

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS EN AGUA POTABLE MEDIANTE SCREENING DE MUESTRAS Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN UV

ALEYDA MONTAÑEZ¹, LISBETH MANGANIELLO^{1*}, NANCY MENDOZA¹, CRISTÓBAL VEGA², RICHARD MORA³

¹Universidad de Carabobo, Facultad de Ingeniería, Centro de Investigaciones Químicas, Valencia, Venezuela

²Universidad de Carabobo, Facultad de Ingeniería, Instituto de Matemáticas y Cálculo Aplicado, Venezuela

³Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de La Salud, Doctorado en Ciencias Médicas, Venezuela

e-mail: lmanganiello@uc.edu.ve

Recibido: junio de 2008

Recibido en forma final revisado: octubre de 2009

RESUMEN

La metodología propuesta fue utilizada para determinar hidrocarburos aromáticos en muestras de agua potable provenientes de una zona sensible al riesgo por contaminación de estas especies. Se seleccionaron 52 muestras de agua de consumo humano mediante un diseño estadístico. Las muestras fueron sometidas a un tratamiento de extracción - preconcentración empleando mini columnas C_{18} y posteriormente fueron analizadas mediante el sistema de Screening de muestras. La calibración del sistema de Screening se llevó a cabo en el intervalo comprendido entre 100 – 500 $\mu\text{g/L}$. La precisión expresada como la desviación estándar relativa para 100 $\mu\text{g/L}$ de una mezcla de hidrocarburos aromáticos ($n = 11$; $P = 0.05$) fue de 8.3%. El sistema HPLC – UV también fue calibrado en un intervalo comprendido entre 80 – 120 $\mu\text{g/L}$ con la finalidad de analizar las muestras donde se determinó la presencia de hidrocarburos aromáticos totales. La precisión expresada como la desviación estándar relativa para 80 $\mu\text{g/L}$ de benceno, 80 $\mu\text{g/L}$ de tolueno y 80 $\mu\text{g/L}$ de etilbenceno ($n = 11$; $P = 0.05$) fue de 1.61%, 0.23% y 0.20% para cada compuesto, respectivamente. La aplicación de las metodologías desarrolladas juega un rol importante en los laboratorios de análisis de agua ya que la primera permite reducir costos, tiempo de respuesta y gasto de solventes; y la segunda permite ampliar la información, discriminando que especies se encuentran presentes y su respectiva concentración.

Palabras clave: Hidrocarburos aromáticos, Sistema de Screening, Aguas para consumo humano, HPLC, Detección UV.

DETERMINATION OF AROMATIC HYDROCARBONS IN DRINKING WATER BY USING SCREENING SAMPLES SYSTEM AND LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH UV DETECTION

ABSTRACT

The proposed method was used to determine the concentration of aromatic hydrocarbons in samples of drinking water from a zone sensible to the contamination risk. 52 drinking water samples were selected by using a statistical design. A system of extraction – pre-concentration with a C_{18} minicolumn was used for samples treatment and then they were analyzed by a system of samples Screening. The calibration of the Screening system thus achieved is linear in the range 100 – 500 $\mu\text{g/L}$. The precision, expressed as relative standard deviation for 100 $\mu\text{g/L}$ of total aromatic hydrocarbons mixture ($n = 11$; $P = 0.05$) was calculated as 8.3%. If the response is affirmative the sample is analyzed by HPLC with UV detection too. The calibration of the HPLC system thus achieved is linear in the range 80 – 120 $\mu\text{g/L}$. The precision, expressed as relative standard deviation for 80.0 $\mu\text{g/L}$ of benzene, 80.0 $\mu\text{g/L}$ of toluene and 80.0 $\mu\text{g/L}$ of ethylbenzene ($n = 11$; $P = 0.05$) was calculated for each one of the aromatic hydrocarbon compounds. The values obtained were 1.61%, 0.23%, and 0.20% respectively. The proposed methods play an important roll in the laboratories of water analysis since first they allow to reduce costs, time and solvent usage and second they allow gathering the information of the presence and concentration of the different aromatic species.

Keywords: Aromatic hydrocarbons, Screening System, Drinking water, HPLC, UV detection.

INTRODUCCIÓN

El acceso al agua potable es una cuestión importante en materia de salud y desarrollo en los ámbitos nacional, regional y local. En algunas regiones, se ha comprobado que las inversiones en sistemas de abastecimiento de agua y saneamiento pueden ser rentables desde un punto de vista económico, ya que la disminución de los efectos adversos para la salud y la consiguiente reducción de los costos de asistencia sanitaria son significativos (OMS, 2006). El agua es esencial para la vida, por esta razón se debe insistir en la relación agua y salud, donde la disponibilidad y la calidad del agua determinan el grado de salud e higiene de cualquier sociedad. El agua y la salud son dos aliados estratégicos que contribuyen al sostenimiento y a la calidad de la vida (Probea, 2005). La gran mayoría de los problemas de salud relacionados de forma evidente con el agua se deben a contaminación por microorganismos. No obstante, existe un número considerable de problemas graves de salud que pueden producirse como consecuencia de la contaminación química del agua. Los riesgos de la salud asociados a los componentes químicos del agua potable se deben principalmente a la capacidad de los componentes químicos de producir efectos adversos sobre la salud, tras periodos de exposición prolongados (OMS, 2006).

Los hidrocarburos aromáticos: benceno, tolueno y etilbenceno son contaminantes prioritarios del agua potable (ATSDR, 1999):

El benceno es un componente natural del petróleo, la gasolina y el humo de cigarrillo. Se usa para fabricar cauchos, lubricantes, tinturas, detergentes, medicamentos y plaguicidas. Los procesos industriales son la fuente principal de benceno en el ambiente, éste se degrada más lentamente en el agua y en el suelo, y puede pasar al agua subterránea a través del suelo. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y la EPA han determinado que el benceno es carcinogénico en seres humanos.

El tolueno se usa en la fabricación de pinturas, diluyentes de pinturas, barniz para las uñas, lacas, adhesivos y gomas, y en ciertos procesos de imprenta y curtido de cuero. Éste puede entrar al agua superficial y al agua subterránea mediante derrames de solventes y productos de petróleo, como también por escapes de tanques subterráneos en gasolineras. El tolueno puede afectar al sistema nervioso produciendo cansancio, confusión, debilidad, pérdida de la memoria, náusea, pérdida del apetito y pérdida de la audición y la vista.

El etilbenceno se encuentra en numerosos productos entre los que se incluyen la gasolina y la pintura. Puede movilizarse al agua subterránea a través del suelo. La IARC ha

determinado que el etilbenceno es posiblemente carcinogénico en seres humanos (ATSDR, 2007).

Dado que la presencia de estos compuestos en el ambiente es de carácter antropogénico, se hace ineludible un control continuo en las diferentes matrices ambientales, especialmente en agua potable, para determinar sus niveles (Moreno, 2003). Por lo tanto es necesario contar con métodos analíticos rápidos y sensibles que permitan analizar un gran número de muestras por día (Faría, 2005). La técnica de HPLC ha sido utilizada en la detección de este tipo de compuestos por su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas y su idoneidad para la separación (Skoog, 2002). Los sistemas de Screening son otra herramienta útil, son sistemas de automatización de respuesta rápida que permiten la reducción de errores debidos a la participación humana, caracterizados por presentar un mayor énfasis cualitativo que cuantitativo con un tratamiento simple de la muestra (Valcárcel, 2000).

En concordancia con lo anteriormente expuesto la presente investigación ofrece el desarrollo de dos metodologías aplicadas en forma secuencial: primero el sistema de Screening, determina la presencia o no de hidrocarburos aromáticos totales y posteriormente si la respuesta es afirmativa, pasan al sistema HPLC donde se ampliará el nivel de información del análisis de las muestras mediante la determinación de cada especie aromática.

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Reactivos y equipos

Reactivos. Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico de alta pureza. Se usó agua ultra pura obtenida de MilliQ System (Millipore Co.). Los solventes empleados fueron de grado HPLC. Los patrones de alta pureza fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Sistema de Screening de Muestras. Ultra micro Celda de flujo: modelo SF 6505 - Hewlett Packard. Detector: UV, arreglo de Diodos en fila modelo 8452 A Hewlett Packard. Bomba peristáltica: modelo 89052 A - Hewlett Packard. Válvula de inyección, Rheodyne modelo 5041, con un lazo de inyección de 20 μ L. Tubos para Bombas peristálticas de 0,045 mm d.i. para el manejo se solventes orgánicos.

Sistema de cromatografía. Columna cromatográfica modelo Sunfire® C18, 5 μ m, dimensiones 150 mm x 3mm Waters. Sistema de bombeo, modelo 510 HPLC, Waters. Sistema de inyección de muestras, modelo U6K, Waters. Jeringa de inyección de capacidad 25 μ L, modelo Hamilton. Detector de UV modelo 2485, Waters.

Muestreo

Para la toma de la muestra se realizó un muestreo aleatorio simple, con un número de distribución uniforme. El tamaño de la muestra se determinó en un 20% de un total de 254 apartamentos, bajo la consideración de una población finita. Se procedió a elaborar una plantilla de selección de los apartamentos a muestrear. Para lo cual, la herramienta tomada fue un macro en el programa Excel, cuya base de análisis es un sistema aleatorio de selección de muestras. Donde una vez asignado una condición de distribución aleatoria entre 0-1, se construyó la matriz de 21 columnas y 14 filas (correspondiente al número de edificios). Generándose como resultado la selección de 52 apartamentos como base estadística para la realización del muestreo respectivo, (tabla 1). La toma de la muestra se llevó a cabo según el protocolo establecido por la Norma (COVENIN, 2002). La zona muestreada fue el Conjunto Residencial Bayona Country, sector Tazajal del municipio Naguanagua, Valencia, Venezuela. La zona fue seleccionada para su estudio por ser considerada una zona de riesgo, ya que su sistema de abastecimiento es mediante un pozo subterráneo que se encuentra aledaño a una serie de talleres mecánicos. Estos talleres arrojan residuos de solventes industriales, cuya evacuación casual, fugas o derrames, pueden ser una amenaza creciente para la salud de los pobladores de la zona.

Sistema de extracción y preconcentración

Filtrado previo de las muestras. Cada muestra de agua potable, se filtró al vacío utilizando membranas de Durapore

0.45 μ m de diámetro de poro y 47 mm de diámetro (Millipore Co.), con la finalidad de eliminar impurezas.

Preparación de las minicolumnas empacadas C₁₈, Sep – Pak®. Las minicolumnas fueron previamente acondicionadas utilizando el siguiente procedimiento: se hicieron pasar 3 mL de metanol previamente filtrado, a través de la minicolumna, a continuación se pasaron 4 mL de una solución compuesta por 50 % metanol y 50 % acetonitrilo y finalmente se pasaron 4 mL de una solución de composición 50 % agua y 50 % acetonitrilo.

Extracción y preconcentración de los compuestos de interés. Posteriormente los compuestos de interés fueron extraídos de la matriz acuosa mediante el diseño de un sistema de extracción y preconcentración conformado por una bomba peristáltica modelo Hp 89052A Hewlett Packard, tubos de bomba de silicón de diámetro interno 0.110 mm y minicolumnas empacadas C₁₈, Sep – Pak®, Water (figura 1). El diseño para este procedimiento está basado en una extracción de tipo sólido – líquido, el cual opera de la siguiente manera: 500 mL de la muestra previamente filtrada es introducida al sistema haciendo uso de una bomba peristáltica, con un flujo de operación de 28.3 mL/min. Ésta es introducida en su totalidad en la minicolumna C₁₈. Posteriormente un 1 mL del extracto de los compuestos de interés es recuperado invirtiendo la dirección de flujo (Manganiello, 2002), utilizando como solvente de recuperación acetonitrilo.

Tabla 1. Plantilla de selección de los apartamentos muestreados.

Edif.	Apartamentos elegidos aleatoriamente																		
1						1.2												2.1	
2																			2.4
3			PB.2																2.3
4					PB.4														2.3
5																			2.2
6																			2.4
7																			3.1
8																			2.4
9																			2.4
10																			2.4
11																			2.4
12																			2.4
13																			2.4
14																			2.4

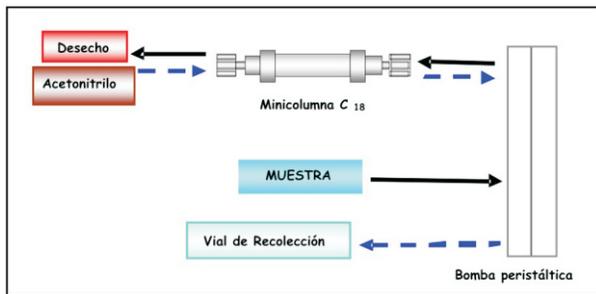


Figura 1. Diseño del sistema de extracción y preconcentración. El sentido de la flecha continua indica la dirección de flujo para el procedimiento de extracción y preconcentración. El sentido de la flecha punteada indica la dirección de flujo para el proceso de recuperación del extracto.

Almacenamiento de la muestra tratada. Los extractos de las muestras fueron conservados a temperatura de 4 °C en envases de plásticos para posteriormente ser analizados por el Sistema de Screening de muestras y el Sistema de Cromatografía Líquida (SCL).

Diseño del sistema de Screening de muestras

En la figura 2 se muestra un esquema del diseño del sistema de Screening. La solución portadora (90/10 acetonitrilo/agua), se introdujo al sistema por medio de una bomba peristáltica, con un flujo de 5.8 mL/min. Los patrones de la mezcla de aromáticos (benceno, tolueno y etilbenceno), y las muestras fueron inyectados al sistema mediante la válvula que se observa en el diagrama, la cual está provista de un bucle de inyección de 20 µL (posición de carga de la muestra). Al girar la válvula a la posición de inyección, la

solución portadora arrastra la muestra hacia la ultramicro celda. Allí la muestra es irradiada por un haz de luz correspondiente a la región ultravioleta del espectro electromagnético en un rango comprendido entre 240 - 254 nm. Esta señal es captada por un detector de arreglo de diodos, reportándose en unidades de absorbancia. Una interfase electrónica conectada del detector a la computadora permite el registro y manipulación de los datos. El programa utilizado para manejar los datos es un software comercial Chem Station- UV visible ® de la casa comercial Hewlett Packard.

Sistema de cromatografía líquida con detección UV

El sistema operó en régimen isocrático con un flujo de 0,4 mL/min. Los patrones de la mezcla de aromáticos (benceno, tolueno y etilbenceno), y los extractos de las muestras fueron inyectados mediante una jeringa a una válvula de inyección de volumen variable. Una vez separados los compuestos aromáticos fueron detectados a una longitud de onda de 254 nm. Esta señal queda registrada en la pantalla del detector y el registrador muestra el pico cromatográfico correspondiente a cada especie detectada. Las variables operacionales que se utilizaron para el presente estudio se detallan a continuación:

Fase móvil, régimen de separación y flujo. La fase móvil seleccionada fue 50/40/10 Acetonitrilo /agua/tetrahidrofurano v/v. El régimen de separación fue del modo elución isocrática con un flujo de 0,4 mL/min. Estas condiciones cromatográficas fueron previamente optimizadas (Manganiello, 2007).

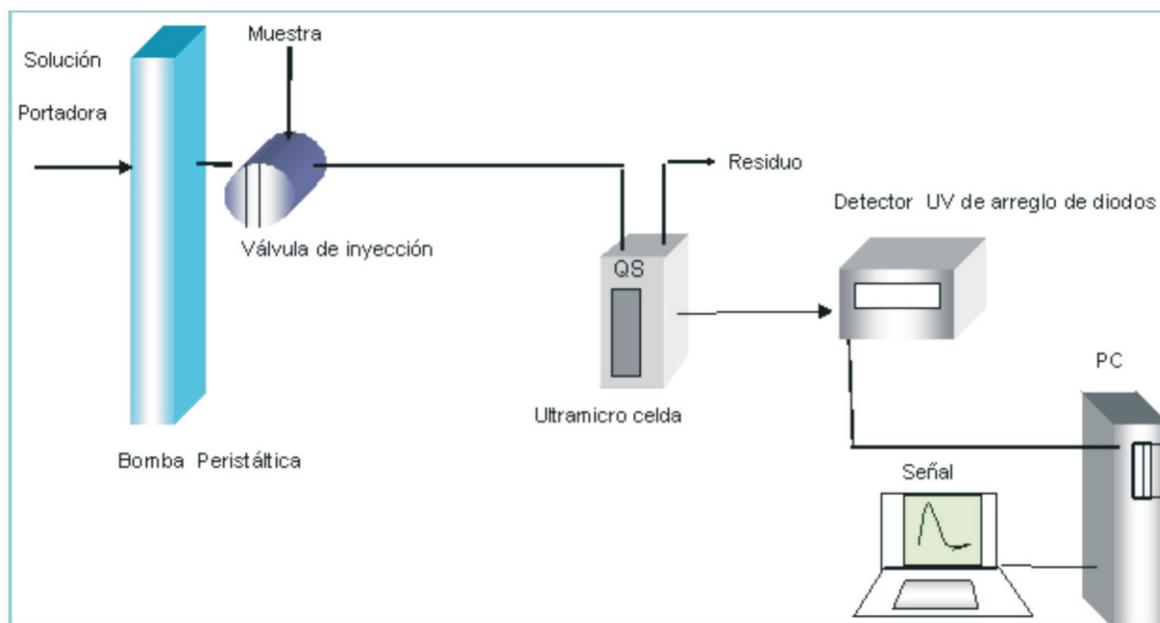


Figura 2. Esquema del diseño del sistema de Screening UV-Visible.

Columna cromatográfica. Se utilizó la columna previamente estudiada en los trabajos de Manganiello & Mendoza, 2007, caracterizada por un relleno C_{18} con un tamaño de partícula de 5 μm , la cual arrojaba resultados óptimos para lograr la separación de los componentes benceno, tolueno y etilbenceno.

Detector de UV. En el detector se procedió a fijar los parámetros de operación a medida que se desarrollaba el proceso de separación, donde quedó establecido para el análisis de los *compuestos* aromáticos una longitud de onda de 254 nm. Para observar una buena definición de los picos, se utilizó una atenuación instrumental de 0,01 AUFS. Para lograr este valor de atenuación se ensayaron valores de 0,01; 0,05; 0,025; 0,050; 0,100 AUFS, notando que a menor atenuación existe mayor sensibilidad para la detección de las tres especies de estudio.

Aplicación de los métodos propuestos

Para chequear la aplicación de los dos métodos propuestos se utilizó el programa estadístico *Statgraphics® plus, versión 3.1*, el cual permite aplicar el *t*-test por parejas a fin de comparar los valores de las concentraciones añadidas a las muestras con los valores de las concentraciones que reporta el método, es decir las concentraciones encontradas. La aplicación del *t*-test arrojará un resultado que permitirá concluir si existen o no diferencias significativas entre ambos resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el sistema de Screening de muestras y en el SCL con detección UV fueron en primer lugar seleccionadas las condiciones óptimas de operación. Luego se determinaron los compuestos aromáticos totales (benceno, tolueno y etilbenceno), mediante el sistema de Screening. Posteriormente las muestras que arrojaron resultados positivos fueron procesadas en el sistema de Cromatografía con la finalidad de identificar y determinar los compuestos aromáticos presentes. El procedimiento de preconcentración de la muestra se realizó con la finalidad de detectar los límites máximos permisibles que establecen las Normas Sanitarias de Calidad del Agua (Gaceta Oficial Venezolana, 1998). Adicionalmente las muestras que arrojaron resultados negativos también fueron analizadas en el sistema HPLC con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos mediante el sistema de Screening.

Optimización del sistema de Screening de muestras

Este sistema fue diseñado para la determinación de compuestos aromáticos totales (benceno tolueno y etilbenceno).

La metodología se basó en identificar y seleccionar aquellas muestras que contenían el grupo de compuestos aromáticos mencionados dentro del total del grupo muestreado. El sistema estudiado responde a los objetivos de este tipo de metodología tales como simplificación y rapidez (Valcárcel, 2000).

Variables de operación

Velocidad de flujo. Para optimizar este parámetro se probaron varios tubos de bomba peristáltica de diferentes diámetros internos (0.015, 0.030, 0.045 mm). El tubo de bomba seleccionado fue de diámetro interno de 0.045 mm, el cual da como resultado una velocidad de flujo de 5.8 mL/min. Este valor permitió un tiempo de detección de los compuestos en la muestra muy rápido, para un tiempo de análisis total de 3 minutos por muestra dando como resultado el análisis de 20 muestras/hora.

Volumen de inyección. Para el estudio de esta variable se probaron tres bucles de inyección de diferentes volúmenes (10, 20, 175) μL . El bucle de inyección de muestra seleccionado fue de 20 μL , éste resultó adecuado para el tamaño de muestra que puede colocarse dentro del espacio de la ultramicro celda (lugar donde se lleva a cabo el proceso de absorción de la luz). Este volumen, dio lugar a valores de respuesta reproducibles. Utilizando un bucle de inyección de 10 μL se observó una respuesta de detección poco reproducible y cuando se utilizaron bucles con volúmenes superiores, como es el caso de 175 μL , se observaron valores de respuesta negativos. En ambos casos un bucle de inyección muy pequeño y/o un bucle muy grande con respecto a la capacidad de la ultramicro celda (60 μL) dan lugar a valores de absorbancia poco reproducibles y/o negativos.

Solución portadora. Esta disolución tuvo como función llevar la muestra a través del sistema. Por tanto se debe asegurar que tenga la polaridad adecuada para transportar los compuestos de interés, en este caso las especies de benceno tolueno y etilbenceno. Se prepararon diferentes composiciones de la solución portadora (10/90 v/v acetonitrilo/agua; 50/50 acetonitrilo/ agua, v/v y 90/10 acetonitrilo/ agua, v/v) a fin de seleccionar la más adecuada. La solución portadora utilizada fue de 90/10 acetonitrilo/ agua, v/v. Al aumentar la composición del acetonitrilo se garantizó mayor afinidad del medio de las muestras con la solución portadora. Con proporciones menores en la solución portadora se observa poca reproducibilidad de los resultados.

Rango de longitud de onda. El rango de longitud de onda, se seleccionó de acuerdo a la banda donde se presenta el pico de absorción en la cual se observan las especies (benceno, tolueno y etilbenceno). Se realizaron ensayos a diferentes

rangos de longitud de onda según datos bibliográficos reportados por Skoog, (2002), para el estudio de compuestos aromáticos tales como: 190 a 500 nm, 200 a 350 nm, 230 a 260 nm, 240 a 254 nm. Se seleccionó el intervalo de longitud de onda de 240 a 254 nm. En la figura 3, se muestra el espectro de absorción obtenido para el intervalo antes mencionado. De esta manera, se permitió captar la señal de los tres compuestos aromáticos estudiados.

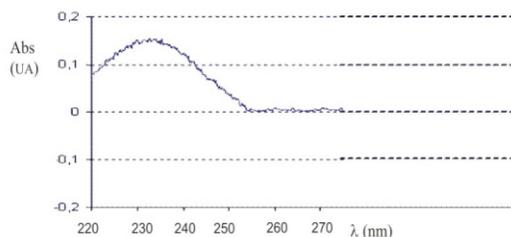


Figura 3. Espectro de absorción obtenido para la mezcla de compuestos aromáticos estudiados (benceno, tolueno y etilbenceno).

Calibración del sistema de Screening de muestras. El criterio para la selección del rango de determinación fue acorde con los valores máximos aceptables establecidos por las Normas Sanitarias de Calidad del Agua (Gaceta oficial, 1998). El coeficiente de correlación fue de 0,9929 lo cual indica que la respuesta del detector guarda proporcionalidad con las diferentes concentraciones de la mezcla de los compuestos estudiados. El límite de detección reportado fue 50 μL .

Es importante resaltar que este valor se encuentra por encima del valor máximo permisible para la especie benceno (10 μL). Para compensar esta limitación instrumental la muestra es previamente preconcentrada en un factor de quinientas veces, lo cual garantiza que el valor máximo permisible para el compuesto de benceno pueda ser detectado por el método de Screening de muestras propuesto. La precisión del método también fue estudiada. Un valor de desviación estándar relativa (RSD) por debajo del 10% indica una precisión aceptable para sistemas de Screening de muestras. Otra característica importante es el número de muestras que pueden procesarse por hora. La velocidad del método queda expresada por este parámetro (Skoog, 2002). El método desarrollado permitió procesar 20 muestras/hora, lo cual es equivalente a tres minutos por muestra, este resultado es una herramienta a tomar en cuenta para la implementación de un método analítico confiable, seguro y rápido.

Sistema de cromatografía líquida con detección UV

Este sistema consistió en la separación y cuantificación de las especies aromáticas estudiadas (benceno, tolueno y etilbenceno), en las muestras que reportaron resultados

positivos previamente fueron analizadas por el sistema de Screening. La figura 4 muestra el cromatograma de las tres especies aromáticas estudiadas.

La variable de operación optimizada fue el Volumen de Inyección. Se estudiaron diferentes volúmenes de inyección de la mezcla de los compuestos aromáticos. Estos volúmenes oscilaron entre (5, 10, 15 y 20) μL siendo el volumen de 15 μL el más ventajoso, ya que cuando se inyectaron cantidades de 5 μL y 10 μL se observó poca definición en la separación de las tres especies y cuando se utilizaron volúmenes de inyección 20 μL los picos de las diferentes especies de estudio se solapaban entre sí. Por tanto el valor de 15 μL seleccionado permite una óptima separación de los picos correspondientes a los compuestos de benceno, tolueno y etilbenceno.

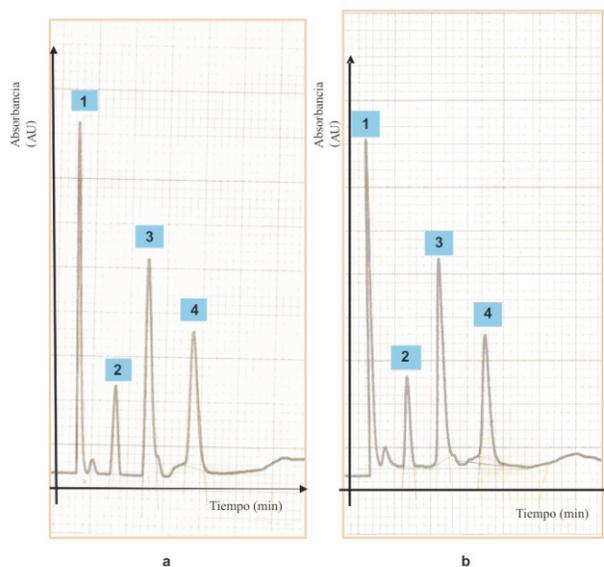


Figura 4. (a) Cromatogramas correspondientes a la separación de (110 $\mu\text{g/L}$ de patrón de mezcla): 1. solvente; 2. Benceno; 3. Tolueno; 4. Etilbenceno. Condiciones cromatográficas: columna Sunfire®C₁₈ .5 μm de diámetro de partícula, dimensiones 150 mm de longitud por 3 mm de diámetro interno. Elución isocrática (50/40/10 acetonitrilo/agua/tetrahidrofurano v/v). Flujo de 0,4 mL/min. Volumen de inyección 15 μL . (b) Réplica de (a).

Calibración del sistema de cromatografía líquida. Se prepararon curvas de calibración para cada una de las especies de estudio (benceno, tolueno y etilbenceno). El criterio para la selección del rango de determinación fue acorde con los valores máximos aceptables establecidos por las Normas Sanitarias de Calidad del Agua, NSCA (Gaceta Oficial Venezolana, 1998). Los coeficientes de correlación para cada uno de los compuestos estudiados benceno, tolueno y etilbenceno fueron: 0,9987, 0,9912, 0,9991. Los límites de de-

tección reportados para las especies fueron para el benceno 50 µL, tolueno 20 µL y etilbenceno 40 µL. Es importante resaltar que el valor para el compuesto de benceno se encuentra por encima del valor máximo permisible (10 µL). Para compensar esta limitación instrumental la muestra es previamente preconcentrada en un factor de 500 veces, tal como se señaló para el sistema de Screening de muestras. Los valores de desviación estándar relativa (RSD), los cuales son una medida de la precisión del método, se encontraron en el intervalo de 0.20 a 1.61 % para cada especie aromática estudiada. El número de muestras procesadas por hora fueron cinco, es importante destacar que aunque hay una inversión mayor de tiempo por muestra esto se traduce a una mayor información por muestra evaluada. La metodología diseñada permite determinar la concentración de benceno, tolueno y etilbenceno que están presentes en cada una de las muestras estudiadas, lo cual constituye una ventaja desde el punto de vista ambiental.

Aplicación de las metodologías diseñadas

La aplicabilidad del método de Screening fue inicialmente chequeada utilizando muestras sintéticas que contenían una mezcla de los tres compuestos de aromáticos, las concentraciones de las mezclas de aromáticos fueron seleccionadas en un rango de 100 a 500 µg/L, por tratarse de un sistema de Screening (Valcárcel, 2000); el análisis de las muestras sintéticas no se realizó de manera rigurosa en comparación a un sistema convencional como es el caso de la Cromatografía Líquida. Estos resultados se muestran en la tabla 2.

Las diferencias entre las concentraciones encontradas y añadidas presentaron un error promedio de 5,4%. Se aplicó

el *t*-test por Parejas, observándose que no hay diferencias significativas entre la concentración añadida y la concentración encontrada. El valor del *t* estadístico calculado fue 0,4193 para la mezcla de aromáticos. Este valor resultó menor que el valor tabulado, 2,015 para 5 grados de libertad y un límite de confianza de 95%, (Farrant, 1997). De acuerdo con el resultado obtenido del análisis estadístico, el método de Screening de muestras desarrollado puede ser aplicado a las muestras reales de aguas destinadas al consumo humano.

La aplicabilidad del método de Cromatografía Líquida fue inicialmente evaluada utilizando muestras sintéticas que contenían las tres especies de aromáticos. Estos resultados se muestran en la tabla 3. Los resultados obtenidos muestran las diferencias entre las concentraciones encontradas y añadidas presentando un error promedio para el benceno de 0,4%, el tolueno 1,5% y el etilbenceno 0,4%. Se aplicó el *t*-test por Parejas, observándose que no hay diferencias significativas entre la concentración añadida y la concentración encontrada. Los valores de la *t* estadística calculados fueron de 1,218; 0,031 y 1,33 para el benceno, tolueno y etilbenceno, respectivamente. Estos valores son menores que el valor tabulado, 1,833 para 9 grados de libertad y un límite de confianza de 95%, (Farrant, 1997). De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis estadístico, el método de Cromatografía Líquida con detección UV, propuesto en el presente trabajo, para la identificación y determinación de benceno, tolueno y etilbenceno puede ser aplicado a muestras reales de aguas destinadas al consumo humano.

Tabla 2. Concentraciones de las muestras sintéticas obtenidas en el sistema de Screening de muestras.

Muestra	Concentración añadida de cada especie para formar la mezcla (benceno, tolueno, etilbenceno) µg/L	Concentración encontrada de cada especie para formar la mezcla (benceno, tolueno, etilbenceno) µg/L	Error (%)	Recuperación (%)
1	100	90,3	-9,7	90,3
2	300	319,3	6,4	106,4
3	300	312,9	4,3	104,3
4	300	308,7	2,9	102,9
5	500	518,1	3,6	103,6
6	500	472,3	-5,5	94,46

Tabla 3. Concentración de las muestras sintéticas en el equipo de Cromatografía Líquida con detección UV.

Muestra	Especies	Concentración añadida (µg/L)	Concentración encontrada (µg/L)	Error (%)
1	Benceno	80	79,7	- 0,4%
	Tolueno	80	80,0	0%
	Etilbenceno	80	80,0	0%
2	Benceno	80	79,7	- 0,4%
	Tolueno	80	80,0	0%
	Etilbenceno	80	80,0	0%
3	Benceno	90	90,1	0,1%
	Tolueno	90	87,7	- 2,6%
	Etilbenceno	90	90,1	0,1%
4	Benceno	90	90,1	0,1%
	Tolueno	90	87,7	- 2,6%
	Etilbenceno	90	90,1	0,1%
5	Benceno	100	90,1	0,1%
	Tolueno	100	103,1	3,1%
	Etilbenceno	100	100,2	0,2%
6	Benceno	100	90,1	0,1%
	Tolueno	100	103,1	3,1%
	Etilbenceno	100	100,2	0,2%
7	Benceno	110	110,7	0,6%
	Tolueno	110	110,8	0,7%
	Etilbenceno	110	108,3	-1,5%
8	Benceno	110	110,7	0,6%
	Tolueno	110	110,8	0,7%
	Etilbenceno	110	108,3	-1,5%
9	Benceno	120	121,0	0,8%
	Tolueno	120	118,5	-1,3%
	Etilbenceno	120	120,4	0,3%
10	Benceno	120	121,0	0,8%
	Tolueno	120	118,5	-1,3%
	Etilbenceno	120	120,4	0,3%

Aplicación a muestras reales

De las 52 muestras de agua potable analizadas mediante el método de Screening, 47 de éstas no evidencian la presencia de hidrocarburos aromáticos (mezcla de benceno, tolueno y etilbenceno), Sólo cinco de las muestras analizadas mediante el Sistema de Screening requirieron ampliar el nivel de información mediante el método de Cromatografía Líquida con detección UV. Es importante agregar que las posibles interferencias por parte de otros compuestos que pudieran estar presentes en las aguas destinadas a consumo humano, fueron estudiadas previamente en los trabajos de Manganiello & Mendoza, (2007). El uso de las minicolumnas C₁₈ además de extraer, permiten separar los compuestos de interés de posibles interferencias presentes en las aguas

analizadas (Waters, 2005). Las muestras reales fueron preconcentradas en las minicolumnas C₁₈ de acuerdo con el procedimiento desarrollado en el apartado de sistemas de extracción y preconcentración de la sección de Técnicas Experimentales.

Una vez evaluadas las muestras en el sistema de Screening, las muestras que arrojaron una respuesta positiva se hicieron pasar a una segunda evaluación mediante el SCL con detección UV, de manera de verificar que los compuestos benceno, tolueno y etilbenceno se encuentran dentro de los límites permisibles según la Gaceta Oficial Venezolana (1998). A continuación en la tabla 4 se muestran los resultados de las cinco muestras reales analizadas.

Tabla 4. Valores de las muestras obtenidos mediante su análisis por Cromatografía Líquida con detección UV.

Componentes orgánicos	Muestra	Valores obtenidos por la técnica de Cromatografía Líquida ($\mu\text{g/L}$)*	Valor Máximo Aceptable ($\mu\text{g/L}$)
Benceno	-----	-----	10
Tolueno	1	0,05	700
Etilbenceno	2	0,15	300
	3	0,13	
	4	0,15	
	5	0,16	

Fuente: Normas sanitarias de calidad del agua potable. Número 36.395.

* Las muestras reales fueron previamente extraídas y preconcentradas en minicolumnas C_{18} .

Los resultados obtenidos mediante este método confirman que las concentraciones de tolueno y etilbenceno presentes en estas muestras se encuentran por debajo del valor máximo permisible que establecen las Normas Sanitarias de Calidad del Agua (Gaceta Oficial Venezolana 1998). Los aportes de este trabajo demuestran el importante rol que representan los dos sistemas de detección desarrollados. El sistema de Screening es simple y rápido para la determinación de compuestos aromáticos (benceno, tolueno y etilbenceno) en muestras de aguas de consumo humano. Este sistema presenta buena sensibilidad y precisión y constituye una herramienta muy útil cuando se considera un número importante de muestras. El sistema de Screening da información de la “presencia” o “no presencia” de las especies aromáticas antes mencionadas. Si la respuesta es afirmativa, es decir, que hay presencia de aromáticos, entonces se pasa al SCL con detección UV, el cual permite ampliar el nivel de información, discriminando que especies aromáticas se encuentran presentes y sus respectivas concentraciones.

CONCLUSIONES

La precisión del sistema de Screening expresada como la desviación estándar relativa para 100 $\mu\text{g/L}$ de una mezcla de hidrocarburos aromáticos ($n = 11$; $P = 0.05$) fue 8.3% y la precisión del sistema HPLC – UV expresada como la desviación estándar relativa para 80 $\mu\text{g/L}$ de benceno, 80 $\mu\text{g/L}$ de tolueno y 80 $\mu\text{g/L}$ de etilbenceno ($n = 11$; $P = 0.05$) fue de 1.61%, 0.23% y 0.20% para cada compuesto, respectivamente.

Los sistemas diseñados, aplicados en forma secuencial, aportan a los laboratorios de rutina, donde se procesan gran cantidad de muestras de agua, rapidez, ahorro del gasto de reactivo, disminución de mano de obra y simplificación del análisis. En base a lo expuesto anteriormente, se recomienda

la implementación de los sistemas propuestos en la presente investigación, por parte de los organismos que se encargan de la vigilancia de la calidad del agua de consumo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pablo Baricelli Ochoa por su valiosa colaboración en suministrar los equipos e insumos utilizados para el diseño del sistema de Screening de muestras. A la Lic. Mariángel Paulini de los Laboratorios CienVar, por suministrarnos la columna cromatográfica Sunfire® C_{18} .

REFERENCIAS

- AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y REGISTRO DE ENFERMEDADES (ATSDR) (2007). Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., p.10.
- AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y REGISTRO DE ENFERMEDADES (ATSDR) (1999). División de toxicología ToxFAQs™ Etilbenceno. España, p. 12.
- FARÍA, R. (2005). Alternativas de extracción de hidrocarburos aromáticos en sedimento y su análisis por Cromatografía de gas. *Revista Ciencia*, 8(2); pp. 240-249.
- FARRANT, T. (1997). Práctica estadística para el análisis científico. *Revista Royal Society of Chemical*. (Canadá), 25(2); pp. 63-68.
- MANGANIELLO, L. & MENDOZA, N. (2007). Determinación de hidrocarburos aromáticos en muestras de agua destinadas al consumo humano empleando previamente un sistema de Screening y Cromatografía Líquida con detección UV. Resumen en extenso en Memorias del III Simposio de Ambiente y Desarrollo, Universidad Cen-

tral de Venezuela. pp. 40-45.

MANGANIELLO, L., ARCE, L., RÍOS, A., VALCÁRCEL, M. (2002). Piezoelectric Screening coupled on line to capillary electrophoresis for detection and separation of Mercury. *J. Sep. Sci.* 25, pp. 319-327.

MORENO, M. (2003). Toxicología ambiental. Evaluación de riesgos para la salud humana. MG – Graw Hill. España, p. 345.

NORMA SANITARIA DE CALIDAD DEL AGUA POTABLE (1998). Gaceta Oficial de la República de Venezuela. Número 36.395.

COVENIN 2709:2002, (2002). Norma Venezolana: Aguas naturales, industriales, guía para las técnicas de muestreo, (1ª revisión) FONDONORMA.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD – OMS (2006). Guías para la calidad del agua potable, tercera edición, recuperado el 01 de junio de 2009, de http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf.

PROBEA, (2005). Importancia del agua para la vida. Revista Educación Proyecto Bio – Regional de Educación Ambiental. 15 (8); pp. 38-45.

SKOOG, H. (2002). Principios de análisis instrumental. Mc Graw Hill. España. 360.

VALCÁRCEL, M. (2000). Automatización y miniaturización en química analítica. Springer Verlag Iberica S.A. Barcelona. España. pp. 30-249.

WATERS (2005). Catálogo de Cromatografía Líquida. (Columnas y suministros) Waters Company. España, p. 135.