



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DE LA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSO CON
SOLIDIFICACIÓN DE FASE ORGÁNICA, APLICADA AL ANÁLISIS DE
COMPUESTOS DE INTERÉS AMBIENTAL EN MATRICES ACUOSAS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. TANIA ROJO PORTILLO



TUTORA: DRA. LUZ ELENA VERA ÁVILA
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO D.F. ENERO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Araceli P. Peña Álvarez
Vocal	Dra. Silke Cram Heydrich
Vocal	Dr. José Federico del Rio Portilla
Vocal	Dra. Martha Patricia García Camacho
Secretario	Dra. María del Pilar Cañizares Macías

El presente trabajo de tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Luz Elena Vera Ávila, en el laboratorio 115 del departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado, Edificio “B” de la Facultad de Química de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

El trabajo se presentó en el XXV Congreso Nacional de Química Analítica (AMQA) realizado en la Facultad de Química de la UNAM, en la modalidad de presentación oral con el título “ESTUDIO DE LA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSO CON SOLIDIFICACIÓN DE FASE ORGÁNICA, APLICADA AL ANÁLISIS DE COMPUESTOS DE INTERÉS AMBIENTAL EN MATRICES ACUOSAS

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la educación de excelencia que me han brindado. Al posgrado en Ciencias Químicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca (número 245314) otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Luz Elena Vera Ávila por la asesoría, apoyo, paciencia, ayuda y sobre todo por la transmisión de conocimiento lo cual fue fundamental para la realización del presente proyecto.

A mi supervisora la M. en C. Rosario Covarrubias Herrera, por el tiempo, comprensión y guía a lo largo de la realización de este trabajo y lo más importante por cada consejo y la amistad brindada.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones durante la revisión de este trabajo.

ÍNDICE

Glosario de abreviaturas	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES	6
II.1 Contaminación Ambiental.....	6
II.1.1. El agua.....	7
II.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	8
II.2.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAP	9
<i>II.2.2. Fuentes y contaminación de HAP.....</i>	<i>11</i>
II.2.2.1. Fuentes ¹¹	11
II.2.2.2. Contaminación por HAP	12
II.2.3. Métodos de análisis.....	12
II.3. Plaguicidas.....	15
<i>II.3.1. Características generales de los fenoxiácidos.....</i>	<i>16</i>
II.3.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los fenoxiácidos ⁴⁰	17
II.3.1.2. Métodos de análisis	18
<i>II.3.2. DDT características generales</i>	<i>20</i>
II.3.2.1. Propiedades fisicoquímicas del DDT ⁴⁴	21
II.3.2.2 Métodos de análisis del DDT.....	22
<i>II.4.1 Propiedades fisicoquímicas de los fenoles.....</i>	<i>23</i>
<i>II.4.2. Métodos de análisis de fenoles.....</i>	<i>24</i>
II.5. Sulfonamidas ⁵⁶	25
<i>II.5.1. Propiedades fisicoquímicas de las sulfonamidas⁵⁷.....</i>	<i>26</i>
<i>II.5.2 Métodos de análisis de las sulfas⁵⁸.....</i>	<i>27</i>
II.6 Métodos de preparación de muestra ⁶²	28
<i>II.6.1 Extracción Líquido-Líquido.....</i>	<i>28</i>
<i>II.6.2 Extracción en fase sólida.....</i>	<i>29</i>

<i>II.6.3. Microextracción</i> ⁶³	30
II.6.3.1. Microextracción por inmersión de una gota de extractante (SDME).....	31
II.6.3.2. Microextracción líquido-líquido disperso (DLLME).....	32
II.6.3.3. Microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la fase orgánica (DLLME-SFO)	33
III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	35
III.1 Hipótesis.....	35
III.2 Objetivos.....	35
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	37
IV.1. Equipo y Materiales	37
IV.2. Reactivos y disolventes.....	38
IV.3. Preparación de soluciones	39
IV.4. Condiciones cromatográficas	41
IV.5. Metodología de la microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de gota orgánica flotante (DLLME-SFO).....	44
IV.6. Aplicación a una muestra real.....	45
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
V.1. Condiciones cromatográficas	46
V.1.1. <i>Condiciones para Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)</i>	46
V.1.2 <i>Condiciones para los plaguicidas</i>	47
V.1.3. <i>Condiciones para los fenoles</i>	49
V.1.4 <i>Condiciones para las sulfonamidas.</i>	51
V.2. Optimización de la técnica de microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica.....	53
V.2.1. <i>Tiempo y velocidad de centrifugación</i>	54
V.2.2. <i>Efecto de la adición de NaCl</i>	54
V.2.3. <i>Cantidad de mezcla extractante</i>	55
V.2.4. <i>Relación extractante-dispersante</i>	57
V.2.5. <i>Corrección de la solución de referencia para la cuantificación</i>	58
V.2.6. <i>Efecto de la agitación y el tiempo de extracción</i>	59
V.2.7. <i>Efecto de la temperatura</i>	60
V.3. Aplicación de la técnica DLLME-SFO para la extracción de diferentes grupos de compuestos	62

V.3.1 <i>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos</i>	62
V.3.1.1. Recobro y precisión del método	62
V.3.1.2. Linealidad del método	65
V.3.2. <i>Plaguicidas</i>	67
V.3.2.1. Recobro y precisión del método	67
V.3.2.2. Linealidad del método	68
V.3.3. <i>Fenoles</i>	69
V.3.3.1. Recobro y precisión del método	69
V.4. Aplicación del método analítico en muestras de agua residual y tratada	74
VI. CONCLUSIONES	78
VII. REFERENCIAS	80
ANEXOS	85

Glosario de abreviaturas

Abreviatura	Descripción
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DLLME-SFO	Microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
UV	ultravioleta
EM	Espectrometría de masas
CG	Cromatografía de gases
EFS	Extracción en fase sólida
Log kow	Logaritmo del Coeficiente de reparto octanol agua
SDME	Single drop microextraction
HF-LPME	Hollow fiber liquid phase microextraction
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction
USAEME	Ultrasound assisted emulsification microextraction
NAF	Naftaleno
ACI	Acenaftileno
ACE	Acenafteno
FLU	Fluoreno
FEN	Fenantreno
BaA	Benzo[a]antraceno
CRIS	Criseno
BaP	Benzo[a]pireno
DBahA	Dibenzo[ah]antraceno
IcdP	Indeno[cd]pireno
2,4-D	Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)acético
2,4-DB	Ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butanoico
2,4,5-T	Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)acético
2,4-DP	Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico o Diclorprop
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano
F	Fenol
2CF	2-Clorofenol
2,4DMF	2,4-Dimetilfenol
4C3MF	4-Cloro-3-metilfenol
2,4DCF	2,4-Diclorofenol
4,6DNOC	4,6-Dinitro-o-cresol
2,4,6TCF	2,4,6-Triclorofenol
PCF	Pentaclorofenol

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla II.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAP.	11
Tabla II.2. Propiedades fisicoquímicas de herbicidas fenoxiácidos.	18
Tabla II.3. Métodos para determinación de fenoxiácidos en matrices acuosas.	19
Tabla II.4. Métodos recientes para el análisis de DDT.	22
Tabla II.5. Propiedades fisicoquímicas de los fenoles.	24
Tabla II.6. Métodos para determinación de fenoles en muestras acuosas.	25
Tabla II.7. Propiedades fisicoquímicas de las sulfonamidas.	27
Tabla II.8. Metodologías analíticas para determinación de sulfas en agua.	28
Tabla IV.1. Concentraciones de HAP en la mezcla stock.	41
Tabla IV.2. Programa de gradiente para la separación de HAP.	43
Tabla IV.3. Gradiente de elución para la separación de plaguicidas	43
Tabla IV.4. Gradiente de elución para la separación de fenoles	44
Tabla IV.5. Gradiente de elución para la separación de sulfonamidas.	44
Tabla V.1. Estudio de la respuesta de los HAP (área de pico) en función de la λ (nm) de detección.	47
Tabla V.2. Estudio de la respuesta de los plaguicidas (área de pico) en función de la λ de detección.	49
Tabla V.3. Estudio de la respuesta de los fenoles en función de la λ de detección.	50
Tabla V.4. Estudio de la respuesta de las sulfas en función de la λ de detección.	52
Tabla V.5. Efecto de la temperatura en la microextracción (n=4).	62
Tabla V.6. Recobro promedio (%R) y precisión (%CV) del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de HAP en muestras acuosas (n=15).	66
Tabla V.7. Linealidad del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de HAP en muestras acuosas (n=3).	67
Tabla V.8. Recobro promedio (%R) y precisión (%CV) del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de 5 plaguicidas en muestras acuosas (n=12).	68
Tabla V.9. Linealidad del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de 5 plaguicidas clorados en muestras acuosas (n=3).	70
Tabla V.10. Recobro promedio (%R) y precisión (%CV) del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación 8 fenoles en muestras acuosas (n=12).	71
Tabla V.11. Linealidad del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de 8 fenoles en muestras acuosas (n=3).	72
Tabla V.12. Características físicas de las muestras de agua colectadas en la planta de tratamiento de CU.	75
Tabla V.13. Recobros obtenidos en el análisis de una muestra de agua residual fortificada con 10 HAP (n=6).	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1. Estructura de los 10 HAP utilizados en este trabajo: a) ligeros, b) pesados.	10
Figura II.2. Estructura y pKa de herbicidas fenoxiácido.	17
Figura II.3. Estructura del DDT.	21
Figura II.4. Estructura y pka de algunos fenoles.	24
Figura II.5. Estructura general de las sulfonamidas.	26
Figura II.6. Zonas aproximadas de predominio de las diferentes formas ácido-base de las sulfonamidas.	27
Figura II.7. Clasificación de las técnicas de microextracción.	31
Figura IV.1. Diagrama del proceso de microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica (DLLME-SFO).	46
Figura V.1. Separación de 10 HAP por gradiente de elución y flujo.	48
Figura V.2. Separación de 5 plaguicidas por gradiente de elución.	50
Figura V.3. Separación de 8 fenoles por gradiente de elución.	51
Figura V.4. Separación de 6 sulfas por gradiente de elución.	54
Figura V.5. Recuperación de Naftaleno y Fenantreno al variar la cantidad de NaCl en la fase acuosa (n=4).	56
Figura V.6. Recuperación de Naftaleno y Fenantreno al variar la cantidad de mezcla extractante añadida a la muestra (n=4).	57
Figura V.7. Efecto de la proporción extractante-dispersante sobre la recuperación de los analitos (n=4).	58
Figura V.8. %Recobro al variar el tiempo de agitación con ultrasonido (n=4).	61
Figura V.9. (a) Imagen de la dispersión formada después de inyectar la mezcla dispersante-extractante en la muestra acuosa, (b) botón formado después de colocar las muestras en hielo.	63
Figura V.10. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra sintética de HAPs en agua grado reactivo, tratada mediante la técnica DLLME-SFO.	64
Figura V.11. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de agua grado reactivo dopada con 5 plaguicidas y tratada mediante la técnica DLLME-SFO.	68
Figura V.12. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de agua grado reactivo dopada con fenoles y tratada mediante la técnica DLLME-SFO.	71
Figura V.13. Cromatogramas obtenidos por inyección directa de un estándar de sulfanlamidas en metanol (superior) y por análisis de una muestra de agua grado reactivo dopada con las 6 sulfas y tratada mediante la técnica DLLME-SFO (inferior).	74
Figura V.14. Cromatograma obtenido al inyectar un estándar de sulfas en metanol adicionado con dodecanol.	74
Figura V.15. Cromatogramas obtenidos del análisis de muestras provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU, aplicando el método DLLME-SFO-CLAR/UV desarrollado para HAP.	76
Figura V.16. Cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de influentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU (inferior) y la misma muestra fortificada con 10 HAP (superior).	77

RESUMEN

Los métodos de preparación de muestra están en continua evolución ya que esta es la etapa más crítica del proceso analítico, donde con mayor frecuencia ocurren pérdidas de analitos y contaminación de la muestra; además, es la etapa que generalmente consume más tiempo y reactivos, y produce mayor cantidad de desechos. Por ello, la tendencia actual busca eliminar o reducir estos inconvenientes mediante el desarrollo de técnicas miniaturizadas que sean más rápidas, eficaces y ecológicas.

En este trabajo se estudia una técnica novedosa para la extracción y preconcentración de compuestos orgánicos en muestras acuosas, denominada microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica (DLLME-SFO, por sus siglas en inglés).

La metodología se optimizó evaluando diferentes condiciones para cada uno de los parámetros que influyen en la formación de la microemulsión y en la recuperación de los analitos, tales como: cantidad de mezcla extractante que fue de 300µL, la relación de extractante: dispersante teniendo como condición óptima (1:2), temperatura de extracción la cual fue de 30°C como valor óptimo, tiempo de agitación el cual fue de 3 min, tipo de agitación la cual fue realizada con ultrasonido []), cantidad de NaCl cuyas condiciones finales fue de 50mg, tiempo y velocidad de centrifugación (4500 rpm durante 10min).

La técnica optimizada se aplicó en el análisis de muestras de agua grado reactivo, fortificadas con hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP) (Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[a]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Indeno[c,d]pireno), plaguicidas (2,4-D; 2,4-DP; 2,4,5-T; 2,4-DB y 4,4-DDT), fenoles (Fenol, 2-Clorofenol, 2,4-Dimetilfenol, 4-Cloro-3-metilfenol, 2,4-Diclorofenol, 4,6-Dinitro-o-cresol, 2,4,6-Triclorofenol y Pentaclorofenol) o sulfonamidas (Sulfatiazol, Sulfadiazina, Sulfamerazina,

Sulfametoxazol, Sulfisoxazol y Sulfadimetoxina). El recobro y la precisión de recobro en la extracción de compuestos altamente hidrofóbicos (HAP pesados y DDT) o de hidrofobicidad media (HAP ligeros, ácidos clorofenoxi y policlorofenoles), resultaron bastante satisfactorios. Para solutos de baja hidrofobicidad (Log Kow entre 2.0-2.5), como los monoclorofenoles y nitrofenoles, los recobros disminuyeron notablemente (entre 30-50%), pero la precisión de recobro siguió siendo muy aceptable. En este último caso, la técnica DLLME-SFO podría aplicarse para la preparación de muestras en las que no se requiera alcanzar una alta sensibilidad ya que existe un factor de concentración. Finalmente, para los solutos francamente hidrofílicos, como el fenol (Log Kow=1.5) y las sulfas (Log Kow ≤ 1), la técnica de microextracción, tal como se estableció en este trabajo, no es apropiada.

El método DLLME-SFO-CLAR/UV para determinación de HAP se aplicó en una muestra de agua residual de la planta de tratamiento de aguas de Ciudad Universitaria. Las señales de matriz observadas fueron escasas y pequeñas, y ninguna de ellas correspondió a los HAP estudiados en el presente trabajo. El análisis de la misma muestra fortificada con 10 HAP a una concentración de 100 ng/mL, demostró que los recobros eran similares a los obtenidos con muestras de agua grado reactivo fortificadas, avalando así la eficiencia del método para determinación de HAP en muestras complejas.

I. INTRODUCCIÓN

La investigación y el desarrollo de la química en el siglo XX produjeron una auténtica revolución, generando nuevos productos y materiales que mejoraron profundamente la calidad de vida y contribuyendo con infinidad de métodos al avance de la tecnología. Sin embargo, estos grandes avances han venido acompañados del uso masivo y el desecho no controlado de gran cantidad de sustancias químicas, provocando importantes problemas ya que se ha alterado el ambiente a tal grado que puede estar en riesgo el equilibrio del planeta.

Desde hace ya varios años, la contaminación y la destrucción de los recursos naturales han suscitado una creciente preocupación en la sociedad, por lo que la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de la distribución, toxicidad y efectos de los agentes químicos en el medio ambiente. La principal vía de entrada de contaminantes en los cuerpos de agua son las aguas residuales, tanto urbanas como industriales y las de origen agrícola o ganadero.

En respuesta a esta problemática, los organismos responsables del cuidado del medio ambiente en los diferentes países, establecieron regulaciones muy severas para controlar la presencia y concentración de una gran gama de sustancias en el ambiente; dichas sustancias son consideradas como contaminantes prioritarios. Dentro de esta clasificación están incluidos compuestos de muy diversas familias como: hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, dioxinas, plaguicidas, fenoles, y muchos otros, cuya toxicidad, mutagenicidad y efectos nocivos para el hombre, o la vida acuática y terrestre, han sido claramente comprobados. Recientemente, otro grupo de sustancias, actualmente no reguladas, han llamado la atención por su presencia sistemática en el ambiente y particularmente en el medio acuático. Estas sustancias han sido denominadas contaminantes emergentes. En esta clasificación se incluyen los agentes activos de fármacos y productos de cuidado personal, así como los destinados a la protección y cuidado de la salud animal.

Para cumplir o verificar el cumplimiento de las regulaciones ya establecidas, y las que serán emitidas en el futuro próximo, se requiere de métodos analíticos capaces de determinar los compuestos de interés a niveles traza (partes por billón o menores) en matrices muy complejas, como lo son las matrices ambientales. Los métodos de análisis comúnmente utilizados para este fin, se basan en técnicas de separación muy poderosas, como la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), acopladas a sistemas de detección sumamente sensibles y, de preferencia, selectivos. La espectrometría de masas (EM) se ha convertido en la mejor opción como método de detección en análisis ambientales, sin embargo, su elevado costo y el alto grado de especialización requerido para su manejo han limitado su uso generalizado (particularmente el de CLAR-EM).

A pesar de la alta capacidad de la instrumentación analítica actual, la preparación de muestra sigue siendo necesaria y es un punto crítico para la obtención de resultados confiables en el análisis de muestras complejas. Es por ello que la investigación en el área de la Química Analítica se ha enfocado, desde hace varios años, en el desarrollo de nuevas técnicas de preparación de muestra. Además de mejorar la precisión y exactitud en esta etapa, las propuestas actuales buscan reducir el consumo de disolventes y reactivos, así como la generación de desechos, mediante el desarrollo de técnicas miniaturizadas.

La **miniaturización** se ha convertido en una verdadera tendencia en Química Analítica. Las técnicas miniaturizadas de preparación de muestra presentan numerosas ventajas frente a los procedimientos tradicionales. Algunas de ellas son la simplicidad, rapidez, economía, reducción del número de etapas y de la manipulación de la muestra. Además, se minimiza la cantidad de muestra utilizada, así como el consumo de reactivos y disolventes caros y tóxicos, dando lugar a procesos más ecológicos. Los métodos reportados en años recientes para la determinación de compuestos potencialmente tóxicos en el ambiente hacen énfasis en las técnicas de microextracción. Es por ello que en este trabajo nos

avocamos al estudio de una técnica novedosa de microextracción líquido-líquido, abordando sus posibles aplicaciones.

En el año 2009, Hui Xu *et.al.* describieron por primera vez una nueva metodología denominada: “*Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplet (DLLME-SFO)*”, que hemos traducido como: “Microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica”, abreviándola con las siglas del nombre en inglés, aplicándola al análisis de difenilo y 4 HAP como son Naftaleno, Acenafteno, Antraceno y fluoranteno en muestras de agua de río, residual subterránea y de la llave teniendo recobros por arriba del 88%. En el presente trabajo se buscó optimizar las condiciones experimentales de la DLLME-SFO con el objeto de establecer un protocolo de preparación de muestra simple, robusto y rápido, que permitiera procesar de manera simultánea un buen número de muestras y que pudiera aplicarse a diferentes familias de analitos y tipos de muestra acuosa, sin requerir modificaciones importantes a excepción de un eventual ajuste del pH de la muestra.

II. ANTECEDENTES

II.1 Contaminación Ambiental

La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afectan a nuestro mundo. Surge cuando se produce un desequilibrio como resultado de la adición de cualquier sustancia al medio ambiente, en cantidad tal que sobrepasa los niveles aceptables en la naturaleza causando efectos adversos en los seres vivos.

La contaminación puede generarse a partir de ciertas manifestaciones de la naturaleza (fuentes naturales) o bien debido a los diferentes procesos productivos del hombre (fuentes antropogénicas) que conforman las actividades de la vida diaria. Más de mil productos químicos son introducidos anualmente en los sistemas hídricos, entre los que se encuentran los pesticidas, detergentes, metales pesados, residuos farmacéuticos, polímeros y muchos más. La contaminación es uno de los principales problemas que enfrentan los acuíferos en México¹.

Debido a la creciente toma de conciencia ambiental por parte de la comunidad científica y en general de la sociedad, desde hace mas de 30 años las Naciones Unidas han abordado diferentes temáticas ambientales, como el calentamiento global, el acceso al agua, la protección de los océanos, etc. Numerosos organismos internacionales se han interesado en la supervisión y la regulación, a nivel global, de un número relativamente pequeño de compuestos químicos llamados contaminantes prioritarios. Estos contaminantes son compuestos persistentes, tóxicos, carcinógenos, teratógenos o mutagénicos². Ejemplos de ellos son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los plaguicidas y los fenoles, que son objeto de estudio en esta tesis.

En los últimos años, el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis ha permitido alertar sobre la presencia de otros contaminantes, potencialmente

peligrosos, denominados globalmente como emergentes. Los contaminantes emergentes son compuestos de los que se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales. Es quizá por esta razón que no han sido regulados, lo que a su vez trae como consecuencia el poco interés y escaso conocimiento que se tiene de ellos en tanto que contaminantes, y la nula o limitada disponibilidad de métodos para su análisis en matrices ambientales. Otra particularidad de estos compuestos es que, debido a su elevada producción y consumo, y por ende su continua introducción en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos. En esta categoría de contaminantes se clasifican los agentes activos de los fármacos y productos de cuidado personal, los productos de limpieza, los productos para el cuidado y prevención de la salud animal y muchos otros productos de uso común. Un ejemplo típico de contaminantes emergentes son las sulfonamidas^{1,3}.

II.1.1. El agua

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida y el sostenimiento del medio ambiente. Sin embargo, por el uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación de desechos industriales y urbanos, ha sufrido un alarmante deterioro¹.

En la clasificación mundial, México está considerado como un país con baja disponibilidad de agua. Siendo la disponibilidad de este líquido uno de los problemas que más preocupa a la humanidad, se vuelve imperativo contar con los medios apropiados para su purificación y reuso. El tratamiento de aguas residuales es de gran importancia ya que ofrece una alternativa para mitigar el problema de la escasez de agua con características apropiadas para el uso y consumo humano.

El agua residual es de composición variada pues proviene de las descargas de aguas municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas y en general

de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas. El análisis de las aguas residuales pre y post-tratamiento es necesario para evaluar la eficacia del proceso de purificación, cuantificar la cantidad de impurezas remanentes y estimar los efectos que podrían provocar en el ambiente o en los seres vivos; por eso se utilizan diferentes métodos que permiten conocer las características, composición y condición de estas aguas⁴.

El desarrollo de métodos analíticos para medir el tipo y cantidad de sustancias disueltas en agua ha avanzado paralelamente a los adelantos en la química analítica. Aunque actualmente se dispone de métodos oficiales bien establecidos para la determinación de diversas familias de contaminantes, las regulaciones existentes tienden a volverse más estrictas y se emiten nuevas regulaciones para sustancias antes no consideradas, por lo que la demanda de nuevas y mejores metodologías analíticas es una constante. Hoy en día, no sólo se consideran los parámetros de precisión, exactitud, sensibilidad y costos al seleccionar los métodos analíticos que se utilizan en los laboratorios dedicados al análisis de agua, sino que también se han vuelto importantes la rapidez de respuesta, la versatilidad, la sencillez en la preparación de muestra y la reducción en la generación de desechos.

II.2. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

Son un grupo de sustancias químicas de 2 a 7 anillos fusionados entre sí, que se forman durante la combustión incompleta de compuestos orgánicos, como el petróleo, el gas natural, la madera, la basura, el tabaco y los alimentos asados al carbón, entre otros. Su formación se produce cuando la materia orgánica es expuesta a temperaturas elevadas (arriba de los 400 °C), mediante un proceso de pirólisis y condensación.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos carcinógenos y mutágenos que se han detectado a niveles traza en todos los compartimentos ambientales. Las agencias de protección ambiental de Estados Unidos, la Unión

Europea y otros países, así como la Organización Mundial de la Salud, los han clasificado como contaminantes prioritarios que deben ser monitoreados regularmente con el fin de proteger el medio ambiente y la salud humana. Debido a su carácter hidrofóbico, las concentraciones de HAP en aguas superficiales y subterráneas son sumamente pequeñas, por lo que su cuantificación en este medio requiere de métodos analíticos generalmente muy elaborados, largos y tediosos. Para dar un seguimiento rutinario a estos compuestos, sería necesario contar con métodos alternos que permitan determinaciones simples, rápidas y económicas ⁵.

Estos compuestos se dividen en dos categorías principales:

1. HAP de bajo peso molecular (ligeros): compuestos de menos de cuatro anillos.
2. HAP de alto peso molecular: compuestos de cuatro o más anillos.

La estructura de los HAP determina su baja degradabilidad. Son considerados contaminantes persistentes, por lo que tienen gran impacto en los ecosistemas y alteran el equilibrio ecológico.

II.2.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAP

La Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos ha incluido 16 HAP en la lista de contaminantes cuyo estudio debe considerarse prioritario⁷. En la Figura II.1 se muestra la estructura de los 10 HAP del grupo de contaminantes prioritarios, con los que se trabajó en el presente proyecto.

Las propiedades físicas y químicas de los HAP son propias de la estructura de cada uno y son determinantes de su comportamiento y destino final en el medio ambiente. En la Tabla II.1 se resumen las propiedades de los 10 HAP utilizados en este estudio.

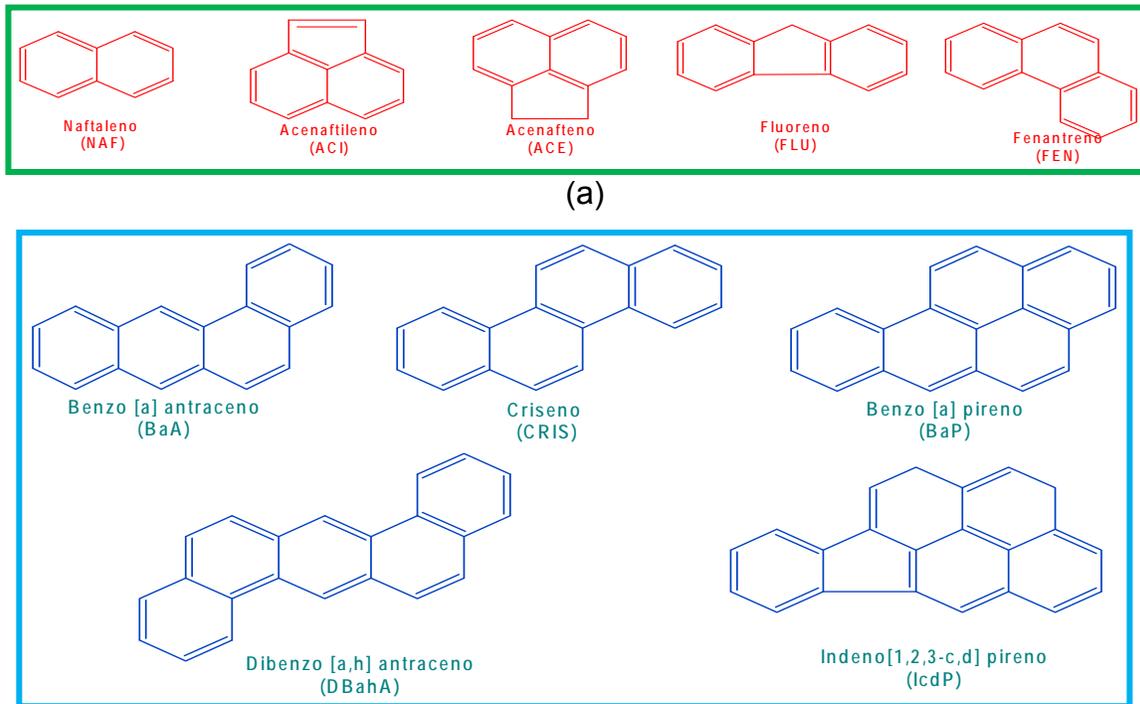


Figura II.1. Estructura de los 10 HAP utilizados en este trabajo:
a) Ligeros, b) pesados⁸.

Como característica común, los HAP presentan baja solubilidad en el agua y son lipofílicos. En general, la solubilidad decrece conforme aumenta el peso molecular, pero la configuración geométrica de la molécula también tiene una influencia considerable. La solubilidad de estos compuestos es un parámetro que determinará en gran medida la concentración y el tipo de HAP que puede encontrarse en el medio ambiente acuoso. Aunque la solubilidad de los HAP en agua es muy baja, puede aumentar notablemente en presencia de detergentes, sales alcalinas, ácidos grasos o disolventes orgánicos.

Los valores del logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua (Log Kow) para los HAP oscilan entre 3 y 6.8, que es generalmente considerado el rango de compuestos lipofílicos. Como consecuencia de sus elevados coeficientes de reparto octanol-agua y baja solubilidad en agua, tienden a acumularse en partículas sólidas de suelos y sedimentos, convirtiéndose en contaminantes orgánicos persistentes en el medio ambiente⁹.

Tabla II.1. Propiedades fisicoquímicas de los HAP* 8,10.

HAP	P.M. (Dalton)	S (mol/L)	P.f. (°C)	P.eb. (°C)	Pv (kPa)	Log Kow
Naftaleno	128.2	2.48×10^{-4}	81	218	1.04×10^{-2}	3.36
Acenaftileno	152.2	2.58×10^{-5}	92	265	8.9×10^{-4}	4.07
Acenafteno	154.2	2.55×10^{-5}	95	279	2.9×10^{-4}	3.92
Fluoreno	166.2	1.19×10^{-5}	116	295	9.0×10^{-5}	4.18
Fenantreno	178.2	7.24×10^{-6}	100	340	1.6×10^{-5}	4.57
Benzo[a]antraceno	228.3	6.14×10^{-6}	161	400	2.8×10^{-6}	5.61
Criseno	228.3	8.76×10^{-9}	254	448	8.4×10^{-6}	5.91
Benzo[a]pireno	252.3	1.51×10^{-8}	178	496	7.3×10^{-10}	6.06
Dibenzo [a,h]antraceno	278.4	1.8×10^{-9}	267	524	1.3×10^{-11}	6.52
Indeno[c,d]pireno	276.3	2.25×10^{-7}	164	536	1.3×10^{-11}	6.58

* P.M.: peso molecular, S: solubilidad a 25°C, P.f.: punto de fusión, P.eb.: punto de ebullición, Pv: presión de vapor a 25°C, Log Kow: logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua.

II.2.2. Fuentes y contaminación de HAP

II.2.2.1. Fuentes¹¹

Se forman principalmente como resultado de una combustión incompleta de hidrocarburos asociados con actividades antropogénicas (mayoritariamente) y de manera natural (minoritariamente).

Fuentes naturales

Algunas formas de combustión natural de materia orgánica que conllevan a la emisión de HAP al aire son las erupciones de los volcanes y los incendios forestales debidos a causas naturales. Los petróleos y en general los combustibles fósiles contienen de forma natural HAP en bajas concentraciones (alrededor del 1%), dependiendo en gran parte del origen del crudo.

Fuentes antropogénicas

Este término hace referencia a todas las formas en las que se originan HAP que sean dependientes de la actividad humana. La amplia utilización de procesos de combustión de materia orgánica durante el último siglo ha hecho que la producción de HAP sea un fenómeno habitual en nuestra sociedad. Los combustibles fósiles son de uso frecuente y abundante, sobre todo en tres ámbitos: actividades industriales, calefacción doméstica y en todo tipo de vehículos de transporte.

II.2.2.2. Contaminación por HAP

La pirólisis de la materia orgánica es un proceso extensivo, lo que implica una amplia distribución en todos los compartimentos ambientales: aire, suelo, agua, sedimentos, tejidos biológicos, incluyendo algunos alimentos.

Los HAP pueden entrar a las aguas de superficie a través de las descargas de plantas industriales y de tratamiento de aguas residuales; además, pueden ser liberados a los suelos a partir de desechos peligrosos si éstos se escapan de los contenedores de almacenamiento. En el suelo los HAP se unen a otras partículas y algunos pueden migrar contaminando los acuíferos. La degradación de los HAP en el suelo y en el agua puede llevar semanas y meses, y es causada principalmente por la acción de microorganismos. A pesar de la baja solubilidad de los HAP en agua, su presencia en este medio está ampliamente regulada en la mayoría de los países⁷.

II.2.3. Métodos de análisis

La determinación de HAP en el ambiente, al igual que cualquier otro microcontaminante, requiere de métodos analíticos altamente sensibles. A pesar de los considerables avances tecnológicos en el campo analítico, la mayoría de los instrumentos no pueden procesar matrices complejas directamente. En la mayoría de los casos se requiere de una etapa previa de preparación de muestra, mediante la cual se concentran los analitos de interés y se obtiene un extracto limpio, compatible con el sistema analítico. En ocasiones, si la muestra es muy

compleja, los extractos resultantes de la etapa de preparación de muestra requieren un protocolo de limpieza adicional antes de su análisis.

En México no existe una norma para el análisis de HAP en aguas residuales, solo existe una norma para el análisis de HAP en suelos que es la NMX-AA-146-SCFI-2008¹². El método describe el análisis para determinar la concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en extractos preparados a partir de muestras de suelo. La determinación cuantitativa se realizó por Cromatografía de Gases /Espectrometría de Masas (CG/EM) o por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con Detector de Fluorescencia y Ultravioleta Visible (UV-VIS). Para el análisis es necesario extraer previamente los HAP que están presentes en la muestra de suelo homogeneizada y cribada mediante cualquiera de las siguientes técnicas de extracción: Sonicación (disruptor ultrasónico o baño ultrasónico), Soxhlet o Extracción Acelerada con Disolventes (ASE por sus siglas en inglés).

Los métodos tradicionales para determinación en agua de los HAP incluidos en la lista de los contaminantes prioritarios de la EPA, son variaciones del método 610 (USEPA 1984)⁶. Todos ellos se basan en la extracción líquido-líquido (ELL) de la muestra acuosa y su posterior análisis por cromatografía de gases o cromatografía de líquidos. El procedimiento es largo y minucioso e implica una amplia manipulación de la muestra, lo que se traduce en altos riesgos de pérdida de analitos durante la preparación de muestra. Además, presentan otras desventajas como: uso de volúmenes relativamente grandes de disolventes orgánicos tóxicos, formación de emulsiones, necesidad de etapas adicionales de evaporación de disolvente, por consiguiente, problema de generación de desechos dañinos para el medio ambiente¹³. Es por ello que estos métodos han sido sustituidos por metodologías más sencillas y menos contaminantes.

Otro método de preparación de muestra muy popular es la extracción en fase sólida (EFS). La EFS está basada en la retención más o menos selectiva de los

analitos en un adsorbente apropiado y su posterior elución. Seleccionando adsorbentes y eluyentes adecuados se pueden conseguir extracciones muy selectivas¹³. Esta técnica se ha aplicado en la extracción de HAP de aguas de consumo humano^{14,15}, medioambientales^{16,17,18} y residuales¹⁹. El adsorbente de fase reversa C18 es, con mucho, la fase más utilizada^{20,21-24}, pero también se han descrito algunas aplicaciones con otras fases reversas como C8^{25,26}, o fases poliméricas estireno-divinilbenceno en el formato de discos. Los disolventes de elución más comunes son el acetonitrilo^{18,22}, metanol²⁴, 2-propanol²⁷, n-hexano^{14,28}, diclorometano^{17,29}, acetato de etilo^{24,30}, tetrahidrofurano²⁶, tolueno¹⁵, o mezclas de ellos^{16,19,31}.

Aunque esta técnica utiliza menor cantidad de disolvente orgánico que la ELL, el volumen del extracto es todavía bastante importante y normalmente se requieren pasos adicionales de evaporación para la concentración de los extractos. Por otro lado, aunque la EFS puede ser automatizada, esto conlleva a un aumento en la complejidad y un coste adicional.

En el caso concreto de los HAP, existen algunos inconvenientes mayores al aplicar la EFS como método de preparación de muestra. Uno de ellos es la pérdida de analitos por adsorción en las paredes de los recipientes y conductos por los que circula la muestra³¹. Este problema suele resolverse mediante la adición de un disolvente orgánico (metanol, acetonitrilo o 2-propanol) o un surfactante, que incrementan la solubilidad de los analitos en la muestra acuosa. Sin embargo, la concentración del disolvente orgánico es un parámetro crítico en EFS. Si el porcentaje de disolvente añadido es bajo, probablemente no sea suficiente para solubilizar los HAP de mayor peso molecular, produciéndose de igual manera las pérdidas por adsorción. Si por el contrario el porcentaje de disolvente orgánico es demasiado elevado, el volumen de ruptura o fuga de los HAP de bajo peso molecular, se verá reducido. Por lo tanto, se trata de un parámetro a tener en cuenta, que debe optimizarse en función del adsorbente y del disolvente utilizado³². Por otro lado, si se trata de conseguir un factor de

enriquecimiento máximo aumentando el volumen de muestra que pasa por el dispositivo de EFS, la eficiencia de la extracción disminuye de forma considerable para los HAP más ligeros, que son menos retenidos por la fase adsorbente y que presentan un volumen de ruptura menor. Otro problema asociado, que limita la recuperación de los compuestos más ligeros, es la pérdida por volatilidad durante las etapas de secado del cartucho y de concentración de los extractos.

Cabe mencionar en este sentido que, con el método oficial 550.1 descrito por la EPA, donde se utiliza la EFS para la extracción de HAP en aguas destinadas a consumo mediante cartuchos de C18 o discos del mismo material, las recuperaciones para algunos de estos compuestos son de un 50% aproximadamente³³.

II.3. Plaguicidas

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de organismos causantes de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera, productos de ésta o alimentos para animales³⁴.

Los plaguicidas se pueden clasificar de diversas formas³⁵:

1. Por su naturaleza química:

- Inorgánicos
- Orgánicos
- Naturales (botánicos microbianos)
- Sintéticos

2. Por su mecanismo de acción:

- Contacto
- Ingestión
- Fumigante

Sistémicos

3. Por el tipo de organismos que afectan:

Insecticidas
Acaricidas
Fungicidas
Herbicidas

En este proyecto de investigación se analizaron 5 plaguicidas: 4 fenoxiácidos y el DDT un compuesto organoclorado.

II.3.1. Características generales de los fenoxiácidos

Los fenoxiácidos constituyen el grupo más antiguo de herbicidas sintéticos; fueron introducidos en la agricultura desde el año 1940. El gran éxito de su aplicación se ha debido principalmente a su fuerte actividad herbicida, que permite utilizar dosis muy pequeñas con las que su aplicación resulta más económica, y a su selectividad³⁶.

Sus residuos y productos de degradación y/o transformación son relativamente móviles en el medio ambiente y causan la contaminación de suelos, aguas superficiales y subterráneas. De esta forma, constituyen un riesgo potencial para la salud humana a través de la exposición directa o mediante los residuos presentes en alimentos y agua para beber³⁷. Su persistencia en el medio ambiente depende de cómo se encuentran formulados, pero normalmente suele estar comprendida entre 5 y 25 semanas.

En la Figura II.2 se presenta la estructura química de los 4 herbicidas fenoxiácido que se utilizaron en este estudio: ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)acético (2,4-D), ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butanoico (2,4-DB), ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico (2,4-DP ó diclorprop) y ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)acético (2,4,5-T).

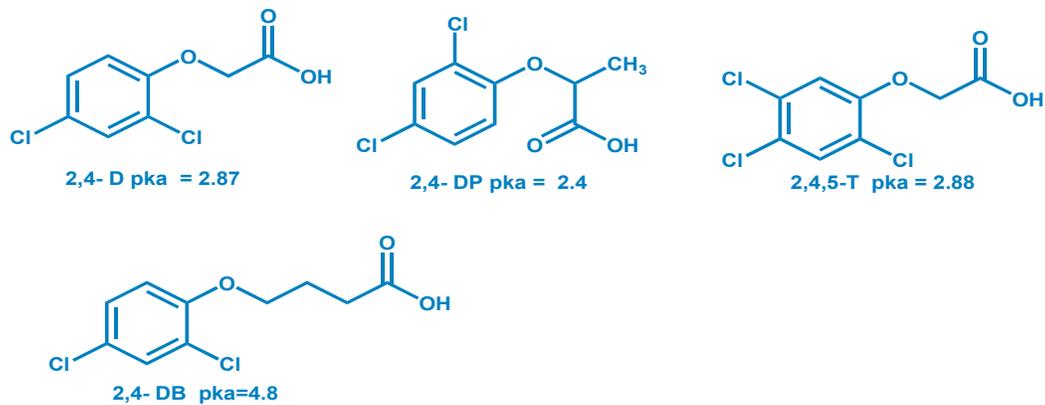


Figura II.2. Estructura y pKa de herbicidas fenoxiácido (Merck)³⁸.

Los ácidos 2,4-D y 2,4-DB se encuentran entre los herbicidas más utilizados en México para el control de maleza en los campos de cereales y en las presas. En la agricultura, el 2,4-D se emplea principalmente en cultivos de arroz, avena, caña de azúcar, centeno, espárrago, maíz, trigo y sorgo; mientras que el 2,4-DB se usa en los de alfalfa, cacahuate y soya. Estos herbicidas, por ser moderadamente hidrosolubles, se introducen en las aguas superficiales y subterráneas por el drenado natural de los suelos debido a las lluvias o por infiltración. Adicionalmente, en México el 2,4-D se utiliza sistemáticamente para el control de hierbas acuáticas en lagunas y presas que sirven como suministro de agua para las plantas potabilizadoras. Aunque uno de estos compuestos está clasificado como moderadamente tóxico (2,4-D) y el otro como ligeramente tóxico (2,4-DB), el estudio de su ciclo en el agua muestra una gran persistencia debida a la baja actividad de biodegradación para este tipo de contaminantes. Por ello, es necesario monitorear regularmente sus niveles de concentración en este medio natural³⁹.

II.3.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los fenoxiácidos⁴⁰

Los herbicidas fenoxiácido son compuestos blancos o incoloros, cristalinos, poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos cuando se utilizan como ácidos o ésteres. Son compuestos relativamente polares. Diversos autores han estudiado la correlación existente entre la adsorción en suelos y constantes

basadas en afinidad por carbono orgánico (Koc), solubilidad en agua, coeficiente de reparto octanol-agua, tiempo de retención en HPLC de fase reversa y peso molecular. En general se sabe que los herbicidas con baja presión de vapor tienden a disiparse lentamente y que los herbicidas con coeficientes de reparto relativamente elevados o baja solubilidad en agua, tienden a adsorberse en el suelo y poseen una gran capacidad de bioacumulación.

Además, los fenoxiácidos son fácilmente ionizables en condiciones naturales pues poseen valores de pKa en el intervalo comprendido entre 2.7 y 4.9. También presentan baja volatilidad y se hidrolizan lentamente con los ácidos y bases en caliente. Las principales características físico-químicas de este tipo de herbicidas se muestra en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Propiedades fisicoquímicas de herbicidas fenoxiácidos*.

Herbicida	Estado físico	P.M. (g/mol)	P.f. (°C)	S (mg/L)	pka	Pv (mm Hg)	Log Kow
2,4-D	polvo cristalino	221	136-140	620	2.73	8.25×10^{-5}	2.8
2,4-DP	sólido incoloro	235.1	116-118	350	3.00	7.5×10^{-8}	3.43
2,4,5-T	sólido blanco	225.5	154-157	150	2.8	3.75×10^{-5}	3.31
2,4-DB	cristales incoloros	249.1	117-119	46	4.8	1.1×10^{-5}	3.53

* P.M.: peso molecular, P.f.; punto de fusión, S: solubilidad a 25°C, Pv: presión de vapor a 25°C, Log Kow: coeficiente de reparto octanol-agua.

II.3.1.2. Métodos de análisis

Debido a las bajas concentraciones permitidas por ley, y a la evidencia de la toxicidad de este tipo de herbicidas, resulta necesario disponer de métodos de análisis sensibles, selectivos y de alta resolución, que permitan controlar los niveles de concentración en diversas matrices. Inicialmente, la determinación de herbicidas fenoxiácido se llevó a cabo mediante métodos colorimétricos y espectrofotométricos, pero no se alcanzaban las sensibilidades requeridas. En la

actualidad, se han propuesto diversos procedimientos, que utilizan en todos los casos técnicas cromatográficas, para su determinación a niveles traza en aguas potables y naturales, suelos y en distintas clases de alimentos⁴⁰.

El método oficial más empleado para determinar los ácidos clorofenoxi en agua es el método 8150 de la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de EU, Keith 1990), que se basa en una doble extracción líquido-líquido seguida por evaporación del disolvente orgánico, derivación de los solutos y análisis por cromatografía de gases. Este método es largo y tedioso, implica una continua manipulación de la muestra y requiere del uso y posterior evaporación de volúmenes relativamente grandes de disolventes orgánicos de alta pureza⁴¹.

En la Tabla II.3 se describen algunas características de otros métodos reportados para la determinación de fenoxiácidos en agua, ya sea por CG o por CLAR.

Tabla II.3. Métodos para determinación de fenoxiácidos en matrices acuosas* ².

Herbicida	Técnica	Detector	LD	Preparación	Matriz	Condiciones
MCPP, MCPA 2,4-D, 2,4-DP 2,4,5-T, 2,4- DB 2,4,5-TP MCPB	CG	EM	1-10 ng/m L	derivatización PFBB EFS-C18 cartuchos 1g	Agua %R 53-104 %CV 5-16	Fase móvil He
Fenoxiácidos	CG	EM	0.1-1 µg/L	MEFS, fibra PDMS-DVB 100µm	Agua ultrapura	-
Fenoxiácidos	CG	EM	1 ng/L	derivatización PFBB	Agua	HP-5 5% fenil-95% metilsiloxano
MCPP 2,4,5-T	CG	EM	0.1 µg/L	EFS-C18 Sep-pack	Agua %R 63-98	-
2,4-D	CLAR	UV (230 nm)	0.02- 0.1 µg/L	EFS-C18 Sep-Pak 500 mg	Agua subterránea %R 73-90	Lichrosorb RP-18 par iónico MeOH- TEA ac. (pH 6.9) 20:80 (v/v)
2,4-D 2,4,5-T	CLAR	ED (0.9V) fotólisis por irradiación a 254 nm	1- 100 pg/m L	EFS-C18 LiChrolut-EN 200 mg	Agua %R 83-106	LiChrocart MeOH-agua (2g/L LiClO ₄ 2 mL HAcO gl. pH 3.9) 3:2 (v/v)

2,4-D 2,4,5-T 2,4-DB	CLAR	UV (230 nm)	1-2 µg/L	Limpieza PRP-100, 10 µm preconc. en línea precolumna polim. CHP-3C	Agua de río %R ≈ 100 % CV <10 %	Spherisorb ODS AcCN-agua (gradiente)
2,4-D 2,4-DP 2,4-DB 2,4,5-T	CLAR	UV (232 nm)	1-4 µg/L	EFS en línea precolumna MFE polímero (HEMA)	-	Spherisorb ODS 65%MeOH 34.6% H ₂ O 0.4% H ₃ PO ₄

*MeOH: metanol, AcCN: acetonitrilo, TEA: trietilamina, HAcO gl.: ácido acético glacial, MEFS: microextracción en fase sólida, PDMS-DVB: polidimetilsiloxano-divinilbenceno.

Como se puede observar en la Tabla, la mayoría de los métodos de preparación de muestra se basan en la EFS, ya sea en línea o fuera de línea.

II.3.2. DDT características generales

El 4,4'-diclorodifeniltricloroetano (DDT) es un pesticida de la familia de organoclorados que fue extensamente usado en el pasado para controlar insectos que dañan los cultivos e insectos que transmiten enfermedades como la malaria. Su uso en los E.U. se prohibió en 1972 por el daño causado a la vida silvestre, pero aun se sigue utilizando en algunos países⁴¹.

En México, su uso se extendió rápidamente a partir de la década de los 50's por la Campaña Nacional para la Erradicación del Paludismo (CNEP)⁴². Al principio de la campaña la intensidad de los rociados fue alta, de 1957 a 1960 el promedio anual fue de 5.7 millones, descendiendo en el periodo de 1961 a 1980 a 3.3 millones y en la década de los ochentas se redujo al mínimo con 829 mil rociados en promedio anual. La reducción de rociados resultó en un deterioro importante del programa, incrementando la transmisión del paludismo, por lo que se inició una nueva estrategia llamada Plan de Acciones Intensivas Simultáneas (PAÍS), sin embargo, su herramienta básica fue nuevamente el rociado domiciliario con DDT; éste se fue reduciendo cada vez, por el impacto positivo del programa. De 1989 a 1991 se aplicaron en promedio 1'778,375 rociamientos, de 1992 a 1999 la media anual descendió al 21% del periodo anterior. Por su alto riesgo para la salud humana, su elevada persistencia y sus propiedades de bioacumulación, este

plaguicida sólo puede ser utilizado por las dependencias del ejecutivo en campañas sanitarias⁴³.

Los residuos de DDT detectados en el organismo humano y en el ecosistema en general, en diferentes fechas y lugares, indican que los niveles más altos ocurren en áreas de agricultura intensiva y áreas maláricas. Los niveles encontrados en leche materna en algunos países de la región fueron (mg/kg grasa): Guatemala 12.2, México (1995) 8.4, Costa Rica (1980) 1.27, Nicaragua (2000) 2.9×10^{-6} . En tejido adiposo se encontraron los siguientes valores (mg/Kg grasa): México (1996) 104.5, Costa Rica (1982) 45.99, Guatemala (1982) 15.00, Nicaragua (1997) 1.74. En lo que respecta a los niveles de DDT en suero, se tienen los reportes siguientes ($\mu\text{g/L}$ de sangre): Veracruz (1999, mujeres en edad reproductiva) 14.5, Chiapas (2000, niños) 79.3⁴³.

II.3.2.1. Propiedades fisicoquímicas del DDT⁴⁴

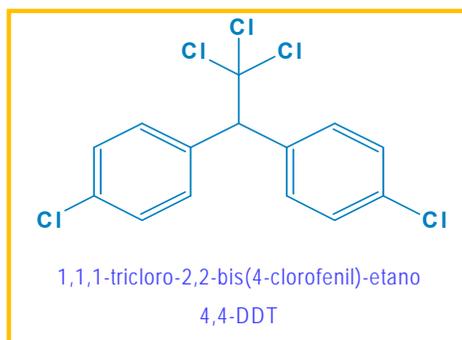


Figura II.3. Estructura del DDT.

Nombre químico: 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano

Fórmula química: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_5$.

Cristales incoloros o polvo blanco, sin olor o con olor aromático ligero. Punto de ebullición 260°C , punto de fusión 108.5°C , densidad relativa 0.98. La solubilidad en agua es 5.50×10^{-3} mg/L a 25°C . Es muy soluble en lípidos y soluble en dioxano, o-diclorobenceno, keroseno crudo, keroseno refinado, naftalenos metilados, aceite mineral, diclorodifluorometano y dibutil ftalato. Su presión de vapor es 1.6×10^{-7} mm Hg a 20°C . Su constante de la ley de Henry es igual a

8.3×10^{-6} atm·m³/mol a 25°C. Esta sustancia en combustión forma gases tóxicos y corrosivos que incluyen al cloruro de hidrógeno. Se descompone a una temperatura de 110°C y reacciona con el aluminio y el hierro. Su constante de reparto octanol agua es Log Kow = 6.19. Su vida media en agua es de 56 días.

II.3.2.2 Métodos de análisis del DDT.

El método 508.1 de la EPA es utilizado para el análisis de plaguicidas como el DDT en agua, usando extracción en fase sólida y cromatografía de gases/captura de electrones⁴⁵. Sin embargo, se han desarrollado muchos otros métodos para el análisis de este insecticida. En la Tabla II.4 se muestran las características principales de algunos de los métodos reportados más recientes, en los que se utilizan técnicas de microextracción para la preparación de muestra como: microextracción por inmersión de una gota de extractante (SDME, single drop microextraction), microextracción en fase líquida contenida en una fibra hueca (HF-LPME, hollow fiber liquid phase microextraction), microextracción líquido-líquido disperso (DLLME, dispersive liquid-liquid microextraction) y microextracción líquido-líquido por emulsificación asistida con ultrasonido (USAEME, ultrasound assisted emulsification microextraction).

Tabla II.4 Métodos recientes para el análisis de DDT⁴⁶.

Tipo de agua	Microextracción	Análisis*	LD (ng/mL)	Recobro (RSD) (%)
Agua de grifo	SDME	CG-DCE	200	90.5 (9.6)
Aguas residuales	SDME	CG-EM	101	50 (7.8)
Agua de lluvia	HF-LPME	CG-EM	17	81.6 (1.66)
Agua de mar	HF-LPME	CG-EM	17	81.7 (1.67)
Agua de río	DLLME	HPLC-UV	320	110 (4.10)
Agua superficial	USAEME	CG-μDCE	2-16	--

DCE: detector de captura de electrones

II.4. Fenoles

Los compuestos fenólicos son ampliamente utilizados como materia prima o como intermediarios en la manufactura de una gran variedad de productos como

fármacos, colorantes, plásticos, antisépticos, pesticidas y muchos otros, por lo que no es de extrañar que formen parte de los diversos tóxicos vertidos en los cuerpos de agua. Se ha comprobado que estos compuestos, y particularmente los cloro y nitrofenoles, aumentan la posibilidad de contraer cáncer, además, son irritantes para los ojos y la piel, y afectan al hígado y los riñones. Por tal motivo, el estudio de su presencia en el agua es fundamental.

La EPA tiene identificados los sitios de desechos peligrosos más críticos de Estados Unidos. Estos sitios aparecen en la Lista de Prioridades Nacionales (NPL, por sus siglas en inglés) y son los designados por el gobierno federal para una limpieza a largo plazo. Se han encontrado clorofenoles en por lo menos 116 de los 1,467 sitios actuales o los que anteriormente figuraban en la lista NPL. Sin embargo, no se sabe cuántos sitios de la NPL han sido evaluados para determinar la presencia de estas sustancias. Esta información es importante porque se trata de sustancias que podrían ser nocivas para la salud y porque estos sitios pueden ser fuentes de exposición. En México se carece de un estudio que indique la magnitud de la contaminación por el uso y desecho de cloro y nitrofenoles⁴⁷.

II.4.1 Propiedades fisicoquímicas de los fenoles

La mayoría de los fenoles son sólidos a temperatura ambiente. Los clorofenoles tienen un fuerte sabor y olor a medicamento, por lo que es posible detectar su presencia en el agua aún a concentraciones muy bajas. La desinfección del agua con cloro produce pequeñas cantidades de clorofenoles que pueden impartir propiedades organolépticas desagradables al agua potable. También se producen en el blanqueamiento de pulpa de madera para fabricar papel⁴⁸. En la Figura II.4 se muestra la estructura de los 8 clorofenoles utilizados en este proyecto y en la Tabla II.5 se presentan algunas de sus propiedades.

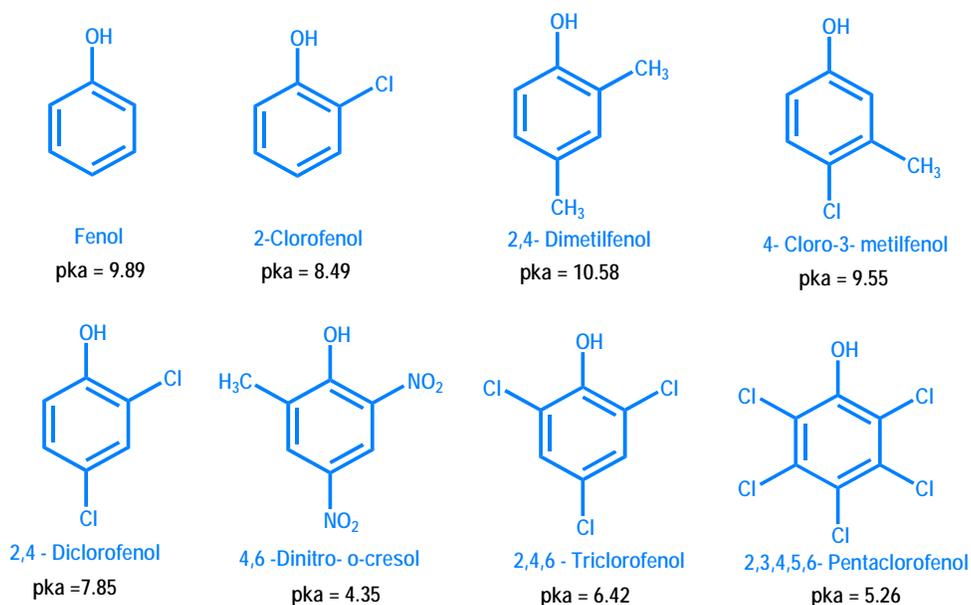


Figura II.4. Estructura y pka de algunos fenoles.

Tabla II.5. Propiedades fisicoquímicas de los fenoles^{49, 50, 51}.

Fenol	P.M.	P.f. (°C)	P.eb. (°C)	Densidad relativa	Solubilidad	pka	Log Kow
F	94.11	43	181.7	1.072	6.6 (%p/p)	9.89	1.46
2CF	128.56	9	174.9	1.26	0.1 (%p/p)	8.49	2.17
2,4DMF	122.17	27-28	210	1.54	6200 mg/L	10.58	2.42
4C3MF	142.59	66-68	235	-	5429 mg/L	9.55	2.99
2,4DCF	163	45	210	-	4500 mg/L	7.85	3.22
4,6DNC	198.13	83-85	-	-	128 mg/L	4.35	2.07
2,4,6TCF	197.45	69.5	246	1.49	434 mg/L	6.42	3.85
PCF	266.34	191	310	1.978	20-25 (%p/p)	5.26	5.03

* P.M.: peso molecular, P.f.: punto de fusión, P.eb.: punto de ebullición, F: fenol, 2CF: 2-clorofenol, 2,4DMF: 2,4-dimetilfenol, 4C3MF: 4-cloro-3-metilfenol, 2,4DCF: 2,4-diclorofenol, 4,6-DNC: 4,6-dinitro-o.cresol, 2,4,6TCF: 2,4,6-triclorofenol, PCF: pentaclorofenol.

II.4.2. Métodos de análisis de fenoles

El método 604 de la EPA es utilizado para el análisis de fenoles en agua, usando cromatografía de gases con detector de captura de electrones y haciendo una derivatización⁵². En México se hace la determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y tratadas de acuerdo con la norma NMX-AA-050-SCFI-2001. El método se basa en la reacción de los fenoles con 4-aminoantipirina

a pH de 10 ± 0.1 en presencia de ferricianuro de potasio. Los compuestos formados, de color amarillo intenso a rojo, son extraídos con cloroformo midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 460 nm, o bien se detectan directamente en la muestra acuosa a 510 nm. Este método cubre intervalos de concentración de 0.001 mg/L a 0.250 mg/L o 0.5 mg/L⁵³.

Existen muchos otros métodos reportados para la determinación de fenoles en agua. En la Tabla II.6 se presentan las principales características de algunos de ellos.

Tabla II.6. Métodos para determinación de fenoles en muestras acuosas* 49,54,55

Analito	Columna	F.M.	Detector	Muestra	observaciones
Fenoles	C-18	MeOH:AcCN	UV	Agua de mar	LD<0.5 µg/L
PCF	ODS-2	MeOH-HAcO	UV	---	Linealidad 1-20 µg/L
Fenoles	SBP-1	--.	FID	---	EFS
Fenoles	PTE-5	--	FID	---	MEFS
Clorofenoles	BPX5	He	ECD	Agua tratada, de rio y pozo	DLLME
Clorofenoles	C-18	MeOH-HAcO (1%) 40:60	DAD	Agua residual de mar y subterránea	MEFS

* -- no especificado; F.M.: fase móvil, FID: detector de ionización de llama, ECD: detector de captura de electrones, DAD: detector UV con arreglo de diodos; LD: límite de detección, HAcO: ac. acético.

II.5. Sulfonamidas⁵⁶

Las sulfamidas (llamadas en grupo sulfas) son sustancias químicas sintéticas derivadas de la sulfonamida, bacteriostáticas y de amplio espectro. Las sulfamidas se emplean como antibióticos, antiparasitarios y coccidiostáticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Las sulfas son usadas tanto en medicina humana, como el sulfametoxazol, la sulfadiazina y la sulfabenzamida, así como veterinaria, como el sulfanitrato, el sulfapirazol y la sulfaquinoxalina. Las sulfonamidas fueron

las primeras drogas eficaces empleadas para el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas en el ser humano.

Son compuestos bioactivos de particular interés debido a sus posibles efectos secundarios no deseados sobre los seres humanos y los organismos acuáticos. Son una clase muy importante de agentes antibacterianos ampliamente utilizados en la acuicultura, como herbicidas agrícolas y con fines veterinarios. En medicina humana se utilizan para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, bronquitis crónica y otras infecciones bacterianas. En cuanto al mecanismo de acción, las sulfamidas son compuestos antibacterianos por inhibición de la biosíntesis de ácidos folínicos, y diuréticos por inhibición de la enzima anhidrasa carbónica. Las sulfonamidas son de especial relevancia ambiental debido a su alta tasa de excreción y su persistencia en los cuerpos de agua, incluso después del tratamiento de aguas residuales.

II.5.1. Propiedades fisicoquímicas de las sulfonamidas⁵⁷

Las sulfonamidas, son un conjunto de sustancias derivadas de la p-amino bencensulfonamida o sulfanilamida, que se descubrió inicialmente como producto activo formado en el organismo tras la administración de un antibacteriano, el colorante prontosil.

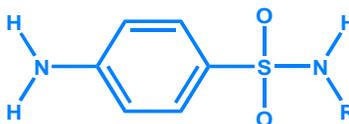


Figura II.5. Estructura general de las sulfonamidas.

En la Tabla II.7 se muestran las principales propiedades fisicoquímicas de las sulfas con las que se trabajó en el presente proyecto. Estos compuestos tienen propiedades ácido-base y presentan dos valores de pKa. El primero corresponde a la protonación del grupo amino en la posición *para* del anillo bencénico, que da origen al par ácido base $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2$. El segundo está relacionado con la pérdida del

protón en el nitrógeno del grupo sulfonamida, generando el par ácido-base NH/N⁻. Por lo tanto, dependiendo del pH del medio, se generan 3 formas de la molécula: SH₂⁺ representa la forma catiónica, SH la forma neutra, y S⁻ la forma aniónica. Las zonas de predominio se muestran en la Figura II.6.



Figura II.6. Zonas aproximadas de predominio de las diferentes formas ácido-base de las sulfonamidas.

Tabla II.7. Propiedades fisicoquímicas de las sulfonamidas.

Sulfonamida	Grupo R	P.M. (g/mol)	Forma	S (mg/mL)	pka ₁	pka ₂	Log Kow
Sulfatiazol		255.3	Polvo cristalino blanco	0.013	2.2	7.2	0.72
Sulfadiazina		250.3	Polvo cristalino amarillo	0.6 (pH 6)	2.0	6.4	-0.117
Sulfamerazina		264.3	Polvo blanco	0.35 (pH 5.5) 1.7 (pH 7.5)	2.1	6.7	0.34
Sulfametoxazol		253.3	Polvo blanco	0.03	1.8	6.0	0.88
Sulfisoxazol		267.3	Polvo blanco	0.13	1.5	5.0	1.03
Sulfadimetoxina		310.3	Polvo blanco	0.046	1.9	6.1	1.45

II.5.2 Métodos de análisis de las sulfas⁵⁸

A fines de la década de los 80's, diversas asociaciones ambientales y de calidad del agua comenzaron a abordar el problema de la determinación de residuos de

antibióticos en los cuerpos de agua. Por su alta sensibilidad y selectividad, la CLAR-EM es actualmente la técnica de elección para la determinación de contaminantes polares, como las sulfas, ya que no se requiere de una derivatización previa al análisis. El análisis por CLAR-UV también ha sido muy empleado para la determinación de sulfonamidas en diversas muestras de agua, como aguas subterráneas y aguas residuales, aunque su sensibilidad y selectividad son mucho más limitadas. Cualquiera que sea la técnica de análisis, en general se requiere de una purificación y preconcentración previa de la muestra, lo que suele realizarse, en el caso de las sulfas, por extracción en fase sólida, ya sea en línea o fuera de línea. La bibliografía referente a los métodos de determinación de sulfonamidas en agua es muy extensa, por ello nos limitaremos a mencionar algunas características de unos cuantos métodos reportados en la última década. En la Tabla II.8 se muestra esta información, representando a los analitos de interés con un número: 1. Sulfatiazol, 2. Sulfadiazina, 3. Sulfamerazina, 4. Sulfametoxazol, 5. Sulfisoxazol, 6. Sulfadimetoxina.

Tabla II.8. Metodologías analíticas para determinación de sulfas en agua.

Compuesto	Muestra	Método*	LD (ng/L)	Recobro (%)	Referencia
1,2,3,6	Agua residual	EFS, CLAR-UV	--	91-106	59
1,2,4,6	Agua de río	EFS, CLAR-EM/EM (ESI)	1	85-90	60
2,3,4,6	Agua residual	ELISA y CLAR-EM/EM (APCI)	>40	45-88	61

* ESI: ionización por electrospray, APCI: ionización química a presión atmosférica.

II.6 Métodos de preparación de muestra⁶²

II.6.1 Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido (ELL) es una técnica empleada habitualmente para la preparación de muestras acuosas, se basa en la transferencia de los analitos desde la muestra acuosa hacia un disolvente orgánico inmiscible en agua, en función de la afinidad relativa que presenten dichos analitos por la fase orgánica y

la fase acuosa. Esa afinidad relativa está determinada por su coeficiente de reparto. La ELL, en su forma tradicional, presenta varios inconvenientes, ya que se trata de una técnica lenta y laboriosa, con elevado consumo de disolventes y con problemas adicionales, como la formación de emulsiones y/o la necesidad de etapas adicionales de evaporación de disolvente, lo que la convierte en una técnica poco amigable con el ambiente.

II.6.2 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (EFS) es el método de preparación de muestra más popular en la actualidad. Está basada en la retención selectiva de los analitos en un adsorbente apropiado y su posterior elución. Se trata de un proceso físico en el que están implicados una fase sólida y un líquido; los analitos son retenidos en el adsorbente si presentan mayor atracción por la fase sólida que por la fase líquida. A medida que la muestra pasa a través del lecho de adsorbente, algunos de los compuestos disueltos interactúan con los sitios activos de la superficie de éste quedando retenidos, mientras que los compuestos que son más afines por la matriz de la muestra pasan a través del lecho sin retenerse. Los coeficientes de distribución de los solutos entre las dos fases dependen tanto de la naturaleza del adsorbente como de la naturaleza y composición de la muestra líquida. Seleccionando adsorbentes adecuados y/o ajustando algunas propiedades de la fase líquida (composición, pH), se pueden conseguir extracciones muy selectivas. A diferencia de la ELL que es un proceso donde se alcanza el equilibrio, en la EFS el proceso debe pararse antes de que los compuestos de interés alcancen el estado de equilibrio y se fuguen del dispositivo de extracción.

La EFS presenta dos modalidades de operación, en línea y fuera de línea. En la EFS en línea, el dispositivo de extracción es generalmente una pequeña precolumna empacada con el adsorbente; una vez terminado el paso de extracción, la precolumna se acopla con la columna analítica del CLAR y los compuestos retenidos son eluidos por la fase móvil y enviados a la columna para su separación y análisis. Los dispositivos de extracción más populares para la

EFS fuera de línea son los cartuchos empacados y los discos porosos recubiertos con una capa de adsorbente. En este caso, la elución se realiza pasando por el dispositivo de extracción un disolvente “fuerte”, es decir, un disolvente por el cual los analitos adsorbidos tengan gran afinidad. En general se procura utilizar el mínimo volumen posible de eluyente para alcanzar un alto factor de enriquecimiento o preconcentración durante el proceso de EFS. El extracto obtenido se analiza posteriormente por CLAR o por CG.

La EFS en línea es un proceso ecológico que prácticamente no requiere del uso de disolventes orgánicos; además es más exacta y precisa que la EFS fuera de línea, y se alcanzan mayores factores de enriquecimiento, es decir, mayor sensibilidad en los análisis. Sin embargo, es una técnica más compleja y menos flexible que la EFS fuera de línea, por lo que esta última es más popular en los laboratorios de análisis. Incluso ya existen métodos oficiales (de la EPA) en los que se utiliza la EFS fuera de línea como técnica de preparación de muestra. Su mayor inconveniente es que normalmente requiere de pasos adicionales de evaporación y reconstitución del extracto para aumentar el factor de enriquecimiento o para hacerlo compatible con el método de análisis.

*II.6.3. Microextracción*⁶³

La tendencia más reciente en el campo de la preparación de muestra en Química Analítica es el desarrollo de metodologías que sean respetuosas con el medio ambiente, es decir, que traten de minimizar al máximo la generación de residuos.

Las técnicas de microextracción cumplen con esa característica, por lo que están jugando un papel cada vez más importante en los análisis ambientales y cada vez son más numerosas las metodologías, y variantes de éstas, descritas en la literatura. En la Figura II.7 se presenta un esquema donde se clasifican las principales técnicas de microextracción que han sido aplicadas para la determinación de contaminantes en matrices ambientales.



Figura II.7. Clasificación de las técnicas de microextracción.

En este esquema, las técnicas se dividen en dos grupos principales, aquellas basadas en la extracción líquido-líquido (LLE, liquid-liquid extraction) y las basadas en la extracción en fase sólida (SPE, solid-phase extraction). Dentro del primer grupo se incluyen: la microextracción por inmersión de una gota estática de extractante en la muestra acuosa (SDME), la microextracción por dispersión del líquido extractante en la muestra acuosa (DLLME), la microextracción utilizando una fibra hueca que contiene al extractante líquido (HF-LPME) y la microextracción en membranas impregnadas con el extractante líquido (MASE, membrane assisted solvent extraction). En el segundo grupo las técnicas principales son la microextracción en fase sólida (SPME, solid-phase microextraction) y la extracción en barra magnética recubierta (SBSE, stir bar sorptive extraction). En las siguientes secciones se describen brevemente las técnicas relacionadas con el estudio realizado en el presente trabajo.

II.6.3.1. Microextracción por inmersión de una gota de extractante (SDME)

Es una de las primeras técnicas de microextracción líquido-líquido descritas. Se trata de una modalidad de inmersión directa basada en el principio de difusión de Nernst. Un pequeño volumen de muestra acuosa (1-2 mL) se coloca en un vial bajo agitación y en ella se sumerge una gota (~8 μ L) de un disolvente orgánico inmiscible en agua, suspendida en la aguja de una jeringa o en un pequeño rodillo de teflón que tiene una muesca en su extremidad para facilitar la adherencia de la gota. El proceso de extracción se lleva a cabo debido a la diferencia de

concentración de los analitos entre las dos fases líquidas inmiscibles y a la afinidad relativa que tienen por cada fase, de acuerdo con su coeficiente de reparto. La transferencia de masa se realiza por convección-difusión. En general, el proceso se mantiene hasta alcanzar el equilibrio termodinámico, aunque en algunos casos se prefiere interrumpirlo antes, para acortar el tiempo de análisis. Sin embargo, en estos casos es necesario controlar perfectamente el tiempo de extracción y la velocidad de agitación para obtener resultados reproducibles. Después de retirar el dispositivo con la gota de extracto suspendida, éste se analiza por CG o CLAR.

Esta técnica tiene la ventaja de que la cantidad de disolvente orgánico utilizado es sumamente pequeña y la separación de fases al final del proceso es fácil e inmediata. Como desventajas se han mencionado las siguientes: inestabilidad de la gota suspendida, baja precisión y tiempos de análisis largos (si el proceso se mantiene hasta alcanzar el equilibrio).

II.6.3.2. Microextracción líquido-líquido disperso (DLLME)

Fue introducida por Assadi y colaboradores en 2006. Se trata de una técnica de microextracción que ofrece importantes ventajas respecto a los métodos de extracción convencionales, ya que permite llevar a cabo la preparación de la muestra de una manera rápida y simple, con bajo coste, sin necesidad de utilizar grandes cantidades de disolventes orgánicos y con posibilidad de combinarla con la mayoría de los métodos analíticos. Estas ventajas han originado que desde su introducción haya sido utilizada para la extracción de diversos contaminantes en muestras acuosas. La técnica se basa en la generación de una emulsión de microgotas de un disolvente orgánico inmiscible en agua (extractante), dispersas en la muestra con ayuda de un segundo disolvente orgánico miscible con el extractante y con la fase acuosa (dispersante). Puesto que el área de contacto entre las microgotas y la muestra acuosa es muy grande, la transferencia de masa entre las fases es muy rápida. Posteriormente, la emulsión se rompe (por centrifugación) y el disolvente orgánico con los solutos extraídos se separa como

una gota que flota en la superficie de la fase acuosa (disolventes menos densos que el agua) o que sedimenta en el fondo del recipiente (disolventes más densos que el agua). La gota de extracto se recoge cuidadosamente con una jeringa para su posterior análisis.

Las principales desventajas de la técnica son:

- Dificultad para recuperar cuantitativamente y con precisión la gota de extracto, especialmente cuando el extractante es más denso que el agua.
- La cantidad de dispersante que debe agregarse es relativamente grande, por lo que el consumo global de disolventes orgánicos es mayor que en otras técnicas de microextracción. Adicionalmente, el dispersante reduce significativamente los coeficientes de reparto de los solutos entre el extractante y la fase acuosa (modificada por el propio dispersante).

Con el objeto de reducir estas desventajas, se han diseñado diversos dispositivos para facilitar la colecta de la gota de extracto. Por otra parte, se han desarrollado variantes del método en las que no se requiere dispersante y la microemulsión es generada sometiendo la solución (muestra + extractante) a la radiación ultrasónica; esta variante se conoce como USAEME (por las siglas del nombre en inglés).

II.6.3.3. Microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la fase orgánica (DLLME-SFO)

Hui Xu *et.al*, desarrollaron una nueva modalidad de la DLLME, aprovechando sus ventajas y resolviendo el problema de colección de la gota de extracto. La técnica fue denominada microextracción líquido-líquido dispersiva basada en la solidificación de la gota orgánica flotante (DLLME-SFO, dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop)⁶⁴⁻⁶⁶. Como su nombre lo indica, la gota de extracto orgánico que se separa de la fase acuosa al final de la DLLME, se somete a un proceso de enfriamiento ligero para promover su solidificación y poder colectarla fácilmente. En este caso, el extractante debe

ser un solvente orgánico menos denso que el agua, tanto en su estado líquido como en su estado sólido, de modo que el pequeño botón sólido que se forma después del enfriamiento quede flotando en la fase acuosa y sea fácilmente accesible.

Al igual que en la DLLME, la técnica DLLME-SFO se basa en un sistema ternario de disolventes, constituido por la muestra acuosa y una mezcla de dos disolventes orgánicos, uno de los cuales actúa como agente dispersante y el otro como agente extractante. La mezcla dispersante-extractante se introduce en la fase acuosa de tal manera que se genere una emulsión de microgotas de fase orgánica en la solución. En estas condiciones la transferencia de masa entre las fases es muy rápida y el equilibrio se alcanza en un tiempo muy corto. Posteriormente, el recipiente que contiene la mezcla se centrifuga para romper la emulsión y separar las fases, y finalmente se mete en un baño de hielo para que el extracto solidifique. El botón sólido se recupera con una espátula, se disuelve en un pequeño volumen de un disolvente orgánico apropiado y se analiza por CLAR o CG.

Para el desarrollo de la técnica se deben cumplir los siguientes puntos:

1. Características del extractante.

- Alta afinidad por los analitos, baja afinidad con el agua.
- Baja volatilidad.
- Punto de fusión cercano a la temperatura ambiente (10 a 22°C).
- Densidad menor a la del agua en estado sólido.

Algunos extractantes que cumplen con estas características son: 1-Undecanol, 1-Dodecanol, 2-Dodecanol, n-Hexadecano y n-Heptadecano

2. Características del dispersante.

- Afinidad por el extractante.
- Afinidad por la fase acuosa.

Ejemplos de dispersantes comúnmente utilizados son: metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano y acetona.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

III.1 Hipótesis

La implementación de un sistema basado en la formación de microgotas de extractante, homogéneamente dispersas en la muestra acuosa, permitirá acelerar el proceso de reparto, independientemente del soluto a extraer. Por lo tanto, controlando las variables del sistema, será posible desarrollar un protocolo experimental rápido y eficaz para la extracción de diferentes familias de contaminantes orgánicos en medios acuosos.

III.2 Objetivos

Objetivo general

Determinar las características y potencialidades de una novedosa técnica de preparación de muestra, basada en la microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica, mediante el desarrollo de un protocolo experimental óptimo y su aplicación en el estudio de recuperación de diferentes grupos de contaminantes orgánicos a partir de matrices acuosas.

Objetivos particulares

- Implementar y optimizar las condiciones experimentales necesarias para llevar a cabo la técnica de microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la fase orgánica (DLLME-SFO).
- Optimizar las condiciones cromatográficas para la separación y determinación de los 4 grupos de compuestos seleccionados en el presente estudio: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, Plaguicidas Clorados, Fenoles y Sulfonamidas.
- Aplicar la técnica DLLME-SFO para la extracción de los cuatro grupos de compuestos a partir de muestras acuosas, con el fin de conocer y evaluar sus capacidades y limitaciones como técnica alternativa de preparación de muestra.

- Comprobar la efectividad de esta novedosa técnica de extracción y su aplicabilidad en matrices complejas, mediante el estudio de recuperación de un grupo de analitos a partir de muestras de agua residual. Comprobar la efectividad de esta novedosa técnica de extracción y su aplicabilidad en matrices complejas, mediante el estudio de recuperación de un grupo de analitos a partir de muestras de agua residual.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

IV.1. Equipo y Materiales

- Cromatógrafo de líquidos constituido por dos bombas Lab Alliance serie II, un detector UV de longitud de onda variable modelo 200 de Linear Instruments, una válvula de inyección Lab Alliance con rizo de 23.5 μ L (calibrado en el laboratorio) y el *software* para adquisición y tratamiento de datos Clarity versión 2.8.1.584.
- Horno para columnas Eppendorf CH-30. En todos los experimentos, la temperatura de la columna se reguló a 30°C.
- Sistema purificador y desionizador de agua NANOpure, Barnstead Thermolyne modelo 04747.
- Baño de ultrasonido, P-Selecta Ultrasons serie 0416297.
- Centrífuga Fisher Scientific, modelo Centrific 225 A con rotor de ángulo fijo E-47859
- Balanza analítica con capacidad de 210 g y precisión de 0.1 mg, Ohaus AP210S.
- pHmetro Corning modelo 220.
- Columnas para cromatografía de líquidos
 - a) Columna de fase reversa (125 \times 4.6 mm, d.i.) Envirosep-pp de Phenomenex con partículas de 5 μ m.
 - b) Columna de fase reversa (100 \times 4.6 mm, d.i.) Hypersil Green PAH con partículas de 5 μ m.
 - c) Columna de fase reversa (150 \times 4.6 mm, d.i.) Synergi Fusion RP-80 de Phenomenex con partículas de 4 μ m.
 - d) Columna de carbón grafitizado (150 \times 3 mm, d.i.) Hypercarb Thermo con partículas de 5 μ m.
- Jeringa de 100 μ L para cromatografía de líquidos, Hamilton 710 SNR
- Electrodo combinado de vidrio-calomel, Cole-Palmer modelo 60648.
- Micropipetas Eppendorf de 250 y 1000 μ L con puntas Transferpette, Wertheim Alemania.

- Material de vidrio común: matraces aforados, pipetas volumétricas, vasos de precipitados, probetas graduadas y matraces kitazato de diferentes capacidades.

IV.2. Reactivos y disolventes

- Naftaleno 99%, Sigma Aldrich.
- Acenaftileno 95%, Sigma Aldrich.
- Acenafteno 99%, Sigma Aldrich.
- Fluoreno 99%, Sigma Aldrich.
- Fenantreno 99%, Sigma Aldrich.
- Benzo[a]antraceno 99%, Sigma Aldrich.
- Criseno 99%, Sigma Aldrich.
- Benzo[a]pireno 99%, Sigma Aldrich.
- Dibenzo[a,h]antraceno 99%, Sigma Aldrich.
- Indeno[1,2,3-c,d]pireno 99%, Sigma Aldrich.
- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 99%, Sigma Aldrich.
- Ácido 4-cloro-2-metilfenoxipropiónico (Mecoprop) 99%, Sigma Aldrich.
- Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)-propiónico (Diclorprop) 99%, Sigma Aldrich.
- Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) 99%, Sigma Aldrich.
- Ácido 2,4-diclorofenoxibutírico (2,4-DB) 99%, Sigma Aldrich.
- 4,4'-diclorodifeniltricloroetano (DDT) 99%, Sigma Aldrich.
- Fenol 99%, Sigma Aldrich.
- 2-Clorofenol 99%, Sigma Aldrich.
- 2,4-Dimetilfenol 99%, Sigma Aldrich.
- 4-Cloro-3-metilfenol 99%, Sigma Aldrich.
- 2,4-Diclorofenol 99%, Sigma Aldrich.
- 4,6-Dinitro-o-cresol 99%, Sigma Aldrich.
- 2,4,6-Triclorofenol 99%, Sigma Aldrich.
- Pentaclorofenol 99%, Sigma Aldrich.
- Sulfadiazina 99%, Sigma Aldrich.
- Sulfatiazol 99%, Sigma Aldrich.

- Sulfamerazina 99%, Sigma Aldrich.
- Sulfametoxazol 99%, Sigma Aldrich.
- Sulfisoxazol 99%, Sigma Aldrich.
- Sulfadimetoxina 99%, Sigma Aldrich.
- Metanol (MeOH) grado HPLC, Tecsiquim.
- Acetonitrilo (AcCN) grado HPLC, Tecsiquim.
- 1-dodecanol 98% Sigma Aldrich.
- Ácido perclórico R.A. 69.7%, J.T. Baker
- Ácido fórmico R.A. 90.1%, J.T. Baker.
- Hidróxido de sodio R.A., perlas 98%, J.T. Baker.
- Cloruro de sodio R.A., 98%, J.T. Baker.
- Agua grado reactivo, Tipo I, obtenida del sistema purificador NANOpure.

IV.3. Preparación de soluciones

Disoluciones comunes

Disolución acuosa de HClO₄ 1 M y 0.1M

Disolución acuosa de NaOH 2 M

Buffer acetato 1 M, pH 4.5

Disolución de acetato de amonio 1 M, pH 7

Buffer formiato 1 M, pH 3.5.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

Se prepararon las siguientes disoluciones individuales de HAP:

Naftaleno (NAF), Acenaftileno (AFT) y Acenafteno (ACE) de 1000 mg/L en MeOH.

Fluoreno (FLU) y Fenantreno (FEN) de 100 mg/L en MeOH.

Benzoantraceno (BAN), Criseno (CRI), Benzopireno (BPI), Dibenzoantraceno (DBA) e Indenopireno (INP) de 100 mg/L en AcCN.

Mezcla madre de HAP.- Se tomaron alícuotas apropiadas de las disoluciones individuales de HAP y se aforaron con MeOH al volumen deseado. En la Tabla IV.1 se muestran las concentraciones de cada soluto en la mezcla madre. Las

concentraciones fueron ajustadas de modo a obtener picos de tamaño similar en los cromatogramas.

Tabla IV.1. Concentraciones de HAP en la mezcla madre.

N°	Compuesto	Concentración (mg/L)
1	NAF	100
2	ACI	100
3	ACE	100
4	FLU	20
5	FEN	20
6	BaA	10
7	CRIS	5
8	BaP	10
9	DBahA	10
10	IcdP	20

A partir de la mezcla madre se prepararon disoluciones estándar de diferentes concentraciones en MeOH. Las disoluciones estándar se utilizaron como referencia en la cuantificación de los solutos y también para preparar las disoluciones de trabajo en agua. Estas últimas fueron preparadas justo antes de usarse en los experimentos de microextracción. Todas las disoluciones se guardaron en refrigeración (-20°C) cuando no estaban en uso, excepto las disoluciones de trabajo las cuales se desecharon al terminar los experimentos respectivos.

Plaguicidas, Fenoles y Sulfonamidas

Se prepararon las siguientes disoluciones individuales a concentración de 100 mg/L en MeOH.

Plaguicidas: insecticida DDT y herbicidas clorofenoxi 2,4-D; 2,4-DB; 2,4,5-T y Diclorprop.

Fenoles: Fenol (F), 2-Clorofenol (2CF), 2,4-Dimetilfenol (2,4DMF), 4-Cloro-3-metilfenol (4C3MF), 2,4-Diclorofenol (2,4DCF), 4,6-Dinitro-o-cresol (4,6DNC), 2,4,6-Triclorofenol (2,4,6TCF) y Pentaclorofenol (PCF).

Sulfonamidas: Sulfadiazina (SDZ), Sulfiatazol (STZ), Sulfamerazina (SMR), Sulfametoxazol (MTX), Sulfisoxazol (SFX) y Sulfadimetoxina (SDX).

Mezclas madre y disoluciones estándar.- A partir de las disoluciones individuales se prepararon mezclas madre en MeOH para las 3 familias de compuestos: plaguicidas (5 solutos), fenoles (8 solutos) y sulfonamidas (6 solutos). La concentración de los compuestos respectivos en estas mezclas fue de 10 mg/L. De las mezclas madre se tomaron alícuotas apropiadas para preparar disoluciones estándar de diferentes concentraciones en MeOH. Todas las disoluciones se guardaron en refrigeración (-20°C) cuando no estaban en uso.

Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de las disoluciones estándar a medida que se iban requiriendo y se desecharon al terminar los ensayos correspondientes. Estas disoluciones se prepararon en agua desionizada grado reactivo tipo I. En el caso de los fenoles y los plaguicidas, las disoluciones de trabajo se ajustaron a pH 2 con HClO₄ antes de realizar los experimentos de microextracción⁶⁷. Para las sulfonamidas, el pH de las disoluciones de trabajo se ajustó a 3.5 con un buffer ácido fórmico-formiato 10⁻² M.

IV.4. Condiciones cromatográficas

Se optimizaron las condiciones para la separación de los HAP, los plaguicidas, los fenoles y las sulfonamidas por CLAR, ensayando diferentes columnas y diferentes fases móviles. En todos los casos se utilizó un detector UV y se determinó la longitud de onda más adecuada para la detección de cada grupo de compuestos.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos

La separación se llevó a cabo en columnas de fase reversa mediante un gradiente de elución y flujo, utilizando como Fase A (débil) una mezcla MeOH-H₂O 75:25 (v/v) y como Fase B (fuerte) una mezcla MeOH-AcCN 75:25 (v/v). El programa de gradiente finalmente empleado se muestra en la Tabla IV.2. Para el análisis se utilizó la columna Hypersil Green PAH. La longitud de onda utilizada para la detección fue de 270 nm.

Tabla IV.2. Programa de gradiente para la separación de HAP.

Tiempo (min)	Fase B (%)	Flujo (mL/min)
0	5	1
7	80	1.3
9	100	1.5

Plaguicidas

La separación de los 5 plaguicidas se realizó en la columna de fase reversa Synergi Fusion-RP 80 de Phenomenex mediante un gradiente de elución, utilizando como Fase A una mezcla MeOH-H₂O (HClO₄ 10⁻² M) 50:50 (v/v) y como Fase B AcCN. Se trabajó a flujo de 1 mL/min. El programa de gradiente empleado se muestra en la Tabla IV.3. La longitud de onda para la detección se fijó a 230 nm.

Tabla IV.3. Gradiente de elución para la separación de plaguicidas

Tiempo (min)	Fase B (%)
0	15
8	57
10	100

Fenoles

La separación de los fenoles se realizó en la columna de fase reversa Synergi Fusion-RP 80 de Phenomenex mediante un gradiente de elución, utilizando como Fase A una disolución acuosa de HClO_4 10^{-2} M y como Fase B AcCN. Se trabajó a flujo de 1 mL/min. El programa de gradiente empleado se muestra en la Tabla IV.4. La longitud de onda establecida para la detección fue de 220 nm.

Tabla IV.4. Gradiente de elución para la separación de fenoles

Tiempo (min)	Fase B (%)
0	30
15	80
20	100

Sulfonamidas

La separación de las sulfas se realizó en una columna de carbón grafitizado Hypercarb de Thermo mediante un gradiente de elución, utilizando como Fase A la mezcla AcCN- H_2O 50:50 (v/v) acidulada con HClO_4 a concentración de 0.001 M y como Fase B AcCN acidulado con HClO_4 a concentración de 0.1 M. Se trabajó a flujo de 0.5 mL/min. El programa de gradiente empleado se muestra en la Tabla IV.5. La longitud de onda de detección se fijó a 270 nm.

Tabla IV.5. Gradiente de elución para la separación de sulfonamidas.

Tiempo (min)	Fase B (%)
0	0
12	20
20	100

IV.5. Metodología de la microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de gota orgánica flotante (DLLME-SFO)

Protocolo de la técnica optimizada

En una serie de tubos de ensayo con capacidad de 12 mL se agregan 50 mg de NaCl y 10 mL de cada una de las muestras a analizar (en este trabajo se utilizaron como muestras las soluciones de trabajo de los 4 grupos de compuestos estudiados). Posteriormente se añaden 300 μ L de la mezcla de extracción dodecanol-MeOH 1:2 (v/v), inyectándola rápidamente con una jeringa de modo que se forme una solución turbia. Los tubos se colocan en un baño de agua a 30°C y se sonicán durante 3 min, luego se centrifugan por 10 min a 4500 rpm y finalmente se transfieren a un baño de hielo. El botón sobrenadante que se ha formado se separa cuidadosamente con una espátula y se coloca en un tubo aforado de 1 mL, disolviéndolo y llevando a aforo con MeOH. El extracto se inyecta en el cromatógrafo de líquidos para su análisis. En la Figura IV.1 se muestra el diagrama del procedimiento de microextracción (DLLME-SFO) optimizado.

El blanco de referencia se prepara de la misma manera, excepto que los 10 mL de muestra son sustituidos por 10 mL de agua desionizada. Este blanco se utiliza para poder identificar el tiempo en el que eluye el pico de dodecanol durante la corrida cromatográfica.

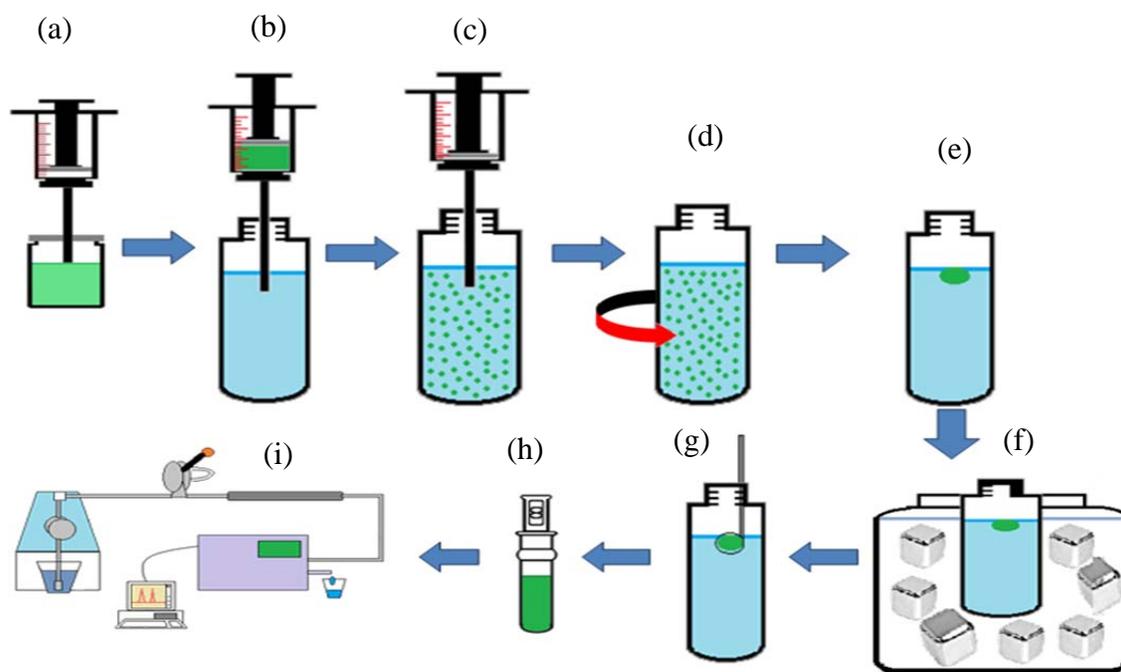


Figura IV.1. Diagrama del proceso de microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica (DLLME-SFO): (a) mezcla extractante-dispersante, (b) inyección de mezcla de extracción en la muestra, (c) formación de la emulsión, (d) sonicado y centrifugado, (e) botón flotante de extracto orgánico, (f) enfriamiento en baño de hielo para consolidar el botón solidificado, (g) recuperación del botón de extracto orgánico, (h) disolución del botón con MeOH y aforo a 1 mL, (i) análisis comatográfico del extracto.

IV.6. Aplicación a una muestra real

Para comprobar la aplicabilidad de la técnica de microextracción en muestras reales y evaluar el efecto de matriz, se realizaron ensayos con dos muestras colectadas en la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria, una de influentes (no tratada) y la otra de efluentes (tratada). Las muestras fueron previamente filtradas al vacío en un sistema Millipore, utilizando membranas de Nylon con poro de 0.45 μm , para eliminar sólidos suspendidos. Posteriormente se analizaron alícuotas de 10 mL de las muestras originales, así como una alícuota de la muestra de influentes fortificada con HAP, aplicando el método desarrollado para esta familia de compuestos (DLLME-SFO, CLAR/UV).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Condiciones cromatográficas

V.1.1. Condiciones para Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)

Las condiciones de detección (UV) se determinaron con el grupo de los 5 HAP más pesados, los cuales fueron separados en la columna de fase reversa Envirosep-pp de Phenomenex con una fase móvil isocrática de MeOH al 100% y detectados a diferentes longitudes de onda. En la Tabla V.1 se reporta el área del pico para cada HAP en función de la longitud de onda de detección.

Tabla V.1. Estudio de la respuesta de los HAP (área de pico) en función de la λ (nm) de detección.

HAP \ λ	215	240	254	260	270
BaA	122.6	91.8	160	160	192
CRIS	131.4	88.5	235.8	358.7	424.4
BaP	69.9	49.3	115.4	123.1	97.7
DBahA	148	38.5	40.2	59	133.3
IcdP	139	177	179.6	82	86.4

Como puede observarse en la Tabla anterior, la longitud de onda que produce la máxima respuesta varía según el compuesto, sin embargo la mayoría de los HAP presentó mejor respuesta a 254 y 270 nm. Se decidió escoger 270 nm porque la respuesta de DBA a 254 nm es muy baja; además, es sabido que las posibles interferencias presentes en muestras de aguas naturales generalmente dan una menor respuesta a mayor λ .

Los 10 HAP en estudio son un grupo de compuestos difíciles de separar tanto por cromatografía de gases como por cromatografía de líquidos. Las columnas Envirosep-pp de Phenomenex e Hypersil Green PAH, utilizadas en este trabajo, están especialmente diseñadas para la separación de HAP por CLAR. Debido a la gran diferencia de hidrofobicidad entre los compuestos de este grupo, fue

necesario diseñar un gradiente de elución con un rápido incremento de la fase fuerte (MeOH-AcCN 75:25, v/v) en el tiempo, el cual fue complementado con un gradiente de velocidad de flujo de la fase móvil para reducir el tiempo de análisis. El programa de gradiente finalmente establecido (Tabla IV.2), permitió lograr una resolución adecuada de los 10 compuestos en aproximadamente 13 min, como se muestra en la Figura V.1.

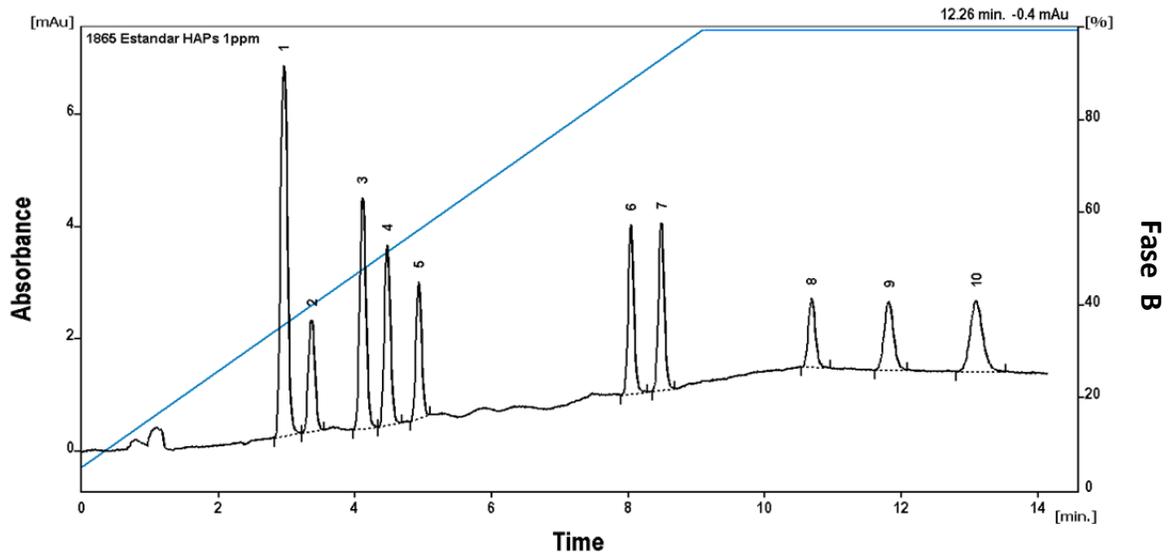


Figura. V.1. Separación de 10 HAP por gradiente de elución y flujo. Inyección directa de una mezcla estándar de HAP. Columna (125 × 4.6 mm, d.i.) Envirosep pp de 5 μ m; Fase móvil A: MeOH-H₂O 75:25 (v/v), Fase B: MeOH-AcCN 75:25 (v/v), detección UV a 270 nm. Solutos: 1) NAF, 2) ACI, 3) ACE, 4) FLU, 5) FEN, 6) BAN, 7) CRIS, 8) Bal, 9) DBah, 10) lcdP.

V.1.2 Condiciones para los plaguicidas

Se estudiaron 4 herbicidas de la familia de ácidos clorofenoxi (2,4-D; 2,4-DB; 2,4,5-T y Diclorprop) y el insecticida organoclorado DDT, ya que los primeros son utilizados en México y el segundo es un compuesto persistente que sigue encontrándose a menudo en los análisis ambientales, aunque su uso ha sido severamente restringido en la mayoría de los países.

De acuerdo con reportes de la literatura^{67,68}, algunos de los ácidos clorofenoxi considerados en el presente estudio han sido separados en columnas convencionales de fase reversa C18 con fases móviles acidificadas para mantener

los solutos en su forma neutra. Con esta base, se realizaron ensayos preliminares inyectando soluciones estándar individuales de cada soluto (10 mg/L) en una columna Hypersil ODS (150 × 4.6 mm, d.i.) de 5 μm, utilizando como fase móvil una mezcla MeOH-agua acidificada (HClO₄ 10⁻² M) 80:20 (v/v) y explorando diferentes longitudes de onda para la detección UV. En la Tabla V.2 se reporta el área del pico para cada plaguicida en función de la longitud de onda de detección. Como se observa en esta Tabla, la longitud de onda óptima para la mayoría de los solutos es 230 nm.

Tabla V.2. Estudio de la respuesta de los plaguicidas (área de pico) en función de la λ de detección.

Plaguicida	Longitud de onda (nm)					
	220	230	240	254	260	270
2,4-D	905	986	275	20.1	32.8	93.8
2,4-DB	441	504	222	10.6	16.8	45.4
2,4,5-T	625	427	294	24.3	12.7	29.1
Diclorprop	429	476	159	15.6	14.3	39.6
DDT	637	684	673	48.9	34.1	15.5

Con las condiciones utilizadas en el ensayo anterior los herbicidas fueron poco retenidos (t_r entre 2.6 y 3.2 min), mientras que el DDT eluyó hasta después de los 12 min. En ensayos subsecuentes se disminuyó la fuerza de la fase móvil para aumentar la retención y resolución de los herbicidas, lo cual se logró en buena medida. Finalmente, se logró obtener una separación aceptable de los 5 plaguicidas en un tiempo de análisis corto con la columna Synergi Fusion-RP 80 y el programa de gradiente reportado en la parte experimental (Tabla IV.3). En la Figura V.2 se presenta el cromatograma obtenido.

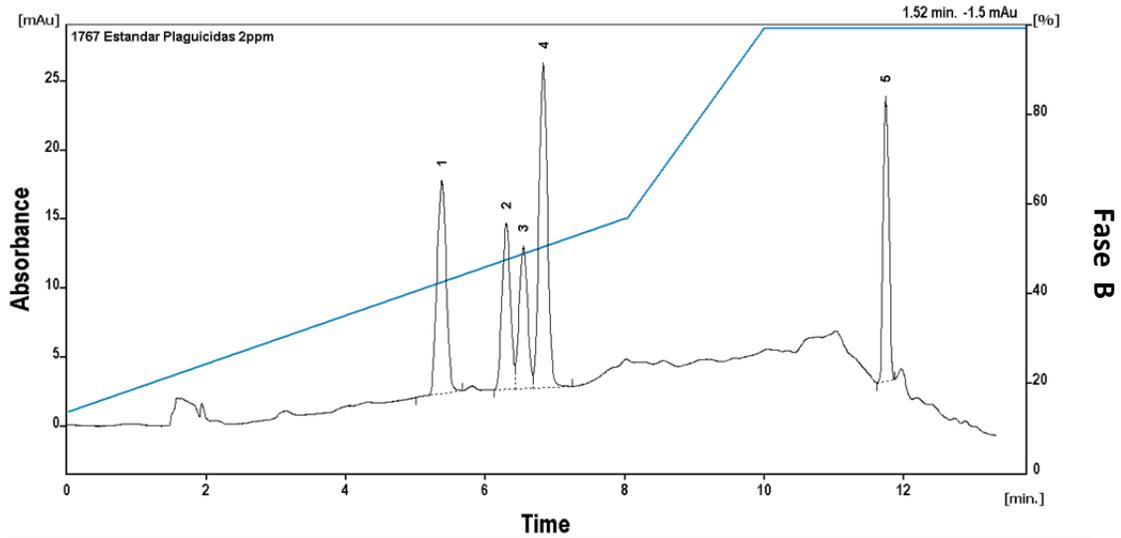


Figura. V.2. Separación de 5 plaguicidas por gradiente de elución. Inyección directa de una mezcla estándar de plaguicidas (10 mg/L). Columna (150 × 4.6 mm, d.i.) Synergi Fusion-RP 80 de 4µm; Fase móvil A: MeOH-H₂O (HClO₄ 10⁻² M) 50:50 (v/v), Fase B: ACN, flujo 1 mL/min, detección UV a 230 nm. Solutos: 1) 2,4-D, 2) 2,4-DB, 3) 2,4,5-T, 4) Diclorprop, 5) DDT.

V.1.3. Condiciones para los fenoles

Las condiciones óptimas para la detección del grupo de 8 fenoles se determinaron por inyección directa de una mezcla estándar (10 mg/L de cada soluto) en una columna de fase reversa, utilizando un gradiente de elución para la separación y explorando diversas longitudes de onda en el detector UV. En la Tabla V.3 se muestra la variación de áreas de pico en función de la longitud de onda de detección.

Tabla V.3. Estudio de la respuesta de los fenoles en función de la λ de detección.

λ (nm)	215	220	230	240	254	260	270	280
Fenoles	Área de pico							
F	1133	973	167	33	79	163	313	205
CF	1961	1666	453	33	87	199	485	574
DMF	746	700	384	48	26	57	152	237
CMF	686	800	862	198	22	43	114	197
DCF	490	426	424	152	10	17	54	119
DNOC	683	517	416	175	655	829	921	782
TCF	1036	627	360	144	13	11	31	85
PCF	2089	1099	384	282	58	38	15	19

Como se puede observar en la Tabla anterior, para la mayoría de los fenoles la sensibilidad es máxima a 215 nm, sin embargo se prefirió utilizar la longitud de onda de 220 nm para disminuir el ruido y la deriva de la línea base en los cromatogramas.

Mediante algunos ensayos preliminares, utilizando una fase móvil isocrática, se corroboró que la mejor separación de los solutos y la mayor simetría de picos se obtienen acidificando la fracción acuosa de la fase móvil a pH 2. En esta condición todos los fenoles se encuentran en su forma neutra. Posteriormente se compararon los cromatogramas obtenidos bajo las mismas condiciones de fase móvil con dos diferentes columnas, la Hypersil ODS de Thermo y la Synergi Fusion-RP 80 de Phenomenex. Con esta última se tuvieron picos más estrechos y simétricos por lo que fue seleccionada para los siguientes ensayos. Finalmente se exploraron diversos programas de gradiente y composiciones de las fases móviles débil y fuerte para optimizar la separación y el tiempo de análisis. En la Figura V.3 se muestra el cromatograma obtenido en las mejores condiciones encontradas. El programa de gradiente utilizado se describió en la parte experimental (Tabla IV.4).

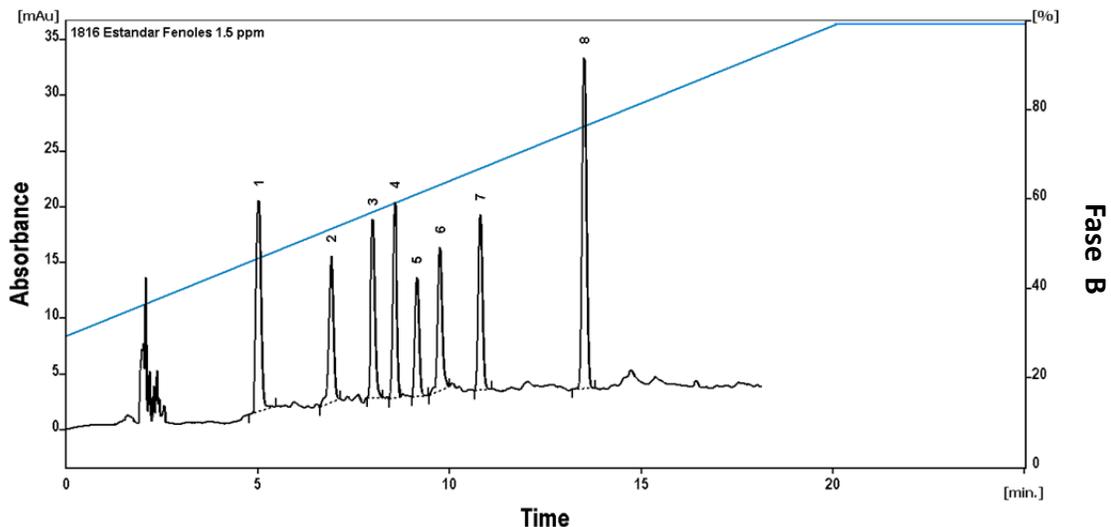


Figura. V.3. Separación de 8 fenoles por gradiente de elución. Inyección directa de una mezcla estándar de fenoles (2 mg/L). Columna (150 × 4.6 mm, d.i.) Synergi Fusion-RP 80 de 4 μ m; Fase móvil A: HClO₄ pH 2 y Fase B: AcCN; flujo 1 mL/min; detección a 220 nm. Solutos: 1) F, 2) 2CF, 3) 2,4DMF, 4) 4C3MF, 5) 2,4DCF, 6) 4,6DNC, 7) 2,4,6TCF, 8) PCF.

V.1.4 Condiciones para las sulfonamidas.

Una vez que se establecieron las condiciones para la separación de las sulfas, según se describe posteriormente, se probaron diferentes longitudes de onda en el detector UV para encontrar las condiciones de máxima sensibilidad en la detección. En la Tabla V.4 se reporta el área de pico para cada sulfa en función de la longitud de onda de detección. Como lo muestra la Tabla, la λ óptima para la detección de la mayoría de las sulfas es 270 nm.

Tabla V.4. Estudio de la respuesta de las sulfas en función de la λ de detección.

λ (nm)	215	220	230	240	254	260	270
Sulfas	Área del pico cromatográfico						
STZ	626	476	242	352	784	996	904
SDZ	1318	1129	656	470	761	1114	1322
SMR	946	822	688	663	805	1012	1064
SMX	1597	1181	511	266	692	1107	1493
SFX	1189	1083	768	575	639	924	1208
SDX	985	834	670	361	981	935	1388

Las sulfas consideradas en este trabajo son compuestos bastante hidrofílicos, con excepción de la sulfadimetoxina (SDX). Para su separación se ensayaron inicialmente las condiciones reportadas en un trabajo previo del grupo de investigación⁵⁶, en el que se emplea una columna de fase reversa C18 y un gradiente AcCN-agua (pH 3.5), comenzando con una alta proporción de fase acuosa (95%). Sin embargo, al inyectar una mezcla estándar de las 6 sulfas en metanol, utilizando esas condiciones, no se obtuvieron resultados satisfactorios ya que los picos de los 5 primeros compuestos eluidos presentaron una notoria deformación. En un segundo ensayo se inyectó un estándar de las mismas sulfas disueltas en agua y se obtuvo una separación excelente con picos esbeltos y simétricos para todos los solutos. Estos resultados indican claramente la incompatibilidad entre una fase móvil muy débil (al inicio del gradiente) y un solvente fuerte en la muestra inyectada; dicho solvente provoca una gran

dispersión de las bandas de los solutos al momento de la inyección. En el caso de los solutos más retenidos, la dispersión de las bandas alcanza a ser contrarrestada por el gradiente de elución; por el contrario, los solutos poco retenidos eluyen de la columna antes de que el gradiente alcance a compensar la dispersión de bandas y por ello se obtienen picos anchos, deformes e incluso desdoblados.

Dadas las características del proceso de microextracción líquido-líquido disperso, que es el objeto de estudio en este trabajo, era indispensable que las muestras a analizar estuvieran disueltas en metanol (o algún otro alcohol). En efecto, el botón sólido de dodecanol con los solutos extraídos, que se obtiene al final del proceso, sólo es soluble en algunos disolventes orgánicos polares como los alcoholes. Por tal motivo, resultaba indispensable encontrar condiciones cromatográficas apropiadas para la separación de las sulfas disueltas en metanol. El problema fundamental de estos analitos radica en la baja retención de algunos de ellos en las columnas convencionales de fase reversa C18, lo que obliga a utilizar fases móviles muy débiles al inicio del programa de gradiente. En vista de ello, se hicieron pruebas con diversas columnas de fase reversa, incluyendo una fase polimérica estireno-divinilbenceno y una fase de carbón grafitizado. Sólo con esta última se logró retener suficientemente a las sulfas más hidrofílicas y separarlas en presencia de fases móviles de mayor fuerza (>20% de disolvente orgánico), de modo a evitar el problema de la inyección en medio alcohólico.

Una vez seleccionada la columna, se ensayaron diversas composiciones para las fases móviles débil y fuerte, así como diversos programas de gradiente de elución, debido a que la SDX se retiene muy fuertemente en el carbón grafitizado. Finalmente se eligió como fase débil una mezcla AcCN-agua 50:50 (v/v) acidulada con HClO₄ 0.001 M y como fase fuerte AcCN con HClO₄ 0.1M. En estas condiciones, el pH de la fase móvil disminuye durante el gradiente, ocasionando la ionización de la SDX y disminuyendo su retención. Por lo tanto, se trata de un gradiente de pH y fuerza de la fase móvil. El programa de gradiente se describió

en la parte experimental (Tabla IV.5). En la Figura V.4 se muestra el cromatograma obtenido con las condiciones establecidas.

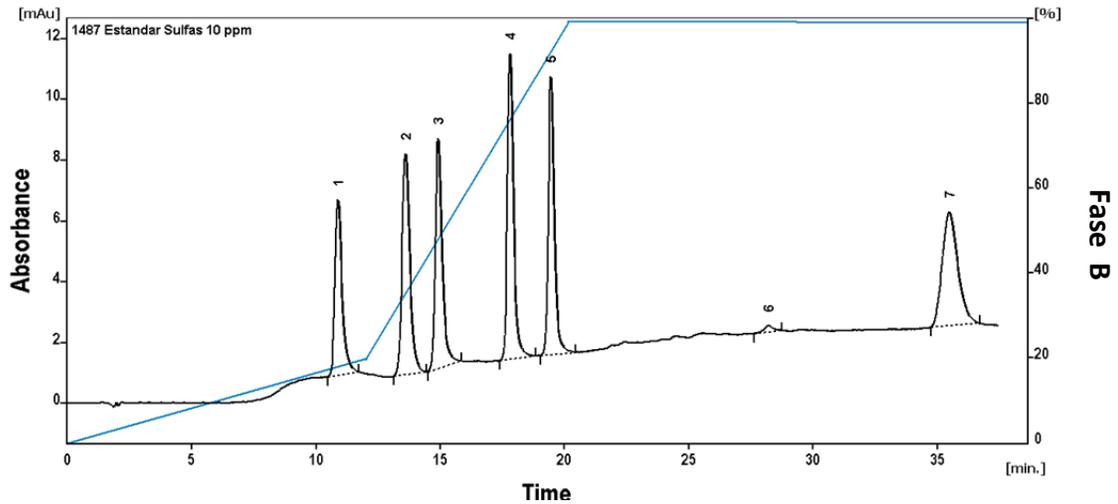


Figura. V.4. Separación de 6 sulfas por gradiente de elución. Inyección directa de una mezcla estándar de sulfas (10 mg/L). Columna (150 × 3 mm, d.i.) Hypercarb de 5µm; Fase móvil A: AcCN-agua 50:50 (v/v) con HClO₄ 0.001 M y Fase B: AcCN con HClO₄ 0.1 M; flujo 0.5 mL/min; detección a 270 nm. Solutos: 1) STZ, 2) SDZ, 3) SMR, 4) SMX, 5) SFX, 6) SDX.

V.2. Optimización de la técnica de microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica

Se utilizaron Naftaleno y Fenantreno como solutos de prueba, evaluando su recuperación al variar diversos parámetros experimentales de la técnica DLLME-SFO. Todos los experimentos fueron realizados en tubos de ensayo de vidrio pyrex con tapón de rosca y capacidad de 12 mL. El volumen de muestra acuosa fortificada con los analitos fue de 10 mL. El extracto, recuperado al final del proceso como un botón sólido, se disolvió en metanol y se aforó a 1 mL con el mismo disolvente para su análisis posterior por CLAR-UV.

Para el cálculo de la recuperación se empleó la siguiente ecuación (E-V.1):

$$\%R = \frac{A_{ext}}{A_{st}} \times \frac{C_{st}}{C_m \times (V_m/V_{ext})} \times 100 \quad (E - V.1)$$

Donde: A_{ext} es el área del pico del analito en el cromatograma del extracto analizado, A_{st} es el área del pico del mismo compuesto en el estándar inyectado como referencia, C_{st} es la concentración del compuesto en el estándar, C_m es la concentración del compuesto en la muestra acuosa fortificada, V_m es el volumen de la muestra fortificada (10 mL) y V_{ext} es el volumen del extracto reconstituido (1 mL). En el anexo 1 se muestran la deducción de la ecuación.

V.2.1. Tiempo y velocidad de centrifugación

La técnica DLLME-SFO se caracteriza por ser un sistema de extracción donde la fase orgánica se encuentra dispersa en forma de microgotas homogéneamente distribuidas en la muestra acuosa. Una vez que los solutos se han repartido entre las fases, es necesario inducir la agregación de las microgotas en una fase continua, la cual forma finalmente el botón sólido cuando el sistema es sometido a enfriamiento. El medio utilizado para romper la emulsión y provocar la separación de fases es la centrifugación. Por ello, las primeras pruebas tuvieron por objeto encontrar condiciones adecuadas de velocidad y tiempo de centrifugación, de modo a obtener una fase acuosa totalmente transparente y una capa o gota de fase orgánica flotando en la superficie de la fase acuosa. El tiempo y velocidad de centrifugación se variaron en el intervalo de 5-20 min y 1500-5000 rpm, respectivamente. La mejor condición para lograr el objetivo deseado en el menor tiempo posible fue aplicando una velocidad de centrifugación de 4500 rpm durante un tiempo de 10 minutos.

V.2.2. Efecto de la adición de NaCl

El cloruro de sodio se añadió a la muestra acuosa para aumentar la fuerza iónica de la solución. En general, el aumento de la fuerza iónica puede causar una disminución en la solubilidad de los analitos, promoviendo una mayor eficiencia en la extracción⁶⁶. Por lo tanto, se estudió la influencia de la cantidad de cloruro de sodio sobre la recuperación de los solutos de prueba, en un intervalo de 0 a 500 mg de sal añadida en 10 mL de fase acuosa (0-5% p/v). Como extractante se

utilizó una mezcla de 1-dodecanol en metanol 1:2 (v/v), inyectando rápidamente 300 μ L en la fase acuosa para formar la emulsión. En la Figura V.5 se muestran gráficamente los resultados de estos ensayos.

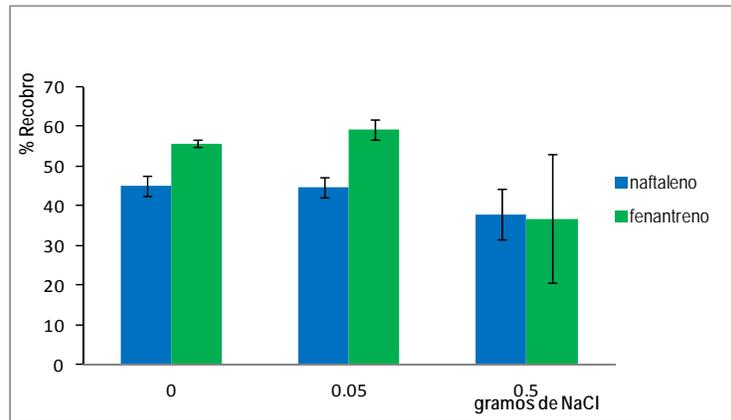


Figura. V.5. Recuperación de Naftaleno y Fenantreno al variar la cantidad de NaCl en la fase acuosa (n=4).

Como muestra la figura anterior, no hubo una diferencia significativa en la eficiencia de extracción al adicionar o no cloruro de sodio (0-0.05). Sin embargo, en ausencia de cloruro de sodio, el botón sólido que se forma al final del proceso no tiene una buena consistencia y se rompe fácilmente. Además, se observó que el dodecanol no se recuperaba completamente en la capa de fase orgánica separada después de centrifugar la emulsión, sino que quedan residuos adheridos a las paredes del tubo. Por otra parte, al aumentar la cantidad de cloruro de sodio añadido hasta 500 mg, la recuperación es menor y un aumento en la dispersión de los resultados. Por lo tanto, se decidió fijar en 50 mg la cantidad de NaCl añadido (0.5% p/v).

V.2.3. Cantidad de mezcla extractante

La selección del disolvente de extracción es crucial para el éxito de la técnica. Este disolvente debe cumplir con una serie de requisitos. Como todo solvente de extracción líquido-líquido, debe ser inmisible en agua y tener buena afinidad por los analitos. Su temperatura de fusión/solidificación debe ser cercana a la temperatura ambiente, de modo que al enfriar ligeramente el recipiente que

contiene las dos fases líquidas, forme un botón sólido. Su densidad en estado sólido debe ser menor a la del agua, para que flote y pueda recuperarse fácilmente. Además debe tener un buen comportamiento cromatográfico (baja detectabilidad, retención moderada en la fase estacionaria y buena solubilidad en el disolvente fuerte de la fase móvil, debe eluir de preferencia como un pico bien definido), de modo que no interfiera en la determinación de los analitos y que no dañe a la columna analítica. También son deseables otras cualidades como baja volatilidad (para evitar pérdidas de analitos), baja toxicidad y fácilmente accesible^{65,66,69}.

Son pocos los disolventes que cumplen con todos los requisitos mencionados, entre ellos se encuentran algunos alcoholes de cadena larga como el 1-Undecanol y el 1- y 2-Dodecanol, así como hidrocarburos alifáticos halogenados con cadenas de 10 a 12 carbonos (más tóxicos). En este trabajo se utilizó el 1-Dodecanol.

Para conocer el efecto de la cantidad de mezcla extractante añadida a la muestra sobre la eficiencia de extracción, se realizaron experimentos con diferentes volúmenes de la mezcla dodecanol-metanol 1:2 (v/v); los volúmenes probados fueron 50, 200, 300 y 400 μL . En la figura V.6 se muestran los resultados obtenidos.

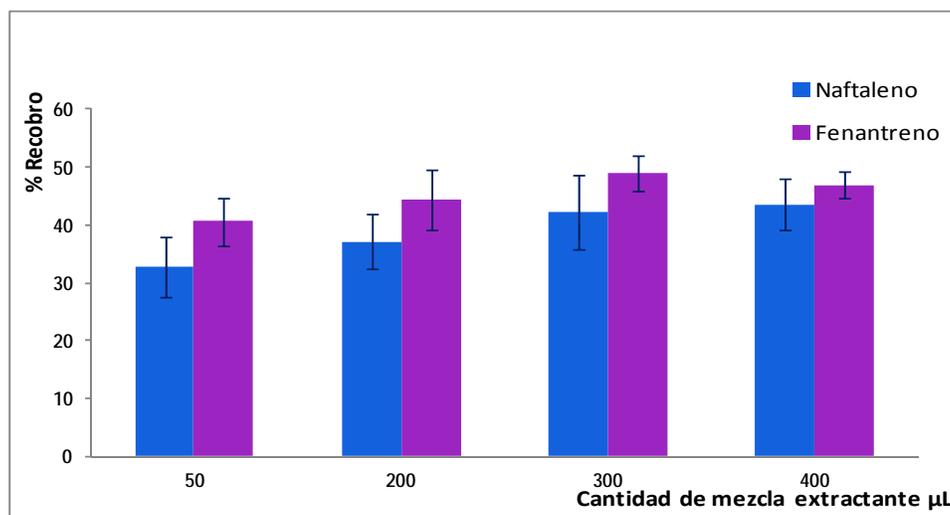


Figura. V.6. Recuperación de Naftaleno y Fenantreno al variar la cantidad de mezcla extractante añadida a la muestra (n=4).

De acuerdo con estos resultados, el aumento del volumen de mezcla extractante de 50 a 300 μL produce un ligero incremento en el recobro de los solutos, pero un aumento ulterior no mejora significativamente la extracción y, al contrario, puede resultar contraproducente. Esto es debido a la alta viscosidad del dodecanol que dificulta el manejo de la mezcla extractante. Con volúmenes de 400 μL , es difícil inyectar con rapidez la mezcla de extracción en la muestra y la dispersión de microgotas de solvente orgánico en la fase acuosa puede no formarse bien. Por tal motivo se decidió trabajar con un volumen de 300 μL de extractante.

V.2.4. Relación extractante-dispersante

El dispersante debe ser un disolvente capaz de solubilizar al extractante y, al mismo tiempo, ser miscible con la fase acuosa de la muestra. El MeOH cumple con estas dos características, ya que es un buen disolvente del dodecanol y es completamente miscible con el agua, por lo que fue elegido como dispersante en este trabajo. Se realizaron algunos experimentos para determinar la proporción óptima extractante-dispersante en la mezcla de extracción, de modo que al inyectarla en la muestra condujera a la formación de una emulsión estable de microgotas orgánicas homogéneamente dispersas en el medio acuoso. Estos experimentos se realizaron inyectando 300 μL de mezcla dodecanol-metanol en proporciones 1:1, 1:2 y 1:3, v/v (Figura V.7).

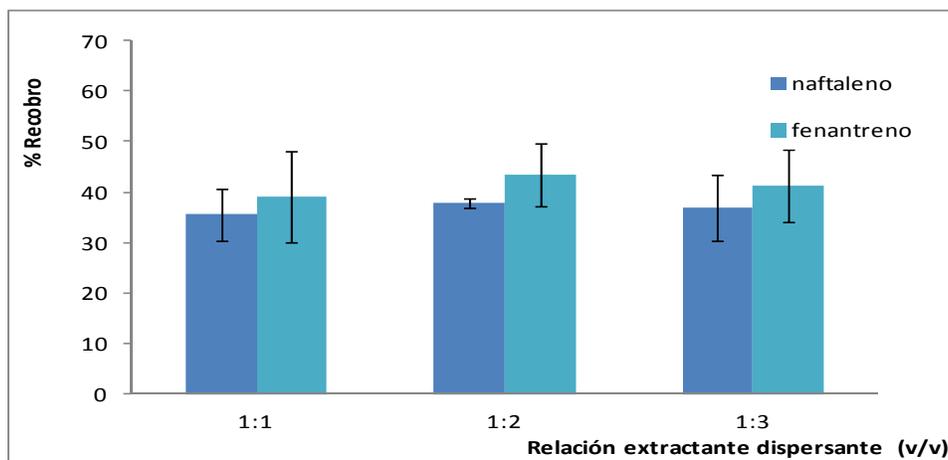


Figura. V.7. Efecto de la proporción extractante-dispersante sobre la Recuperación de los analitos (n=4).

Los resultados mostrados en la Figura V.7 indican que no hay diferencia significativa en la recuperación de los solutos al variar la relación dodecanol-metanol. No obstante, se decidió elegir una relación 1:2 para evitar que la mezcla fuera demasiado viscosa y facilitar su manipulación.

V.2.5. Corrección de la solución de referencia para la cuantificación

En los ensayos anteriores se estuvo usando como referencia para la cuantificación de los analitos la misma solución de trabajo con la que se realizaron los experimentos de microextracción, es decir, una disolución acuosa fortificada con los compuestos a concentración conocida. Debido a que la recuperación de naftaleno y fenantreno es demasiado baja menor al 50%, se realizaron algunas pruebas para checar el comportamiento cromatográfico y la respuesta de los solutos disueltos en diferentes medios: agua, metanol y metanol-dodecanol en relación 2:1 (v/v). Los cromatogramas obtenidos mostraron que el tiempo de retención era similar en todos los casos, pero el área de los picos era significativamente menor cuando los solutos estaban disueltos en metanol comparado con la disolución en agua; por otra parte, no se observaron diferencias de área de pico al inyectar los solutos disueltos en metanol o en metanol con dodecanol. Estas observaciones indicaron que en los ensayos de microextracción anteriores se había estado subvaluando la recuperación de los analitos, puesto que el botón sólido de dodecanol obtenido al final del proceso se disolvió y reconstituyó en metanol. A pesar de este problema, las conclusiones globales sobre el efecto de los parámetros analizados en los incisos anteriores siguen siendo válidas puesto que se dedujeron a partir de una comparación de recobros relativos a la misma referencia.

La cuantificación de los analitos en los ensayos que se realizaron posteriormente, se llevó a cabo usando como referencia un estándar de naftaleno y fenantreno disueltos en metanol. Por ello, los recobros reportados en los siguientes incisos son más altos.

V.2.6. Efecto de la agitación y el tiempo de extracción

Una vez inyectada la mezcla extractante y formada la emulsión, la agitación del sistema puede ser un factor favorable en la eficiencia de extracción. Con esta premisa, se realizaron pruebas ensayando tres tipos de agitación: manual, con vortex y con ultrasonido. La agitación manual no fue adecuada debido a que fácilmente se producía una ruptura prematura de la emulsión. La agitación con vortex fue demasiado agresiva pues ocasionó el depósito de fase orgánica sobre las paredes del tubo y al interior de la tapa, sin que se pudiera recuperar posteriormente. El ultrasonido resultó ser la mejor opción para agitar el sistema de manera controlada, sin generar efectos indeseables como los antes descritos. Su aplicación como medio para favorecer la extracción se basa en la capacidad de la energía ultrasónica para proporcionar altas temperaturas (que producen un aumento de la solubilidad y difusión) y altas presiones (que favorecen la penetración y transporte) en la interfase entre el disolvente y la matriz⁷⁰.

En los ensayos siguientes se buscó determinar si la agitación por ultrasonido tenía algún efecto positivo en la eficiencia de extracción y cuál era el tiempo óptimo de extracción, es decir, el tiempo que debe dejarse el sistema emulsionado (con o sin agitación) antes de inducir la separación de fases por centrifugación. Para ello se llevó a cabo una serie de experimentos manteniendo los tubos estáticos (sin agitación) por diferentes tiempos (0-5 min) después de formada la emulsión. También se realizó otra serie de experimentos en la que los tubos se sumergieron en un baño ultrasónico por diferentes tiempos (3, 5 y 10 min), inmediatamente después de haber formado la emulsión.

Los resultados de la primera serie de experimentos mostraron que, en ausencia de agitación, no hubo diferencias significativas entre tiempos de extracción diferentes. Por otra parte, al aplicar el ultrasonido para agitar la emulsión tampoco se observaron diferencias significativas como lo muestra la Figura V.8.

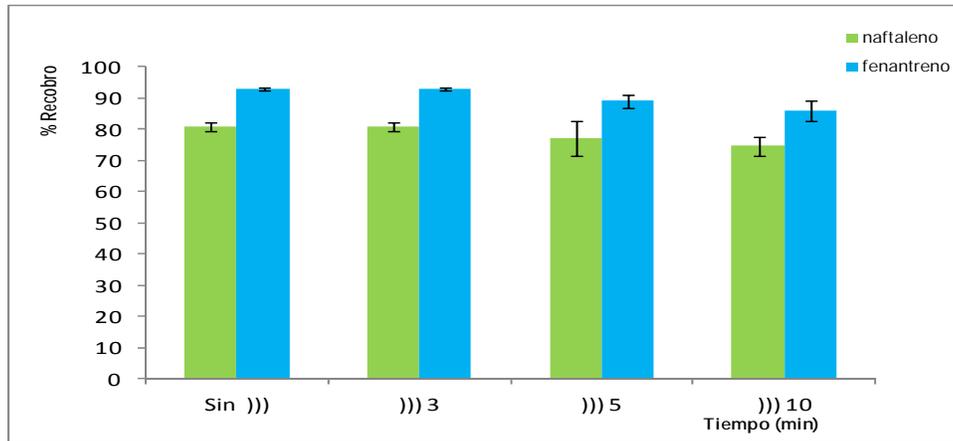


Figura V.8. %Recobro al variar el tiempo de agitación con ultrasonido (n=4). ()))) ultrasonido.

Contrariamente a lo esperado, no se observó ninguna influencia de la agitación ni del tiempo de extracción en la recuperación de los solutos de prueba, ya que se obtuvieron prácticamente los mismos recobros al mantener la emulsión estática y al aplicar ultrasonido por diferentes tiempos. Esto se atribuye a que el área de contacto entre la fase orgánica y la solución acuosa es sumamente grande una vez que se forma la emulsión; por lo tanto, la transferencia de masa de la muestra al disolvente de extracción es tan rápida que el equilibrio de extracción se puede alcanzar en un período de tiempo muy corto, aún sin agitación. Este hecho pone en relevancia una gran ventaja de la técnica DLLME-SFO, ya que el tiempo de análisis se reduce considerablemente en comparación con otras técnicas de preparación de muestra.

A pesar de lo antes discutido, no se quiso descartar la aplicación del ultrasonido y, para fijar condiciones constantes en el protocolo de la técnica, se estableció un tiempo de 3 min en el baño ultrasónico como tiempo de extracción.

V.2.7. Efecto de la temperatura

Este ensayo se realizó con el objetivo de conocer qué efecto tiene la temperatura en la extracción. Inmediatamente después de formada la emulsión, los tubos se colocaron en un baño maría a la temperatura deseada por algunos minutos y se

llevaron al ultrasonido. En la Tabla V.5 se muestran los recobros obtenidos al variar la temperatura:

Tabla V.5. Efecto de la temperatura en la microextracción (n=4).

Analito	T.A. (~23°C)	30°C	35°C	40°C
Naftaleno	Botón	80.7 ± 1.1	77.1 ± 4.4	78.8 ± 6.6
Fenantreno	quebradizo	93 ± 0.35	89 ± 1.9	90 ± 5.5

Como se puede observar en la Tabla anterior, es importante mantener una temperatura arriba de la temperatura ambiente para que al final del proceso se pueda formar un botón de consistencia adecuada. Sin embargo, no se observó diferencia significativa en los recobros de los analitos a las otras 3 temperaturas, por lo que se eligió la temperatura de 30°C ya que la dispersión de los datos fue menor al aplicar esta temperatura.

V.2.8. Protocolo final de la técnica

Las condiciones establecidas para el protocolo final de la técnica fueron descritas en la parte experimental. Con estas condiciones se logró obtener una dispersión homogénea y estable del extractante en la muestra, así como la posterior formación de un botón sólido con consistencia adecuada para poder separarlo fácilmente de la fase acuosa. Como resultado de esta optimización, se obtuvieron recobros aceptables y reproducibles para los analitos de prueba. La técnica de DLLME-SFO es un método de preparación de muestra rápido y sencillo, ya que, con el protocolo desarrollado, se puede realizar la extracción de aproximadamente 12 muestras en menos de 30 min y tenerlas listas para el análisis cromatográfico. En la Figura V.9 se ilustra la apariencia que tiene la solución una vez formada la emulsión, así como la apariencia del botón que se obtiene después de centrifugar y colocar los tubos en un baño de hielo.

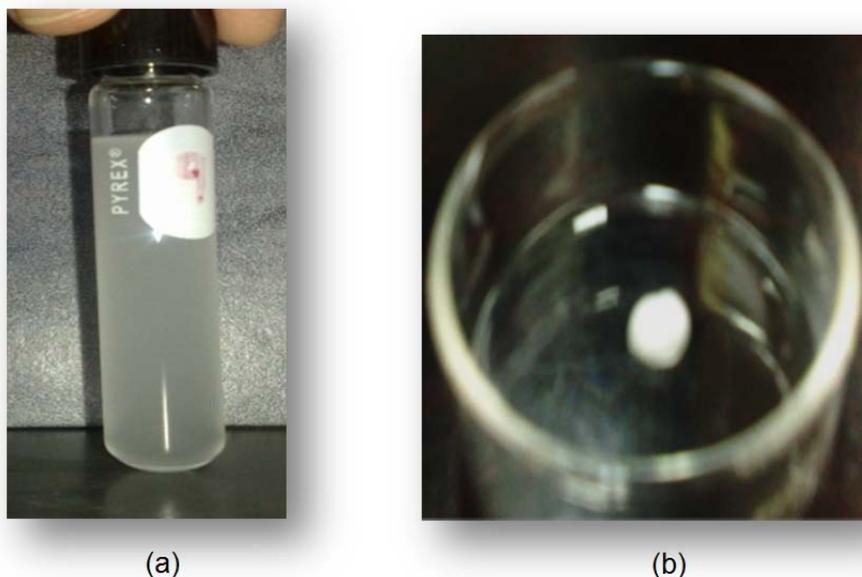


Figura V.9. (a) Imagen de la dispersión formada después de inyectar la mezcla dispersante-extractante en la muestra acuosa, (b) botón formado después de colocar las muestras en hielo.

El factor de enriquecimiento de los compuestos durante el proceso de extracción es de sólo 10 veces, puesto que se parte de 10 mL de muestra acuosa y el extracto final se lleva a un volumen de 1 mL en un tubo aforado. Sin embargo, en caso de requerirse, se podría aumentar el enriquecimiento hasta un factor de 100 o 200 si el botón de extracto se disuelve con 100 o 50 μL de metanol, respectivamente, sin llevar a un volumen fijo. Obviamente, la precisión y exactitud del método se verían afectadas por la variabilidad e incertidumbre en el volumen final del extracto.

V.3. Aplicación de la técnica DLLME-SFO para la extracción de diferentes grupos de compuestos

V.3.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

V.3.1.1. Recobro y precisión del método

Con las condiciones de separación y detección de los HAP optimizadas, se procedió a realizar la microextracción aplicando el protocolo desarrollado a muestras de agua grado reactivo fortificadas con los compuestos seleccionados.

En la Figura V.10 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos al analizar el extracto resultante del proceso de microextracción (botón reconstituido en metanol). Como se observa en esta figura, además de los 10 picos correspondientes a los HAP, hay un pequeño pico extra que eluye en ~5.0 min. El análisis del blanco de referencia (muestra acuosa no dopada, sometida al mismo tratamiento), permitió determinar que esta señal es generada por el dodecanol utilizado como extractante. Sin embargo, con el gradiente diseñado, la señal del extractante no interfiere de manera significativa en la cuantificación de los compuestos de interés.

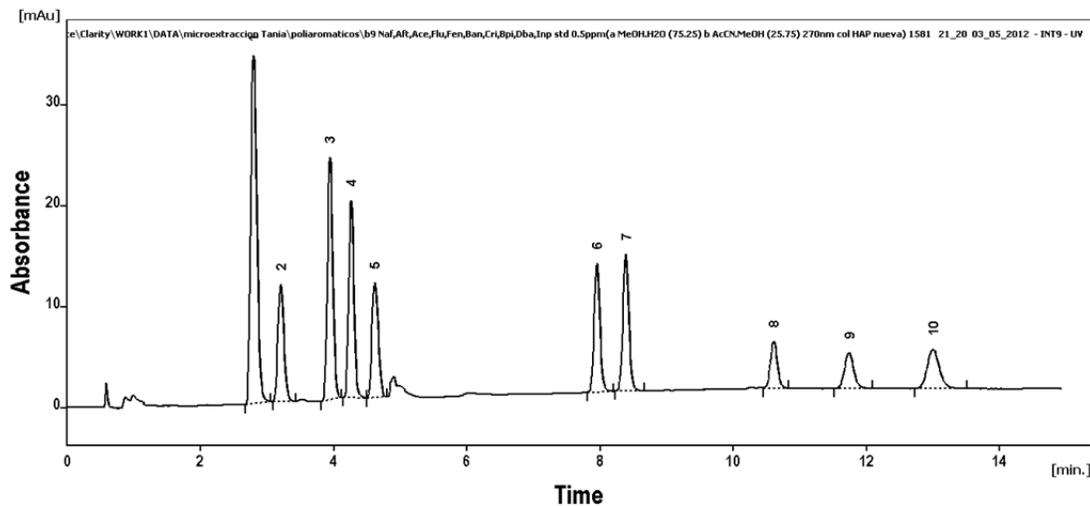


Figura V.10. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra sintética de HAPs en agua grado reactivo, tratada mediante la técnica DLLME-SFO. Solutos: 1) NAF, 2) ACI, 3) ACE, 4) FLU, 5) FEN, 6) BaA, 7) CRIS, 8) BaP, 9) DBahA, 10) IcdP. Condiciones cromatográficas como en la Fig. V.1.

En la Tabla V.6 se reportan los recobros promedio obtenidos al analizar 15 réplicas de una muestra de agua grado reactivo dopada con los HAP. Las concentraciones fueron ajustadas de modo a tener picos de tamaño parecido, ya que la absorbancia de estos compuestos varía fuertemente en función del número de anillos aromáticos en la molécula. Los análisis se realizaron en tres diferentes días; sin embargo, es importante mencionar que la técnica de extracción empleada permite preparar simultáneamente varias muestras en un tiempo relativamente corto, por lo que el tiempo de análisis está principalmente condicionado por las corridas cromatográficas.

En la Tabla V.6 también se reportan los valores del coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) para cada compuesto, ya que éste permite estimar y comparar la hidrofobicidad de los analitos estudiados. Como puede observarse, los recobros obtenidos fueron similares para todos los HAP, oscilando entre 85-94%.

La precisión de un método está relacionada con la dispersión que tienen las medidas alrededor del valor promedio y se expresa mediante la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV). Estos parámetros permiten evaluar la incertidumbre de los resultados debida a errores aleatorios. La precisión obtenida en estos ensayos, evaluada por el coeficiente de variación del recobro, fue $\leq 7.5\%$ lo que se considera satisfactorio para estos niveles de concentración. La única excepción fue el dibenzoantraceno que presentó una variabilidad un poco mayor (11.6%).

Según los criterios establecidos por la EPA para el análisis de contaminantes orgánicos en aguas naturales, se considera aceptable una recuperación de los compuestos de interés entre 70% y 130% y un CV de hasta 30% cuando se analizan muestras fortificadas a niveles de partes por billón, por lo que se puede decir que el método desarrollado cumple con los criterios de calidad comúnmente aceptados.

Tabla V.6. Recobro promedio (%R) y precisión (%CV) del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de HAP en muestras acuosas (n=15).

Analito	Concentración (ng/mL)	R % \pm S	CV%	Log Kow
Naftaleno	500	86.4 \pm 3.9	4.6	3.37
Acenaftileno	500	92.4 \pm 3.6	4.0	4.07
Acenafteno	500	93.6 \pm 3.9	4.2	3.98
Fluoreno	100	94.1 \pm 4.5	4.8	4.18
Fenantreno	100	92.3 \pm 4.3	4.6	4.46
Benzoantraceno	50	92.5 \pm 4	4.4	5.63
Criseno	25	90.9 \pm 4.2	4.6	5.56
Benzopireno	50	86.8 \pm 5.0	6.2	6.06
dibenzoantraceno	50	85.4 \pm 9.9	11.6	6.84
Indenopireno	100	86.2 \pm 6.4	7.5	6.58

V.3.1.2. Linealidad del método

La linealidad del método fue determinada mediante el análisis de muestras de agua grado reactivo fortificadas con los 10 HAP a cinco niveles de concentración. Por las razones antes señaladas, sobre la gran diferencia en la respuesta de los analitos, los intervalos de concentración estudiados variaron desde 100-2000 ng/mL para naftaleno hasta 5-100 ng/mL para criseno. No obstante, en todos los casos se mantuvo un factor de 20 entre la concentración más alta y la más baja del intervalo. Para cada nivel se prepararon y analizaron tres réplicas independientes. La cantidad recuperada de cada compuesto se calculó comparando las áreas del pico en los cromatogramas de las muestras analizadas con las obtenidas por inyección directa de una mezcla estándar, por lo tanto se trata de un recobro absoluto.

En el Anexo 2 se presentan las gráficas de *Cantidad Recuperada Vs Cantidad Adicionada* para cada soluto. El resultado del tratamiento estadístico de los datos por el método de mínimos cuadrados se reporta en la Tabla V.7.

Tabla V.7. Linealidad del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de HAP en muestras acuosas (n=3).

Analito	Cantidad adicionada* (µg)	Coefficiente de determinación (r ²)	Ordenada al origen ± S (µg)	Pendiente ± S
NAF	1 – 20	0.9992	0.068 ± 0.144	0.875 ± 0.014
AFT	1 – 20	0.9998	0.063 ± 0.068	0.954 ± 0.006
ACE	1 – 20	0.9999	-0.072 ± 0.054	0.964 ± 0.005
FLU	0.2 – 4	0.9961	0.060 ± 0.064	0.871 ± 0.031
FEN	0.2 – 4	0.9993	-0.002 ± 0.009	0.978 ± 0.004
BaA	0.1 – 2	0.9989	-0.019 ± 0.017	0.928 ± 0.017
CRIS	0.05 – 1	0.9984	-0.006 ± 0.011	0.932 ± 0.021
BaP	0.1 – 2	0.9952	0.028 ± 0.034	0.831 ± 0.033
DBahA	0.1 – 2	0.9971	0.022 ± 0.026	0.821 ± 0.025
IcdP	0.2 – 4	0.9977	0.007 ± 0.047	0.855 ± 0.024

* Adición en 10 mL de muestra acuosa

Los coeficientes de determinación (r²) obtenidos en el análisis de regresión lineal fueron superiores a 0.99, lo que demuestra que existe una relación lineal entre la cantidad de soluto determinada por el método y la cantidad de soluto añadida a la muestra analizada.

Las ecuaciones de las rectas de regresión que describen la cantidad de soluto recuperado en función de la cantidad de soluto adicionado son un buen indicador de las características del método analítico desarrollado. Si la ordenada al origen es estadísticamente igual a cero significa que el método no presenta errores sistemáticos. Por otra parte la pendiente multiplicada por cien representa el porcentaje del recobro promedio del analito en el intervalo de concentraciones estudiado. En este caso, se puede decir que el método no presenta errores sistemáticos y que el recobro promedio en el intervalo de concentraciones estudiado para los 10 HAP osciló entre 82% y 98%.

V.3.2. Plaguicidas

V.3.2.1. Recobro y precisión del método

En la Figura V.11 se presenta el cromatograma obtenido al analizar el extracto de una muestra de agua grado reactivo fortificada con el insecticida DDT y 4 herbicidas clorofenoxi a concentraciones de 100 ng/mL.

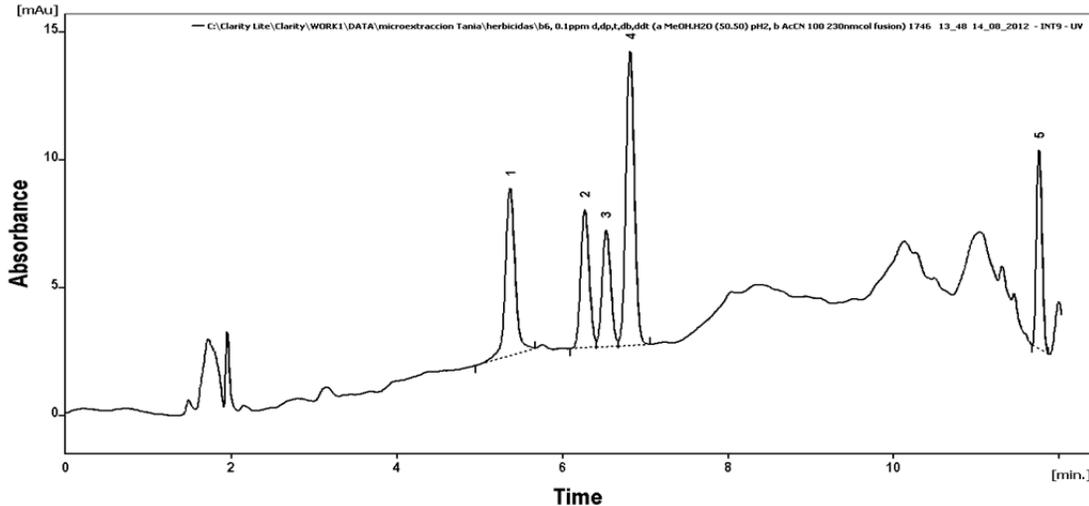


Figura V.11. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de agua grado reactivo dopada con 5 plaguicidas y tratada mediante la técnica DLLME-SFO. Solutos: 1) 2,4-D, 2) Diclorprop, 3) 2,4,5-T, 4) 2,4-DB, 5) DDT. Condiciones cromatográficas como en la Fig. V.2.

Los resultados de recobro promedio y precisión obtenidos para cada compuesto al analizar 12 réplicas de la muestra fortificada se reportan en la Tabla V.8.

Tabla V.8. Recobro promedio (%R) y precisión (%CV) del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de 5 plaguicidas en muestras acuosas (n=12).

Analito	Concentración (ng/mL)	R ± S (%)	CV (%)	Log Kow
2,4-D	100	66.3 ± 3.1	4.7	2.8
Diclorprop	100	83.5 ± 4.9	5.8	3.43
2,4,5-T	100	83.0 ± 3.5	4.2	3.31
2,4-DB	100	89.5 ± 4.6	5.1	3.53
DDT	100	74.2 ± 4.8	6.5	6.19

Los recobros fueron superiores a 74%, excepto para el 2,4-D que tuvo una recuperación más baja (66%), probablemente debido a que es el compuesto más hidrofílico del grupo. Por otra parte, la precisión del método, evaluada por el coeficiente de variación del recobro, fue $\leq 6.5\%$, lo que se considera bastante satisfactorio. Es de notar que la repetibilidad de resultados para el 2,4-D fue buena ($< 5\%$), a pesar de su baja recuperación.

V.3.2.2. Linealidad del método

La linealidad fue determinada mediante el análisis de muestras de agua grado reactivo fortificadas con los plaguicidas a 5 niveles de concentración en el intervalo de 10 a 400 ng/mL. Para cada nivel se prepararon y analizaron tres réplicas independientes. Todas las muestras fueron preparadas según el procedimiento optimizado de microextracción y posteriormente analizadas por cromatografía de líquidos.

Los resultados promedio de las determinaciones experimentales para cada nivel de concentración se presentan en el Anexo 3 como una relación de *Cantidad Adicionada Vs Cantidad Recuperada*. Los estándares se inyectaron antes y después del análisis de la muestra para tomar en cuenta cualquier variabilidad en la respuesta del detector UV.

En la Tabla V.9 se reportan los parámetros de la ecuación lineal obtenida mediante el tratamiento estadístico de los datos experimentales por el método de mínimos cuadrados.

Tabla V.9. Linealidad del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de 5 plaguicidas clorados en muestras acuosas (n=3).

Analito	Concentración (ng/mL)	Coefficiente de determinación (r²)	Ordenada al origen ± S (µg)	Pendiente ± S
2,4-D	10 - 400	0.9997	0.019 ± 0.012	0.607 ± 0.006
Diclorprop	10 - 400	0.9993	-0.001 ± 0.025	0.802 ± 0.012
2,4,5-T	10 - 400	0.9998	0.000 ± 0.013	0.859 ± 0.006
2,4-DB	10 - 400	0.9992	-0.003 ± 0.078	0.874 ± 0.013
DDT	10 - 400	0.9981	-0.066 ± 0.039	0.779 ± 0.019

De acuerdo con los valores de coeficiente de determinación se puede concluir que el método es lineal para todos los plaguicidas en el intervalo de concentraciones estudiado. El valor de la pendiente indica que la recuperación promedio de los analitos en ese intervalo de concentraciones varía entre 61% y 87% dependiendo del plaguicida. La ordenada al origen es estadísticamente igual a cero en todos los casos, por lo que se puede decir que el método no presenta errores sistemáticos.

V.3.3. Fenoles

V.3.3.1. Recobro y precisión del método

La precisión del método se evaluó con base en el coeficiente de variación obtenido en el análisis de 12 réplicas independientes de agua grado reactivo dopada con los 8 fenoles a 100 ng/mL. En la Figura V.12 se presenta uno de los cromatogramas obtenidos en este estudio.

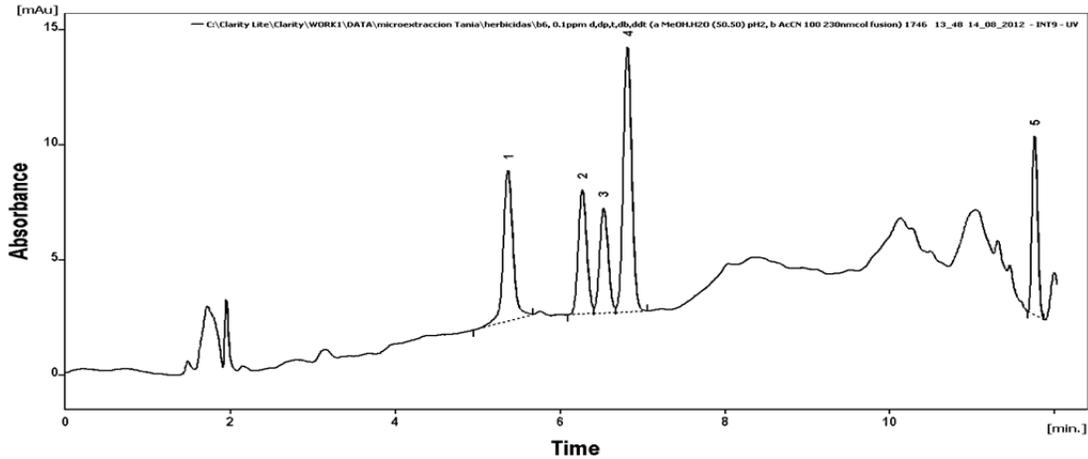


Figura V.12. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de agua grado reactivo dopada con fenoles y tratada mediante la técnica DLLME-SFO. Solutos: 1) F, 2) 2CF, 3) 2,4DMF, 4) 4C3MF, 5) 2,4DCF, 6) 4,6DNC, 7) 2,4,6TCF, 8) PCF. Condiciones cromatográficas como en la Fig. V.3.

Los resultados de recobro promedio y precisión obtenidos para cada compuesto se reportan en la Tabla V.10. Los recobros fueron muy variados debido a la gran diferencia de hidrofobicidad entre los analitos. Los fenoles con Log Kow mayor a 3 tuvieron una recuperación aceptable (> 70%), mientras que los fenoles hidrofílicos con log Kow < 3 tuvieron baja recuperación (< 51%), destacando el propio Fenol (log Kow = 1.46), cuya recuperación sólo llegó a 13%. Sin embargo, se puede notar que, a pesar de la baja recuperación de varios analitos, la precisión del método es satisfactoria, con coeficientes de variación entre 4.1 y 9.9%.

Tabla V.10. Recobro promedio (%R) y precisión (%CV) del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación 8 fenoles en muestras acuosas (n=12).

Analito	Concentración (ng/mL)	R ± S (%)	CV (%)	Log Kow
F	100	13.1 ±0.61	4.64	1.46
2CF	100	38.2 ±1.91	5.01	2.17
2,4DMF	100	50.5 ±2.51	4.97	2.42
4C3MF	100	73.7 ±3.05	4.13	3.1
2,4DCF	100	76.9 ±4.89	6.36	3.12
4,6DNC	100	37.6 ±2.45	6.53	2.13
2,4,6TCF	100	86.2 ±4.13	4.79	3.38
PCF	100	81.8 ±8.09	9.88	5.01

V.3.3.2. Linealidad del método

La linealidad del método para fenoles se determinó mediante el análisis de muestras de agua grado reactivo fortificadas con los 8 fenoles a 5 niveles de concentración en el intervalo de 15-150 ng/mL. En el Anexo 4 se presentan las gráficas de *Cantidad Recuperada Vs Cantidad Adicionada*. En la Tabla V.11 se reportan los parámetros de la ecuación de regresión obtenida mediante el análisis estadístico de los datos experimentales, aplicando el método de mínimos cuadrados.

Tabla V.11. Linealidad del método DLLME-SFO – CLAR/UV para la determinación de 8 fenoles en muestras acuosas (n=3).

Analito	Intervalo de concentración (ng/mL)	Coefficiente de determinación (r^2)	Ordenada al origen \pm S (μ g)	Pendiente \pm S
F	15 - 150	0.9983	0.003 \pm 0.002	0.146 \pm 0.003
2CF	15 - 150	0.9938	-0.009 \pm 0.011	0.302 \pm 0.013
2,4DMF	15 - 150	0.9998	-0.012 \pm 0.003	0.495 \pm 0.003
4C3MF	15 - 150	0.9973	0.011 \pm 0.018	0.754 \pm 0.022
2,4DCF	15 - 150	0.9994	-0.006 \pm 0.009	0.824 \pm 0.010
4,6DNOC	15 - 150	0.9964	-0.003 \pm 0.012	0.411 \pm 0.014
2,4,6TCF	15 - 150	0.9993	0.002 \pm 0.010	0.861 \pm 0.013
PCF	15 - 150	0.9995	0.012 \pm 0.008	0.844 \pm 0.010

Los coeficientes de determinación mostrados en la Tabla V.11 corroboran que existe una relación lineal entre la cantidad de soluto recuperada y la cantidad adicionada a la muestra acuosa. La relación lineal se cumple incluso para los compuestos que tienen muy baja recuperación como el Fenol. La ordenada al origen es estadísticamente igual a cero por lo que se considera que el método no presenta errores sistemáticos. Por su parte, la pendiente confirma los bajos valores de recuperación para los fenoles hidrofílicos como fueron FI, 2-CF y 4,6-DNOC. La recuperación promedio en el intervalo de concentraciones estudiado es similar a la obtenida en el ensayo de repetitividad.

V.3.4 Sulfanolidas.

En la Figura V.13 se comparan los cromatogramas obtenidos por inyección directa de una mezcla estándar de las 6 sulfonamidas (10 mg/L, cada una) y por inyección del extracto obtenido después de realizar la DLLME-SFO en una muestra dopada con las mismas sulfas a 1 mg/L cada una. Puesto que el factor de enriquecimiento en la técnica desarrollada es de 10, el cromatograma de la muestra debería tener picos similares a los del estándar si la recuperación fuera cuantitativa. Como muestra el cromatograma del extracto, las recuperaciones fueron sumamente bajas para todos los solutos. Esto se atribuye a que las sulfas son compuestos muy polares, con una gran afinidad por el agua y baja afinidad por el dodecanol, razón por la cual no se logran extraer.

Las sulfas presentan dos valores de pKa; en medio muy ácido ($\text{pH} < 2$, aproximadamente), se encuentran en forma catiónica por protonación de su grupo amino, mientras que en medios neutros y alcalinos ($\text{pH} > 6$, aproximadamente), se encuentran en forma aniónica por desprotonación del grupo sulfamida. Por ello, se realizaron ensayos de microextracción fijando el pH de la muestra acuosa a diferentes valores en el intervalo de pH 2-6, en el cual predomina la forma neutra. Sin embargo, no se lograron obtener recuperaciones aceptables en estos ensayos para ninguna sulfa. En el grupo de sulfas estudiado, la sulfadimetoxina es la menos polar por lo que se esperaba un mejor comportamiento de este soluto durante la microextracción. Contrariamente a lo esperado, su recuperación fue nula. Por experimentos independientes se pudo constatar que la sulfadimetoxina presenta algún tipo de interacción particular con el dodecanol, lo que ocasiona un comportamiento anómalo en la columna de carbón grafitizado cuando la solución inyectada contiene dodecanol. En la Figura V.14 se presenta el cromatograma obtenido al inyectar el estándar de sulfas (en metanol) después de haberle añadido unos microlitros de dodecanol. Como puede observarse, el pico de sulfadimetoxina desaparece y se generan otras señales, a tiempos de retención menores, que podrían ser debidas a una elución parcial y fragmentada de esta sulfa asociada al dodecanol. Esto muestra que, además de la hidrofobicidad,

también es necesario considerar los efectos de posibles interacciones soluto-extractante que inciden en el comportamiento cromatográfico de los analitos de interés.

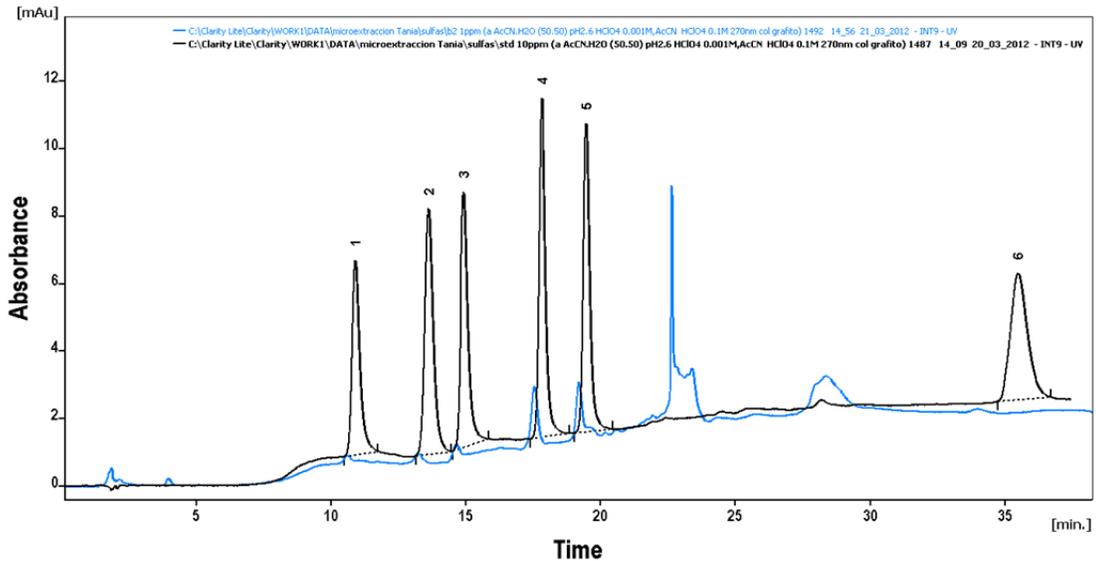


Figura V.13. Cromatogramas obtenidos por inyección directa de un estándar de sulfanilamidas en metanol (superior) y por análisis de una muestra de agua grado reactivo dopada con las 6 sulfas y tratada mediante la técnica DLLME-SFO (inferior). Solutos: 1) STZ, 2) SDZ, 3) SMR, 4) SMX, 5) SFX, 6) SDX. Condiciones cromatográficas como en la Fig. V.4.

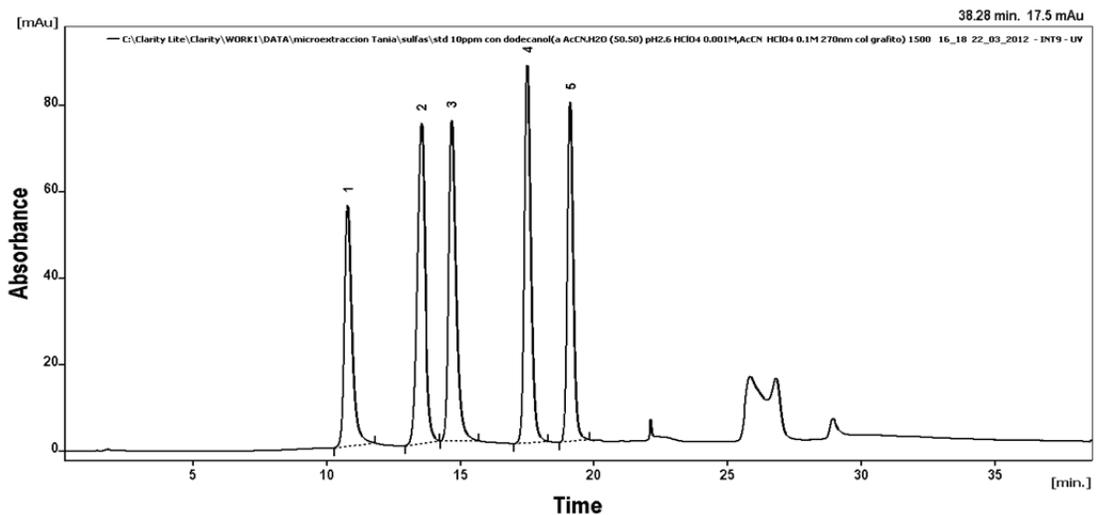


Figura V.14. Cromatograma obtenido al inyectar un estándar de sulfas en metanol adicionado con dodecanol. Solutos: 1) STZ, 2) SDZ, 3) SMR, 4) SMX, 5) SFX.

V.4. Aplicación del método analítico en muestras de agua residual y tratada

Se colectaron dos muestras de agua de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ciudad Universitaria; una de ellas corresponde al agua residual antes de ser tratada (influentes) y la segunda es una muestra del agua ya tratada (efluentes). En la Tabla V.12 se presentan algunas características de estas muestras.

Tabla V.12. Características físicas de las muestras de agua colectadas en la planta de tratamiento de CU.

Característica	Influentes	Efluentes
Color	Amarilla	Amarilla clara
Olor	Fétido	Ligero
Sólidos	Partículas suspendidas abundantes	Pocos sólidos
pH	8.23	5.25
Turbidez	Muy turbia	Transparente

Las dos muestras se filtraron para eliminar sólidos suspendidos, primero, a través de papel filtro de poro grueso y finalmente por membranas de poro fino (0.45 μm de diámetro), utilizando vacío. Al terminar este tratamiento, ambas muestras quedaron completamente transparentes.

Se tomaron alícuotas de 10 mL de cada muestra y se analizaron por el método DLLME-SFO-CLAR/UV desarrollado, aplicando las condiciones cromatográficas establecidas para hidrocarburos poliaromáticos. Se eligió esta familia debido a que los HAP son contaminantes ubicuos que pueden encontrarse en muy diversas muestras. En la Figura V.15 se muestran los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras de influentes y efluentes de la planta de CU, así como un blanco de agua grado reactivo sometido al mismo tratamiento. Como puede observarse, los cromatogramas de las muestras reales son bastante limpios y muestran pocas señales, incluso en el caso del agua residual no tratada. De hecho, se puede decir que el pico de matriz que eluye al inicio del cromatograma es bastante moderado y estrecho. Generalmente, en el análisis de contaminantes en aguas naturales con gran carga de materia orgánica (como los influentes), suele observarse un gran

pico de matriz al inicio del cromatograma, el cual desciende muy lentamente a la línea base provocando serias interferencias en la cuantificación de los analitos menos retenidos. Esto señala una ventaja más de la técnica DLLME-SFO, ya que aparentemente el extractante utilizado no tiene gran afinidad por la materia orgánica causante del pico de matriz (probablemente ácidos húmicos).

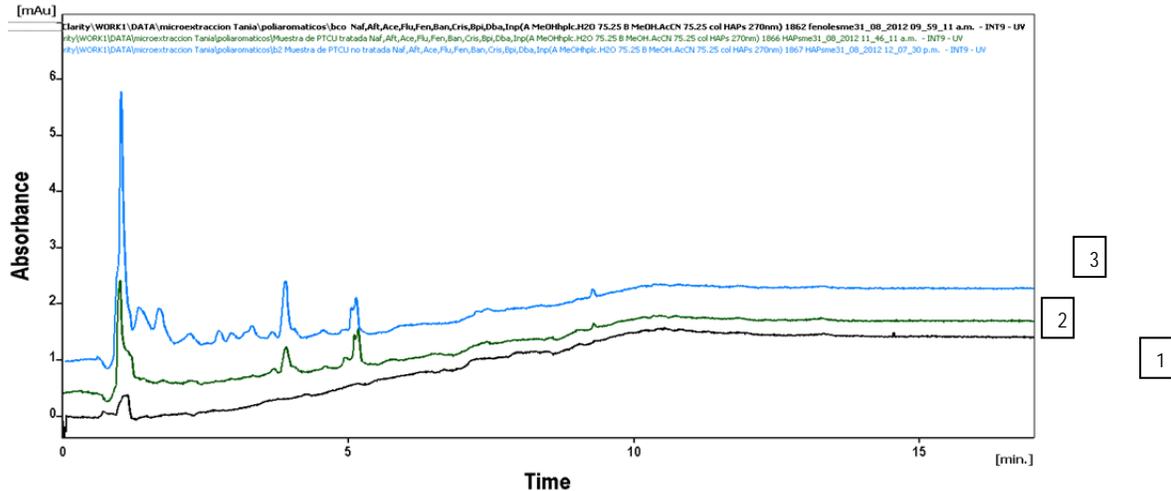


Figura V.15. Cromatogramas obtenidos del análisis de muestras provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU, aplicando el método DLLME-SFO–CLAR/UV desarrollado para HAP. 1) blanco agua grado reactivo, 2) muestra de agua tratada (efluentes), 3) muestra de agua sin tratar (influentes).

En los cromatogramas de la Figura V.15 se observa, tanto para los influentes como para los efluentes, una señal que eluye a un tiempo de retención muy cercano al del acenafteno (~4 min). Para verificar si este compuesto estaba presente en el agua residual, se decidió reanalizar la muestra de influentes después de fortificarla con los 10 HAP (concentraciones en el intervalo de 5 a 100 ng/mL, dependiendo del analito). En la Figura V.16 se presentan los cromatogramas de la muestra de influentes dopada y sin dopar, los cuales permiten afirmar que la señal observada no es debida al acenafteno. De hecho, la comparación de estos cromatogramas indica que ninguno de los 10 HAP está presente, a concentraciones detectables, en la muestra de influentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU.

Con el objeto de verificar la confiabilidad de los datos que se obtienen al aplicar la técnica desarrollada en muestras complejas, como el agua residual no tratada, se analizaron varias réplicas de la muestra de influentes fortificada con los 10 HAP. En la Tabla V.13 se reportan los resultados de estos análisis.

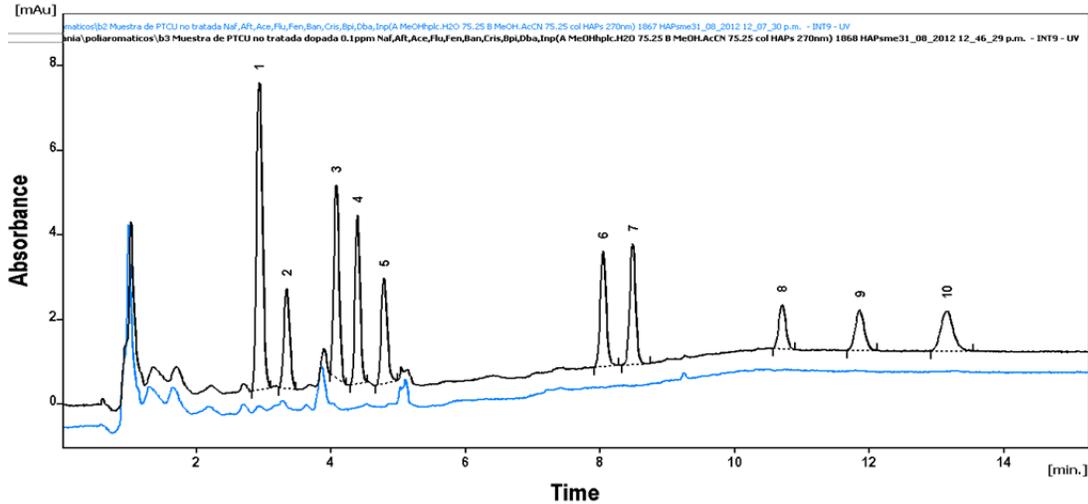


Figura V.16. Cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra de influentes de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU (inferior) y la misma muestra fortificada con 10 HAP (superior). Solutos: 1) NAF, 2) ACI, 3) ACE, 4) FLU, 5) FEN, 6) BaA, 7) CRIS, 8) BaP, 9) DBahA, 10) IcdP.

Tabla V.13. Recobros obtenidos en el análisis de una muestra de agua residual fortificada con 10 HAP (n=6).

HAPs	Concentración ng/mL	Recobro ± S (%)	C.V (%)
NAF	100	87.0 ± 2.3	2.7
AFT	100	90.5 ± 1.9	2.1
ACE	100	86.1 ± 1.6	1.8
FLU	20	92.2 ± 2.8	3.1
FEN	20	95.6 ± 3.2	3.3
BaA	10	87.2 ± 0.8	0.98
CRIS	5	89.1 ± 1.6	1.8
BaP	10	81.6 ± 2.3	2.8
DBahA	10	74.1 ± 3.7	5.0
IcdP	20	80.9 ± 1.9	2.4

Los recobros obtenidos de los HAPs en la muestra de agua residual fortificada fueron similares a los obtenidos con las muestras de agua grado reactivo fortificada (ver Tabla V.6), lo que avala la efectividad y confiabilidad del método DLLME-SFO-CLAR/UV para el análisis de contaminantes en muestras reales.

VI. CONCLUSIONES

- Se logró implementar y optimizar la técnica de microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica (DLLME-SFO), utilizando como extractante al 1-dodecanol. El protocolo desarrollado para la extracción y purificación de compuestos orgánicos a partir de matrices acuosas es sencillo, rápido, versátil, económico y ambientalmente amigable, ya que el consumo de disolventes orgánicos es mínimo.
- Los resultados obtenidos en la extracción de 10 hidrocarburos aromáticos policíclicos, de la lista de contaminantes prioritarios de la EPA, demuestran la capacidad de la técnica para extraer eficientemente compuestos de hidrofobicidad alta y media en una sola operación. Los recobros satisfactorios y similares para todos los HAP, permitieron corroborar que el problema de pérdida de los analitos más hidrofóbicos, por expulsión del seno de la fase acuosa, es inexistente cuando se utiliza la técnica DLLME-SFO, lo que le confiere una ventaja importante respecto a otros métodos de preparación de muestra, como la extracción en fase sólida.
- También se obtuvieron buenos resultados en la extracción de compuestos más polares como los herbicidas de la familia de ácidos clorofenoxi y los fenoles policlorados, cuya recuperación promedio fue superior al 75%, con excepción del 2,4-D (61%). Para compuestos polares de baja hidrofobicidad ($\text{Log Kow} < 2.5$), como los monoclorofenoles, metilfenoles y nitrofenoles, la recuperación promedio fue considerablemente menor (30-50%), descendiendo hasta un valor francamente bajo para el fenol (14%), que es el compuesto menos hidrofóbico del grupo ($\text{Log Kow} = 1.5$).
- Independientemente de la recuperación, la precisión de la técnica DLLME-SFO, medida por el coeficiente de variación del recobro, fue satisfactoria para las tres familias de compuestos mencionadas. Por lo tanto, este

método de preparación de muestra puede ser aplicado confiablemente para la extracción de una gran variedad de compuestos a partir de medios acuosos, teniendo como limitante una menor sensibilidad en los análisis para los compuestos de baja recuperación.

- Las sulfonamidas no se pueden extraer con esta técnica cuando se utiliza como extractante el dodecanol. Esto es debido a que son compuestos hidrofílicos, cuya afinidad por el agua es muy superior a su afinidad por el dodecanol. Posiblemente con otros extractantes más polares, como los líquidos iónicos, se lograrían mejores resultados.

- La aplicación de la técnica para la extracción de HAP a partir de una muestra real de alta complejidad (agua residual), puso en evidencia su capacidad como medio de purificación de muestras. Aparentemente, el extractante tiene poca afinidad por los ácidos húmicos y otros componentes de la materia orgánica disuelta. Las interferencias de matriz detectadas fueron escasas y muy moderadas, de modo que el recobro de los analitos fue similar al obtenido a partir de muestras de agua grado reactivo fortificadas.

VII. REFERENCIAS

1. Jimenez C.B. La Contaminación Ambiental en México. Causas, Efectos y tecnología apropiada. Limusa. **2005**, pp. 29-50.
2. <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>
3. Salazar L. Evaluación de la toxicidad de hidrocarburos poliaromáticos en un sistema acuático y su aplicación en la ponderación de evidencias. Tesis, IPN, **2008**, pp. 15-20.
4. Ramalho, R.S. Tratamiento de Aguas Residuales. Ed Reverté, Barcelona, **1991**, pp. 5-30.
5. http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.pdf
6. USEPA Method 610 – Polynuclear aromatic hydrocarbons. *Fed.Regist.* 49, No. 209, 112-120.
7. Stecher G. P. The index Merck of Chemicals and Drugs, seventh edition. USA, **1960**.
8. World Health Organization (WHO), International Program on Chemical Safety, Geneva **1998**. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>.
9. Neff J. M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects. Applied Science Publishers LTD, London, **1979**, p. 262
10. Cabrera C.M.J. Identificación y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en sedimentos de cuerpos de agua afectados por la actividad petrolera en la zona de Shushufindi. Tesis, IPN, **2011**, pp. 3-6.
11. Agudo A. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. Instituto Catalán de Oncología, Secretaria de Salud Laboral y Medio Ambiente MCA-UGT, España, **2010**, pp. 16-30.
12. NMX-AA-146-SCFI-2008, Suelos-Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM) o Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detectores de Fluorescencia y Ultravioleta Visible (Uv-Vis)-Método de Prueba. Vigencia D.O.F. **2009**.pp. 26-03.
13. Peña S.M.A. Desarrollo de nuevas metodologías de preparación de muestra para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices medioambientales y alimentarias. Tesis, USC, **2010**, pp. 41-44.
14. Garcia-Falcon M.S., Pérez-Lamela M., Simal-Gandara J. Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 6897-6903.
15. Crozier P.W., Plomley J.B., Matchuk L. Trace level analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters by solid phase extraction (SPE) and gas chromatography-ion trap mass spectrometry (GC-ITMS). *Analyst* **2001**, 126, 1974-1979.
16. Delhomme O., Rieb E., Millet M. Solid-phase extraction and LC with fluorescence detection for analysis of PAHs in rainwater. *Chromatographia* **2007**, 65, 163-171.

17. Kiss G., Varga-Puchony Z., Gelencsér A., Krivácsy Z., Molnár Á., Hlavay J. Survey of concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in Lake Balaton by HPLC with fluorescence detection. *Chromatographia* **1998**, *48*, 149-153.
18. Titato G.M., Lancas F.M. Comparison between different extraction (LLE and SPE) and determination (HPLC and capillary-LC) techniques in the analysis of selected PAHs in water samples. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28*, 3045-3056.
19. Busetti F., Heitz A., Cuomo M., Badoer S., Traverso P. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1102*, 104-115.
20. Ma Y.-G., Cheng J.-P., Jiao F., Duo K.-X., Rong Z., Li M., Wang W.-H. Distribution, sources, and potential risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in drinking water resources from Henan Province in middle of China. *Environ. Monit. Assess.* **2008**, *146*, 127-138.
21. Kanchanamayoon W., Tatrahun N. Extraction of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *J. Environ. Sci. Technol.* **2009**, *2*, 95-99.
22. Martínez E., Gros M., Lacorte S., Barceló D. Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1047*, 181-188.
23. Pitarch E., Medina C., Portolés T., López F.J., Hernández F. Determination of priority organic micro-pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 246-258.
24. Werres F., Balsaa P., Schmidt T.C. Total concentration analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with high suspended particulate matter content. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2235-2240.
25. He Y., Lee H.K. Trace analysis by combined use of off-line solid-phase extraction, on-column sample focusing and U-shape flow cell in capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1998**, *808*, 79-86.
26. Kootstra P.R., Straub M.H.C., Stil G.H., Van der Velde E.G., Hesselink W., Land C.C.J. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. *J. Chromatogr. A* **1995**, *697*, 123-129.
27. Kiss G., Varga-Puchony Z., Hlavay J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1996**, *725*, 261-272.
28. Urbe I., Ruana J. Application of solid-phase extraction discs with a glass fiber matrix to fast determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *J. Chromatogr. A* **1997**, *778*, 337-345.
29. Wolska L., Rawa-Adkonis M., Namieśnik J. Determining PAHs and PCBs in aqueous samples: Finding and evaluating sources of error. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1389-1397.
30. Barrek S., Cren-Olivé C., Wiest L., Baudot R., Arnaudguilhem C., Grenier-Loustalot M.-F. Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC-MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters. *Talanta* **2009**, *79*, 712-722.

31. Matamoros V., Jover E., Bayona J.M. Part-per-trillion determination of pharmaceuticals, pesticides, and related organic contaminants in river water by solid-phase extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 699-706.
32. Marcé R.M., Borrull F. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *J. Chromatogr. A* **2000**, 885, 273-290.
33. USEPA, Method 550.1 – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection. In: Methods for the determination of organic compounds in drinking water – Supplement I (EPA/600/4/90-020).
34. ATSDR, 2002: Hazardous substances emergency events surveillance, annual report 2002. U.S. Department for Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia.
35. Calva L.A. Plaguicidas Organoclorados. UAM.1. pp. 35-36.
36. Bruna G.F. Aplicación de hidrotalcitas como adsorbentes para la reducción de la contaminación por plaguicidas de aguas y suelos. Tesis Universidad de Córdoba, 2010.
37. Pozo O., Pitarch E., Sancho J.V., Hernández F. Determination of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and its main metabolite, 4-chloro-2-methylphenol in water and soil by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2001**, 923, 75-85.
38. Vera-Avila L.E., Meraz-Lira J.L., Padilla-Cortés P. Metodología en línea para la determinación de trazas de los herbicidas 2,4-D y 2,4-DB en agua. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **1997**, 13 (2), 63-71.
39. Rosales C.N. Desarrollos metodológicos en cromatografía líquida capilar y quiral. Aplicación a la determinación de herbicidas fenoxiácido en muestras complejas. Madrid, 2005.
40. Isern M.D. La Química de los Pesticidas y su Metodología Analítica. Argentina, 2002.
41. Instituto de Salud, Ambiente y Trabajo de México, Diagnóstico situacional del uso de DDT y el control de la malaria. Informe Regional para México y Centroamérica
42. Segundo foro de investigación sobre contaminantes orgánicos persistentes en México, 2006.
43. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp35-c4.pdf>.
44. USEPA, Method 508.1. Determination of chlorinated pesticides, herbicides, and organohalides by liquid-solid extraction and electron capture gas chromatography. In: Methods for the determination of organic compounds in drinking water – Supplement III (EPA/600/R-95-131).
45. Pinto M.I., Sontag G., Bernardino R.J., Noronh J.P. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. *Microchemical Journal* **2010**, 96, 225–237
46. http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs107.pdf

47. Hernández, F.L. Oxidación en fase húmeda del 2-Clorofenol con catalizadores CuO/TiO₂-Al₂O₃ para disminuir clorofenoles en aguas residuales. Hidalgo, 2008.
48. Silva V.M. Preconcentración selectiva de fenoles contaminantes prioritarios y determinación por espectrofotometría UV-Vis, CLAR y CG-MS. Madrid, 2000.
49. Ivanciuc T., Ivanciuc O., Klein D.J. Prediction of environmental properties for chlorophenols with Posetic quantitative super-structure/property relationships (QSSPR). *Int. J. Mol. Sci.* **2006**, 7, 358-374.
50. http://www.gsi-net.com/es/publicaciones/gsi-chemical-database/single/230.html?Chem_name=TEST
51. USEPA Method 604 – Phenols. In: Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. 40 CFR, Part 136, Appendix A
52. NMX-AA-050-SCFI-2001. Análisis de agua – Determinación de fenoles totales en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas.
53. Fattahi N., Assad Y., Reza M., Hossein M., Jahromi E.Z. Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography-electron-capture detection. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1157, 23–29.
54. Mahugo Santana C., Torres Padrón M.E., Sosa Ferrera Z., Santana Rodríguez J.J. Development of a solid-phase microextraction method with micellar desorption for the determination of chlorophenols in water samples: Comparison with conventional solid-phase microextraction method. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1140, 13–20.
55. Bahamonde Soria R. Desarrollo de una metodología por EFS-CLAR/UV para la determinación de sulfas a niveles traza en aguas ambientales, Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 2011.
56. Soto C.J. Nuevas aportaciones al análisis de residuos de plaguicidas y antibióticos en aguas y alimentos. 2001, pp. 215-220.
57. Guzmán B.F. Estudio analítico de sulfamidas, compuestos asociados y productos de degradación mediante nuevos métodos de separación. 2001
58. Rao T.N., Sarada B.V., Tryk D.A., Fujishima A. Electroanalytical study of sulfa drugs at diamond electrodes and their determination by HPLC with amperometric detection. *J. Electroanal. Chem.* **2000**, 491, 175–181.
59. Stoob K., Singer H.P., Goetz C.W., Ruff M., Mueller S.R. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1097, 138-147.
60. Shelver W.L., Shappell N.W., Franek M., Rubio F.R. ELISA for sulfonamides and its application for screening in water contamination. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 6609-6615.
61. Montes G.R. Avances en técnicas de microextracción para la determinación de compuestos traza en muestras medioambientales y alimentarias. 2009.
62. Peña S.M. Desarrollo de nuevas tecnologías de preparación de muestras para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices medioambientales alimentarias. 2009.

-
63. Leong M.-I., Huang S.-D. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. *J Chromatogr A* **2008**, *1211*, 8-12.
 64. Xu H., Ding Z., Lv L., Song D., Feng Y.-Q. A novel dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *636*, 28-33.
 65. Farahani H., Yamini Y., Shariati S., Khalili-Zanjani M.R., Mansour-Baghahi S. Development of liquid phase microextraction method based on solidification of floated organic drop for extraction and preconcentration of organochlorine pesticides in water samples. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *626*, 166-173.
 66. Vera-Avila L.E., Padilla C.P., Hernández G.M., Meraz J.L. On-Line preconcentration, cleanup and high-performance liquid chromatographic determination of chlorophenoxy acid herbicides in water. *J. Chromatogr. A* **1996**, *731*, 115-122.
 67. Geerdink R.B., Graumans A.M.B.C., Viveen J. Determination of phenoxyacid herbicides in water. *J. Chromatogr.* **1991**, *547*, 478-483.
 68. Wang H., Yang H., Wang C., Chen F., Ma M., Wang W., Wang X. Analysis of phenolic pollutants in human samples by high performance capillary electrophoresis based on pretreatment of ultrasound-assisted emulsification microextraction and solidification of floating organic droplet. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1253*, 16-21.
 69. Regueiro J., Llompарт M., Garcia-Jares C., Garcia-Monteaгudo J.C., Cela R. Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1190*, 27-38.

ANEXOS

Anexo 1. Ecuaciones y relaciones de Recobro.

1) Ecuación para cálculo de la recuperación en el proceso de microextracción.

La deducción de la ecuación se basa en una relación fundamental de la cromatografía cuantitativa. Para cualquier soluto "c" se cumple que:

$$\frac{A_{std}}{C_{std}} = k = \frac{A_{ext}}{C_{ext}} \quad (E - A 1.1)$$

Donde: A_{std} y A_{ext} son las áreas del pico del soluto "c" en el cromatograma obtenido por inyección de un estándar de referencia y el extracto obtenido de la microextracción respectivamente, C_{std} y C_{ext} son las concentraciones del soluto en el estándar y en el extracto y k es el factor respuesta para ese soluto en las condiciones cromatográficas empleadas (fase estacionaria, fase móvil y parámetros de detección). La concentración de soluto en el extracto esta relacionada con su concentración en la muestra acuosa que fue extraída (C_m) con el volumen de dicha muestra (V_m) y el volumen final del extracto (V_{ext}), así como el factor de recobro $\left(\frac{\%R}{100}\right)$ según:

$$C_{ext} = \frac{C_m V_m}{V_{ext}} \times \frac{\%R}{100} \quad (E - A 1.2)$$

Combinando y reorganizando las ecuaciones E - A 1.1 y E - A 1.2 se obtiene:

$$\%R = \frac{C_{ext} V_{ext}}{C_m V_m} \times 100 = \frac{A_{ext} V_{ext}}{k C_m V_m} \times 100 \quad (E - A 1.4)$$

Y finalmente, sustituyendo k :

$$\%R = \frac{A_{std} C_{std}}{A_{std} C_m \left(\frac{V_m}{V_{ext}} \right)} \times 100 \quad (E A 1.4)$$

2) Relación entre la Curva de calibración y la Curva de recobro

La linealidad de un método se demuestra típicamente por una relación de Área vs Concentración, donde “Área” se refiere al área del pico del analito obtenida al inyectar en el cromatografo la muestra preparada según el método desarrollado (en este caso el extracto final obtenido) y “Concentración” se refiere a la concentración del analito en la muestra original (agua). Si el método es lineal, la gráfica de Área vs Concentración puede ajustarse a la ecuación de la línea recta por el método de mínimos cuadrados y el coeficiente de determinación obtenido del ajuste deberá tener un valor cercano a la unidad (r^2-1). En nuestro caso la ecuación correspondiente sería:

$$A_{std} = a + b C_m \quad (E - A 1.5)$$

Donde: “a” y “b” son la ordenada al origen y la pendiente de la recta. La ordenada al origen deberá ser estadísticamente igual a 0 y la pendiente esta relacionada con el factor de respuesta del analito (k), el factor de concentración de la muestra durante la microextracción $\left(\frac{V_m}{V_{ext}} \right)$ y el factor de recobro del método $\left(\% R/100 \right)$, según lo muestran las ecuaciones E – A 1.1 y E – A 1.2. Por lo tanto, el método es lineal el factor de respuesta del analito es constante (lo que corresponde a la linealidad del sistema) y si el recobro es constante en el intervalo de concentraciones del analito en la muestra estudiada.

Por otra parte se prefiere estudiar la linealidad del método por una relación Cantidad Recuperada vs Cantidad Adicionada donde “Cantidad Recuperada” es la cantidad de analito determinada en la muestra preparada (en este caso, el extracto de volumen V_{ext}) y “Cantidad Adicionada” es la cantidad de analito agregado a un volumen dado de la muestra original (la muestra acuosa de volumen V_m). si el método es lineal, la gráfica de Cantidad Recuperada (Q_{rec}) Vs Cantidad Adicionada (Q_{ad}) puede ajustarse a la ecuación de la línea recta y el coeficiente de determinación obtenido será cercano a la unidad . la ecuación correspondiente será:

$$Q_{rec} = a' + b' Q_{ad} \quad (E - A 1.6)$$

Donde “a’ ” es la ordenada al origen que deberá ser estadísticamente igual a cero y “b’ ” es la pendiente, que es igual al factor de recobro promedio del método en el intervalo de concentraciones del analito en la muestra estudiada. A continuación se demuestra que el estudio de linealidad mediante la gráfica de Q_{recu} vs Q_{ad} es equivalente al que se realiza mediante la gráfica A_{ext} vs C_m .

$$Q_{rec} = C_{ext} V_{ext} \quad (E - A 1.7)$$

$$Q_{ad} = C_m V_m \quad (E - A 1.8)$$

Sustituyendo E – A 1.7 y E – A 1.8 en E – A 1.6, y empleando la relación E – A 1.1 se obtiene:

$$\frac{A_{ext} V_{ext}}{k} = a' + b' C_m V_m \quad (E - A 1.9)$$

Rearreglando términos y considerando que la pendiente “b’ ” es igual al factor del recobro de obtiene:

$$A_{ext} = \frac{a' k}{V_{ext}} + \frac{\%R}{100} x \frac{k V_m}{V_{ext}} x C_m \quad (E - A 1.10)$$

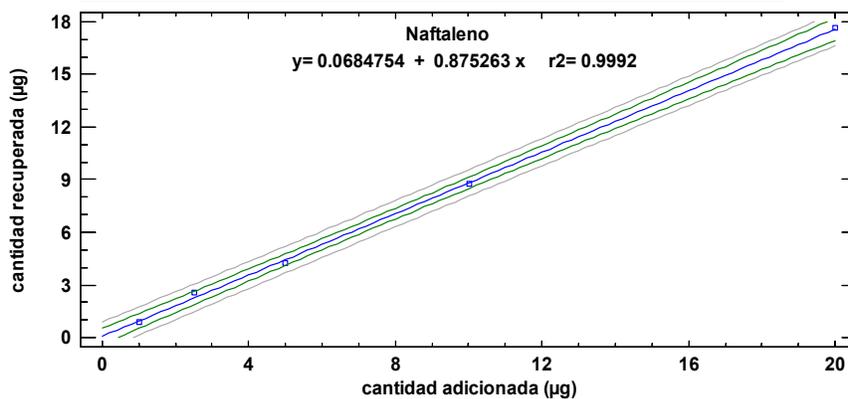
Al comparar esta ecuación con la que se obtiene por el estudio de áreas vs concentración se deduce que:

$$a = \frac{a' k}{V_{ext}} \quad (E - A 1.11)$$

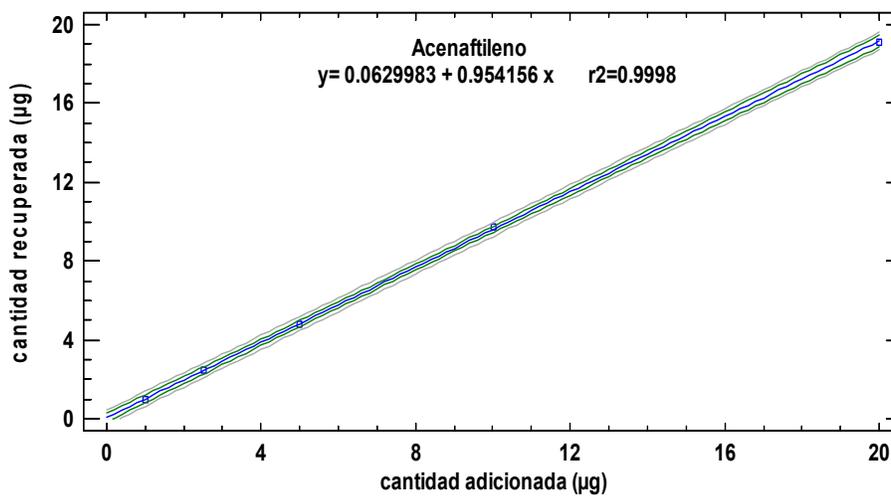
$$b = b' x k \frac{V_m}{V_{ext}} = \frac{\%R}{100} x k x \frac{V_m}{V_{ext}} \quad (E - A 1.12)$$

Anexo 2. Linealidad de HAPs.

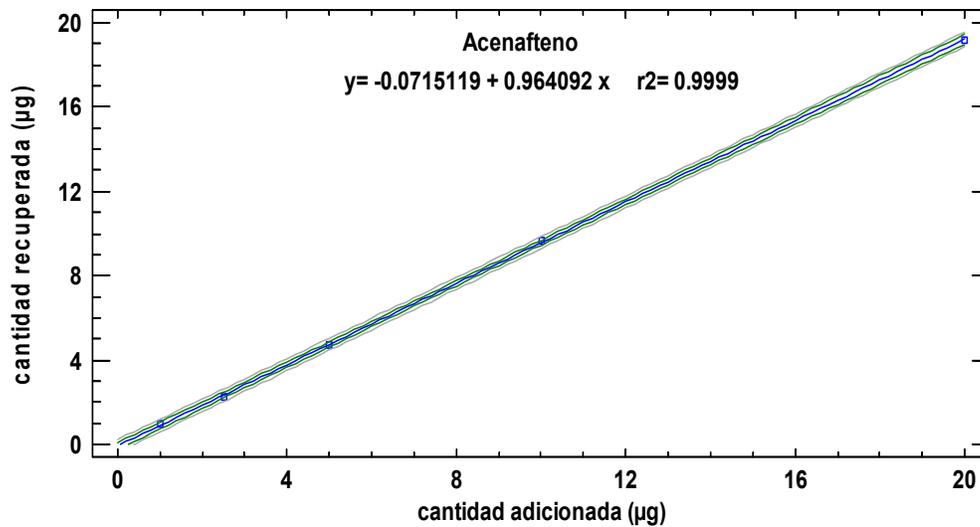
Naftaleno		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.100	1.00	0.87
0.250	2.50	2.55
0.500	5.00	4.25
1.000	10.00	8.74
2.000	20.00	17.63



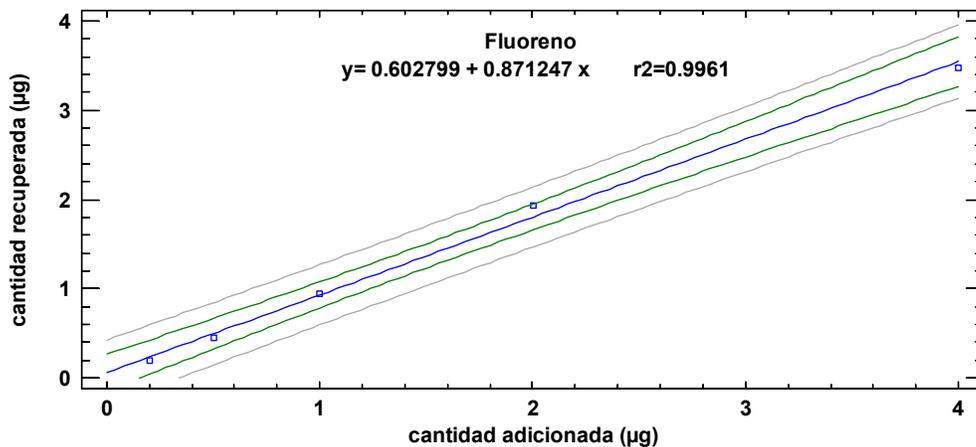
Acenaftileno		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.100	1.00	0.95
0.250	2.50	2.49
0.500	5.00	4.78
1.000	10.00	9.74
2.000	20.00	19.09



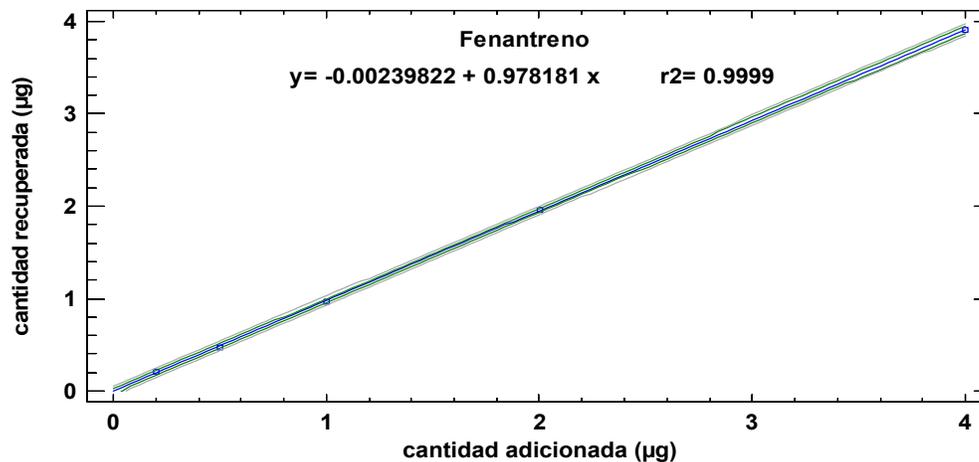
Acenafteno		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.100	1.00	0.96
0.250	2.50	2.27
0.500	5.00	4.69
1.000	10.00	9.65
2.000	20.00	19.19



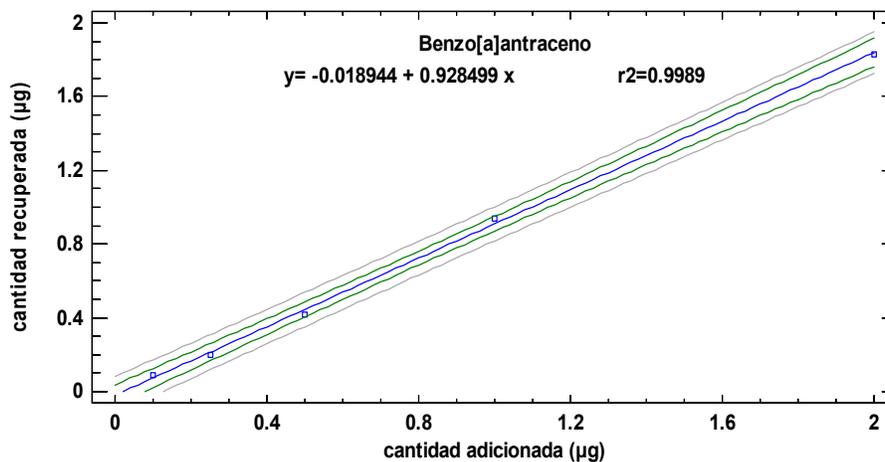
Fluoreno		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.020	0.20	0.19
0.050	0.50	0.45
0.100	1.00	0.95
0.200	2.00	1.94
0.400	4.00	3.48



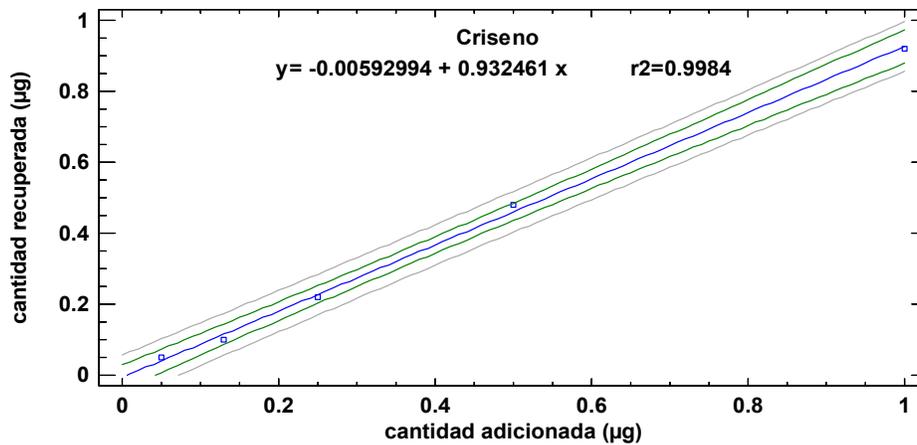
Fenantreno		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.020	0.20	0.21
0.050	0.50	0.47
0.100	1.00	0.97
0.200	2.00	1.96
0.400	4.00	3.91



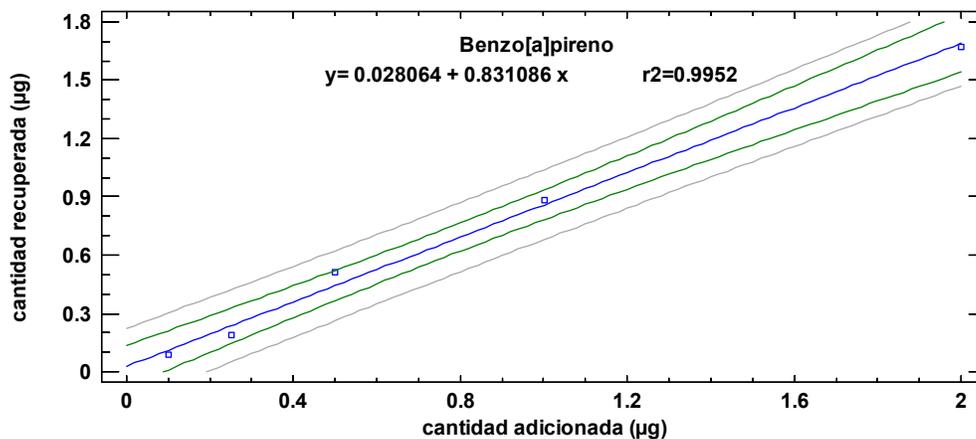
Benzo[a]antraceno		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.010	0.10	0.09
0.025	0.25	0.20
0.050	0.50	0.42
0.100	1.00	0.94
0.200	2.00	1.83



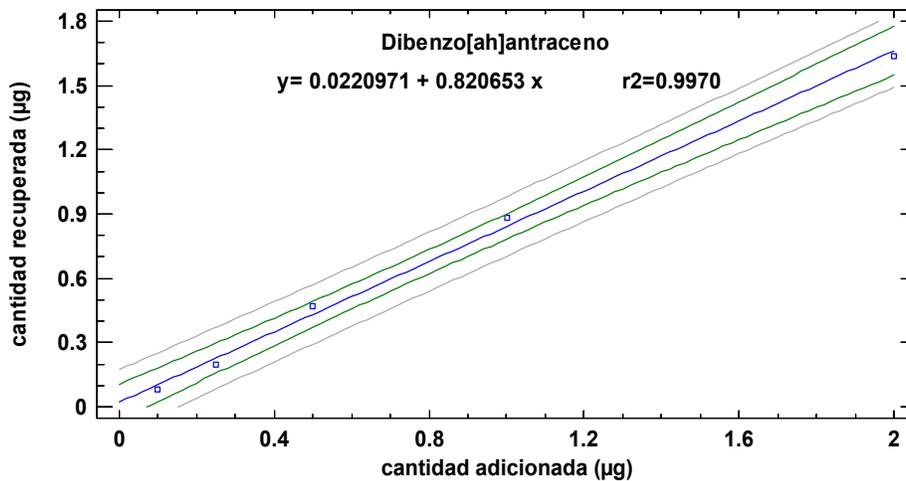
Criseno		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.005	0.05	0.05
0.013	0.13	0.10
0.025	0.25	0.22
0.050	0.50	0.48
0.100	1.00	0.92



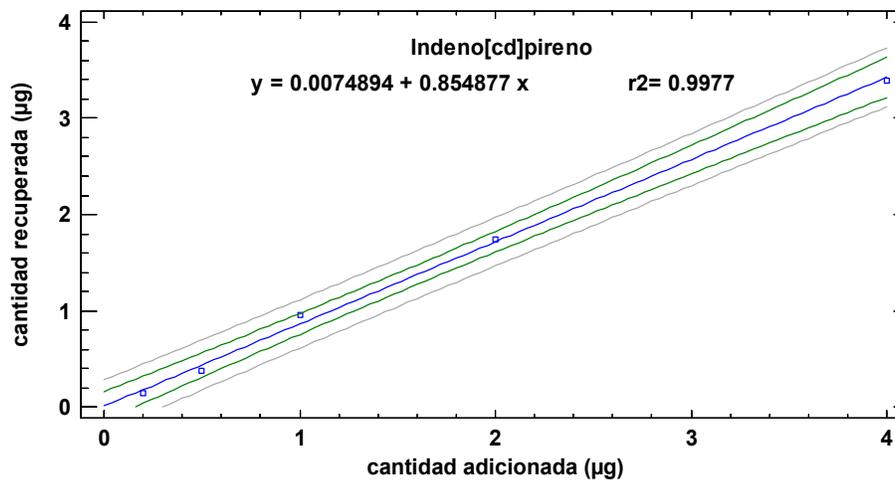
Benzo[a]pireno		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.010	0.10	0.09
0.025	0.25	0.19
0.050	0.50	0.51
0.100	1.00	0.88
0.200	2.00	1.67



Dibenzo[ah]antraceno		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.010	0.10	0.08
0.025	0.25	0.20
0.050	0.50	0.47
0.100	1.00	0.88
0.200	2.00	1.64

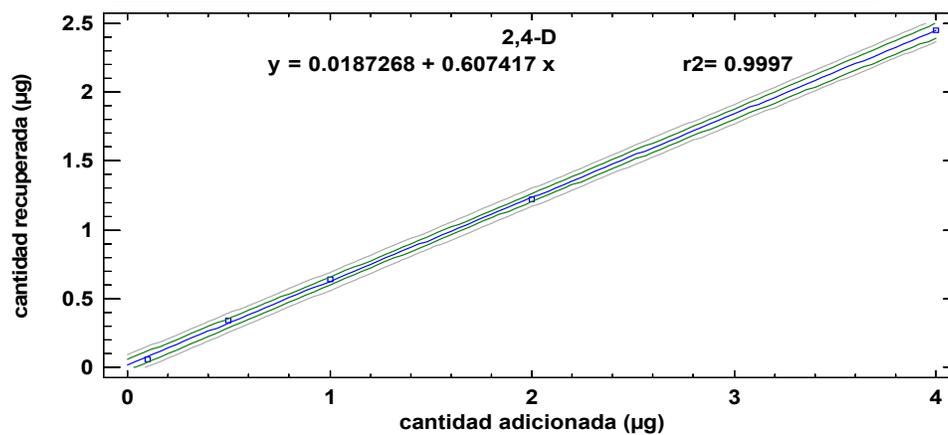


Indeno[cd]pireno		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.020	0.20	0.14
0.050	0.50	0.38
0.100	1.00	0.96
0.200	2.00	1.74
0.400	4.00	3.40

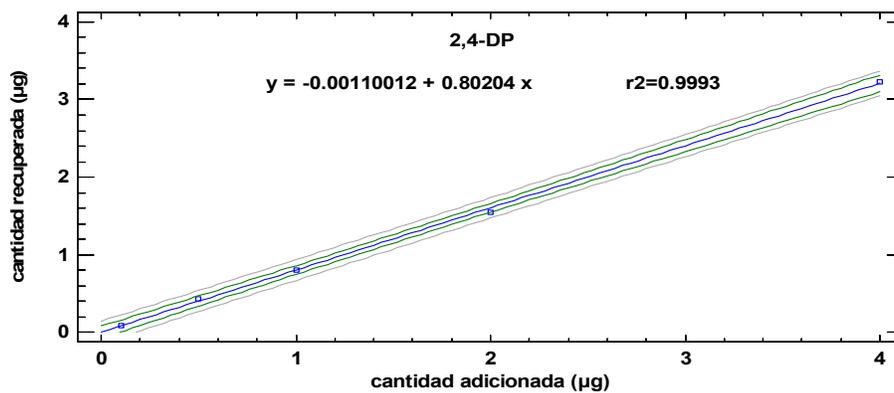


Anexo 3. Linealidad Plaguicidas.

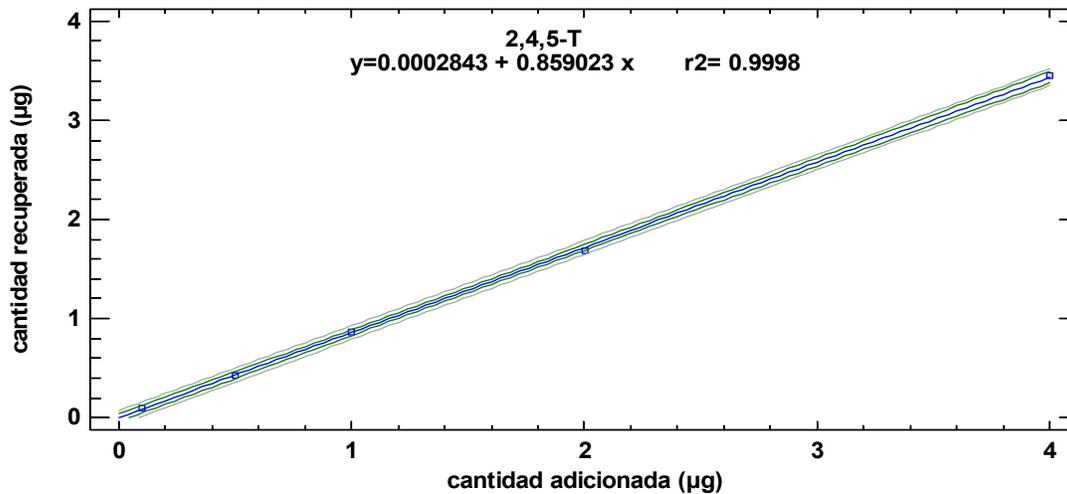
2,4-D		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.010	0.10	0.06
0.050	0.50	0.34
0.100	1.00	0.64
0.200	2.00	1.22
0.400	4.00	2.45



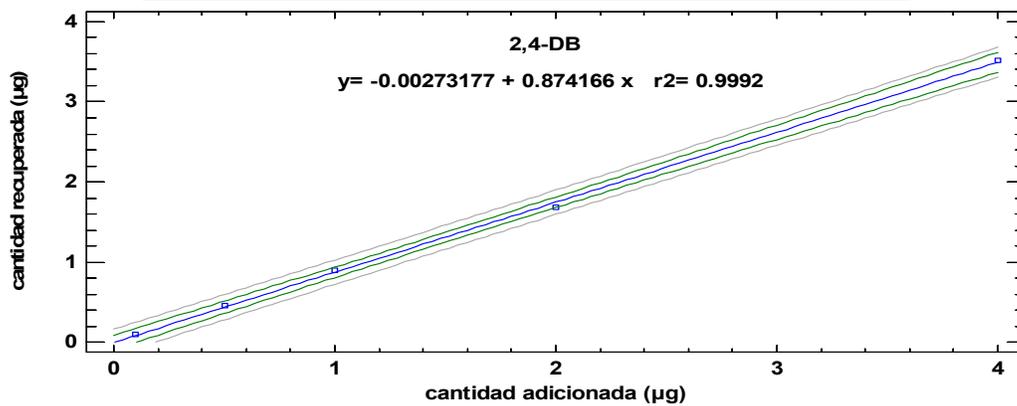
2,4-DP		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.010	0.10	0.08
0.050	0.50	0.43
0.100	1.00	0.80
0.200	2.00	1.55
0.400	4.00	3.23



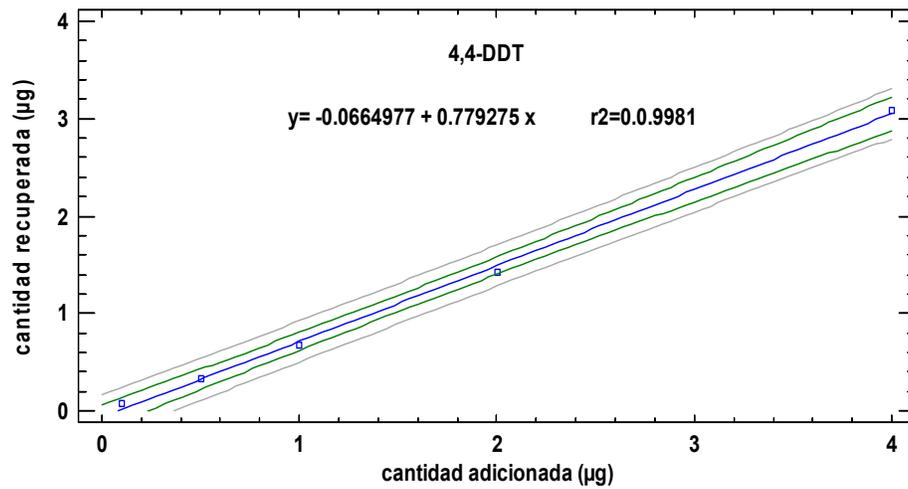
2,4,5 - T		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.010	0.10	0.10
0.050	0.50	0.43
0.100	1.00	0.86
0.200	2.00	1.69
0.400	4.00	3.45



2,4-DB		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.010	0.10	0.09
0.050	0.50	0.45
0.100	1.00	0.89
0.200	2.00	1.68
0.400	4.00	3.52

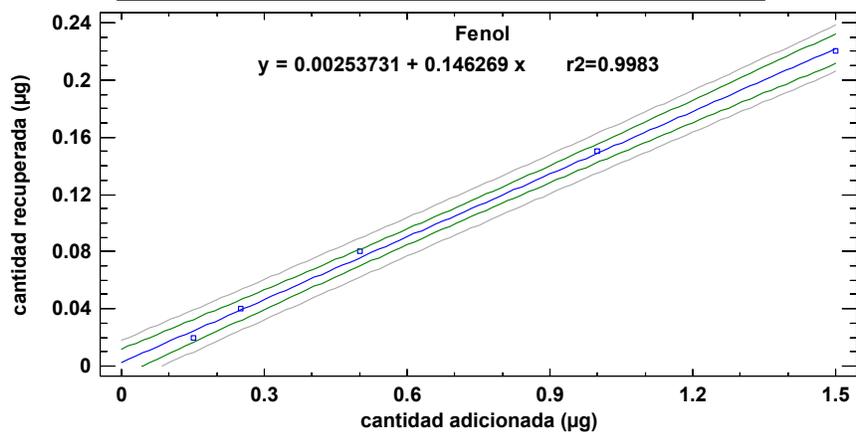


DDT		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.010	0.10	0.07
0.050	0.50	0.33
0.100	1.00	0.67
0.200	2.00	1.43
0.400	4.00	3.09

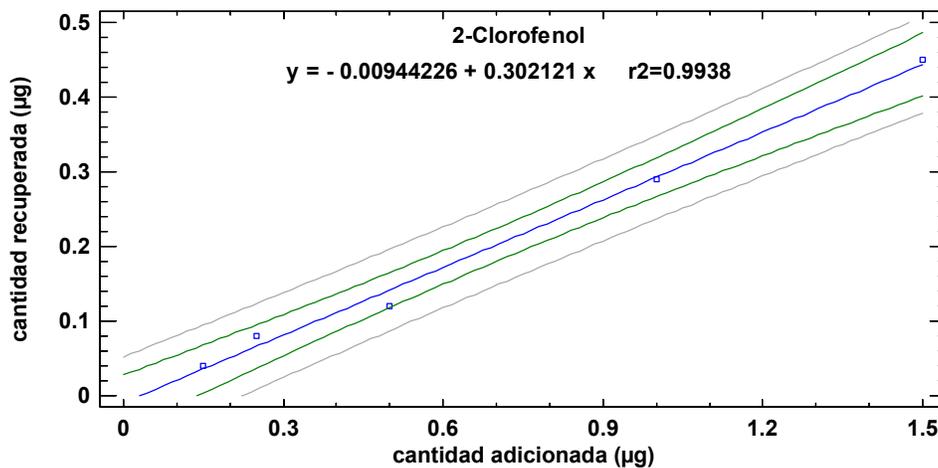


Anexo 4. Linealidad Fenoles.

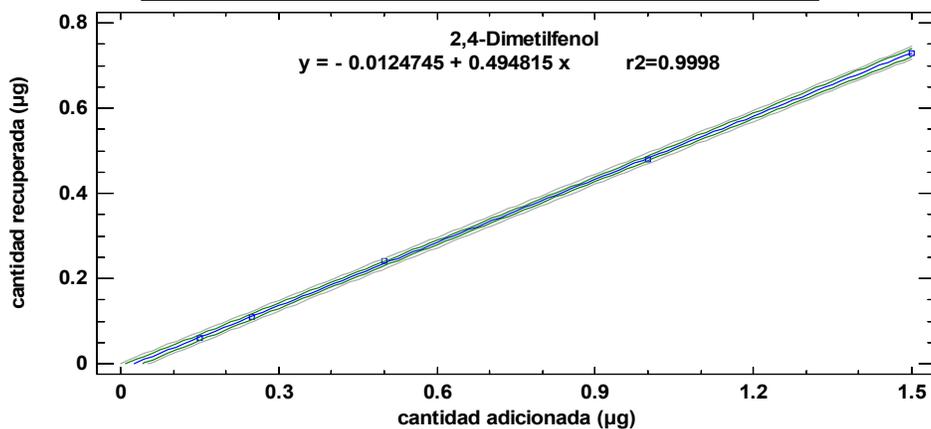
Fenol		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.015	0.15	0.02
0.025	0.25	0.04
0.050	0.50	0.08
0.100	1.00	0.15
0.150	1.50	0.22



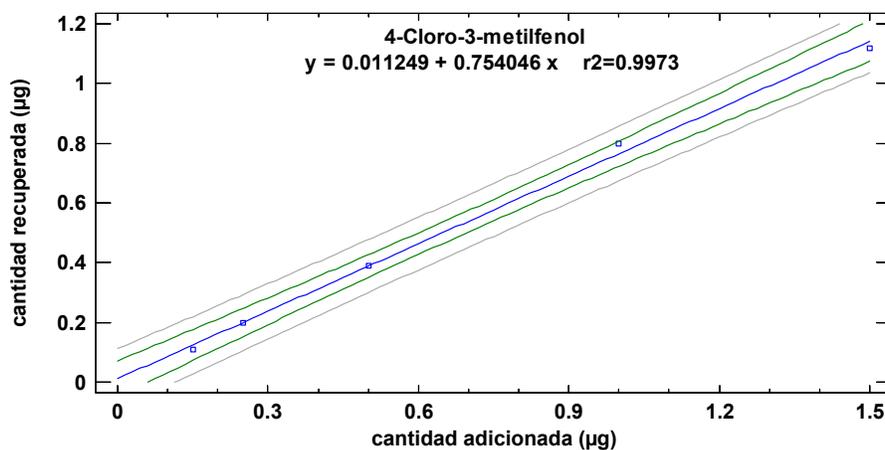
2-clorofenol		
concentración ($\mu\text{g/ml}$)	cantidad adicionada (μg)	Cantidad recuperada (μg)
0.015	0.15	0.04
0.025	0.25	0.08
0.050	0.50	0.12
0.100	1.00	0.29
0.150	1.50	0.45



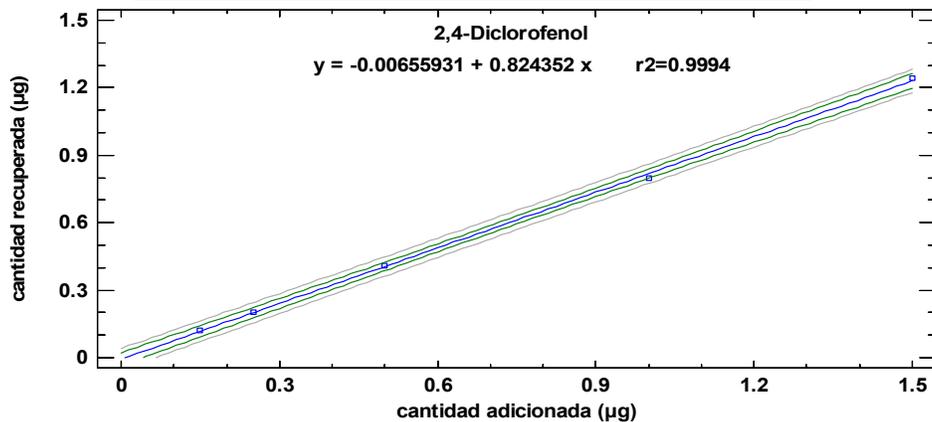
2,4-dimetilfenol		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.015	0.15	0.06
0.025	0.25	0.11
0.050	0.50	0.24
0.100	1.00	0.48
0.150	1.50	0.73



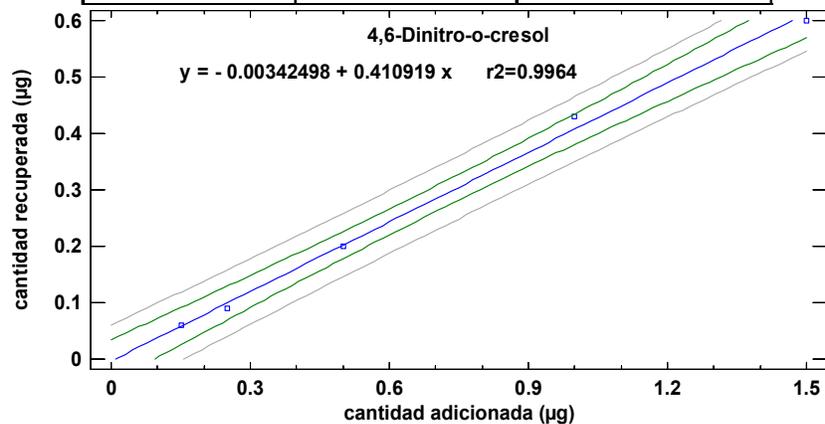
4-cloro-3-metilfenol		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.015	0.15	0.11
0.025	0.25	0.20
0.050	0.50	0.39
0.100	1.00	0.80
0.150	1.50	1.12



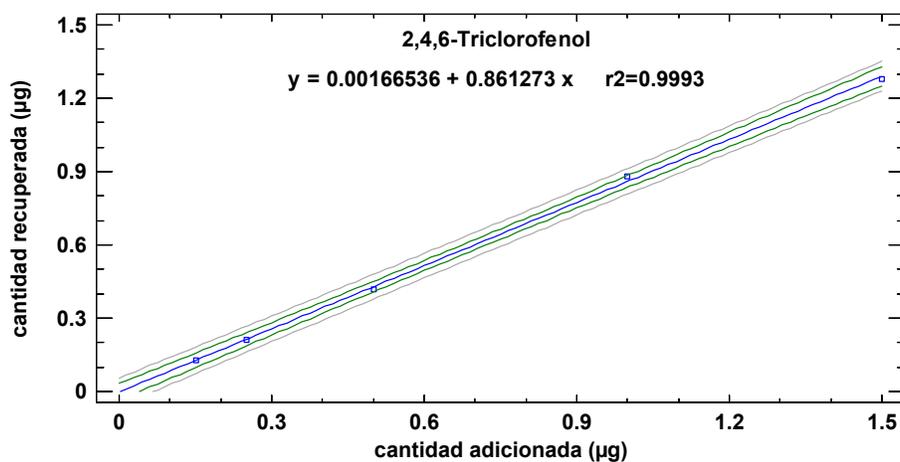
2,4-diclorofenol		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.015	0.15	0.12
0.025	0.25	0.20
0.050	0.50	0.41
0.100	1.00	0.80
0.150	1.50	1.24



4,6-dinitro-o-cresol		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.015	0.15	0.06
0.025	0.25	0.09
0.050	0.50	0.20
0.100	1.00	0.43
0.150	1.50	0.60



2,4,6-triclorofenol		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.015	0.15	0.13
0.025	0.25	0.21
0.050	0.50	0.42
0.100	1.00	0.88
0.150	1.50	1.28



Pentaclorofenol		
concentración (µg/ml)	cantidad adicionada (µg)	Cantidad recuperada (µg)
0.015	0.15	0.13
0.025	0.25	0.23
0.050	0.50	0.43
0.100	1.00	0.87
0.150	1.50	1.27

