3.3.3 Limites de detección y cuantificación.

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

Tabla 24. Límites de detección y cuantificación para el sistema

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

LD = Límite de detección, LC = Límite de cuantificación

Tabla 25. Límites de detección y cuantificación para el método

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

LD = Límite de detección, LC = Límite de cuantificación

3.3.4 Robustez.

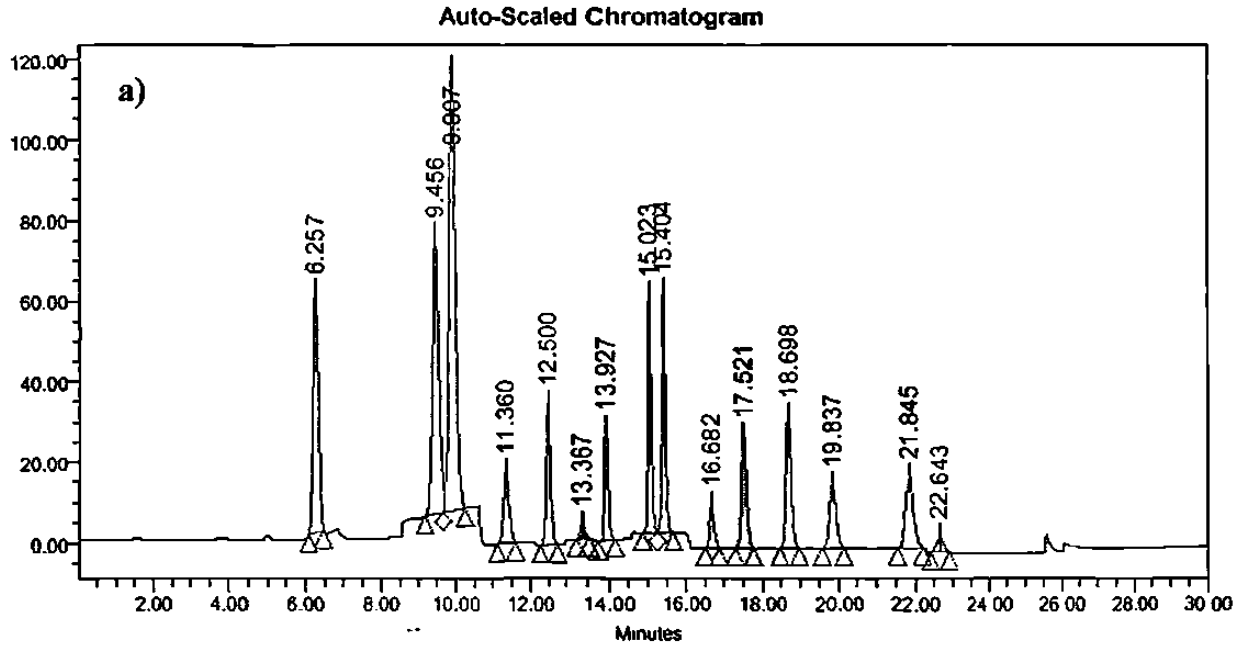
En la Tabla 26 se presenta un resumen de los resultados obtenidos de la evaluación de la robustez de la extracción. Se pudo apreciar que las cuatro variables tuvieron algún efecto en por lo menos dos analitos.

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

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

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

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



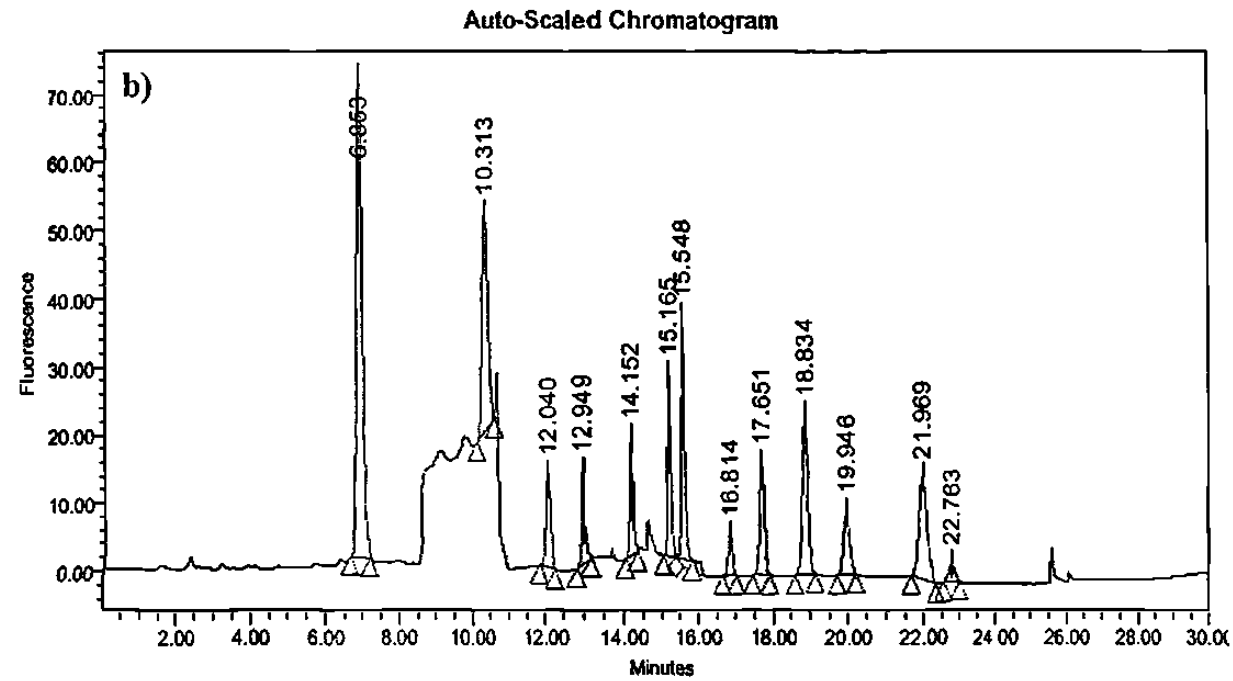


Figura 10. a) Cromatograma obtenido con las condiciones normales (fase móvil inicial agua - acetonitrilo 40:60), b) Cromatograma obtenido con una fase móvil inicial baja en acetonitrilo (agua - acetonitrilo 42:58).

3.4 Análisis de muestras reales

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

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

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

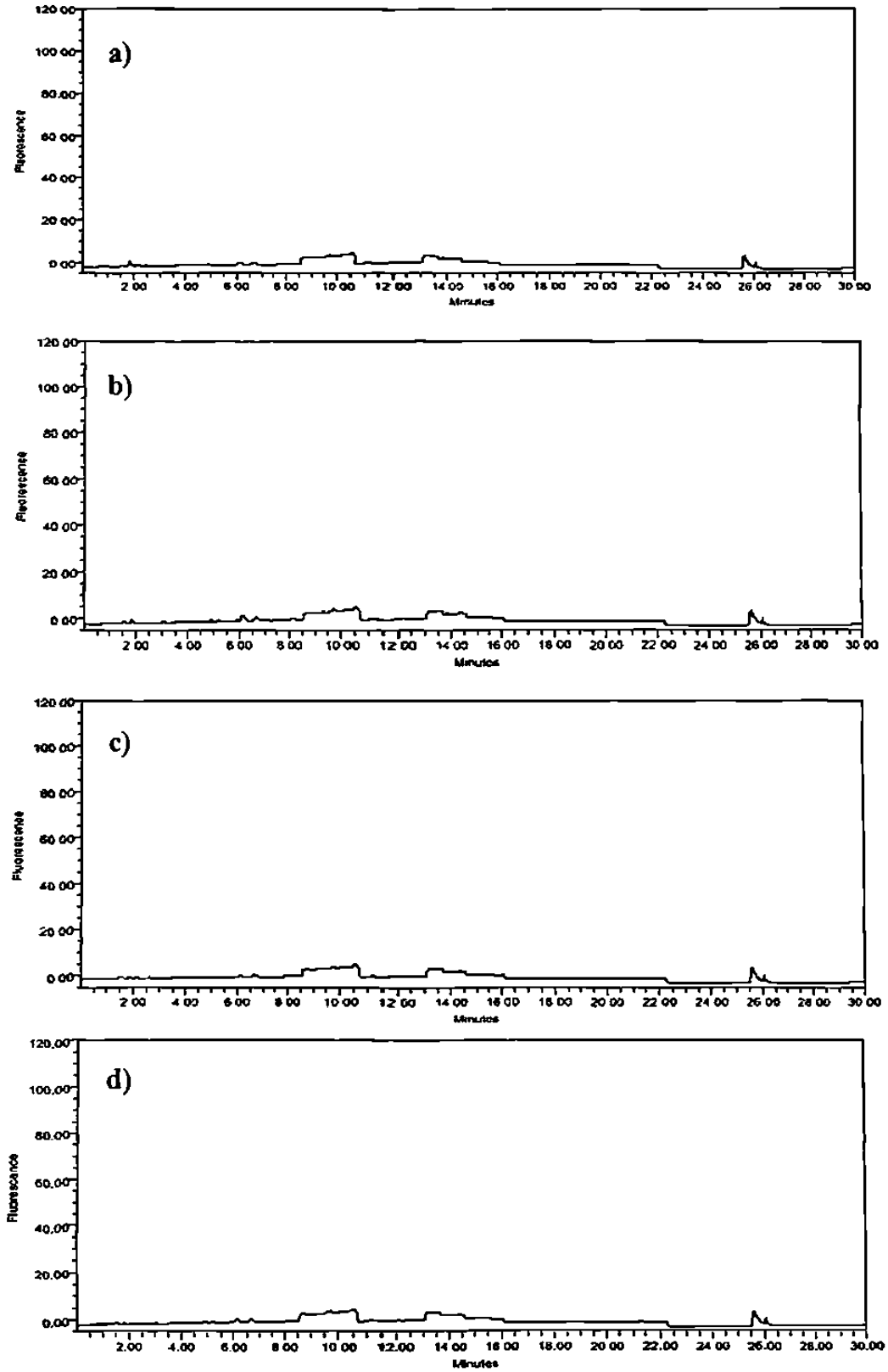


Figura 11.Cromatogramas de las muestras sin adicionar. a) agua GYM, b) agua de río, c) suministro municipal de Monterrey y d) suministro municipal de San Nicolás

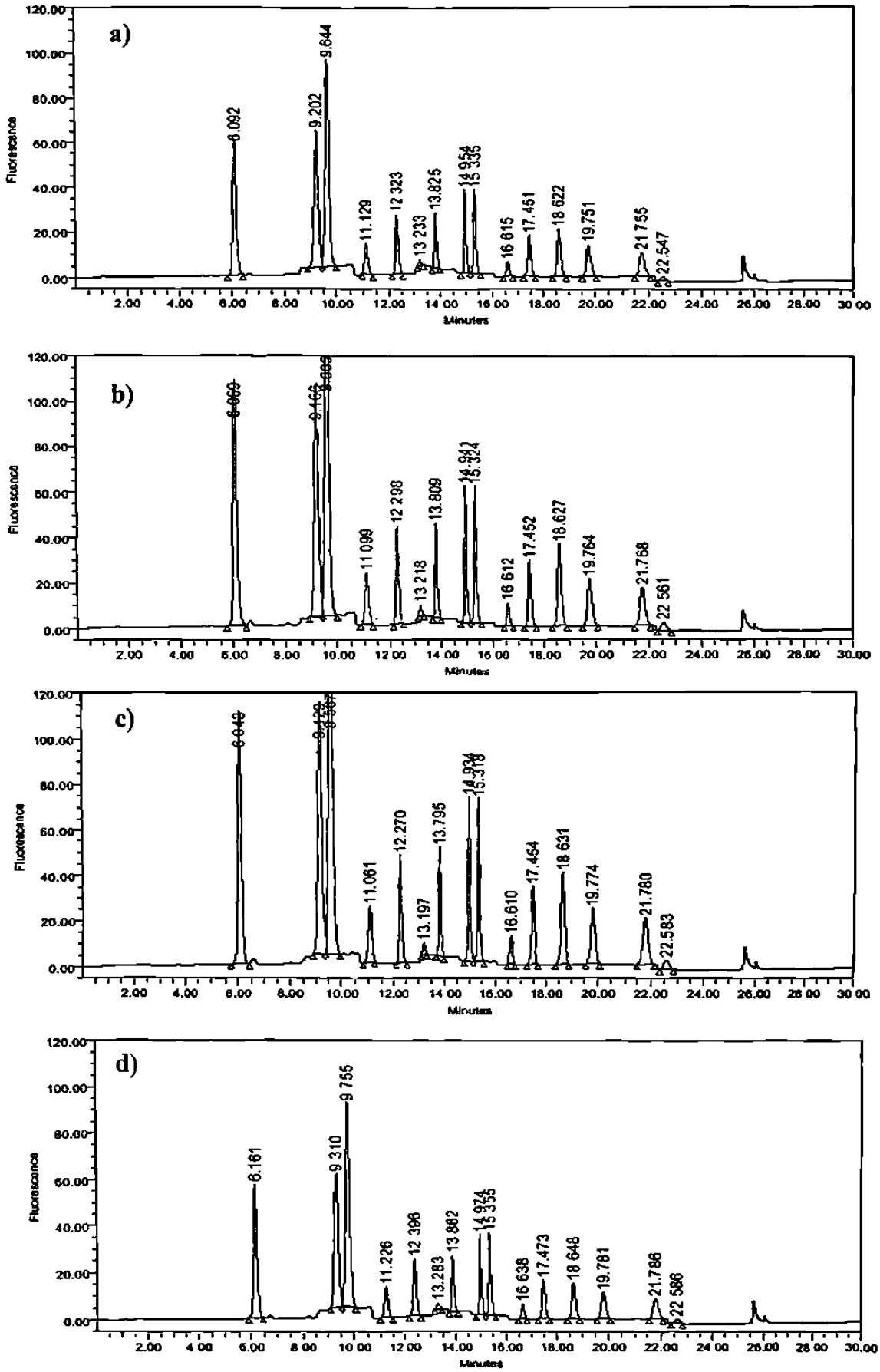


Figura 12.Cromatogramas de las muestras adicionadas. a) agua GYM, b) agua de río, c) suministro municipal de Monterrey y d) suministro municipal de San Nicolás

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

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

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

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

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

* n = 3

Tabla 29. Resultados del análisis fisicoquímico de las muestras*

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

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

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Análisis cromatográfico.

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

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

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

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

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

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

4.2 Microextracción en fase sólida.

4.2.1 Procedimiento de la SPME.

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

4.2.2 Selección de fibra.

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

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

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

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

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

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

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

4.2.3 Optimización de la SPME.

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

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

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

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

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

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

4.3 Validación.

4.3.1 Linealidad.

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

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

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

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

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

4.3.2 Precisión.

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

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

4.3.3 Exactitud.

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

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

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

4.3.4 Límites de detección y cuantificación.

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

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

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

4.3.5 Robustez.

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

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

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

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

4.4 Análisis de muestras reales.

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

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

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

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

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

4.5 Costos.

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

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

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones.

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

2. Se recomienda el uso de la Fibra de PDMS/DVB para la extracción de los PAHs en estudio, según los datos observados durante el desarrollo de las etapas del trabajo sobre todo la de validación.

3. Los diseños experimentales fueron una herramienta efectiva en los procesos de optimización al permitirnos en pocos experimentos obtener las condiciones óptimas de la SPME, comparado con lo que pudo haber requerido analizar cada variable de forma individual.

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

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

5.2 Perspectivas.

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

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

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

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

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Green J. Mark. A Practical Guide to Analytical Method Validation. Analytical Chemistry, 1996, 68, 305A – 309A.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Miller J.C., Miller J.N. Estadística para Química Analítica. Ed. Addison – Wesley Iberoamericana. 2ª edición, E.U.A., 1993. pp 147 – 148, 159 – 164, 168 – 170.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Treviño Flores N.N. Memorias del Curso "Estrategias de Optimación". Sociedad Quimica de México Sección Nuevo León, Febrero de 1999.

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

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

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

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

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO