 ± 0,07	0,7

### 5.3 Curva de calibración

Para evaluar la estabilidad de los patrones de HAP en soluciones acuosas se realizaron curvas de calibración a concentraciones del orden de los ug/L. Adicionalmente se evaluaron los cambios de sensibilidad de las curvas de calibración con el agregado de acetonitrilo al 10 % v/v en los patrones, para la determinación de la influencia de este solvente orgánico en la estabilidad de los mismos. En ambas curvas se evaluó la sensibilidad y la linealidad a diferentes tiempos de preparación de los patrones; 0, 24, 48 horas y una semana. Se elaboraron cinco curvas una por cada analito de interés, para ello se preparó una solución multipatrón que contenía los cinco

compuestos en solución acuosa. Los patrones utilizados para la curva de calibración se describen en la tabla 7, con los respectivos HAP estudiados.

**Tabla 7.** Concentraciones de las soluciones ( $\mu\text{g/L}$ ) de la curva de calibración.

HAP	ppb ( $\mu\text{g/L}$ )				
	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3	Patrón 4	Patrón 5
<b>Naftaleno</b>	10,0 $\pm$ 0,4	20,0 $\pm$ 0,3	29,9 $\pm$ 0,3	39,9 $\pm$ 0,3	49,9 $\pm$ 0,3
<b>Acenafteno</b>	10,0 $\pm$ 0,4	20,0 $\pm$ 0,3	30,0 $\pm$ 0,3	40,0 $\pm$ 0,3	50,0 $\pm$ 0,3
<b>Antraceno</b>	10,0 $\pm$ 0,4	20,0 $\pm$ 0,3	30,0 $\pm$ 0,3	40,0 $\pm$ 0,3	50,0 $\pm$ 0,3
<b>Pireno</b>	10,0 $\pm$ 0,4	20,0 $\pm$ 0,3	30,0 $\pm$ 0,3	40,0 $\pm$ 0,3	50,0 $\pm$ 0,3
<b>Criseno</b>	10,0 $\pm$ 0,8	19,9 $\pm$ 0,7	29,9 $\pm$ 0,7	39,9 $\pm$ 0,7	49,9 $\pm$ 0,7

## 5.4 Análisis de HAP por HPLC-FL

### 5.4.1 Instrumentación

Los HAP se analizaron en un HPLC equipado con un detector de fluorescencia marca Angilet Technologies. La columna empleada fue una columna  $C_{18}$  para HAP (columna con grupos silanol desactivados con metilsilano) marca Merck de 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro interno; 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

La separación cromatográfica fue llevada a cabo bajo los parámetros experimentales optimizada como se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8.** Condiciones de trabajo

Parámetros	Condición
Fase móvil	Metanol/Agua (85:15) %
Temperatura	Ambiente
Flujo	1,6 mL/min
Volumen de inyección	20 $\mu$ L

La identificación de los HAP se realizó, mediante la comparación del tiempo de retención de cada HAP en el cronograma con los estándares inyectados por separado, los cromatogramas fueron obtenidos utilizando las longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ) mostradas en la tabla 9.

**Tabla 9.** Longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 7 HAP <sup>[9,45]</sup>.

HAP	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
Naftaleno	215	330
Acenafteno y Fluoreno	220	325
Fenantreno	250	380
Antraceno y Pireno	275	420
Criseno	270	385

Una vez que se identificaron los HAPs se realizó una programación de longitud de onda de excitación y emisión lo cual se aplicó a una solución multipatrón de 50 ppb de cada HAP.

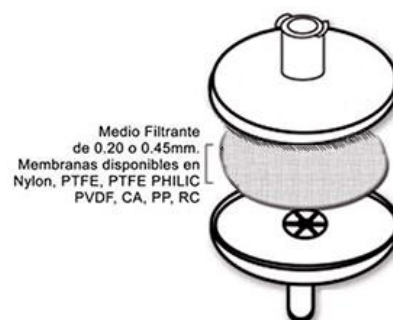


## 5.5 Evaluación de los tipos de filtros

Se estudiaron cuatro (4) tipos de filtros usando diferentes soportes los cuales se detallan en la figura 10 y 11, dos soporte de acero inoxidable y dos soporte de polipropileno de diferentes materiales (celulosa, AP10 y nylon), mostrados en la tabla 10. Evaluando el efecto de los mismos en el porcentaje de recuperación de los HAP. Una vez obtenido el filtro óptimo, se evaluó el acondicionado y lavado del filtro con acetonitrilo durante 2 horas <sup>[11]</sup>.



**Figura 10.** Piezas del porta filtro de acero inoxidable.



**Figura 11.** Descripción de un filtro de jeringa

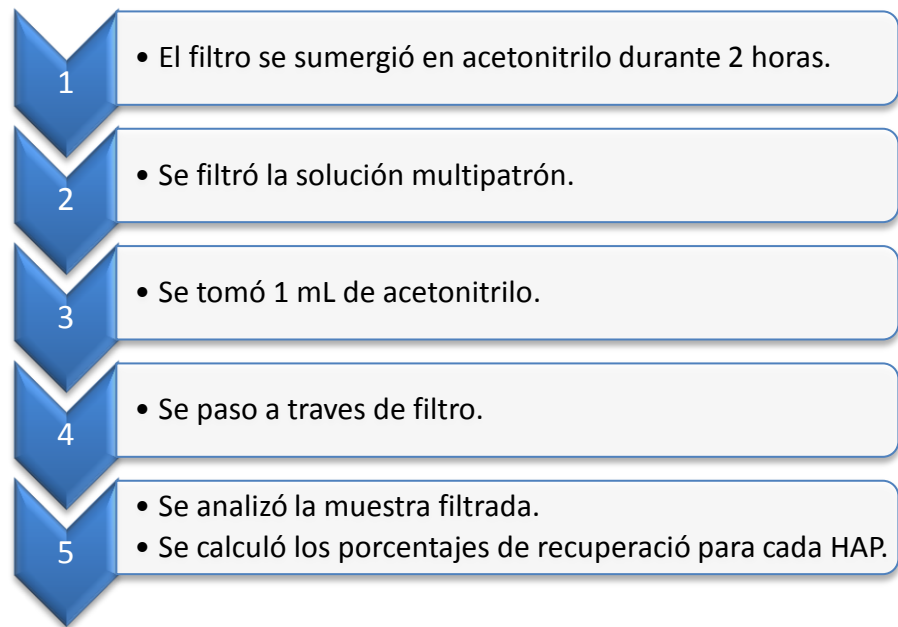
**Tabla 10.** Filtros y sus características.

<b>Soporte</b>	<b>Filtro</b>	<b>Tamaño de poro(<math>\mu\text{m}</math>)</b>
Acero inoxidable	AP10	0,2-0,6
	Celulosa	0,45
Plástico	Nylon	
	Celulosa	

Se evaluó los filtros con una solución multipatrón con 30 ppb de cada HAP, la prueba de los filtros se realizó bajo dos condiciones: con y sin agregado de solvente orgánico, para establecer la influencia del solvente sobre el porcentaje de recuperación de los HAP.

#### **5.5.1 Proceso de lavado del filtro.**

Una vez establecido el filtro óptimo de acuerdo a los resultados obtenidos en la sección 5.5, fue evaluado el método de acondicionamiento y lavado con acetonitrilo como solvente orgánico.



**Figura 12.** Esquema del proceso de lavado del filtro.

### 5.6 Recolección de Muestra.

En dos frascos de vidrio ámbar con capacidad 1L, previamente lavado y secado, se enjuago con acetonitrilo y se recubrió la tapa con teflón. Se recolecto la muestra de agua de grifo en el Centro de Química Analítica, mientras que el agua natural se recolectó en la avenida Boyacá en el distribuidor La Castellana, proviene del “Waraira Repano” (El Ávila). El muestreo fue realizado de forma directa, sin la aplicación de alguna técnica adicional. Las muestras fueron fortificadas con los HAP y almacenadas resguardadas de la luz a 10°C hasta su análisis.

## 5.7 Experimento factorial para el estudio del efecto matriz de las muestras de agua de grifo y natural.

Con el objetivo de determinar el efecto de las diferentes variables en las muestras de agua, se empleó el diseño experimental  $2^n$ , cuyas variables o factores se expresan con n y el termino 2 se refiere a valores que toman estas variables denominados también niveles (-, +), los factores y niveles para el agua de grifo se muestra en la tabla 11, en la tabla 12 se muestran los valores para el agua de río.

**Tabla 11.** Factores y niveles del diseño experimental del agua de grifo.

<b>Factores:</b>	<b>Nivel -</b>	<b>Nivel +</b>
A: Tiempo (h)	0	48
B: Acetonitrilo CH <sub>3</sub> CN (%)	10	20
C: Tiosulfato de sodio Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (ug/mL)	0	90

**Tabla 12.** Factores y niveles del diseño experimental del agua de río.

<b>Factores:</b>	<b>Nivel -</b>	<b>Nivel +</b>
A: Tiempo (h)	0	48
B: Acetonitrilo CH <sub>3</sub> CN (%)	10	20
C: pH	4	7

Con los factores y niveles definidos se plantearon las posibles combinaciones experimentales, siendo el diseño experimental  $2^3$  con un total de 8 experimentos distintos, el diseño experimental se muestra en la tabla 13.

**Tabla 13.** Diseño experimental empleado para las muestras de aguas.

<b>Experimentos</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	-	-	+
<b>3</b>	-	+	-
<b>4</b>	-	+	+
<b>5</b>	+	-	-
<b>6</b>	+	-	+
<b>7</b>	+	+	-
<b>8</b>	+	+	+

Una vez preparadas las muestras se analizaron con el HPLC-FLD, las muestras que requerían 48 horas fueron refrigeradas a 10 °C con protección a la luz. Los resultados obtenidos fueron tratados con el software estadístico Statgraphics XVII <sup>[46]</sup>.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

Este capítulo fue dividido en seis (6) secciones, entre las cuales se encuentran: 6.1. Estudio de condiciones de análisis de los HAP por HPLC-FLD, 6.2 y 6.3 Estudio de la estabilidad de los HAP sin y con agregado de solvente orgánico, respectivamente, 6.4 Estudio del efecto de los filtros, 6.5. Análisis de los HAP en agua de grifo y finalmente 6.6. Análisis de los HAP en agua natural. Los resultados obtenidos fueron analizados como se detalla en la sección V.

### **6.1 Estudio de condiciones de análisis de HAP por HPLC-FL**

En esta sección se evaluó las mejores condiciones de separación y detección de 7 hidrocarburos aromáticos policíclicos disponible en el laboratorio. La evaluación se realizó en el equipo HPLC-FL con el uso de una mezcla de solvente metanol/agua en modo isocrático debido a problemas con el sistema de gradientes del equipo, siendo esto una limitante en la escogencia de los hidrocarburos aromáticos a evaluar en estudios posteriores.

Para la selección de las mejores condiciones de separación y detección se realizó la inyección de cada uno de los HAP en las diferentes proporciones de fases móviles evaluadas y con las longitudes de onda de excitación y emisión del sistema de detección más sensibles para cada analito de interés.

En la tabla 9 se muestra los HAP evaluados y las longitudes de onda de excitación y emisión recomendada en la literatura.

Para las condiciones de separación se evaluaron varias proporciones de solvente metanol/agua en la fase móvil y se seleccionó la que permitía separar la mayor cantidad de HAP en el menor tiempo posible para evitar un gasto innecesario de solvente orgánico. Esta condición fue lograda a una proporción de solvente metanol/agua de 85/15 % v/v.

En la tabla 14 se muestran un resumen de los tiempos de retención obtenidos para la fase móvil 85/15 % v/v de los diferentes HAP evaluados. Es de indicar que estos se van a distribuir de acuerdo a las interacciones fisicoquímicas que se llevan a cabo entre los HAP y la columna, dependiendo de su tamaño, número de anillos aromáticos y su peso molecular, es así que los de mayor peso molecular presentan un mayor tiempo de retención, debido a que a mayor número de anillos aumenta el carácter lipofílico aumentando su afinidad por la fase estacionaria <sup>[31, 34]</sup>.

**Tabla 14.** Tiempos de retención de cada HAP en fase móvil 85/15 % v/v metanol/agua para el sistema HPLC-FL.

HAP	t <sub>R</sub> (min)
Naftaleno	2,8
Acenafteno	4,6
Fluoreno	4,8
Fenantreno	5,0
Antraceno	5,4
Pireno	7,7
Criseno	10,8

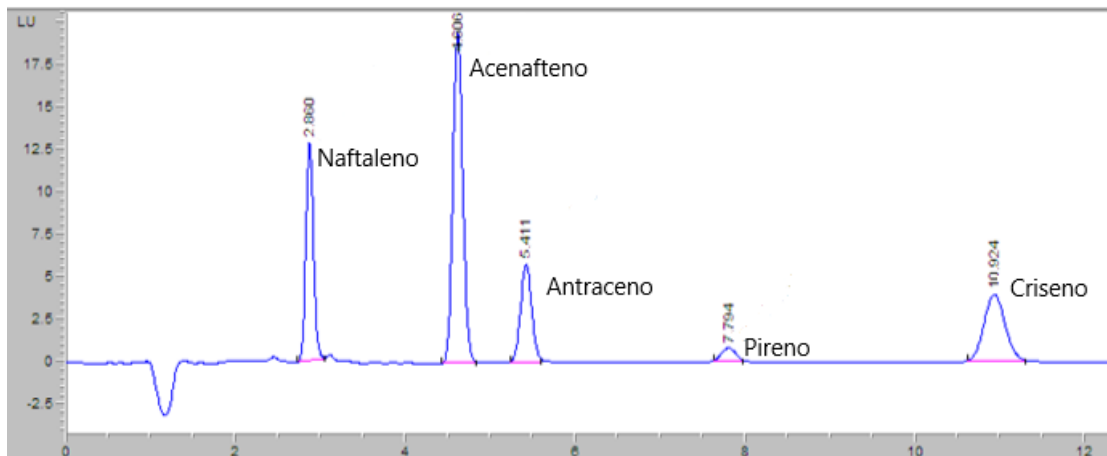
Comparando entre el acenafteno-fluoreno y fenantreno-antraceno los tiempos de retención fueron similares al inyectarlos al equipo bajo las mismas condiciones experimentales. Para solventar esto, algunos autores han propuesto condiciones con gradiente para una mejor separación de estos compuestos, sin embargo hay evidencia de que acenafteno y fluoreno presentan problemas en su separación <sup>[1]</sup>. Como se mencionó anteriormente por limitaciones con el equipo solo se pudo trabajar en la modalidad isocrática, por lo que fue necesario seleccionar a uno de cada par con problema de separación para los estudios posteriores. En el primer caso se consideró el acenafteno como el más conveniente ya que presenta mayor presión de vapor que el Fluoreno, así mismo el Acenafteno presentó mayor sensibilidad en el detector de fluorescencia que el Fluoreno. Con criterios similares se seleccionó el antraceno en vez del fenantreno para los estudios posteriores.

En resumen para efectos de estudios y por limitaciones experimentales, fue seleccionado los siguiente HAP: Naftaleno, Acenafteno y Antraceno, que corresponde al grupo de bajo peso molecular y Pireno y Criseno, del grupo de alto peso molecular. De acuerdo a la longitud de onda de trabajo de cada HAP se planteó una programación de longitud de ondas en el sistema de detección como se muestra en la Tabla 15. Realizando un análisis con una solución patrón constituida por los cinco HAP en concentraciones de 60 ppb (ng/ml) cada uno, bajo las condiciones experimentales antes expuestas se puede visualizar en la figura 13 la separación de todos los HAP seleccionados en un tiempo de 12 min.



**Tabla 15.** Programación de longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 5 HAP [9,45].

HAP	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	Tiempo (min)
Naftaleno	220	325	0
Acenafteno			
Antraceno	275	420	4,90
Pireno			
Criseno	270	385	9



**Figura 13.** Cromatograma obtenido para un patrón multicomponente de HAP en el sistema HPLC-FL.

## 6.2 Estudio de la estabilidad de los HAP.

Debido a la baja polaridad de los HAP, estos presentan poca solubilidad en agua, a pesar de ello estos se encuentran presentes en aguas naturales producto de la contaminación ambiental, por lo que su determinación es importante [11, 12, 24]. Por otra parte existe poca información acerca de la estabilidad de los HAP en medios acuoso.

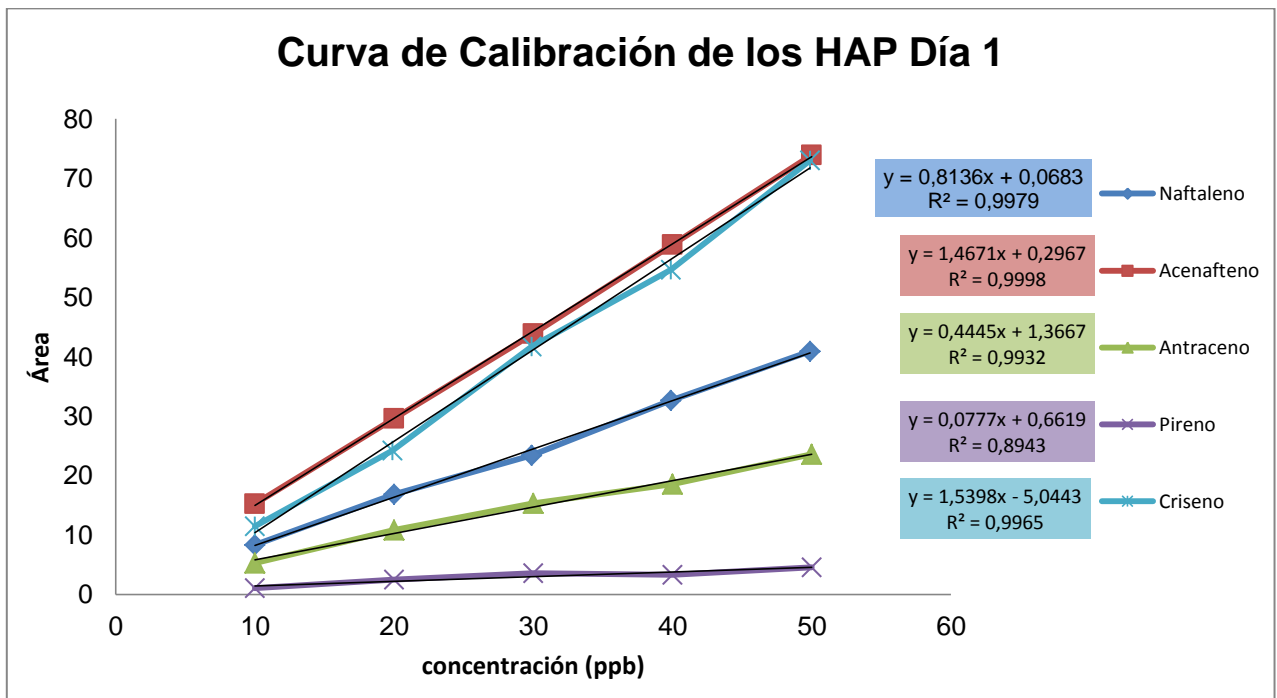
En un estudio reciente Vera y col. en el 2002 evaluaron la estabilidad de HAP en dos medios acuosos, agua grado reactivo (con acetonitrilo) y agua potable durante 24 horas, obteniendo para el agua grado reactivo que los HAP permanecieron estables, a diferencia del agua potable donde se degradaron <sup>[11]</sup>. Otros Autores han aplicado métodos de análisis para la determinación de HAP sin reportar problemas en la determinación y obteniendo buena linealidad en las curvas de calibración con  $r^2$  entre (0,9972-0,9999) <sup>[1, 9, 16, 47]</sup>. En esta revisión no se encontró información acerca de estudios de estabilidad de los HAP en soluciones acuosas con tiempos mayores a 24 horas.

Con experiencia en nuestro laboratorio se ha observado una disminución de la señal de pico de los HAP en soluciones acuosas a medida que pasan las horas y días de ser preparadas, por lo que se quiere evaluar el comportamiento de las curvas de calibración de los HAP en diferentes días de análisis después de su preparación, para determinar si este efecto modifica significativamente el comportamiento lineal y la sensibilidad de las curvas. Para lograr este objetivo se graficó el área de cada HAP evaluado en función de la concentración y se determinó la sensibilidad (pendiente) de cada curva para diferentes días de trabajo.

### **6.2.1 Evaluación Día 1**

La preparación de la curva de calibración de los 5 HAP en evaluación se expuso en la sección 5.3. Los análisis del primer día de preparación mostraron buena linealidad en las curvas de calibración con  $r^2$  entre 0,9932 - 0,9998 a concentraciones entre 10-50 ppb para la mayoría de los HAP en estudio como se muestra en la Grafico 1, a su vez el Acenafteno y Criseno presentaron la mayor sensibilidad con respecto a los otros HAP, a

diferencia del pireno que mostró muy baja sensibilidad con una pendiente  $<0,08$ , se puede suponer que esta baja sensibilidad se debe a su poca solubilidad en agua, siendo irregular su distribución en medio acuoso.

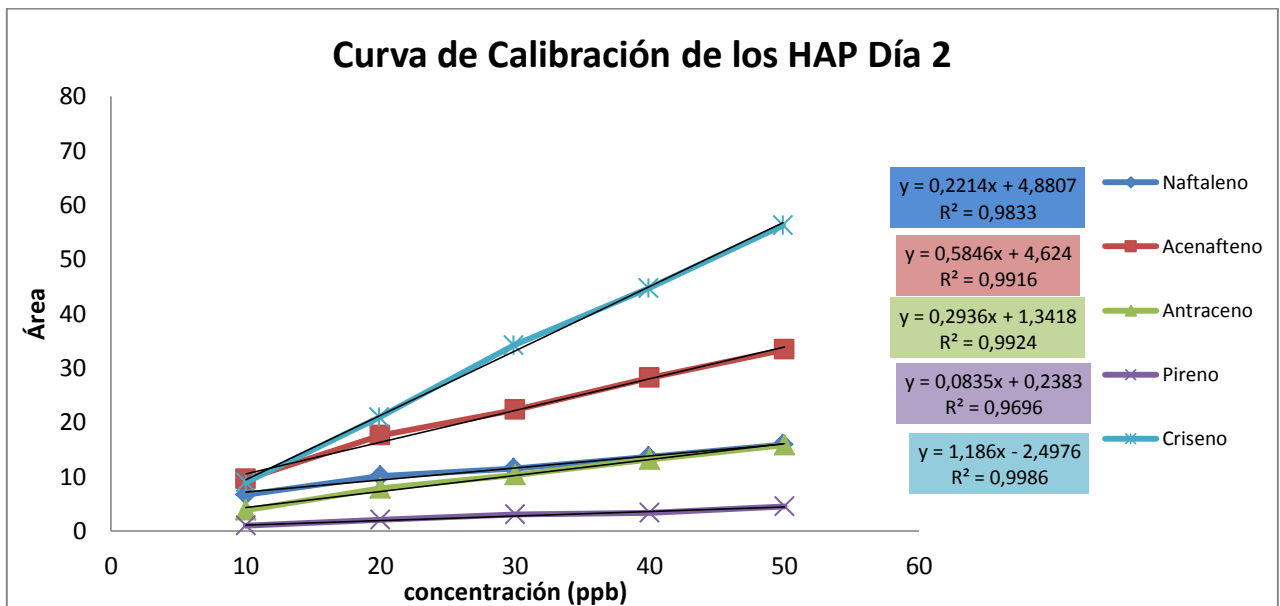


**Gráfico 1.** Curvas de calibración de los 5 HAP en el 1<sup>er</sup> día de análisis.

Para los estudios posteriores los patrones fueron refrigerados a 10 °C y protegidos de la luz como se indican en la literatura para los procesos de conservación de HAP en medio acuosos <sup>[48]</sup>.

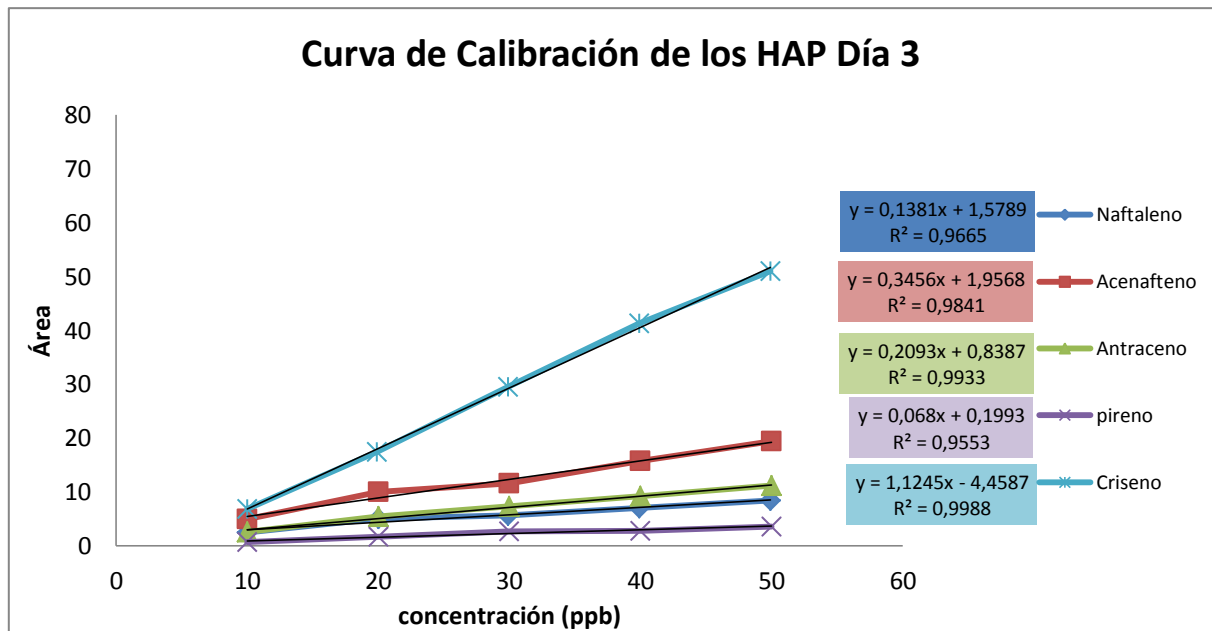
### 6.2.2 Evaluación Día 2 y 3

Los HAP se analizaron bajo las mismas condiciones del primer día, tres (3) de estos presentaron un comportamiento lineal con coeficientes de correlación  $r^2$  (0,9916 - 0,9986) como se puede apreciar en el Gráfico 2 correspondiente al segundo día de análisis, a su vez estos valores difieren en comparación con los  $r^2$  del primer día mostrando una pequeña pérdida de la linealidad para el caso del naftaleno, de igual manera mostraron una caída apreciable de la pendiente de las curvas en comparación con el Grafico 1. En el caso del naftaleno y antraceno esta caída de pendiente fue mayor con respecto al primer día de análisis. En el caso de Criseno y Acenafteno las curvas presentaron una caída de pendiente, sin embargo mantuvieron su comportamiento lineal, a diferencia del pireno cuya pendiente permaneció constante con respecto al primer día pero también mantiene su bajo comportamiento lineal.



**Gráfico 2.** Curvas de calibración de los 5 HAP en el 2<sup>do</sup> día de análisis.

El tercer día de análisis de los HAP al igual que el segundo día se aprecia una caída de la señal para cada HAP como se muestra en el Grafico 3, es decir, la sensibilidad disminuyó de forma marcada generando pendientes para 4 HAP menores a 0,3456, a su vez en algunos casos la linealidad disminuyó ligeramente con valores semejantes al segundo día;  $r^2 > 0,95$ . En cuanto al Criseno, este mostró valores de linealidad con  $r^2$  0,9988 y sensibilidad 1,1245 parecidos al segundo día, por lo que se mantuvo estable a pesar de ser un HAP con alto peso molecular.

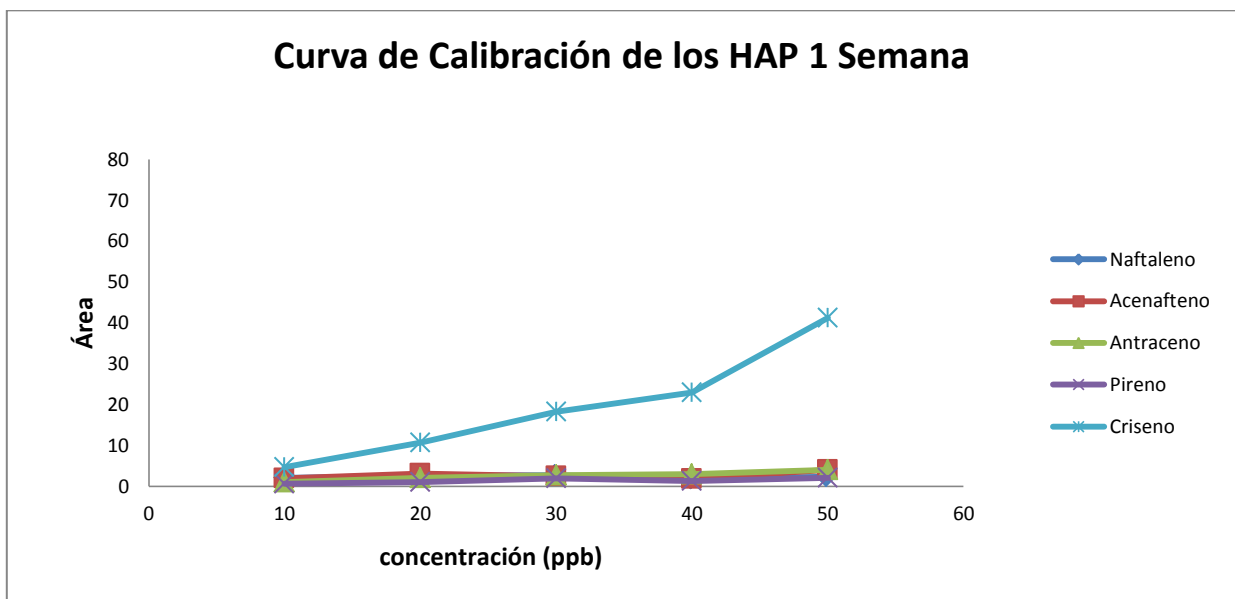


**Gráfico 3.** Curvas de calibración de los 5 HAP en el 3<sup>er</sup> día de análisis.

Una vez más los patrones fueron almacenados en el refrigerador y protegidos de la luz, por una semana más para su posterior estudio.

### 6.2.3 Evaluación Semana 1

Se observa para las curvas de calibración de los HAP a una semana de su preparación una pérdida considerable de la señal como se muestra en el gráfico 4, a excepción del Criseno que mantiene la sensibilidad, pero al igual que los otros HAP se pierde la linealidad de las curvas con valores de  $r^2 < 0,90$  considerado esto como una gran dispersión entre los puntos <sup>[38]</sup>.



**Gráfico 4.** Curvas de calibración de los 5 HAP a la semana de preparación de patrones.

Los gráficos 2, 3 y 4 demuestran que existe la pérdida de sensibilidad o caída de la señal de los HAP y de la linealidad a medida que pasan los días cuando son preparados los patrones en matrices acuosas. Algunos autores atribuyen esta pérdida de señal a una posible adsorción de los HAP en el material de vidrio <sup>[12,13]</sup>. Estos

resultados se pueden apreciar mejor mediante el uso del método estadístico con rectas de regresión para comparar métodos analíticos.

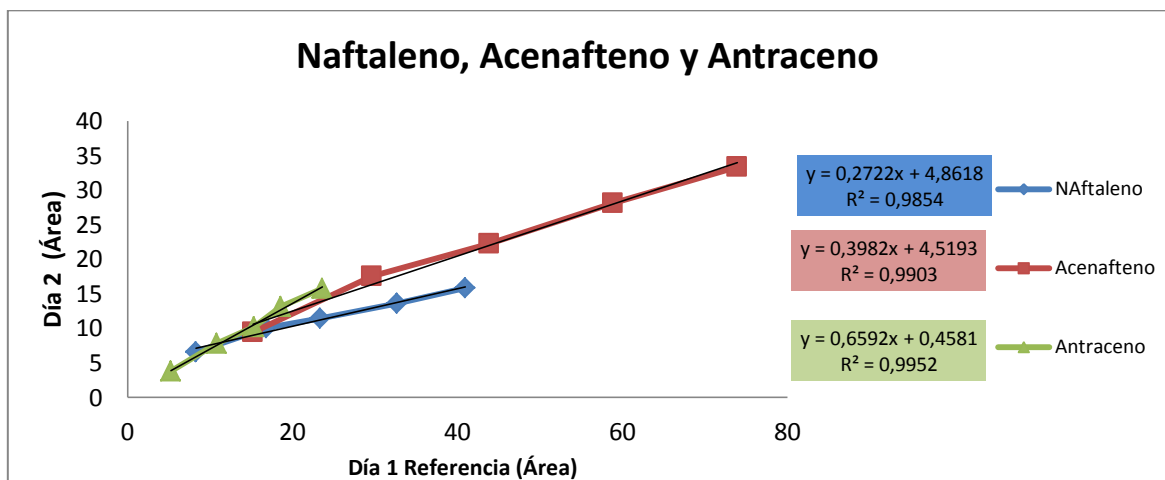
#### **6.2.4 Comparación de días de preparación de patrones mediante comparación de métodos por rectas de regresión.**

Una forma adecuada para evaluar estadísticamente los resultados presentados anteriormente es el uso de rectas de regresión para comparar métodos analíticos <sup>[38]</sup>, cuyo interés principal del método es realizar una comparación que evidencie la diferencia o no entre los resultados de cada método, que para nuestro caso es establecer si hay diferencia entre los resultados de las curvas de calibración del primer día de análisis con respecto a los demás días.

Para realizar esta comparación se calcula la pendiente, punto de corte y coeficiente de correlación de las rectas contrastadas de cada método. En el caso ideal donde no existe diferencia entre un método con respecto al otro, la pendiente y el coeficiente de correlación es igual a uno (1) con punto de corte igual a cero (0), mientras que si existe diferencia alguno de estos valores variarían como se detalló en la sección **2.8.5**, en nuestro caso la pérdida de sensibilidad y linealidad, se traduce en la pérdida de los HAP en una matriz acuosa. Los grafico 5 y 6 muestran los resultados de los HAP de bajo peso molecular y los de alto peso molecular, respectivamente.

La comparación del día 2 con respecto al día 1 para los HAP de bajo peso molecular que se muestra en el grafico 5, presentaron valores cercano a uno (1) con respecto al coeficiente de correlación  $r^2$ , es decir, la linealidad se mantiene entre las

curvas de calibración, no obstante los valores de pendiente están muy por debajo de uno (1), en otras palabras presentó pérdida de sensibilidad o caída de la señal de los HAP. Los puntos de cortes para cada HAP fue diferente de cero (0), la literatura establece que esto puede deberse a un error sistemático en una de las pendientes del grafico de calibrado individual. Esto se puede atribuir a la alta dispersión de la banda cromatográficas que se observan en los sistemas HPLC que afecta la estimación del área de pico y que generalmente no permite que las rectas de calibración pasen por el punto cero <sup>[38]</sup>.

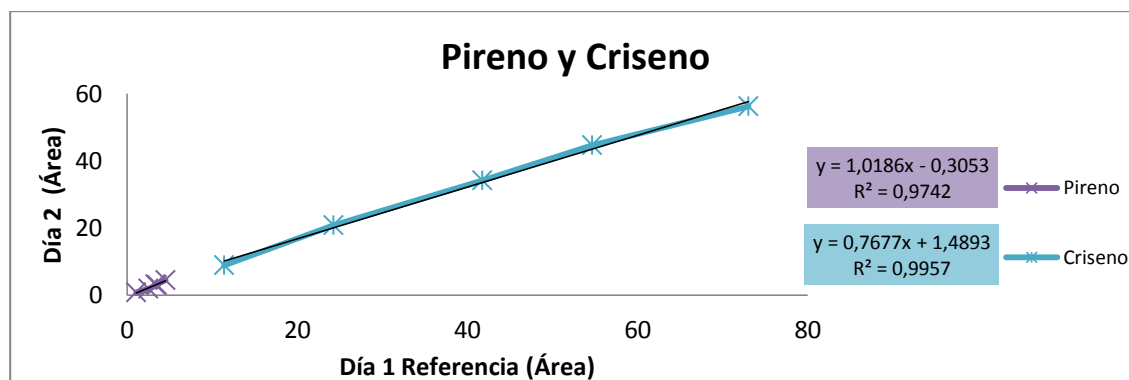


**Gráfico 5.** Rectas de regresión para comparar los días 1 y 2 de preparación de patrones de HAP de bajo peso molecular en matriz acuosa.

En el caso del grafico 6 para HAP de alto peso molecular, el pireno presentó una pendiente cercano a uno (1), al igual que el coeficiente de correlación y punto de corte cercano a cero (0), a pesar de que el pireno mostro baja sensibilidad durante el análisis, se puede decir que se mantuvo estable para el segundo día de análisis. Mientras que el



criseno aunque su linealidad fue cercana a uno (1) su pendiente fue de 0,7677, por lo que se evidencia la pérdida de señal del criseno al segundo día de análisis.



**Gráfico 6.** Rectas de regresión para comparar los días 1 y 2 de preparación de patrones de los HAP de alto peso molecular en matriz acuosa.

No se plantearon los gráficos de comparación del primer día de análisis con respecto al tercer día e incluso a una semana de preparación, dado que presentaron pérdidas considerables de sensibilidad y linealidad en los estudios anteriores. Con estos resultados queda en evidencia que los HAP en medios acuoso no son estables transcurridas 24 horas de su preparación.

### 6.3 Estudio de la estabilidad de los HAP con el agregado de solvente orgánico

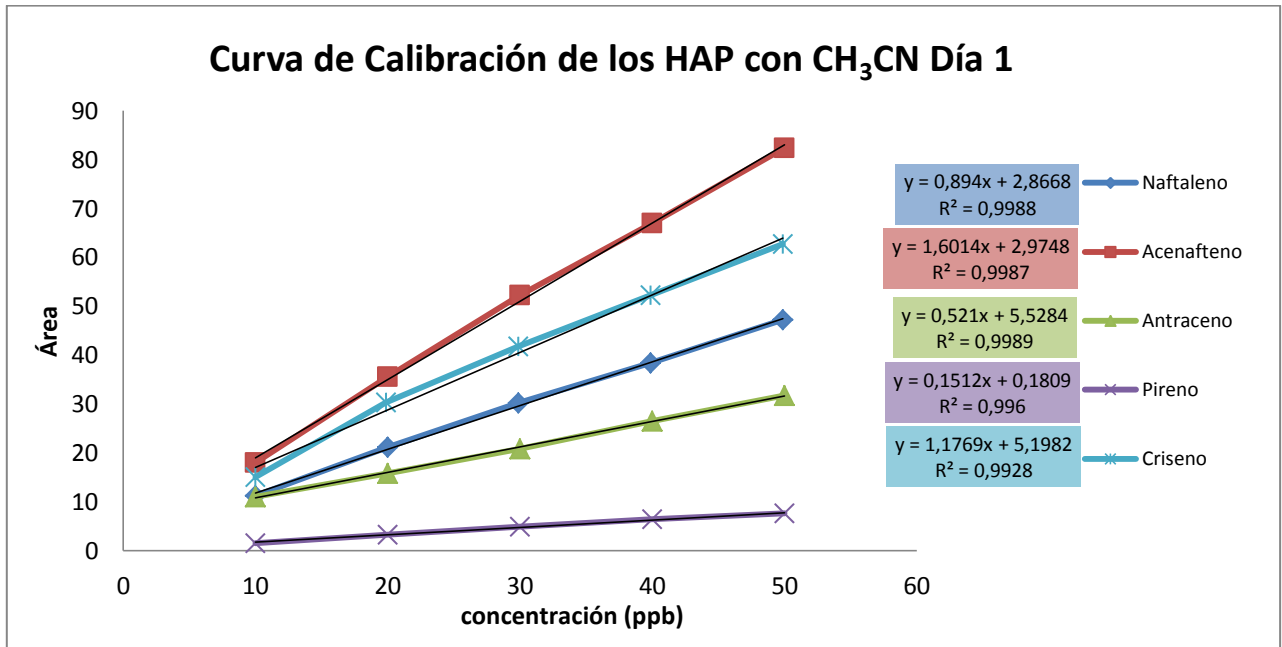
En estudios recientes algunos autores han reportado el uso de solvente orgánico para evitar la adsorción de HAP en las paredes del recipiente de almacenamiento. Estos autores determinaron que con el uso solvente orgánico como metanol o

acetonitrilo, no es necesario utilizar surfactantes y que el porcentaje adecuado de solvente orgánico es de 5% si se va usar la técnica de SPME y mayores a este para otras técnicas de análisis<sup>[11,12]</sup>.

Como se demostró en la sección anterior, los HAP se pierden en matrices acuosas a tiempos mayores de 24 horas. Por consiguiente para mejorar la estabilidad de los HAP se evaluó el agregado de solvente orgánico en los patrones. Para ello se utilizó el acetonitrilo por ser mencionado por algunos autores como el solvente ideal<sup>[12, 13]</sup>. Bajo las condiciones de trabajo ya planteadas anteriormente se evaluó el comportamiento de las curvas de calibración de los HAP a diferentes días de preparación con el agregado de 10 % de acetonitrilo para apreciar si el agregado de solvente orgánico tiene efecto o no en el comportamiento de las curvas de calibración.

### **6.3.1 Evaluación Día 1 y 2**

La preparación de las curvas de calibración de los 5 HAP con el agregado de solvente orgánico se presenta en la sección 5.3. Los resultados en el análisis de los HAP del primer día de preparación de los patrones con solvente orgánico (ver gráfico 7) muestran mejoras tanto en la linealidad con valores de  $r^2$  entre 0,9928 - 0,9989, como en la pendiente con valores entre 0,1512 - 1,6014 para todos los HAP evaluados (comparar con grafico 1), es decir, se observa aumento de la sensibilidad del análisis para el primer día con el agregado de solvente orgánico, siendo el acenafteno el más sensible de todos. Al igual que en el grafico 1, el pireno posee una baja sensibilidad con pendiente 0,1512 con respecto a los otros HAP, sin embargo, su sensibilidad se incrementó aproximadamente el doble con respecto a la curva de calibración sin el agregado de solvente orgánico.

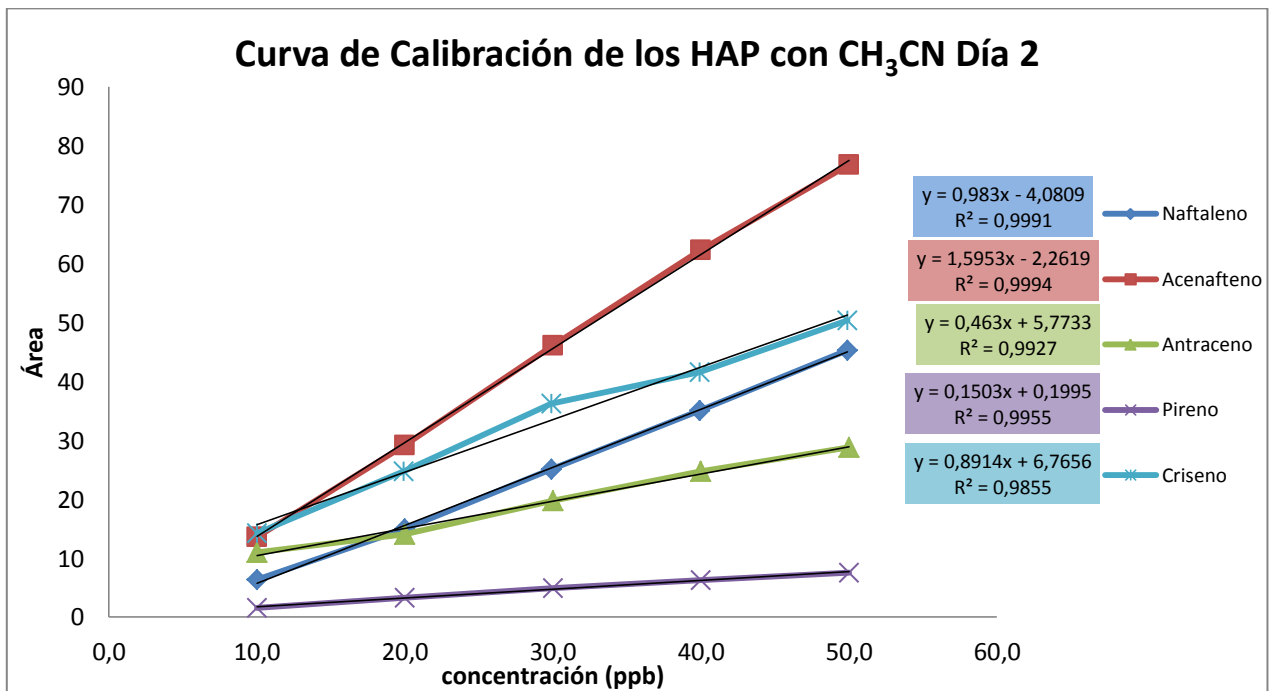


**Gráfico 7.** Curvas de calibración de los 5 HAP con 10% de acetonitrilo en el 1<sup>er</sup> día de análisis.

Los patrones de la curva de calibración anterior se mantuvieron refrigerados y protegidos de la luz para ser analizados en los días posteriores.

Para el segundo día aún se mantienen estables los HAP con respecto a la linealidad, a excepción del criseno, como se muestra en el gráfico 8, con valores de  $r^2$  entre 0,9855 - 0,9994 y en contraste hay pérdida de sensibilidad para algunos HAP en los valores de pendientes determinadas, siendo nuevamente el pireno el de menor sensibilidad con respecto a los otros HAPs. En el caso del Criseno, este presenta una irregularidad en el tercer punto, variando su coeficiente de correlación significativamente. Por otra parte comparando los valores de pendiente y linealidad con los valores

del grafico 2 que corresponde al segundo día sin solvente orgánico, se visualiza mayores valores por lo que se aprecian mejoras en el segundo día con el agregado de solvente orgánico con respecto al no agregado de solvente orgánico.

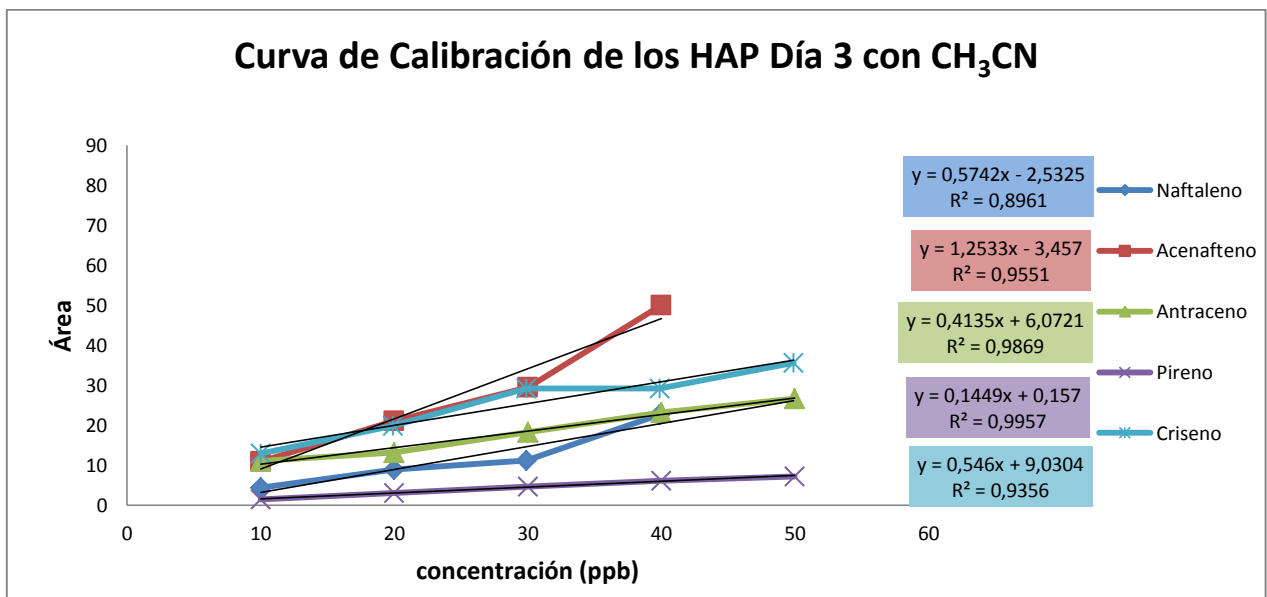


**Gráfico 8.** Curvas de calibración de los 5 HAP con 10 % de acetonitrilo en el 2<sup>do</sup> día de análisis.

### 6.3.1 Evaluación Día 3 y 1 semana.

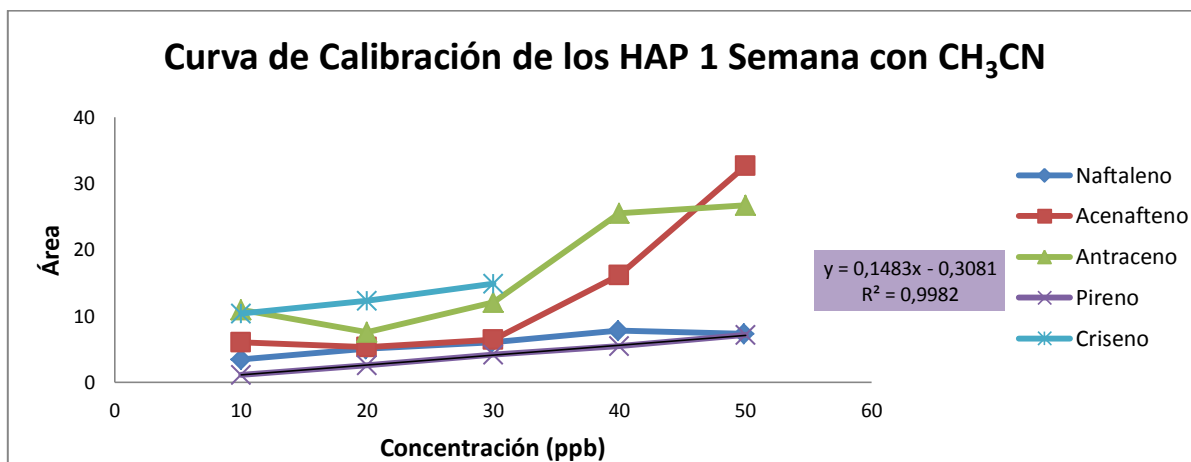
El tercer día de análisis de los HAP se aprecia una caída en la señal de las pendientes para 4 HAP con valores menores a 1,25, además la linealidad disminuyó con valores de  $r^2 < 0,98$  como se muestra en el grafico 9. Sin embargo comparando los valores de las pendientes y la linealidad de todos los HAP del gráficos 4 que

corresponde al tercer día análisis sin solvente orgánico se aprecia mejores resultados en el caso del agregado de solvente orgánico correspondiente al grafico 9. El pireno que mantiene la linealidad con valores de  $r^2$  0,9957, este comportamiento también se apreció en el grafico 3 correspondiente al tercer día sin el solvente orgánico, mientras que su pendiente disminuyo ligeramente con respecto al análisis del segundo día.



**Gráfico 9.** Curvas de calibración de los 5 HAP con 10% de acetonitrilo en el 3<sup>er</sup> día de análisis

Las curvas de calibración de los HAP a una semana de su preparación se observa la pérdida total de la linealidad para 4 HAP con valores de  $r^2 < 0,80$  y caída de la señal como se muestra en el gráfico 10, es decir, se presentaron pérdidas de los HAP en la matriz acuosa, a excepción del pireno que mantiene su linealidad y sensibilidad en la curva con valores de  $r^2$  0,9982 y 0,1482 respectivamente.



**Gráfico 10.** Curvas de calibración de los 5 HAP con 10% de acetonitrilo análisis a 1 semana de preparación.

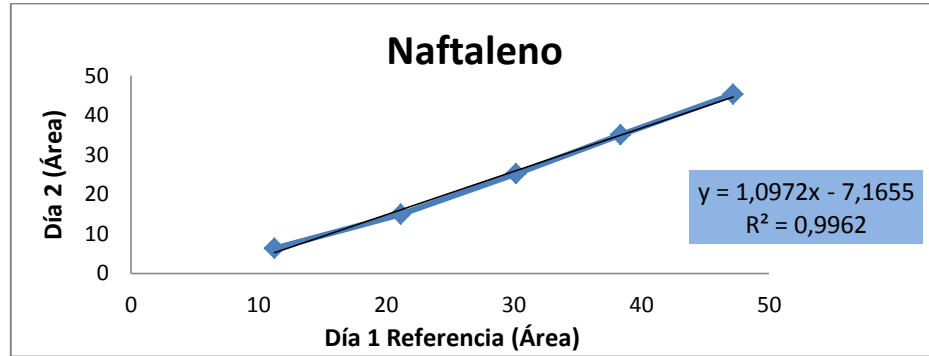
En general los gráficos 7 y 8 demuestran que con 10 % de acetonitrilo la pérdida de sensibilidad de todos los HAP no es significativa en comparación con los gráficos 1 y 2 correspondiente a las curvas de calibración sin este solvente orgánico, lo que demuestra que todos los HAP estudiados se pueden mantener estabilizados en soluciones acuosas a las 24 horas de preparación con un pequeño % de acetonitrilo, algunos autores atribuyen que el agregar solvente orgánico aumenta la solubilidad de los HAP y permite evitar pérdidas por posible adsorción de los mismos en el material de vidrio <sup>[12,13,49]</sup>, el acetonitrilo es un solvente ideal dado que posee una estructura con una parte lipofílica y una polaridad adecuada que permite aumentar la solubilidad de todos los HAP en matrices acuosas <sup>[11]</sup>. A pesar de la estabilidad generada por el uso de solvente orgánico, los gráficos 9 y 10 demuestran que existe la pérdida de la sensibilidad y la linealidad de todos los HAP después de las 24 horas, es decir, se aprecia una caída de señal significativa a partir del tercer día de ser preparados los patrones en matrices acuosas con el solvente orgánico, también estos resultados se

aprecian mejor mediante el uso de rectas de regresión para comparar métodos analíticos.

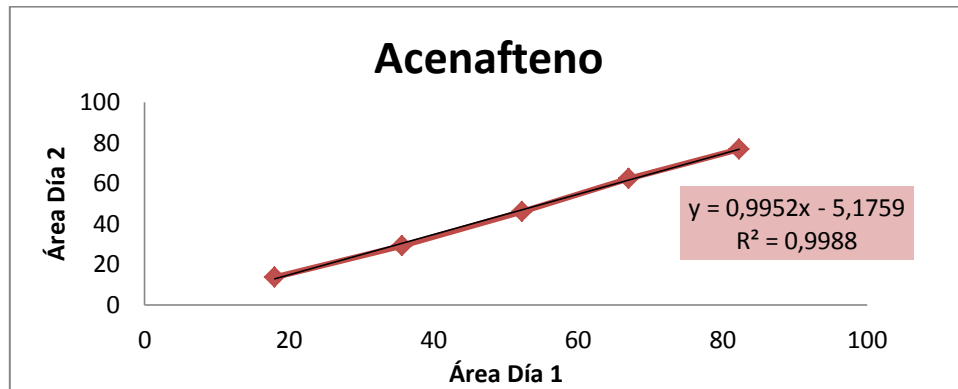
### **6.3.2 Comparación de los días de preparación de patrones con agregado de solvente orgánico mediante el uso de rectas de comparación de métodos.**

Nuevamente para la comparación de rectas se calcula la pendiente, coeficiente de correlación ( $r^2$ ) y punto de corte de las rectas contrastadas para cada día de preparación de patrones con el agregado de solvente orgánico. Recordando que en el caso ideal en el cual no existe diferencia entre un método con respecto al otro estos valores deben ser uno (1) para la pendiente y el coeficiente de correlación y cero (0) para el punto de corte <sup>[37]</sup>. Los resultados de los HAP de bajo peso molecular se muestran en los gráficos 11,12 y 13, mientras que los HAP de alto peso molecular se muestran en los gráficos 14 y 15.

El naftaleno y Acenafteno presentaron valores de pendientes mayores a 0,99 y coeficiente de correlación  $r^2 > 0,99$ , es decir cercano a uno (1), Se puede suponer que el naftaleno y acenafteno se mantienen estable en solución con solvente orgánico, los gráficos 11 y 12 muestran las rectas de comparación del día uno y dos de preparación del naftaleno y acenafteno.



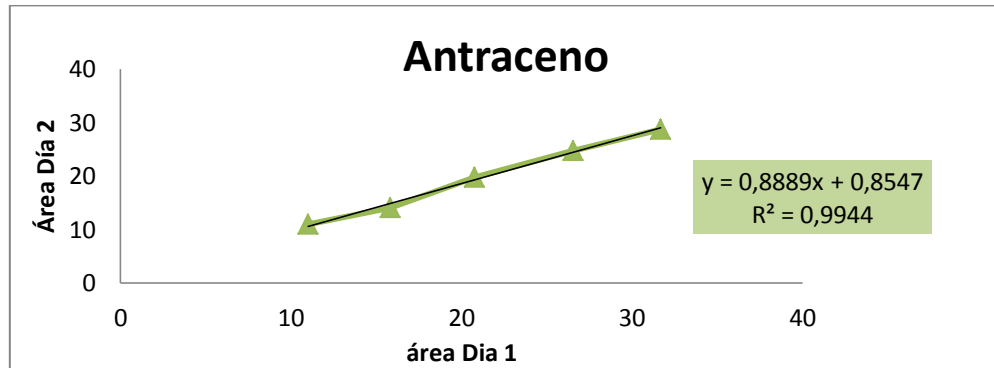
**Gráfico 11.** Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del naftaleno con solvente orgánico.



**Gráfico 12.** Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del acenafteno con solvente orgánico

En el caso del antraceno este mantuvo la linealidad con valor de  $r^2 > 0,99$  cercano a uno como se muestra en el gráfico 13, a pesar de ello presento valores de pendiente menores a 0,90 cuyo valor está por debajo de uno (1) y el punto de corte diferente de cero, indica que existe una diferencia entre los días de preparación para el antraceno, es decir pérdida de la sensibilidad del compuesto.

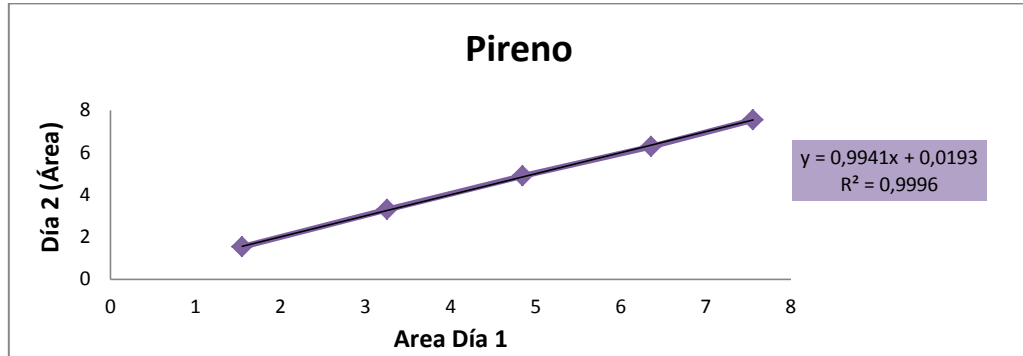




**Gráfico 13.** Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del antraceno con solvente orgánico.

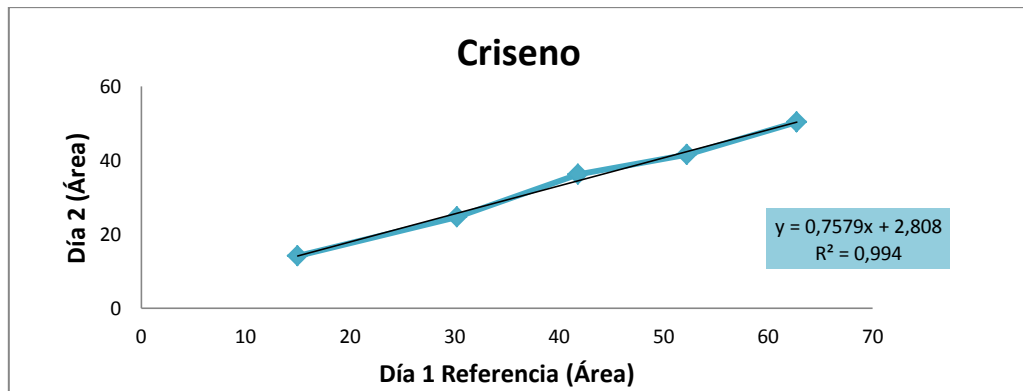
En general los HAP de bajo peso molecular presentaron buenos valores de  $r^2 > 0,99$ , siendo cercanos a uno; al igual que las pendientes con valores cercano a uno (1) a diferencia del antraceno que su valor estuvo por debajo, pendiente  $< 0,90$  lo que se traduce en pérdida de los HAP en la matriz acuosa aunque se mantiene la linealidad de sus curvas.

Los HAP de alto peso molecular, en este caso pireno y criseno se muestran en los gráficos 14 y 15 respectivamente. El pireno presento valores muy cercanos a uno (1) con valores de pendiente y  $r^2 > 0,99$ , con punto de corte cercano a cero (0). Es decir, el pireno observó muy buena estabilidad en la matriz acuosa, por otra parte el agregado de solvente aumentó su solubilidad y por tanto su sensibilidad.



**Gráfico 14.** Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del pireno.

El Criseno presentó pérdida en la señal puesto que el valor de pendiente estaba por debajo de uno (1) como se muestra en el grafico 15, incluso presentó mayor pérdida de sensibilidad con respecto a todos los HAP en estudio con punto de corte distinto de cero (0), a su vez el criseno mantuvo su linealidad con  $r^2 > 0,99$ . A pesar del agregado de solvente orgánico, el Criseno es de alto peso molecular por lo que su solubilidad es muy baja en matrices acuosas, los HAP de alto peso molecular tienden a adsorberse en el material de vidrio del recipiente que lo contiene.



**Gráfico 15.** Recta de comparación de los día 1 y 2 de preparación del Criseno.

En general la estabilidad de los HAP en la matriz acuosa se ve favorecida con el agregado de un solvente orgánico como el acetonitrilo, esto se enfatizó en los grafico 11, 12, 13, 14 y 15, en los cuales se aprecia la linealidad de los compuestos con valores de coeficiente de correlación muy cercano a uno (1), la pérdida de sensibilidad no es significativa puesto que los valores de la pendiente son cercanos a uno, a excepción del antraceno y criseno cuyo valor está por debajo de uno. Los puntos de cortes para cada HAP fue diferente de cero (0), la literatura establece que esto puede deberse a un error sistemático en una de las pendientes del gráfico de calibrado individual o a la alta dispersión de la banda cromatográficas que se observan en los sistemas HPLC que afecta la estimación del área de pico y genera que las rectas de calibración no pasen por el punto cero <sup>[38]</sup>.

Estos valores demuestran que el agregado de acetonitrilo estabilizó a los HAP en matriz acuosa, puesto que estos presentaron mejoras en los valores mostrados en los gráficos 5 y 6, aumentando su sensibilidad. Es decir, es necesario el agregado de un solvente orgánico como estabilizante de los HAP en medios acuoso, el más usado es el acetonitrilo y el isopropanol puesto que posee la polaridad adecuada para aumentar la solubilidad de los HAP en solución manteniéndolo en equilibrio <sup>[49]</sup>, en contraste el equilibrio se pierde al tercer día por lo cual se plantea que los análisis con este tipo de compuestos se realice en los dos primeros días de preparación.

#### **6.4 Estudio del efecto de los filtros**

Para los análisis que se llevan a cabo con muestras de agua naturales que pueden contener impurezas que interfieren en el buen funcionamiento del equipo HPLC se recomienda la filtración de las mismas con filtros de celulosa, para obtener un agua

libre de dichas impurezas o materia orgánica que puedan obstruir la columna o dañar los pistones de la bomba del HPLC, por lo general de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro para columnas analíticas <sup>[31, 50]</sup>.

Sin embargo existe poca información acerca de problemas asociados con el uso de filtros para tratar este tipo de muestras. Como se demostró en la sección anterior existe pérdida de los HAP en matriz acuosa a tan solo un día de preparación como producto de una posible adsorción de los mismos en el recipiente que lo contiene. Algunos autores han planteado para la filtración de la muestra el uso de soporte de acero inoxidable para evitar la adsorción de los HAP en el material de plástico <sup>[50]</sup>, otros autores plantean el uso de otro material de filtro como nylon y el acondicionamiento del mismo en solvente como acetonitrilo <sup>[11]</sup>.

Debido a que existe discrepancia en la literatura y en búsqueda de las mejores condiciones para el tratamiento de muestras se determinó la influencia de la filtración sobre el área de picos de los HAP con (4) tipos de filtros en diferente soportes y al igual que en los estudios anteriores, se evaluó también el efecto del agregado o no de acetonitrilo. El porcentaje de acetonitrilo utilizado en la solución fue del 10% y el estudio se realizó con un multipatrón de 30 ppb de cada HAP en estudio.

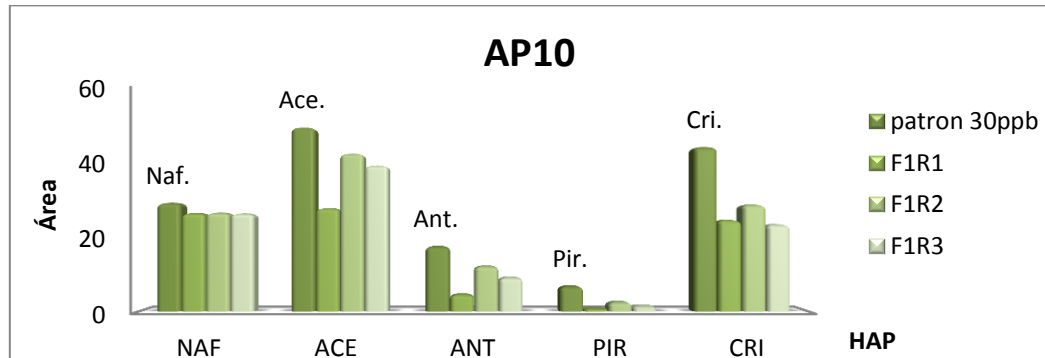
Para realizar esta evaluación se determinó las áreas para tres (3) réplicas de muestras para tres (3) filtros de la misma característica y se realizó los cálculos de desviación estándar relativa y % de recuperación. Es importante resaltar que normas como la EPA 821-B-98-002-1999 correspondiente al protocolo para la aprobación de nuevos métodos analíticos para el estudio de compuestos orgánicos e inorgánicos en aguas de consumo o desecho, consideran valores aceptables de exactitud en un rango

de 80 al 120% y de precisión con RSD menores al 20%. Sin embargo, el proceso de filtración es solo uno de varios pasos en el tratamiento de la muestra y debería considerarse rangos y valores más pequeños para hablar de exactitud y precisión aceptables <sup>[39]</sup>.

#### **6.4.1 Filtro AP10**

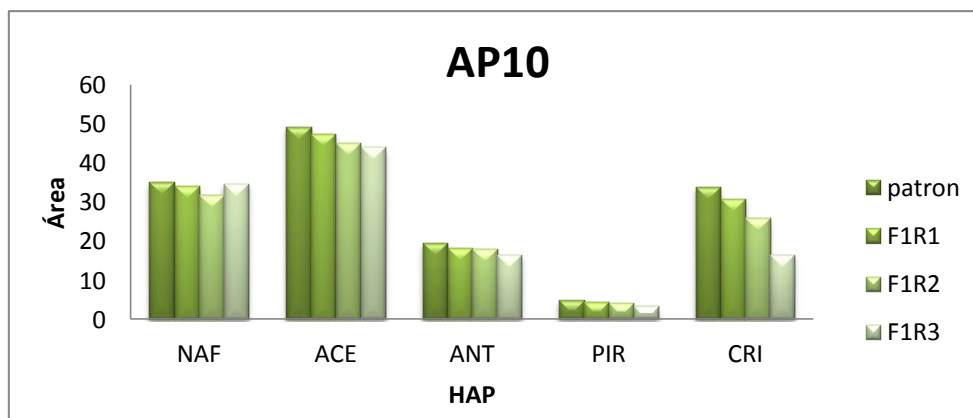
El filtro AP10 el cual posee diámetro de poro de 0,2 a 0,6  $\mu\text{m}$  se utilizó con un soporte de acero inoxidable y jeringa de vidrio. Para el estudio se filtró la solución multipatrón de 30 ppb de cada HAP con y sin agregado de acetonitrilo por triplicado para evaluar la reproducibilidad del método de filtración. Así mismo se calculó la exactitud comparando el promedio de área obtenida con respecto a un patrón inyectado directamente al equipo sin filtrar.

En el grafico 16 para la filtración de multipatrón en el filtro AP10 sin solvente orgánico se puede observar que las áreas de los HAP de bajo peso molecular son comparables con las áreas del patrón sin filtrar en contraste con los de alto peso molecular que sus áreas son menores. Por otra parte en el Apéndice D se puede apreciar que la desviación estándar relativa entre las réplicas es menor a 51% siendo más reproducible el naftaleno con una RSD de 2%.



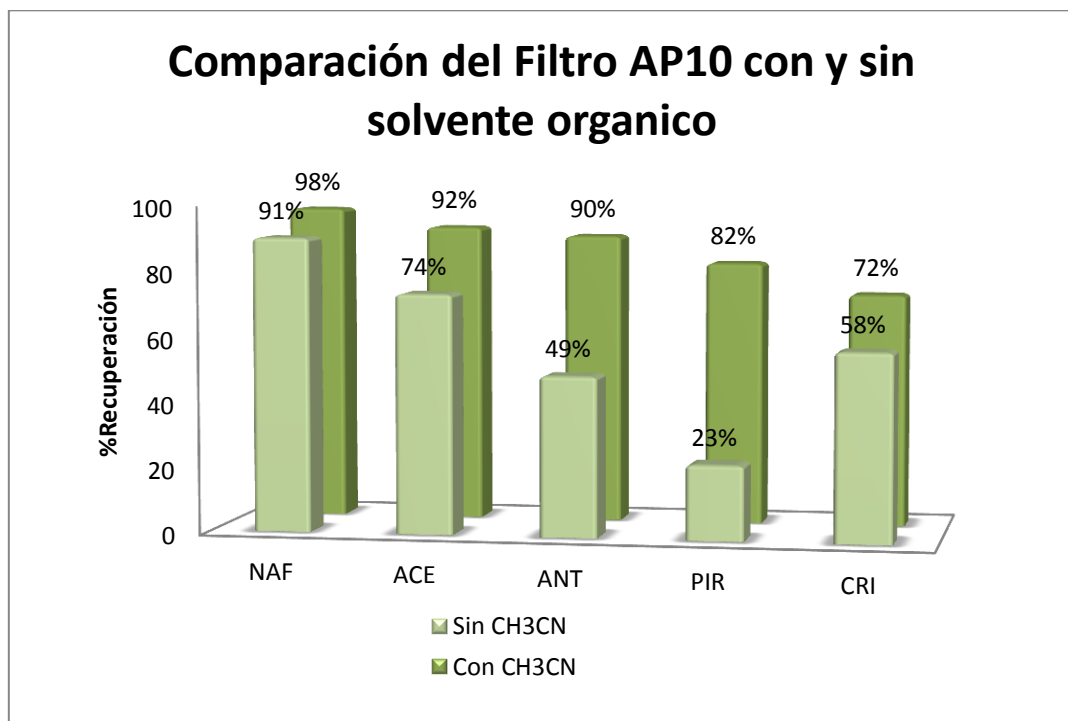
**Gráfico 16.** Áreas de réplica del filtro AP10.

También se evaluó el filtro AP10 con solvente orgánico, usando acetonitrilo al 10% en la solución (ver apéndice D), con este último la contribución del solvente se vio fuertemente marcado puesto que las áreas de las réplicas generaron una RSD menor a 26%, siendo el valor más bajo el del acenafteno con 4%, los HAP de bajo peso molecular e incluso los de alto peso molecular presentaron áreas comparables con el patrón sin filtrar, el grafico 17 muestra la dispersión de las áreas obtenidas al filtrar soluciones con el agregado de acetonitrilo.



**Gráfico 17.** Áreas de réplicas de la filtración con filtro AP10 con solución multipatrón con 10% de acetonitrilo.

En el gráfico 18 se comparan los porcentajes de recuperación de los HAP con y sin agregado de solvente orgánico para el filtro AP10, se observa el efecto del agregado de solvente orgánico que varía de manera favorable, especialmente en el caso de los HAP de alto peso molecular como el pireno y criseno que presentaron porcentaje de recuperación de 82% y 72%, respectivamente, a diferencia del análisis sin solvente orgánico en el cual las recuperaciones fueron 23% y 58% para pireno y criseno respectivamente. Debido al amplio rango de diámetro de poro que posee este filtro se obtienen estos altos porcentajes de recuperación mostrados en el gráfico 18.

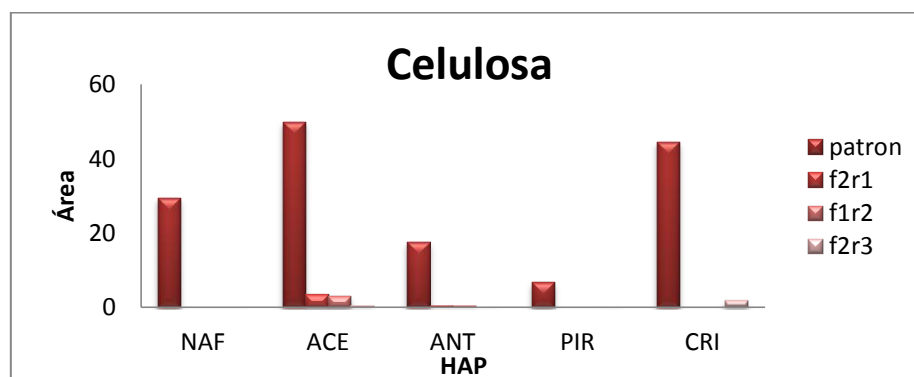


**Gráfico 18.** Comparación de los %recuperación de los HAP al 10% de acetonitrilo y sin solvente orgánico.

### 6.4.2 Filtro Celulosa A

En este caso el filtro de celulosa con un diámetro de poro de  $0,45 \mu\text{m}$  se colocó en un soporte de acero inoxidable adaptable a una jeringa de vidrio para evitar la posible adsorción de los HAP en el material de soporte como se ha indicado en la literatura <sup>[51]</sup>.

El grafico 19 se muestra los resultados obtenidos para el multipatrón sin agregado de solvente orgánico apreciando muy bajas recuperaciones de los HAP (< 5 %) si se compara con el área del patrón sin filtrar. En el caso del naftaleno no se pudo estudiar ya que el filtro presentó una posible contaminación dado que las áreas eran elevadas con respecto patrón sin filtrar.

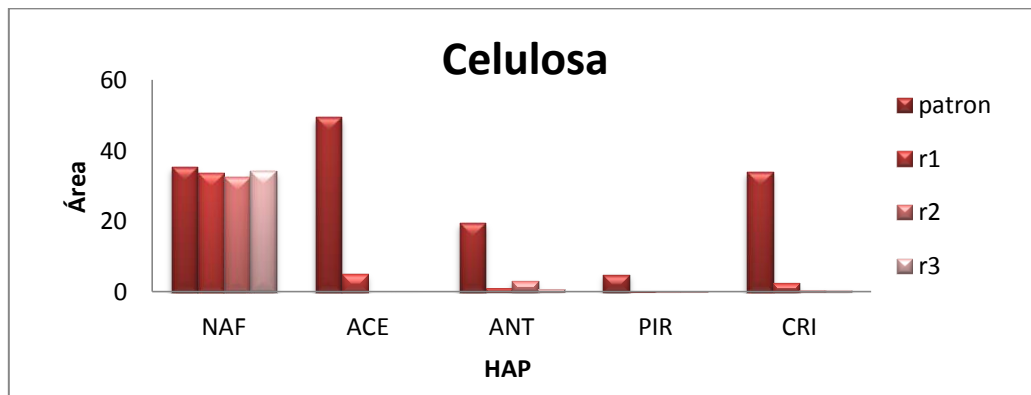


**Gráfico 19.** Áreas de réplica del filtro Celulosa.

Por otra parte se evaluó el filtro celulosa con acetonitrilo al 10% en la solución multipatrón, las áreas de las réplicas obtenidas se visualiza en el grafico 20 y también

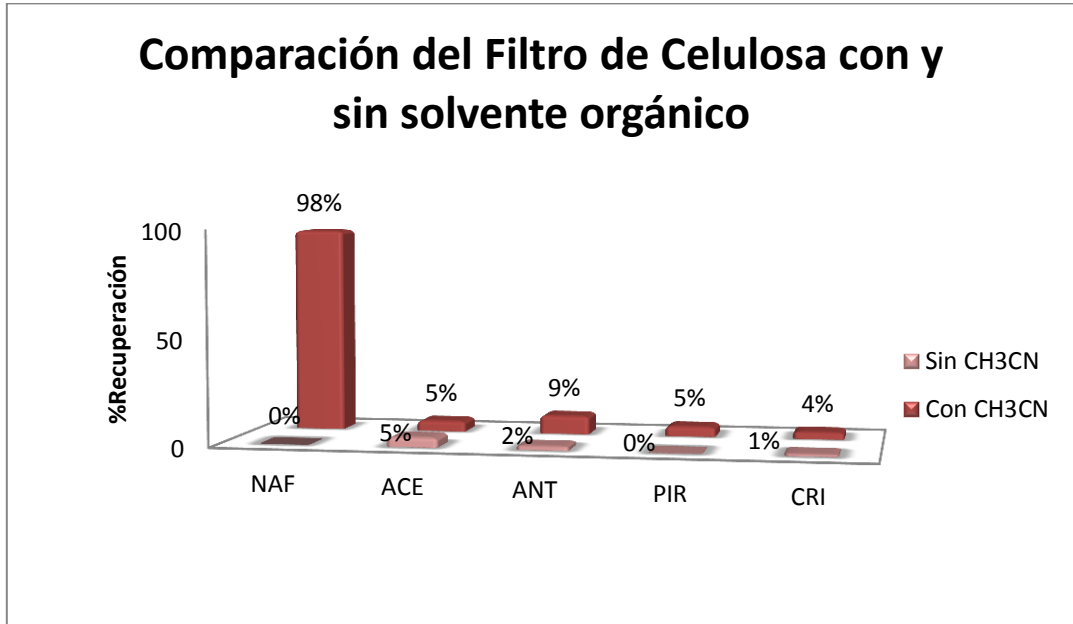


se puede apreciar que las áreas son bajas comparado con el patrón sil filtrar, a excepción del naftaleno que obtuvo áreas comparables con el mismo y mejor reproducibilidad con RSD del 3%.



**Gráfico 20.** Áreas de réplicas del filtro Celulosa con 10% de acetonitrilo.

En el gráfico 21 se agrupan los %recuperación obtenidos para el filtro de celulosa A con y sin agregado de acetonitrilo en la solución del multipatrón, en este se muestra claramente la pérdida significativa de los HAP, siendo <5% sin solvente orgánico y < 9% con acetonitrilo; a excepción del naftaleno cuya recuperación fue del 98%. Sin embargo se puede observar en el gráfico que indiferentemente si se utiliza solvente orgánico o no, este filtro no es recomendable para la filtración de muestras acuosas que contienen HAP.



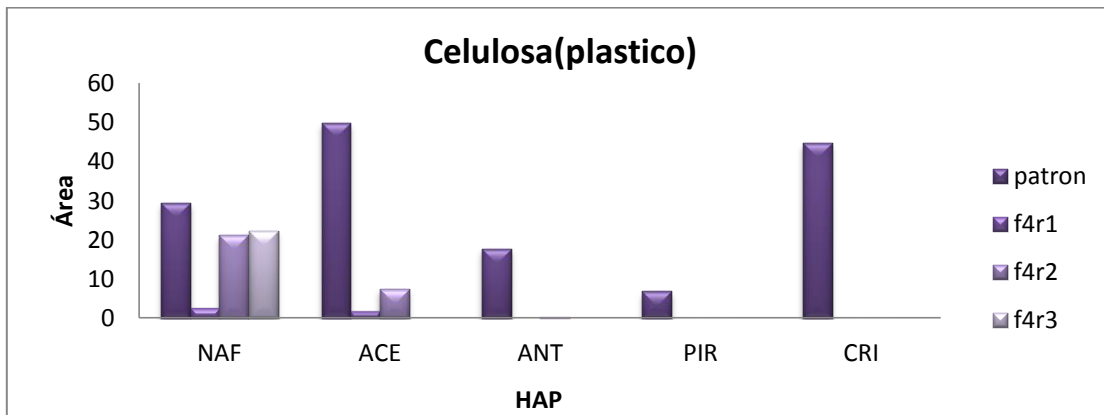
**Gráfico 21.** Comparación de los %recuperación de los HAP al 10% de acetonitrilo y sin solvente orgánico.

#### 6.4.3 Filtro celulosa B

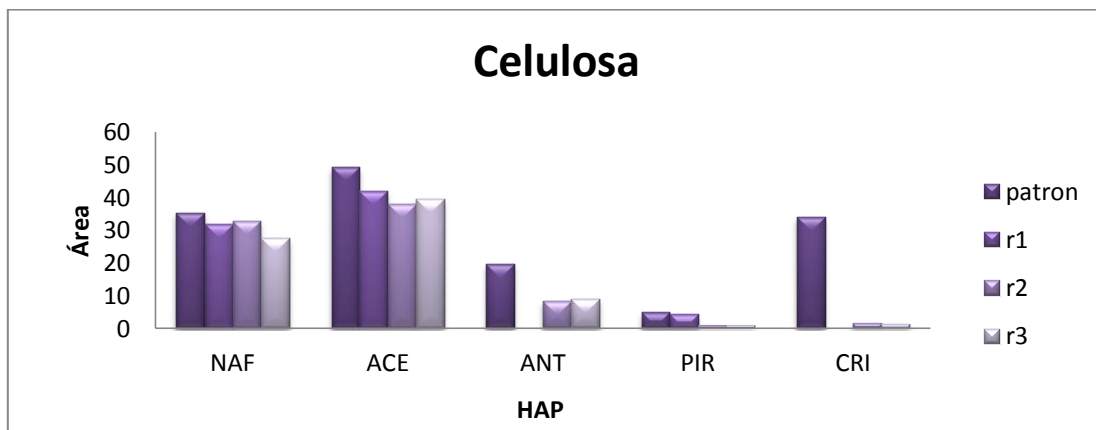
El filtro Celulosa B también tiene un diámetro de poro  $0,45 \mu\text{m}$  pero está dentro de un soporte de plástico de polipropileno, son filtros adaptables a jeringas muy utilizadas en los laboratorios para el análisis de aguas.

El gráfico 22 se puede visualizar los resultados de la filtración de la solución multipatrón sin solvente orgánico, obteniendo una dispersión alta debido a la baja recuperación con RSD entre 4 a 100% para las réplicas de los HAP de bajo peso molecular y para los compuestos de alto peso molecular, no se pudo calcular los RSD puesto que se obtuvo muy poca recuperación. En el caso del gráfico 23 donde se

muestra las áreas obtenidas de la filtración con el uso de acetonitrilo en la solución del multipatrón, la dispersión mejora un poco, sin embargo sigue siendo alta con RSD entre 3 a 8% para los HAP de bajo peso molecular y 10 a 79% para los de alto peso molecular (ver apéndice D).

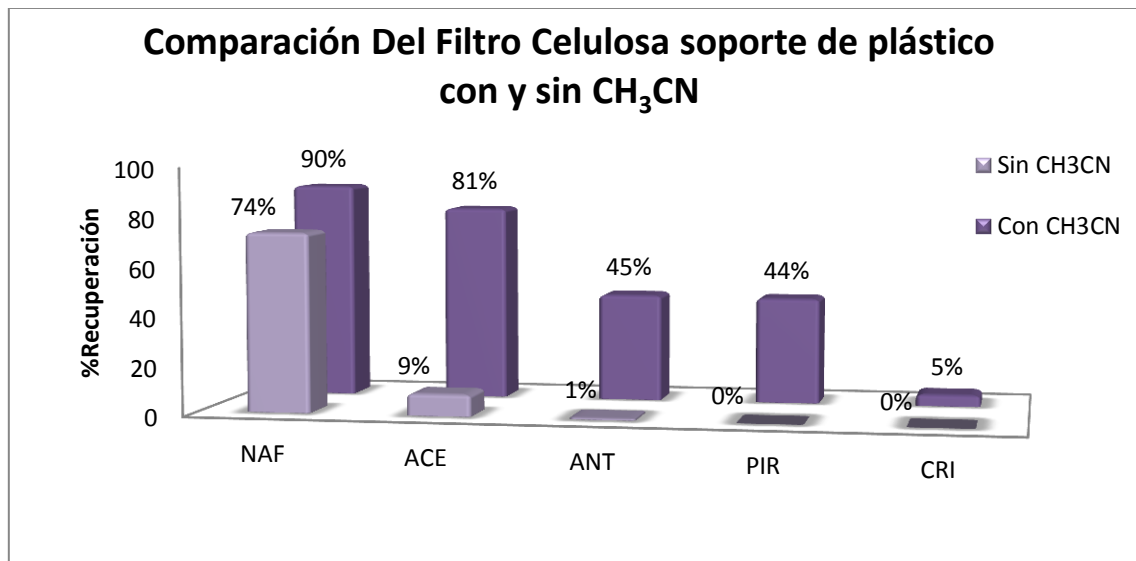


**Gráfico 22.** Áreas de réplica del filtro celulosa sin solvente orgánico.



**Gráfico 23.** Áreas de réplica del filtro de Celulosa con 10% de acetonitrilo

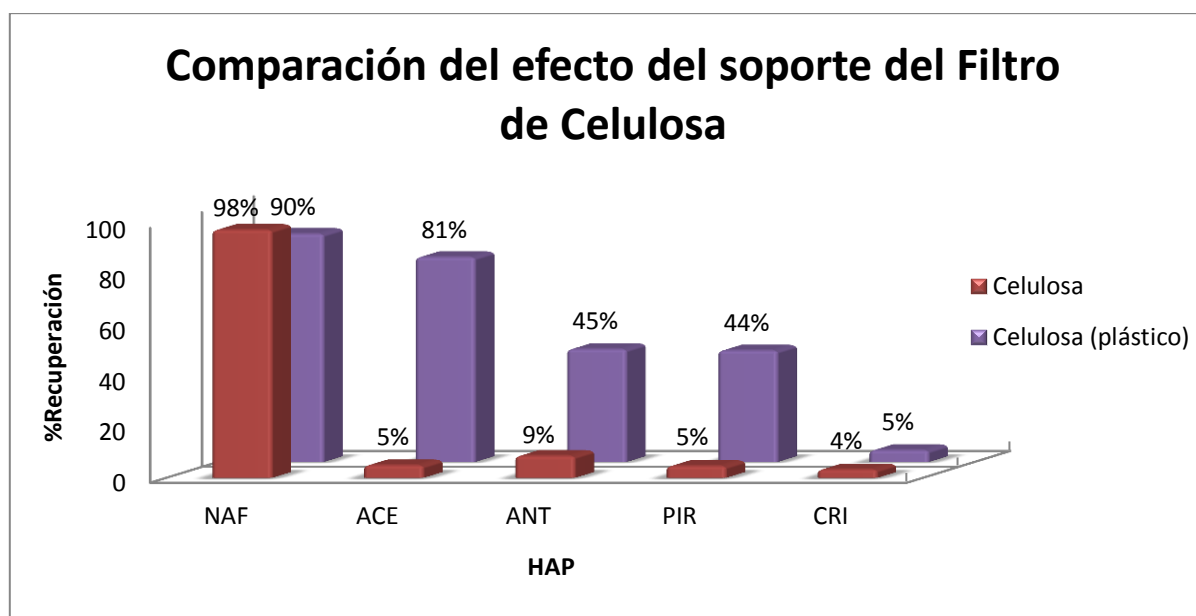
A su vez los porcentajes de recuperación se muestran en el gráfico 24. En el caso de la filtración para muestras con acetonitrilo, las recuperaciones van del 90 al 45% para los HAP de bajo peso molecular y para los de alto peso molecular son 44 y 5%. Comparando con los valores sin solvente orgánico estos estuvieron por debajo de 74% para los de bajo peso molecular, mientras que para los de alto peso molecular la recuperación fue 0%.



**Gráfico 24.** Comparación de los %recuperación de los HAP con 10% de acetonitrilo y sin solvente orgánico.

Los resultados del filtro de celulosa B con solvente orgánico muestran una mejora significativa con respecto al filtro de celulosa A, lo que indica que el material del soporte de los filtros juega un papel importante en los procesos de filtración de los HAP en matrices acuosas. Así mismo se requiere el uso de un porcentaje de solvente orgánico para facilitar la recuperación de los HAP en los procesos de filtración, sin embargo aun cuando existen mejoras con este último filtro, los porcentajes de

recuperación para los HAP que tienen un mayor peso molecular están por debajo de los valores aceptables <sup>[39]</sup>.

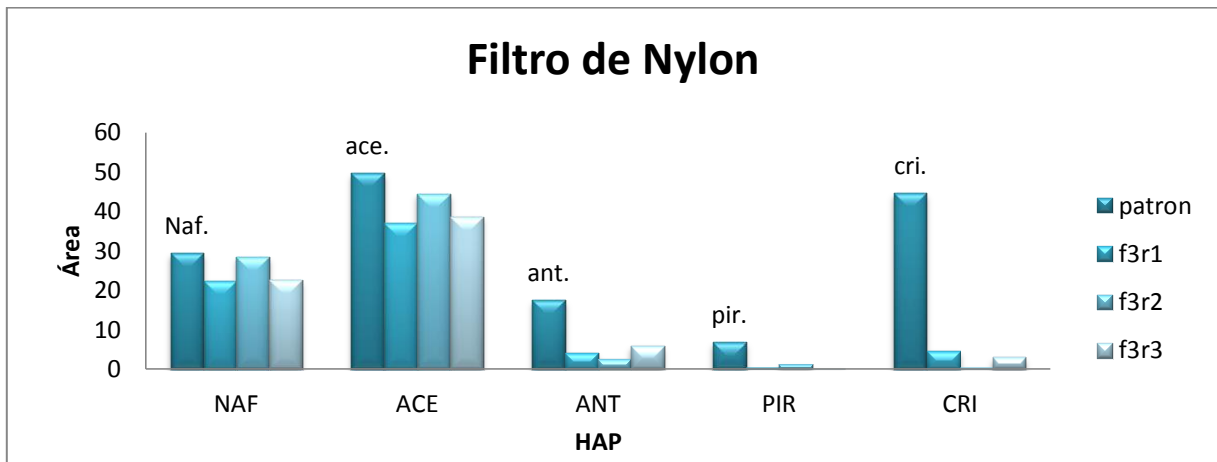


**Gráfico 25.** Estudio del efecto del soporte del filtro de celulosa.

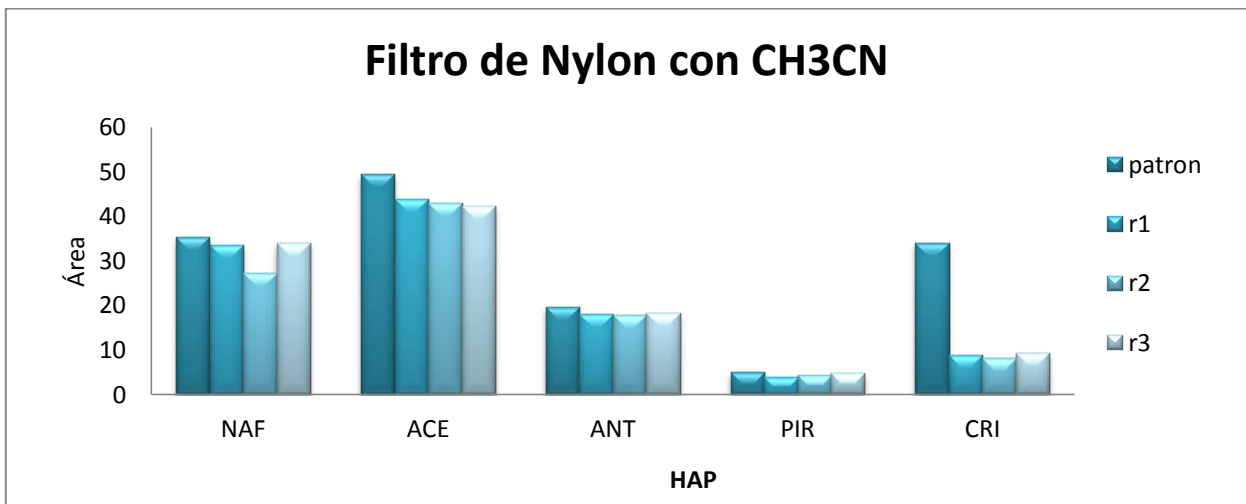
#### 6.4.4 Filtro Nylon

El filtro Nylon el cual posee un diámetro de poro  $0,45 \mu\text{m}$  con soporte de plástico se evaluó con y sin el agregado de solvente orgánico en la matriz del multipatrón de HAP. En el gráfico 26 se presentan los resultados sin agregado de acetonitrilo obteniendo una reproducibilidad moderada con desviación estándar relativa menor a 34% entre las réplicas, sin embargo para los compuestos de alto peso molecular no se aprecia dicha dispersión por las bajas recuperaciones. Mientras que el gráfico 27 muestra las áreas obtenidas de los HAP con agregado de acetonitrilo al 10% en la

solución multipatrón, en este caso el proceso de filtración genera una buena reproducibilidad para todos los HAP; para los de bajo peso molecular los valores de desviaciones estándar relativa es menor al 8% y los de alto peso el RSD es menor al 9%.

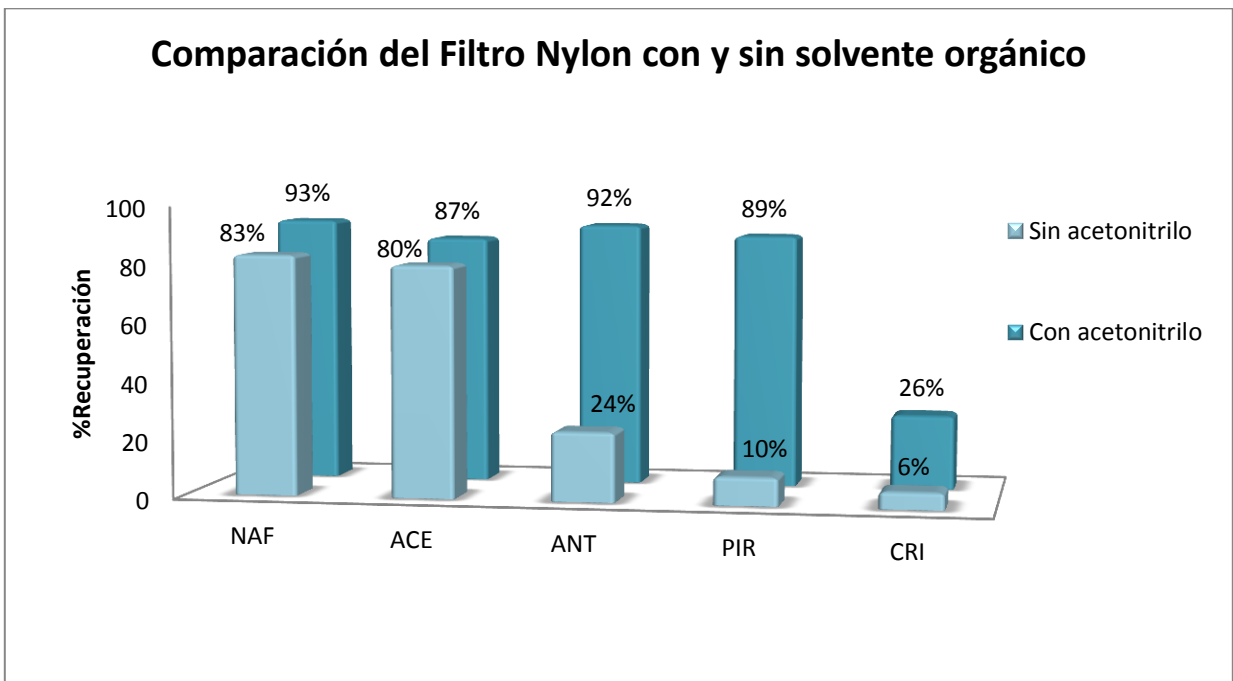


**Gráfico 26.** Áreas de réplica del filtro Nylon.



**Gráfico 27.** Áreas de réplica del filtro de Nylon con 10% de acetonitrilo.

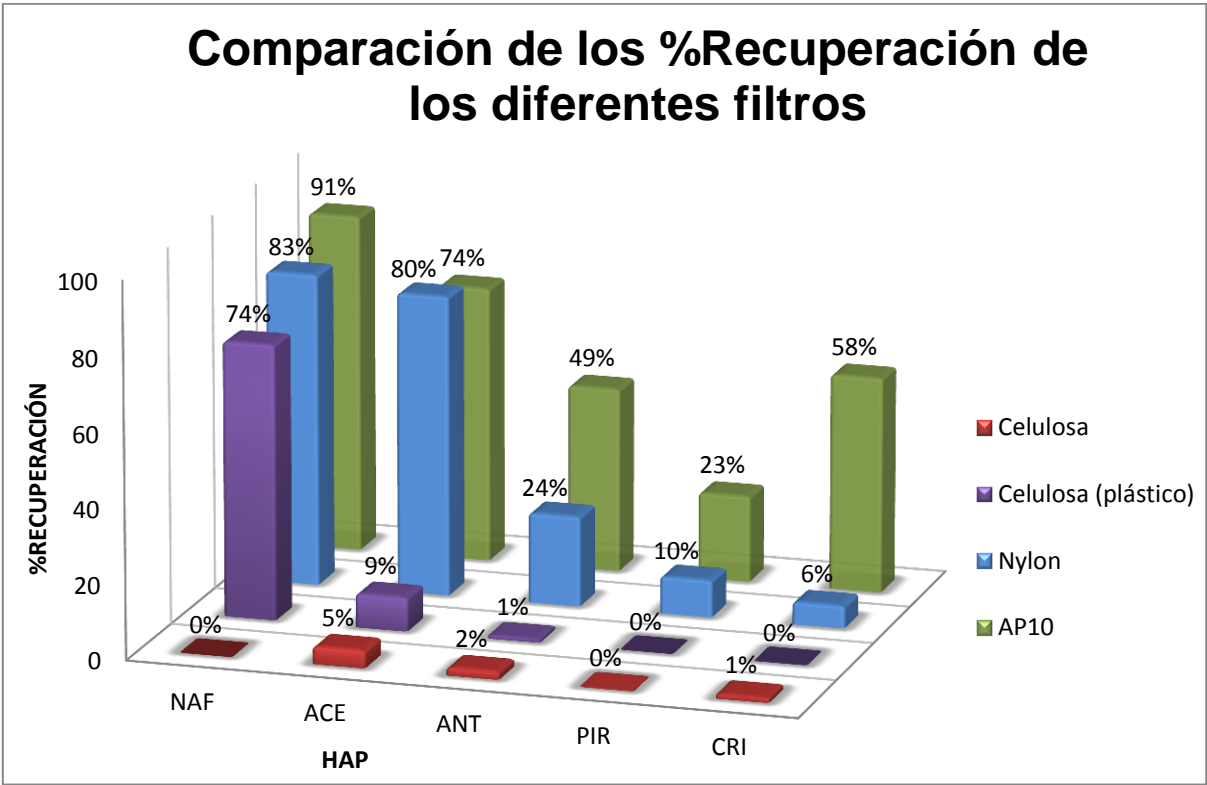
Los porcentajes de recuperación se pueden visualizar en el grafico 28; con el agregado de acetonitrilo los valores son mayores al 89% para los HAP evaluados, a excepción del criseno que presenta una baja recuperación del 26%. Comparando estos valores sin el agregado de solvente orgánico, solo el naftaleno y acenafteno muestran porcentajes de recuperación mayores al 80%, mientras que los demás HAP estudiados generaron bajos porcentajes de recuperación menores al 24%, esto nuevamente muestra la importancia del agregado de un porcentaje de solvente orgánico a la matriz acuosa del patrón para evitar su absorción en el filtro o recipiente de almacenamiento.



**Gráfico 28.** Comparación de los %recuperación de los HAP con 10% de acetonitrilo y sin solvente orgánico.

Comparando entre los cuatros tipos de filtro sin el agregado de solvente orgánico como se visualiza en el grafico 29, los filtros que presentaron mejores resultados son el

filtro de AP10 y el nylon con recuperaciones entre 23 a 91% y 6 a 83%, respectivamente. Sin embargo estas recuperaciones son bajas y sin el agregado de solvente orgánico es poca la reproducibilidad con valores de RSD para el AP10 y el nylon entre 2 a 51% y 8 a 71%, respectivamente, siendo estos valores muy altos con respecto a los aceptados [39].



**Gráfico 29.** Comparación de los %recuperación de los HAP sin solvente orgánico.

Por otra parte los valores del porcentaje de recuperación entre los cuatro filtros con 10% de acetonitrilo se muestra en el gráfico 30, al comparar con el grafico 29 correspondiente a los porcentajes de recuperación sin solvente orgánico, en general se observa que estos valores aumentaron considerablemente, inclusive para el filtro de



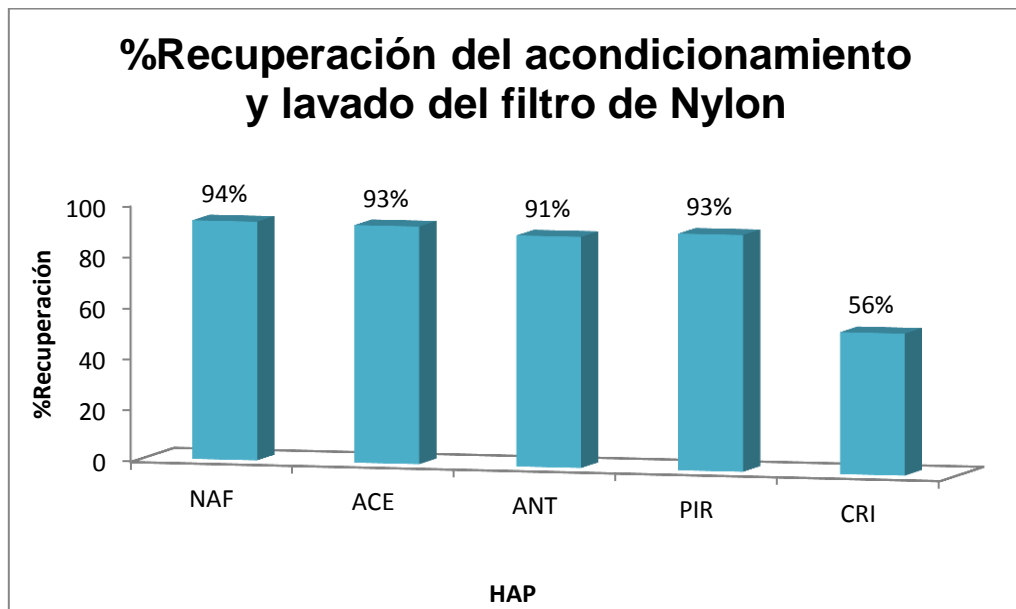
celulosa. Nuevamente los mejores resultados se obtuvieron con el filtro AP10, sin embargo presenta la desventaja de poseer un amplio rango de diámetro de poro, lo que no garantiza la eliminación de materias orgánicas y/o partículas disueltas en la muestra lo que puede generar daños en la columna del HPLC si no se utiliza una pre-columna. Considerando lo mencionado anteriormente, el filtro de Nylon que tiene un diámetro de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  es el más apropiado por su reproducibilidad y recuperación con respecto a los filtro de celulosa con diámetro de poro equivalente, lamentablemente se aprecia en el grafico que puede existir problema con este filtro para los HAP de alto peso molecular por la baja recuperación obtenida.



**Gráfico 30.** Comparación de los %recuperación de los HAP con 10% de acetonitrilo.

### 6.3.3 Efecto del lavado y acondicionamiento del filtro Nylon con acetonitrilo

Se evaluó el efecto del lavado y acondicionamiento de los filtros de nylon durante una hora en acetonitrilo <sup>[11]</sup> y luego se filtró el multipatrón de 30 ppb de cada HAP con acetonitrilo al 10% de la solución. En el grafico 31 se muestra los porcentaje de recuperación obtenidos para cada uno de los HAP evaluados, en este se obtuvo un porcentaje de recuperación por encima del 91% para los HAP de bajo peso molecular y 56% para los de alto peso molecular.



**Gráfico 31.** %Recuperación de los HAP con 10% de acetonitrilo.

Estos resultados sugieren que es necesario el proceso de acondicionamiento y lavado con solvente orgánico una vez filtrada la muestra para evitar pérdidas de los HAP en el filtro.

## **6.5 Estudio del efecto matriz de las muestras de agua.**

Es conocido que los HAP presentan poca solubilidad en agua, sin embargo estos se encuentran presentes en aguas naturales producto de la contaminación ambiental, por lo que su determinación es importante. Existen numerosos estudios de los HAP en muestras de aguas naturales de diferentes orígenes [11,12,24,], sin embargo se ha encontrado que al realizar el muestreo se pierde parte de los HAP producto de los equilibrios formados entre estos y la materia orgánica presente en la matriz, es por ello que se estudió el comportamiento de los HAP en muestras de agua de grifo y agua del Ávila, llevando a cabo el procedimiento expuesto en la sección 5.7 para la aplicación de un diseño experimental  $2^n$  [40]. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el uso del programa estadístico Statgraphics XVII, que permite evaluar el efecto de cada factor e interacciones entre ellos sobre la respuesta del sistema que en nuestro caso fue área de pico.

### **6.5.1 Análisis del diseño factorial para el Agua de grifo**

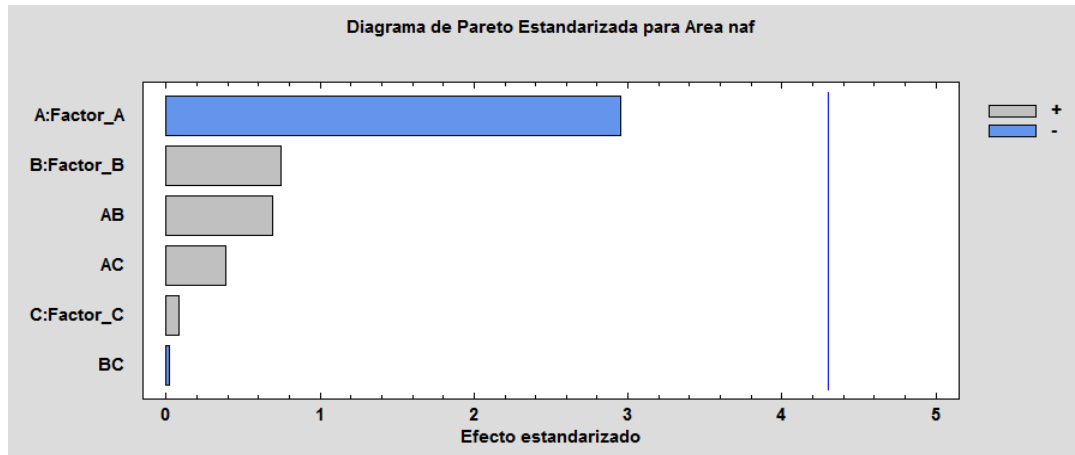
Para el estudio del efecto de cada factor: A, B y C correspondientes al tiempo, solvente y conservante en el agua de grifo, respectivamente, se aplicó el diseño experimental  $2^3$ . Estos factores se evaluaron con una solución multipatrón de 30 ppb de cada HAP, los resultados obtenidos para cada muestra se presentan en la tabla 16.

**Tabla 16.** Resultados de Áreas de pico obtenidas con el experimento 2<sup>3</sup> para cada HAP en la matriz del agua de grifo.

Experimento	A	B	C	Naftaleno	Acenafteno	Antraceno	Pireno	Criseno
1	-	-	-	44,9	49	11	1,3	2,9
2	-	-	+	42,7	48,1	11,1	1,2	3,6
3	-	+	-	45,5	54,4	22,9	4,0	13,8
4	-	+	+	43,0	53,9	18,6	4,2	18,2
5	+	-	-	14,0	10,6	5,7	1,1	2,5
6	+	-	+	17,7	16,3	7,0	1,1	3,3
7	+	+	-	25,1	38,7	20,8	3,9	13,7
8	+	+	-	28,6	47,4	17,9	4,2	18,2

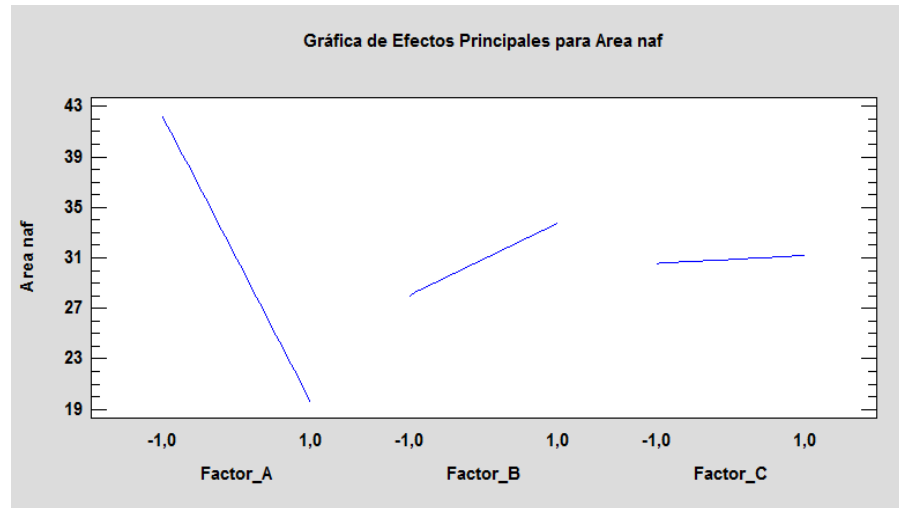
#### 6.5.1.1 Naftaleno.

En el gráfico 32 correspondiente al diagrama de Pareto para el naftaleno, se muestra el efecto de cada factor y sus interacciones, es de indicar que los factores deben superar el límite de significación para establecer que los efectos son significativos. Este límite es calculado por el programa usualmente suponiendo que las interacciones de tercer orden no son significativas y que su variación es producto de un error aleatorio. Para este diagrama se observa que todos los factores no son significativos, por tanto se suponen que todos carecen de influencia. Sin embargo, se aprecia que el factor A (tiempo de análisis) exhibe un efecto marcado con respecto a los otros factores y es de tendencia negativa, lo que significa que puede existir una mayor respuesta a un menor tiempo de preparación de muestra. En la tabla 16 se aprecia para el naftaleno que se obtiene mejores respuesta en el nivel más bajo para el factor A, lo que afirma esta hipótesis.



**Gráfico 32.** Diagrama de Pareto estandarizada para el naftaleno.

Otra forma de evaluar el nivel de significancia y la tendencia de los factores sobre la respuesta es el gráfico de los efectos principales de cada variable como se muestra en el gráfico 33, mientras mayor es la pendiente de un factor mayor es su efecto sobre la respuesta. En el gráfico se puede apreciar el marcado nivel de significancia que presenta el tiempo de análisis, ya que la pendiente es pronunciada además es de tendencia negativa. Mientras que el efecto del acetonitrilo y tiosulfato de sodio tienen pendientes positivas, sin embargo no son tan pronunciadas como en el caso del tiempo. Estos resultados indican que probablemente existió un error fuera de lo normal en las interacciones del tercer orden que afectaron el límite de significación e impidieron demostrar en el diagrama de Pareto (gráfico 32) que el factor A es una variable significativa para el naftaleno.



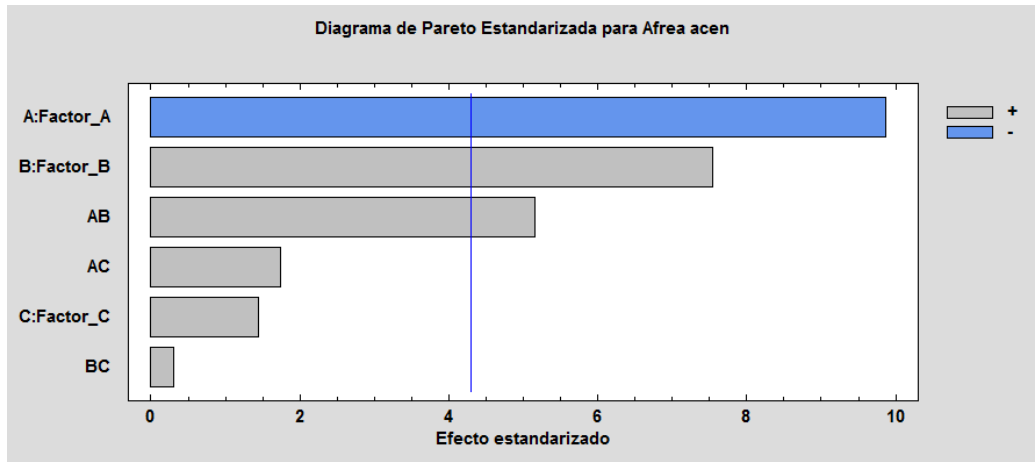
**Gráfico 33.** Gráfica de efectos principales para el naftaleno.

Es así que para el naftaleno es importante analizar las muestras de agua de grifo en el menor tiempo posible, dado que a medida que transcurre el tiempo se ve desfavorecido el análisis por la caída de la señal, lo cual se asemeja al comportamiento encontrado para los patrones de naftaleno en matrices acuosas y con agregado de solvente orgánico para el primer día de análisis (gráficos 1 y 7).

#### 6.5.1.2 Acenafteno.

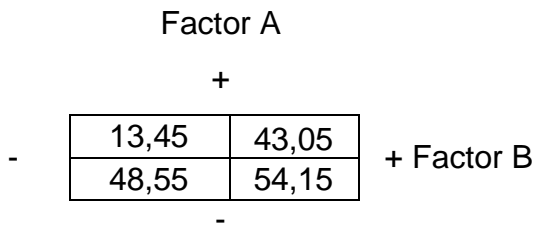
En el diagrama de Pareto para el acenafteno correspondiente al gráfico 34, se puede observar que los factores que generan mayor efecto son: el tiempo, el solvente y la interacción tiempo-solvente (AB). Nuevamente el signo negativo para el tiempo indica que la mayor respuesta se obtiene cuando se analiza la muestra en la condición más baja. En el caso del solvente cuya tendencia es positiva, se tiene mejores respuestas a

mayor porcentaje de acetonitrilo al 20%. Por otra parte el agregado de tiosulfato de sodio no es significativo.



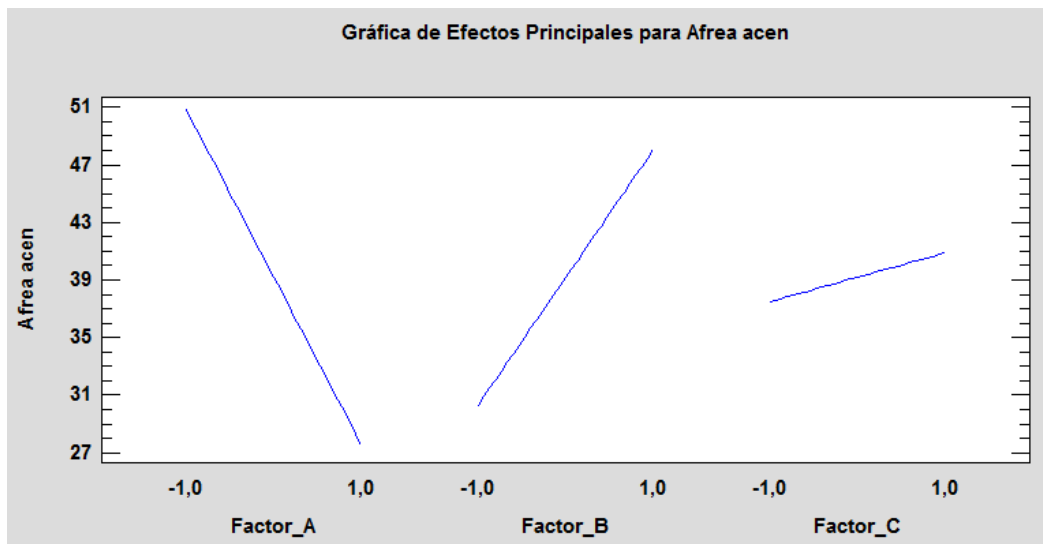
**Gráfico 34.** Diagrama de Pareto estandarizada para el acenafteno.

Se realizó un diagrama de interacción tiempo-solvente para establecer cuál de las condiciones de interacción favorecían la respuesta. Como se muestra en la figura 14. Se obtienen mayores áreas cuando los niveles son A (-)= 0 horas y B (+)= 20% de solvente, que corresponde a los experimentos 3 y 4 de la tabla 18.



**Figura 14.** Diagrama de interacción tiempo-solvente para el acenafteno.

De cada factor se graficaron los efectos principales para el acenafteno como se muestra en el grafico 35, se observa que el tiempo presenta una tendencia bastante pronunciada y negativa, indicando la influencia en las áreas obtenidas. En contraste el solvente cuya pendiente también es pronunciada y positiva presentando en este caso mejores resultados al aumentar la concentración del solvente. Finalmente el tiosulfato de sodio presenta una pendiente poco pronunciada por lo que no influye en el análisis, lo cual coincide con el diagrama de pareto (grafico 34).



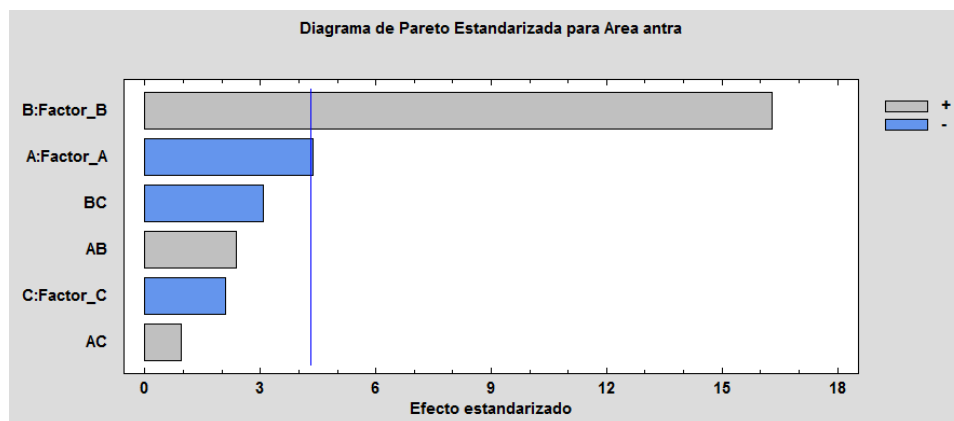
**Gráfico 35.** Gráfica de efectos principales para el acenafteno.

Las condiciones para el análisis del acenafteno en la muestra de agua de grifo es a menor tiempo (0 horas) y mayor concentración de solvente (20% de acetonitrilo).



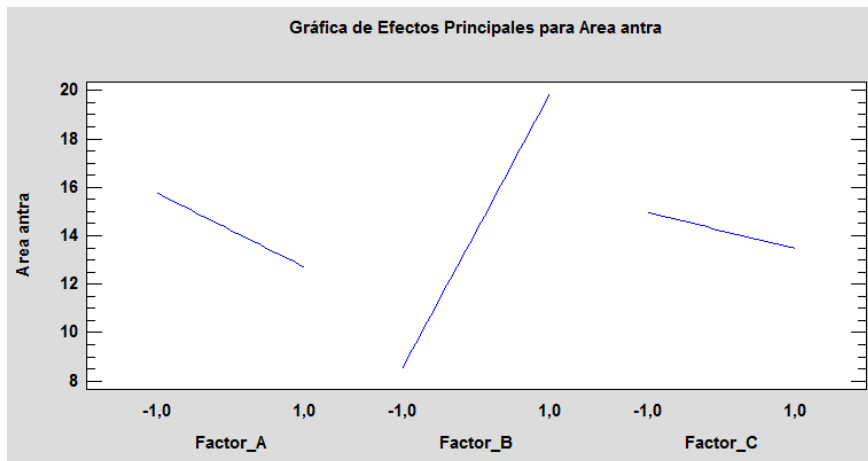
### 6.5.1.3 Antraceno.

En el caso del antraceno se observa en el diagrama de Pareto, mostrado en el grafico 36, que el único factor significativo es la concentración del solvente, desplazando el efecto del tiempo, presentando tendencia positiva por lo que se obtienen mejores respuestas cuando el porcentaje de acetonitrilo es mayor. Las demás variables experimentales no son significativas, por tanto su efecto carece de influencia. En la tabla 18 se muestran las áreas del antraceno con mejores resultados para la solución al 20% de acetonitrilo, experimentos 3, 4, 7 y 8.



**Gráfico 36.** Diagrama de Pareto estandarizada para el antraceno.

De acuerdo a los resultados del análisis factorial se graficó los efectos principales de cada factor, en el grafico 37 se aprecia que la pendiente del factor solvente presenta un efecto significativo con tendencia positiva, lo que coincide con el diagrama de pareto para el antraceno, indicando que al aumentar el porcentaje de solvente aumenta su señal. En los casos de tiempo y agregado de tiosulfato de sodio tienen una pendiente menos pronunciada, indicativo de su bajo efecto.

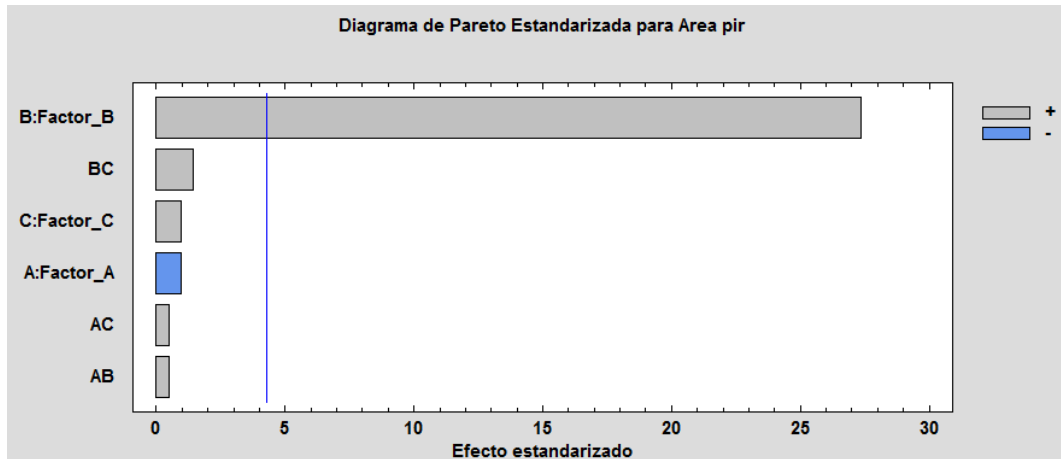


**Gráfico 37.** Gráfica de efectos principales para el antraceno.

Al igual que el acenafteno, el antraceno presenta mejores respuestas con el aumento del porcentaje del solvente orgánico en la solución mientras que el tiempo es irrelevante. Esto puede indicar que el solvente orgánico estabiliza y aumenta la solubilidad del antraceno en la solución acuosa en la matriz del agua de grifo.

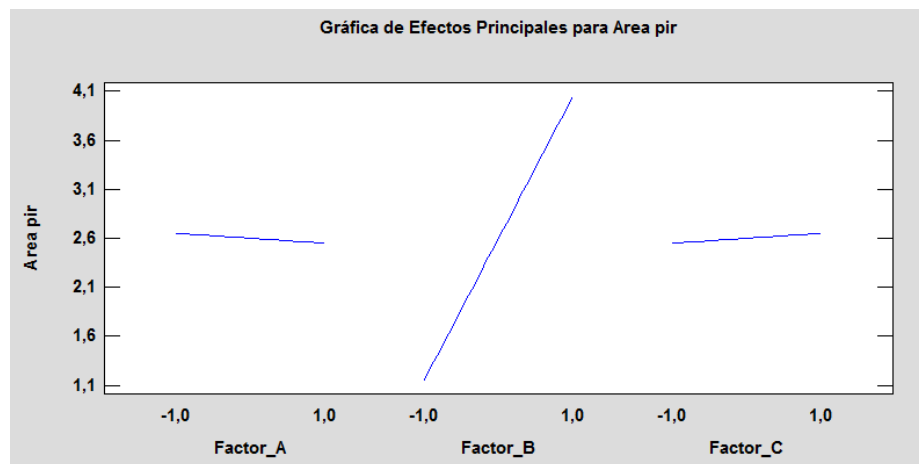
#### 6.5.1.4 Pireno.

En el diagrama de Pareto para el pireno presentado en el grafico 38, se observa que el único factor significativo es el solvente (B) al igual que en el caso del antraceno y muestra una tendencia positiva, indicando que al aumentar el porcentaje de solvente orgánico se genera mejores resultados. Por otra parte, los demás factores no son significativos.



**Gráfico 38.** Diagrama de Pareto estandarizada para el pireno.

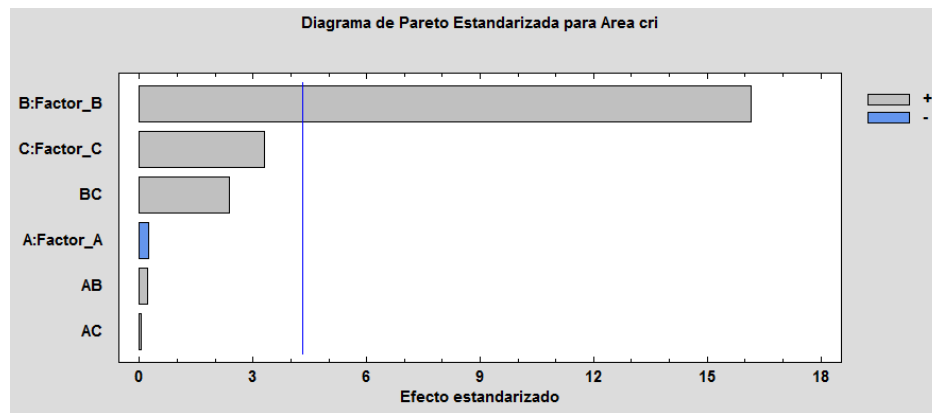
Los efectos principales para el pireno se muestran en el gráfico 39, en el cual se puede apreciar una pendiente muy pronunciada para el factor B correspondiente al solvente, favoreciendo el nivel alto (20% de solvente).



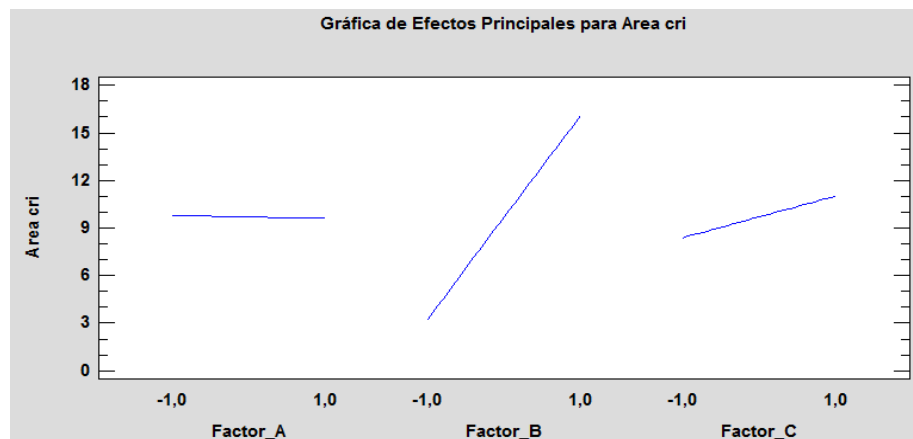
**Gráfico 39.** Gráfica de efectos principales para el pireno.

### 6.5.1.5 Criseno.

El diagrama de Pareto para el criseno mostrado en el grafico 40, se observa que el solvente nuevamente presenta un efecto muy importante al igual que en los casos del pireno y antraceno. El efecto del tiempo y tiosulfato de sodio nuevamente no son significativos. Estos resultados son reafirmados en el grafico 41 de efecto principal en donde la única pendiente pronunciada se presenta para el factor B.



**Gráfico 40.** Diagrama de Pareto estandarizada para el criseno.



**Gráfico 41.** Gráfica de efectos principales para el criseno.

En general los gráficos presentados anteriormente muestran que existe una mejora significativa del área de pico con el uso de 20% de acetonitrilo en la muestra por lo que es necesario el uso de este solvente en la muestra de agua de chorro. Con respecto al naftaleno y el acenafteno a pesar de presentar mayor solubilidad en agua no son estables en el tiempo en esta matriz acuosa. Algunos estudios atribuyen esta baja estabilidad a la baja presión de vapor que presenta el naftaleno e incluso plantean que es necesario evitar espacios vacíos entre el septum y la solución ya que estos favorecen la formación del equilibrio líquido-gaseoso <sup>[51]</sup>.

Para los resultados de este estudio no se observó ninguna influencia del agregado de tiosulfato de sodio en la determinación de HAP en la muestra como lo plantea el Método 601 de la US EPA para aguas de grifos. Sin embargo, como se desconoce si el agua de grifo estudiada tiene o no residuos de cloro por la potabilización y que este reactivo no genere efectos negativos sobre la señal se recomienda su uso según lo indicado en estas normas <sup>[8]</sup>.

### **6.5.2 Agua de río**

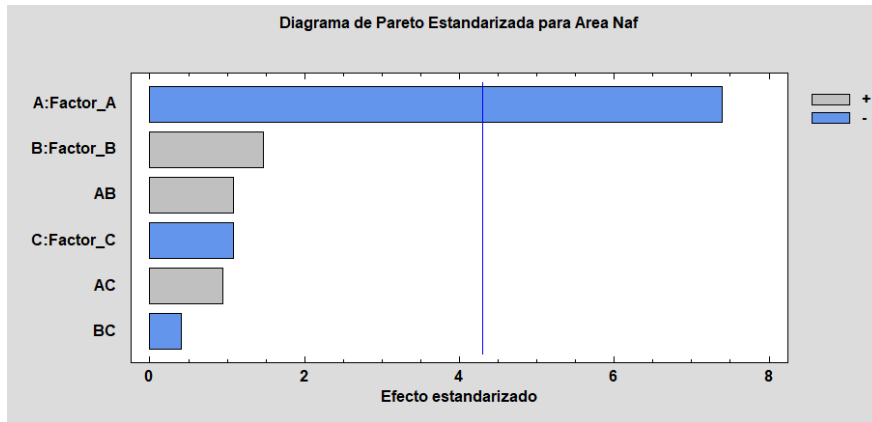
Para el estudio del comportamiento de los HAP en muestras de agua de río se evaluaron tres tipos de factores: Factor A, B y C correspondientes al tiempo, solvente y variación de pH, respectivamente. El efecto de estos factores, se evaluaron con el agregado de una solución multipatrón de 30 ppb de cada HAP sobre la matriz de esta muestra, contando con un total de 8 experimentos como se muestra en la tabla 17. Los experimentos fueron realizados en muestras de agua natural proveniente del Parque Nacional Waraira Repano de la Ciudad Capital comúnmente conocido como El Ávila.

**Tabla 17.** Resultados de Áreas de pico obtenidas con el diseño de experimento 2<sup>3</sup> para cada HAP en la matriz del agua de río.

Experimento	A	B	C	Naftaleno	Acenafteno	Antraceno	Pireno	Criseno
1	-	-	-	44,7	52,9	11,4	1,4	4,0
2	-	-	+	37,9	56,3	12,3	2,0	6,8
3	-	+	-	46,3	60,9	18,0	3,8	13,4
4	-	+	+	39,0	59,9	17,2	3,4	12,3
5	+	-	-	10,7	21,7	9,2	1,2	3,5
6	+	-	+	12,8	23,3	9,1	1,6	6,5
7	+	+	-	22,2	44,9	17,4	3,8	13,3
8	+	+	-	19,1	41,0	16,5	3,3	12,1

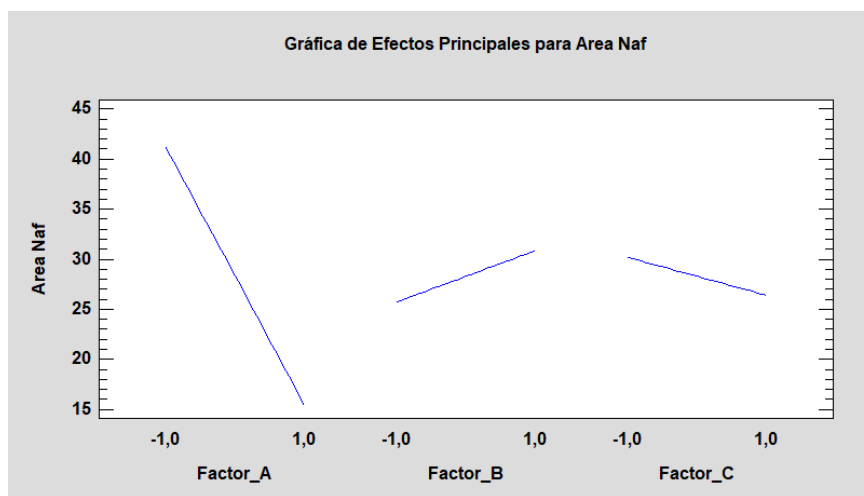
#### 6.5.2.1 Naftaleno.

En el grafico 42 correspondiente al diagrama de Pareto para el naftaleno se aprecia que el único factor significativo es el tiempo de espera para el análisis de las muestras, con signo negativo lo que indica que se obtienen mejores resultados cuando la muestra es analizada al momento de su preparación (t= 0 hora). Los demás factores experimentales no son significativos por lo que carecen de influencia.



**Gráfico 42.** Diagrama de Pareto estandarizada para el naftaleno.

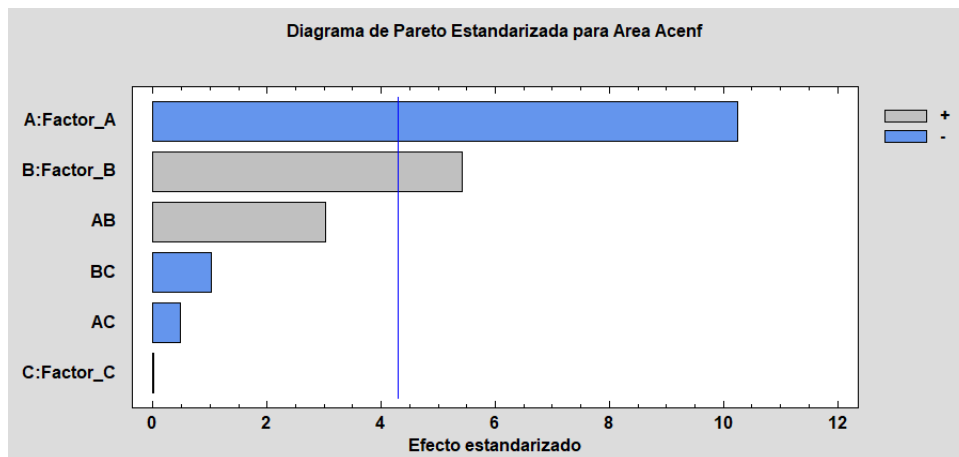
El efecto del factor principal para el naftaleno se visualiza en el gráfico 43, en el cual se aprecia nuevamente una pendiente muy pronunciada con tendencia negativa para el tiempo (factor A), mientras que los demás factores generan poca significancia dado que sus pendientes no son pronunciadas. Este comportamiento fue similar al observado para este compuesto para el agua de grifo.



**Gráfico 43.** Gráfica de efectos principales para el naftaleno.

### 6.5.2.2 Acenafteno.

En el gráfico 44 que muestra el diagrama de Pareto para el acenafteno, se observan que los factores significativos son: el tiempo (factor A) y el solvente (factor B). El tiempo presenta una mayor respuesta que el solvente con tendencia negativa, indicando una vez más que las muestras deben ser analizadas al menor tiempo de ser preparadas. A su vez el solvente presenta una tendencia positiva, lo que exhibe que a mayor concentración del solvente se obtienen mejores respuesta en el análisis. En este caso no se observó interacciones de segundo orden.

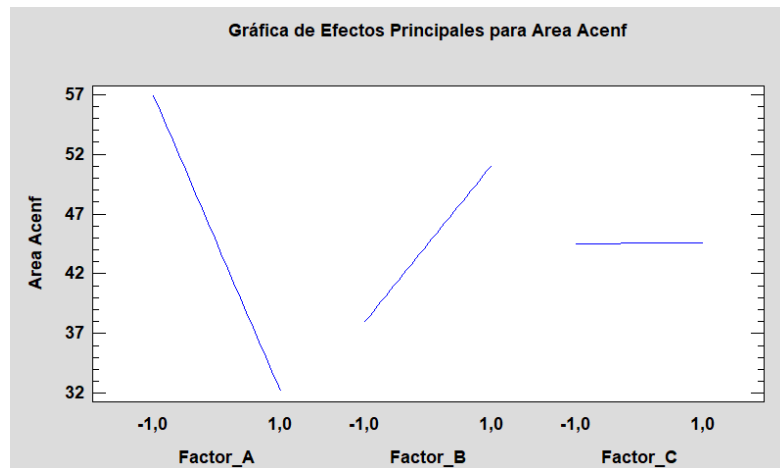


**Gráfico 44.** Diagrama de Pareto estandarizada para el acenafteno.

El gráfico de efectos principales para el acenafteno se presenta en el gráfico 45, en el cual se puede visualizar la pendiente pronunciada con tendencia negativa para el factor A correspondiente al tiempo, que al igual que en el caso del naftaleno indica que a medida que transcurre el tiempo se ve desfavorecido el análisis con pérdida de la señal. Para el caso del factor B correspondiente al solvente orgánico su pendiente



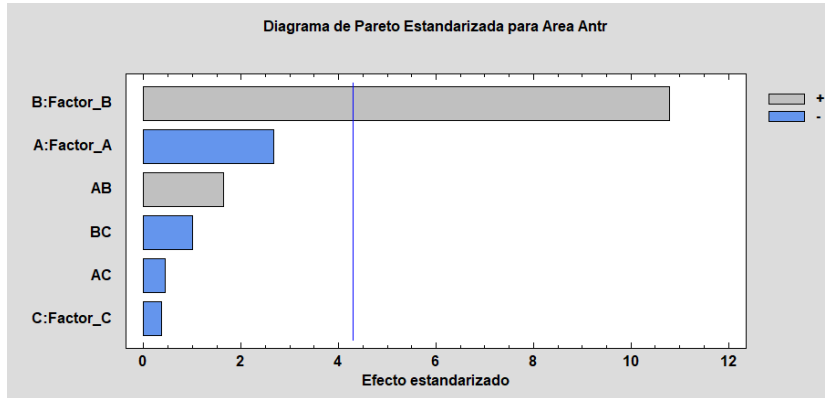
también es pronunciada pero positiva, lo que puede indicar que al aumentar el porcentaje de solvente orgánico permite aumentar la solubilidad del acenafteno en la matriz acuosa, estos dos factores son predominantes con respecto al factor de pH que presenta una pendiente casi nula, indicando que su influencia es nula.



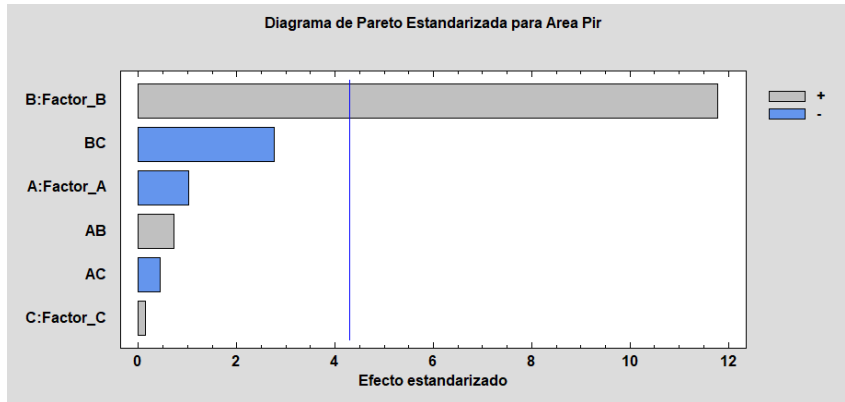
**Gráfico 45.** Gráfica de efectos principales para el acenafteno.

### 6.5.2.3 Antraceno, Pireno y Criseno.

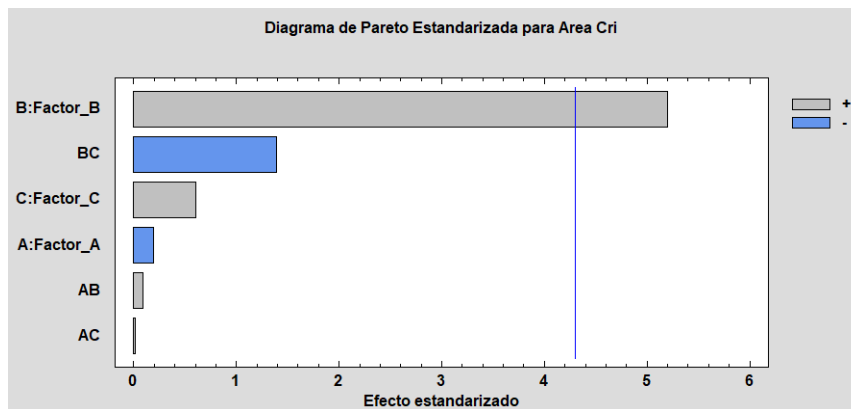
Los compuestos antraceno, pireno y criseno en la muestra de agua de río presentaron un comportamiento similar que en el agua de grifo, como se aprecia en el diagrama de pareto correspondiente al gráfico 46, 47 y 48, respectivamente, el único factor que genera un efecto significativo es el solvente, cuya tendencia es positiva, es decir se ve favorecida la estabilidad de estos compuestos al aumentar el porcentaje del solvente orgánico. Los demás factores y sus respectivas interacciones no son significativos.



**Gráfico 46.** Diagrama de Pareto estandarizada para el antraceno.

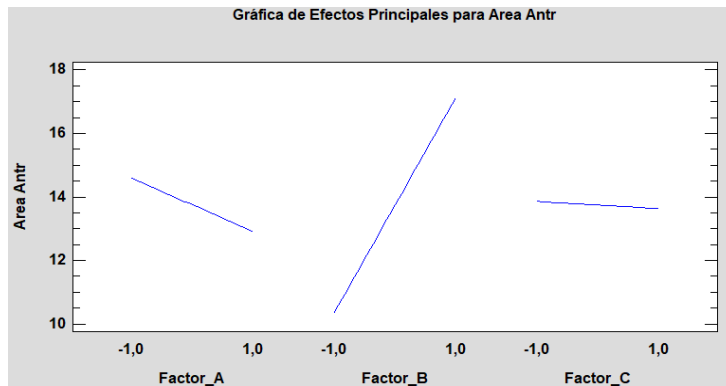


**Gráfico 47.** Diagrama de Pareto estandarizada para el pireno.

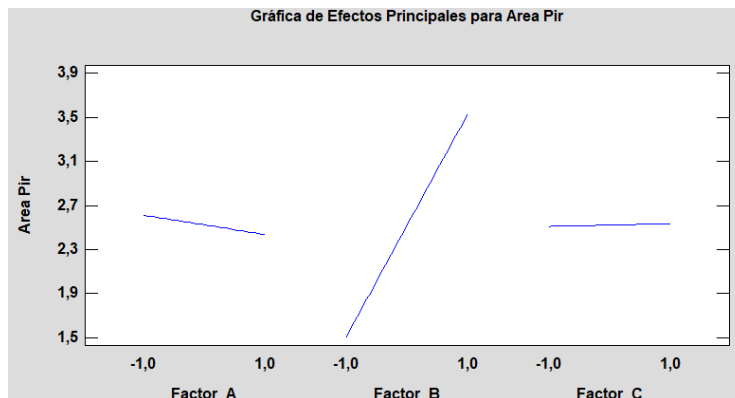


**Gráfico 48.** Diagrama de Pareto estandarizada para el Criseno.

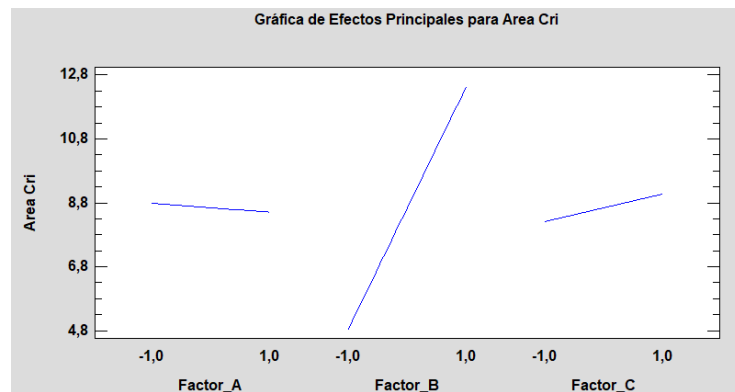
En el estudio estadístico de efectos principales para antraceno, pireno y criseno, gráficos 49, 50 y 51 respectivamente, también se aprecia que el efecto con mayor pendiente es el factor B, siendo el más importante.



**Gráfico 49.** Gráfica de efectos principales para el antraceno.



**Gráfico 50.** Gráfica de efectos principales para el pireno.



**Gráfico 51.** Gráfica de efectos principales para el Criseno.

En conclusión los gráficos presentados anteriormente exhiben un efecto matriz importante y que es necesario el uso de solvente orgánico, en este caso acetonitrilo, para estabilizar los HAP viéndose favorecidos los de alto peso molecular, incluyendo el antraceno. Al igual que en la muestra de agua de grifo, el naftaleno y acenafteno, a pesar de ser más solubles en agua, presentaron caída de señal o pérdidas en la muestras de agua de río al poco tiempo de ser preparadas, esta pérdida de señal para el caso de naftaleno se le puede atribuir a la baja presión de vapor que presenta el mismo, lo que puede influir en su estabilidad en medios acuosos <sup>[51]</sup>.

Nuevamente ha quedado demostrado que es importante el uso de solvente orgánico como lo han indicado algunos autores, sin embargo el % de este solvente va depender de la técnica de extracción aplicada, nuestro análisis fue por inyección directa de muestra y se observó que mientras mayor es el % de solvente orgánico mejor fue el resultados. En cuanto al pH no se observó ningún efecto sobre la respuesta por lo que puede utilizarse bajos pH en las muestras de agua de rio como herramienta para evitar la formación de baterías que pueden degradar los HAP en este tipo de agua <sup>[26, 52, 53, 54]</sup>.

## VII. CONCLUSIONES

- Las curvas de calibración de los patrones acuosos sin la adición de solvente orgánico mostraron buena linealidad con  $r^2 > 0,9998$  y sensibilidad en el primer día de análisis, sin embargo presentaron pérdida de señal al transcurrir el tiempo.
- Las curvas de calibración de los patrones acuosos con solvente orgánico presentaron mejoras en la sensibilidad y linealidad con  $r^2 > 0,9989$ , se mantuvieron estables hasta el segundo día de análisis, evidenciando que es necesario el uso de solvente orgánico para favorecer la estabilidad de los HAP en solución acuosa.
- El filtro que mostró mayor recuperación sin solvente orgánico fue el AP10 con recuperaciones mayores al 49% para los HAP ligeros y  $>23\%$  para HAP pesados con  $CV < 39\%$  y  $CV < 51\%$ , respectivamente.
- Los filtros que mostraron mejores recuperaciones con el agregado de solvente orgánico fueron el AP10 y Nylon.
- Para el filtro AP10 se obtuvieron recuperaciones  $>90\%$  para los HAP ligeros con  $CV < 5\%$  mientras que para los pesados fueron  $>72\%$  con  $CV < 26\%$ , sin embargo al poseer un tamaño de poro amplio de  $0,2-0,6\ \mu\text{m}$  no es apropiado para los análisis de rutina en HPLC.
- El filtro de Nylon presentó buenas recuperaciones con el agregado de solvente orgánico para los HAP ligeros con valores  $>87\%$  y  $CV < 8\%$ , pero sus valores de recuperación fueron bajos para los HAP pesados con valores  $>26\%$  y  $CV < 9\%$ .

- Con el acondicionamiento de los filtros de nylon con acetonitrilo se obtiene mejoras en la recuperación de los HAP, lo que indica la adherencia de los mismos en el filtro.
  
- En la evaluación de la estabilidad de los HAP en matriz de agua de chorro y natural con un diseño factorial se determinó que es necesario el análisis de los HAP el primer día de ser colectadas las muestras para los HAP de bajo peso molecular, mientras que para los HAP pesados, incluyendo el antraceno, es necesario el uso de solvente orgánico como acetonitrilo al 20% para mejorar la estabilidad de los mismo en esta matriz si se aplica métodos de análisis de inyección directa.

## VIII. RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar el comportamiento de los HAP en medios acuosos sin agregado de estándares mediante inyección directa al HPLC-FLD o utilizando técnicas de pre-concentración como SPE o SPME.
  
- ✓ Evaluar los HAP mediante HPLC-FLD con gradiente de elución para ampliar el estudio a otros HAP.
  
- ✓ Si se aplica técnicas de pre-concentración SPE o SPME, estudiar nuevamente los efectos del solvente, tiempo y tiosulfato de sodio en la estabilidad y mejora de respuesta de los HAP.

#### IV. REFERENCIAS

- [1] Santana J., Valdés M., Olivares S., Lima L. Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos ligeros en aguas superficiales de los ríos Almendares y Luyanó en la Habana. *CENIC Cs. Quím.* 2012; 43: 1-7.
- [2] Manoli E., Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *Trends in Analytical Chem.* 1999; 18 (6): 417-428.
- [3] International Agency for research on cancer (IARC). IARC monographs on the evaluations of carcinogenicity risks to human. Overall evaluations of carcinogenicity an updating of IARC monographs. Lyon 1987; 17:1-42.
- [4] Cameán A., Jos, A., Moreno I., Pichardo S., Repetto M. Tóxicos formados durante el proceso, preparación y almacenamiento de los alimentos. *Toxicología Alimentaria.* Madrid: Ediciones Díaz de Santo; 2012. Pag. 493-497.
- [5] United States Environmental Protection Agency (USEPA). Priority Pollutant List [Internet]. 2014. [Consultado el 24/01/2017]. Disponible en: [www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf](http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf)
- [6] Díaz, N. Análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable mediante cromatografía de gases con detector selectivo de espectrometría de masas. Desarrollo y validación de un método analítico. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. México, 2000.
- [7] Bernalte, E. Desarrollo y aplicabilidad de metodologías analíticas para la evaluación de contaminantes ambientales de especial peligrosidad: Hidrocarburos aromáticos policíclicos y mercurio. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. España, 2013. p. 22-23.
- [8] EPA. Method 610: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. [Internet]. Promulgated 1984. [Consultado 24/01/2017]; Disponible en: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method\\_610\\_1984.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_610_1984.pdf)



- [9] Ishizaki, A., Saito, K., Hanioka, N., Narimatsu, S. Kataoka, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chrom. A Elsevier*. 2010, 1217: 5555-5563.
- [10] Wegrzyn E., Grzékiewicz S., Poplawska W. y Glód B. Modified analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons, using sec for samples preparation and RP-HPLC with fluorescence detection. Application to different food samples. *Acta Chrom*. 2006; 17: 233-250.
- [11] Vera L., Cázares E, Covarrubias R., Camacho E. Metodología en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos polinucleares en agua a nivel de ultratrazas. *Rev. Int. Contam. Ambient*. 2002; 18 (1): 5-16.
- [12] García M., Cancho B., Simal J. Stirring bar sorptive extraction in the determination of PAHs in drinking waters. *Water Research*. 2004; 38: 1679–1684.
- [13] García M., Pérez M., Simal J. Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52: 6897–6903.
- [14] Omaña L. Optimización de la técnica de micro-extracción en fase sólida para el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de agua. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Venezuela, 2016.
- [15] García S. y Pérez R. Aplicaciones de la cromatografía líquida con detector de diodos y fluorescencia al análisis de contaminantes medioambientales. España: Editorial Ciemat. 2012. Pág. 11-12.
- [16] Huang, Y. Determination of low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by high performance liquid chromatography with tandem fluorescence and diode-array detectors. *Chemosphere*. 2013; 92: 1010-1016.
- [17] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ASTDR) [Internet]. 2016. Resúmenes de Salud Pública-Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. [Consultado en 12/02/17]. Disponible en: [www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs69.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html)

- [18] Mastandrea C., et al. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riegos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 2005; 39(1): 27-36.
- [19] García, M. J. Los Hidrocarburos aromaticos policíclicos asociados a combustibles fósiles. Caracterización, análisis y remediación. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. España, 2005. p. 31.
- [20] US EPA. Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. Cincinnati, OH. *Final Draft. : Environmental Criteria and Assessment Office.* 1993. ECAO-CIN-842.
- [21] Sarria R., Sánchez X., Pérez E. Estandarización de un método para el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de agua empleando espectroscopia ultravioleta y HPLC. *Journal de Cs. en Ing.*2016; 8: 39-46.
- [22] Li, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment, soil and plants of the Aojiang River waterway in Wenzhou, China. *J Hazard Mater.* 2010. 173 (1-3): 75-81.
- [23] Castells, X. *Reciclaje de Residuos Industriales.* Díaz de Santos. España. 2000: pag. 512.
- [24] Agudo, A. Los HAP, acercamiento a su problemática como riesgo laboral. España: UGT Comisión Ejecutiva Laboral; 2010. p. 19-25.
- [25] Pérez-Morales López G., et al. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (I): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 2016; 10 (1): 1-15.
- [26] Hur, J., Lee B., Shin, H. Microbial degradation of dissolved organic matter (DOM) and its influence on phenanthrene–DOM interactions. *Chemosphere.* 2011; 85: 1360-1367.
- [27] Barcelò, D. y Hennion M. Sampling of polar pesticides from water matrices. *Analytica Chimica Acta, Elsevier.* 1997; 338: 3-18.
- [28] Mastrángelo, M., Topalián, M., Mortier, C., Fernández, A. Coeficientes de partición de hidrocarburos aromáticos policíclicos con sustancias húmicas: un método simple para su determinación. *Revista de Toxicología.* 2005; 22 (3):169-174.

- [29] Titato G., Lanças F. Optimization and validation of HPLC-UV-DAD and HPLC-APCI-MS methodologies for the determination of selected PAHs in water samples. *Journal of Chrom. Science*. 2006; 44: 35-40.
- [30] World Health Organization. *PAH in drinking-water, Guidelines for drinking-water quality*. Suiza. 2003; 2 (2): 4-5.
- [31] Harris, D. Análisis Químico cuantitativo. 3<sup>ra</sup> Edición. España: Editorial Reverté. 2007. p. 608-624,714.
- [32] Liska I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis historical development and overview, *J. Chromatogr. A*. 2000; 885 (1-2): 3-16.
- [33] Pawliszyn, J. Applications of solid phase micro extraction. *The Royal society of Chemistry*. Cambridge. (1999). 284-295.
- [34] Skoog, D. Holler, T. Nieman, T. Principios de análisis instrumental. 5ta edición. Mc Graw Hill. España: 2001. Cap. 15 y 28.
- [35] Escalona, A. Galarraga, F. Fernandez, R. Centeno, A. Velasquez, J. Perez, G. Desarrollo de un métodos no convencionales para la extracción de fenantreno y pireno en partículas sedimentadas. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.* 2012, Vol. 27 (1): 41-48.
- [36] Martínez, M. Moctezuma, C. Métodos físicos-químicos en biotecnología, espectrofluorimetría. Universidad Autónoma de México. 2006, pag: 10, 29, 39, 40.
- [37] Agilent Technologies. Manual de usuario, detector de fluorescencia Agilent 1260 Infinity. Alemania, 2013. N°Ref: 61321-95014. Pag: 12-13.
- [38] Miller, J, Miller, J. Estadística y quimiometría para química analítica. 4ta Edición. España: Pearson Educación; 2002. p.: 5, 130-135, 190.
- [39] EPA 821-B-98-002-1999. Protocol for EPA Approval of Alternate Test Procedures for Organic and Inorganic Analytes in Wastewater and Drinking Water. 1999; 1-56.
- [40] Abel, D. Diseño estadístico de experimento. Editorial Universidad de Antioquia 1<sup>era</sup> edición. ISBN: 95987142640. Colombia. 1999. p. 346.
- [41] Ferré, J. Estadística aplicada. El diseño factorial completo 2<sup>k</sup>. Técnicas de Laboratorio. ISSN 0371-5728. N°292; 2003. Pag.: 430-434.

- [42] Liu, L., Liu, Y., Lin, J. Tang, N. Hayakawa, K. Maeda, T. Development of analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulates: A review. *Journal of Environmental Sciences*. 2007; 19: 1-11.
- [43] López, J. Rodríguez, J. Limiñana, J. Santana P. HAPs en el medio ambiente particulado de la isla de Gran Canaria, España. *Rev. Afinidad LXVI*, 2010; 544: 445-453.
- [44] Chen, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction and liquid chromatography. *Anal. Sciences*. 2004; 20: 1383-1388.
- [45] Dionex Corporation. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in tap water using on line solid-phase extraction followed by HPLC with UV and fluorescence detections. Application Note 191, LPN 2128. 2009.
- [46] Statpoint Technologies inc. Statgraphics ® version 16.2 32 bits, [programa de computadora]. Requerimiento de sistema, 2GB RAM, soporta cualquier versión de Windows XP, ME, 2000, Vista y 7. 2018.
- [47] Díaz, M, et al. Método para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. *Ciencia UANL. Redalyc*. 2001; 4(4) p. 420-425.
- [48] S'liwka-Kaszyńska, M., Kot-Wasik, A., Namieśnik, J. Preservation and Storage of Water Samples. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2003; 33 (1): 31-44.
- [49] Rey, S. y Villacampa, B. Determinación de HAP en agua residuales y vertidos por SPE en línea y HPLC/DAD/FLD. *Cromatografía y Técnicas Afines*. Madrid. 2016, 37 (1): 3-21.
- [50] Thermo Scientific. Libro del Agua. Excepcionales sistema de depuración de agua de laboratorio sin complicaciones. [Internet]. 2013 [Consultado 05/02/2018]; p. 4-5. Disponible en:  
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LED/Product-Guides/D21093~.pdf>
- [51] Murillo, M. Chaves, M. Validación de un método de análisis para la determinación de HAP por HPLC en partículas PM10 y PM2,5. *Tecnología en Marcha*. 2012, 25 (3): 39-49.

- [52] Visitación, L. Rojas, F. Meza, V. Flores, L. Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos de residuos de barrido de calles usando compost. *Rev. Soc Quím Perú*. 2016; 82(2): 162-174.
- [53] Quinceno, E. Ríos, L. Potenciadores en el proceso de remoción biológica de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PHAS). *Hechos Microbiol*. 2014; 5 (1); 36-50.
- [54] Petit, K., Colina, J., Yegres, F., Moran, H., Richard-Yegres, N. Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera. *Revista Química Viva*. 2013; Numero 3, año 12.

## APÉNDICE

### APÉNDICE A

- Preparación de la solución madre

HAP	$P_{\text{HAP}} \pm 0,00001 \text{ g}$	$P_{\text{sol.}} \pm 0,0001 \text{ g}$	mg/Kg	$\Delta \text{ ppm}$	CV (%)
Naftaleno	0,01023	78,5987	130,2	0,1	0,08
Acenafteno	0,01026	78,8888	130,1		
Antraceno	0,01069	78,8324	135,6		0,07
Pireno	0,01056	78,1116	135,2		
Criseno	0,0115	80,173	143	1	0,7

- Preparación de la solución intermedia

HAP	mg/Kg	$P_{\text{Alí.}} \pm 0,0001 \text{ g}$	$P_{\text{Sol.}} \pm 0,0001 \text{ g}$	ppm (mg/Kg)	$\Delta \text{ ppm}$	CV (%)
Naftaleno	$130,2 \pm 0,1$	3,7922	49,4920	9,976	0,008	0,08
Acenafteno	$130,1 \pm 0,1$	3,0557	39,7461	10,002		
Antraceno	$135,6 \pm 0,1$	2,9808	40,414	10,001	0,007	0,07
Pireno	$135,2 \pm 0,1$	2,9136	39,3906	10,000		
Criseno	$143 \pm 1$	5,6091	80,4280	9,97	0,07	0,7

- Solución patrón en medio acuoso.

HAP	mg/Kg	Vol. Alí. (mL)	Vol. Balón (mL)	ppb ( $\mu\text{g/L}$ )	$\Delta \text{ ppb}$	CV (%)
Naftaleno	$9,976 \pm 0,008$	2	200	99,7	0,2	0,2
Acenafteno	$10,002 \pm 0,008$			100,0		
Antraceno	$10,001 \pm 0,007$			100,0		
Pireno	$10,000 \pm 0,007$			100,0		
Criseno	$9,97 \pm 0,07$			100,0	0,7	0,7

## APÉNDICE B

Los parámetros analíticos de precisión y exactitud calculada para el método de filtración son la desviación estándar (s), desviación estándar relativa (RSD) y el porcentaje de recuperación.

- **Promedio:**  $\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$

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

- **Desviación estándar relativa o coeficiente de variación:**

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

- **Porcentaje de Recuperación:**  $\%R = \frac{\text{Cantidad de analito en la muestra}}{\text{Concentracion esperada}} \times 100$

## APÉNDICE C

- **Patrones de las curvas de calibración**

HAP	ppb ( $\mu\text{g/L}$ )				
	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3	Patrón 4	Patrón 5
<b>Naftaleno</b>	10,0 $\pm$ 0,4	20,0 $\pm$ 0,3	29,9 $\pm$ 0,3	39,9 $\pm$ 0,3	49,9 $\pm$ 0,3
<b>Acenafteno</b>	10,0 $\pm$ 0,4	20,0 $\pm$ 0,3	30,0 $\pm$ 0,3	40,0 $\pm$ 0,3	50,0 $\pm$ 0,3
<b>Antraceno</b>	10,0 $\pm$ 0,4	20,0 $\pm$ 0,3	30,0 $\pm$ 0,3	40,0 $\pm$ 0,3	50,0 $\pm$ 0,3
<b>Pireno</b>	10,0 $\pm$ 0,4	20,0 $\pm$ 0,3	30,0 $\pm$ 0,3	40,0 $\pm$ 0,3	50,0 $\pm$ 0,3
<b>Criseno</b>	10,0 $\pm$ 0,8	19,9 $\pm$ 0,7	29,9 $\pm$ 0,7	39,9 $\pm$ 0,7	49,9 $\pm$ 0,7

- ❖ **Ecuación de la curva de calibración**

- **Sin solvente orgánico**

Día 1

HAP	Pendiente	Punto de Corte	$r^2$
Naftaleno	0,8136	0,0683	0,9979
Acenafteno	1,4671	0,2967	0,9998
Antraceno	0,4445	1,3667	0,9932
Pireno	0,0777	0,6619	0,8943
Criseno	1,5398	-5,0443	0,9965

Día 2

HAP	Pendiente	Punto de Corte	$r^2$
Naftaleno	0,2214	4,8807	0,9833
Acenafteno	0,5846	4,624	0,9916
Antraceno	0,2936	1,3418	0,9924
Pireno	0,0835	0,2383	0,9696
Criseno	1,186	-2,4976	0,9986



Día 3

HAP	Pendiente	Punto de corte	$r^2$
Naftaleno	0,1381	1,5789	0,9665
Acenafteno	0,3456	1,9568	0,9841
Antraceno	0,2093	0,8387	0,9933
Pireno	0,068	0,1993	0,9553
Criseno	1,1245	-4,4587	0,9988

- **Con solvente orgánico (10% Acetonitrilo)**

Día 1

HAP	Pendiente	Punto de Corte	$r^2$
Naftaleno	0,894	2,8668	0,9988
Acenafteno	1,6014	2,9749	0,9987
Antraceno	0,521	5,5284	0,9989
Pireno	0,1512	0,1809	0,996
Criseno	1,1769	5,1982	0,9928

Día 2

HAP	Pendiente	Punto de Corte	$r^2$
Naftaleno	0,983	-4,0809	0,9991
Acenafteno	1,5953	-2,2619	0,9994
Antraceno	0,463	5,7733	0,9927
Pireno	0,1503	0,1995	0,9955
Criseno	0,8914	6,7656	0,9855

Día 3

HAP	Pendiente	Punto de Corte	$r^2$
Naftaleno	0,5742	-2,5325	0,8961
Acenafteno	1,2533	-3,457	0,9551
Antraceno	0,4135	6,072	0,9869
Pireno	0,1449	0,157	0,9957
Criseno	0,546	9,0304	0,9356

## APÉNDICE D

### 1) AP10

HAP	Sin acetonitrilo				Con acetonitrilo (10%)			
	$\bar{X}$	s	RSD (%)	% R	$\bar{X}$	s	RSD (%)	% R
Naftaleno	26,6	0,5	2	91	34	2	5	98
Acenafteno	37	7	18	74	46	2	4	92
Antraceno	9	3	39	49	18	1	5	90
Pireno	1,6	0,8	51	23	4	1	13	82
Criseno	26	3	10	58	24	6	26	72

### 2) Celulosa A

HAP	Sin acetonitrilo				Con acetonitrilo (10%)			
	$\bar{X}$	s	RSD (%)	%R.	$\bar{X}$	s	RSD (%)	% R.
Naftaleno	0	0,0	0	0	34	1	3	98
Acenafteno	2	1	63	5	3	3	110	5
Antraceno	0,4	0,2	54	2	2	1	63	9
Pireno	0	0	0	0	0	0	53	5
Criseno	1	1	100	1	1	1	82	4

### 3) Celulosa B

HAP	Sin acetonitrilo				Con acetonitrilo (10%)			
	$\bar{X}$	s	RSD (%)	%R.	$\bar{X}$	s	RSD (%)	% R.
Naftaleno	22	1	4	74	31	3	8	90
Acenafteno	5	3	70	9	40	2	5	81
Antraceno	0,2	0,2	100	1	8,8	0,3	3	45
Pireno	0	0	0	0	2	2	79	44
Criseno	0	0	0	0	1,7	0,2	10	5

## 4) Nylon

HAP	Sin acetonitrilo				Con acetonitrilo (10%)			
	$\bar{X}$	s	RSD (%)	%R.	$\bar{X}$	s	RSD (%)	%R.
Naftaleno	25	3	12	83	32	3	8	93
Acenafteno	40	3	8	80	43	1	3	87
Antraceno	4	1	34	24	18,1	0,2	1	92
Pireno	0,7	0,5	71	10	4,4	0,4	9	89
Criseno	3	2	66	6	9	0,6	7	26