

56

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**METODOLOGIA PARA DETERMINAR
HIDROCARBUROS POLIAROMATICOS (HPA'S) EN
MUESTRAS DE SUELO POR CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (CLAR).**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTAN:
DELIA REYNOSO RODRIGUEZ
GREGORIO RUBEN TECUAPETLA CHANTES

ASESORES DE TESIS:
ING. IND. O. MARILU GONZALEZ FERNANDEZ
M. en C. JULIO CESAR BOIELLO POZOS

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO
2000

Handwritten signature or stamp



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Miyares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlan

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Metodología para determinar Hidrocarburos Poli aromáticos (HPA's)
en muestras de suelo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución
(CLAR)

que presenta la pasante: Delia Reynoso Rodríguez
con número de cuenta: 9110774-1 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 8 de Septiembre de 2000

PRESIDENTE M. en C. José Guillermo Penieres Carrillo

VOCAL C.F.B. Elia Granados Enriquez

SECRETARIOM. en C. Julio César Botello Pozos

PRIMER SUPLENTE Dra. Olivia García Mellado

SEGUNDO SUPLENTE Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Metodología para determinar Hidrocarburos Poliaromáticos (HPAs)
en muestras de suelo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución
(CLAR)

que presenta el pasante: Tecuápetla Chantes Gregorio Rubén
con número de cuenta: 9118996-9 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 8 de Septiembre de 2000

PRESIDENTEM. en C. José Guillermo Penieres Carrillo

VOCAL C.F.B Elia Granados Enriquez

SECRETARIOM. en C. Julio César Botello Pozos

PRIMER SUPLENTE Dra. Olivia García Mellado

SEGUNDO SUPLENTE Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

**Metodología para determinar Hidrocarburos
Poliaromáticos (HPA's) en muestras de suelo
por Cromatografía Líquida de Alta Resolución
(CLAR).**

Te doy gracias Señor por darme la oportunidad de terminar una etapa de mi vida, por lo que de mi ser hiciste y por mis sueños logrados.

A mis Padres.

Por otorgarme la vida y por tantos desvelos para guiar mis pasos hacia la felicidad, que con su amor, enseñanza y educación no hubiera podido lograr una de mis grandes metas en la vida.

Que Dios los Bendiga

A mi hermano.

Por su cariño y apoyo.

A Ángeles, Alicia y Alejandro.

Por su apoyo y por ser unas personas excepcionales que me apoyaron durante toda la carrera en los momentos más difíciles.

A Rogelio Galicia.

Por ser un gran amigo a pesar del poco tiempo que convivimos.

A la generación 21 de C:FB. y amigos.
por todos los momentos gratos que hemos pasado.

REYNOSO.

A mis padres porque los amo y siempre estuvieron conmigo.

A Pablo, Laura y Fideal por ser lo mejor que puede existir (mis hermanos).

A Ana y Daniela por regalarme algo tan maravilloso como es el ser Tío.

A mis grandes amigos de la Generación 21º de Q.F.B. por los grandes momentos vividos

IECUAPELTA

AGRADECIMIENTOS:

Deseamos agradecer:

A Ing. Ind. Q. Marilú González Fernández por su gran apoyo para la realización de este trabajo y por su amistad sincera.

Al M. en C. Julio César Botello Pozos por ser una excelente persona así como un gran profesor y por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A nuestro respetable jurado:

M. en C. José Guillermo Penieres Carrillo.
Q.F.B. Elia Granados Enríquez
Dra. Olivia García Mellado
Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

Al Ing. Q. Antonio Badillo García por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Al Tec. Raúl Espinosa y Crespo y Armando Soto por ser unas personas excepcionales que nos enseñaron como llevar con alegría la vida.

A las Tec. Patricia Estrada Ortiz y Lucía Pérez Carrillo por su grata compañía y valiosa ayuda en todo momento.

Agradecemos al Instituto Mexicano del Petróleo por su apoyo y facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS HPA's.	
1.1. GENERALIDADES DE LOS HPA'S.	2
1.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS.	7
1.3. CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS.	13
CAPÍTULO 2. TEORÍA DE LA CROMATOGRAFÍA.	
2.1. GENERALIDADES.	17
2.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ESPECÍFICOS.	18
2.3. ANTECEDENTES DE LA CROMATOGRAFÍA. LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).	20
2.4. PARTES DEL EQUIPO DE CLAR.	20
2.5. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS.	31
CAPÍTULO 3. VALIDACIÓN.	
3.1. ESPECIFICACIONES PARA VALIDAR UN MÉTODO ANALÍTICO.	36
3.2. LINEALIDAD.	36
3.3. PRECISIÓN.	37
3.4. REPRODUCIBILIDAD.	38
3.5. EXACTITUD.	38
3.6. LÍMITE DE DETECCIÓN (L.D).	39
3.6. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.(LC).	39
3.7. ESPECIFICIDAD.	40
3.8. ROBUSTEZ.	40
3.9. ANÁLISIS CUANTITATIVO.	41
CAPÍTULO 4. PARTE EXPERIMENTAL.	45
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	66
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.	108

ANEXOS.	
ANEXO A. ESPECTROS DE ABSORCIÓN.	110
ANEXO B. GRÁFICOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES DE CADA UNO DE LOS HPA's.	117
ANEXO C. GRÁFICOS PARA LA EXACTITUD DEL MÉTODO.	127
ANEXO D. FORMULARIO EMPLEADO PARA LA VALIDACIÓN.	136
REFERENCIAS.	141

INTRODUCCIÓN.

En México, grandes empresas públicas y particulares se han percatado de la importancia de proteger el medio ambiente, y se han dado a la tarea de reducir al mínimo la producción de contaminantes.

Dada la importancia, de tener un mayor control sobre estos contaminantes que se arrojan cada día a nuestro entorno, la Unión Europea, desde 1976, al igual que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, USEPA en inglés) ha enlistado sustancias peligrosas las cuales deben de ser estrictamente monitoreadas. Algunas de estas sustancias son los Hidrocarburos Poliaromáticos (HPA's), los cuales son uno de los principales contaminantes del medio ambiente, debido a que se presentan en procesos de combustión incompleta de combustibles sólidos y líquidos tales como carbón, madera, keroseno y combustibles fósiles. En estos contextos también nos menciona que la identificación y cuantificación de los HPA's en el medio ambiente, son esenciales. Encontrando que uno de los métodos analíticos más adecuados para el estudio de HPA's es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), en combinación con detectores de fluorescencia y UV, siendo éstos los ideales para el análisis de HPA's, acorde a la United States Environmental Protection Agency (USEPA).¹

Esto se debe a que algunos de estos compuestos han presentado propiedades cancerígenas; necesitando de un monitoreo ambiental especial en aire, agua y suelo, debido a la complejidad de la matriz en la que se encuentran estos analitos, es fundamental el contar con técnicas para la preparación de este tipo de muestras que nos permitan el desarrollo de métodos analíticos y la determinación de estas sustancias, teniendo como principal objetivo proteger y preservar la ecología y por lo tanto la salud humana.²

Este trabajo se realizó en el Instituto Mexicano del Petróleo en colaboración del Laboratorio de Cromatografía de gases y la sección de analítica de la FES Cuautitlán con el propósito obtener un método analítico para la determinación de estos compuestos en muestras de suelo provenientes de Villahermosa Tabasco.

OBJETIVO GENERAL.

- Desarrollar y validar un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para la identificación y cuantificación de Hidrocarburos Poliaromáticos (HPA's) en muestras de suelo.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar las condiciones de extracción y preparación de las muestras de suelo con una posible contaminación poliaromática.
 - Seleccionar las condiciones adecuadas para la obtención de un método por CLAR que permita la identificación y cuantificación de HPA's en muestras de suelo.
 - Realizar la validación del método cromatográfico por CLAR para la identificación y cuantificación de HPA's.
 - Poner a prueba el método analítico desarrollado contra muestras reales provenientes de Villahermosa Tabasco para determinar su eficiencia
-

C
A
P
Í
T
U
L
O
I

CARACTERÍSTICAS
QUÍMICAS, FÍSICAS Y
TOXICOLÓGICAS DE LOS
HPA'S

2.1 GENERALIDADES DE LOS PHA's.

Los HPA's son las siglas para nombrar a los hidrocarburos poliaromáticos (se usa también el término de polinucleares); éstos son considerados como uno de los principales contaminantes del medio ambiente, ya que pueden depositarse en la atmósfera, medios acuosos, suelos, etc. Las partículas que adsorben a los HPA's pueden permanecer en la atmósfera por mucho tiempo (del orden de semanas), depositándose en ríos por procesos de precipitación, lo cual, facilita su distribución en la superficie del agua, provocando su contaminación.³

Los HPA's son el producto de un proceso de combustión incompleta de combustibles sólidos y líquidos, tales como carbón, madera, keroseno y combustible en aceite, los cuales se condensan y adsorben rápidamente sobre las partículas que presentan un diámetro en micrómetros preferentemente. Por lo general, los compuestos más volátiles se mantienen por mayor tiempo en su fase gaseosa, pero su distribución en el medio ambiente en esta fase es muy sensible a los cambios de temperatura, lo cual sugiere que la porción de la concentración en la fase gaseosa disminuye notablemente en invierno.⁴

Éstos son una familia de hidrocarburos aromáticos compuesta de estructuras benzenoides policíclicas, es decir, de compuestos que constan de dos o más anillos de benceno que están unidos por un extremo común (un enlace C-C). Tales anillos, reciben el nombre de sistemas de anillos fusionados. Se dice que el benceno y los compuestos relacionados con él son aromáticos o por lo menos, contienen un carácter aromático. En su forma más simple, la deslocalización de los electrones en el benceno es una cualidad que a menudo se conoce como aromaticidad.⁵

La aromaticidad no se limita al benceno, sino que generalmente se le asocia con ciertas moléculas que presentan cuatro características comunes:⁵

- Son estructuras cíclicas que contienen cierto número de enlaces π .
- Son estructuras planas.
- Cada átomo en el anillo debe de tener hibridación sp_2 .
- Puede ocurrir deslocalización de electrones π .

Tres aspectos señalan que una molécula puede poseer carácter aromático:⁵

- Estabilidad poco común, según lo muestra la falta de reactividad hacia reactivos que normalmente reaccionan con sus análogos monocíclicos.
 - Medidas termoquímicas de energía de deslocalización mediante calores de hidrogenación o de combustión, los cuales indican una molécula de mayor estabilidad de lo que se podría predecir con base en modelos monocíclicos.
 - El uso de medidas físicas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN); es particularmente útil en el caso de iones orgánicos.
-

Los cálculos del orbital molecular teórico (presentados por Hückel en 1931) predijeron que las moléculas monocíclicas que contienen nubes cíclicas de electrones π deslocalizados muestran un carácter aromático cuando hay $(4n+2)$ electrones en la molécula en la que n es cualquier entero. Los compuestos cíclicos que tienen 2, 6, 10, 14, ..., $(4n+2)$ electrones π deslocalizados son aromáticos. Los que tienen 4, 8, 12, 16, ..., $(4n)$ electrones π deslocalizados no son aromáticos y reciben el nombre de antiaromáticos debido a su alto grado de inestabilidad.⁵

De acuerdo a lo anterior los HPA's se clasifican como aromáticos porque se comportan como tales. Es decir, son resistentes a la oxidación, a la reducción y a cualquier otro tipo de reacción de adición. En general, son más estables de lo que se podría predecir con base en modelos alifáticos (por ejemplo, el ciclohexano). Sin embargo, son menos resistentes que el benceno a las reacciones enunciadas antes. Por ejemplo, la reacción del antraceno o fenantreno con ácido crómico da lugar a la oxidación y formación de las respectivas dicetonas (9,10-quinonas) que son cíclicas y conjugadas. Aquí, la reacción no produce la destrucción completa de la naturaleza aromática y del material inicial. Por otra parte, el benceno no reacciona en estas condiciones.⁵

La reacción principal de los HPA's es la sustitución electrofílica aromática. Los calores de hidrogenación, los de combustión y la resonancia magnética nuclear (RMN) indican que estos compuestos son realmente aromáticos. Esto no es de sorprender, ya que estos compuestos son cíclicos, contienen $(4n+2)$ electrones, son planos, cada carbono tiene hibridación sp_2 . También es posible la deslocalización de los electrones a través de todo el sistema cíclico.⁶

Las principales fuentes de hidrocarburos aromáticos policíclicos son el alquitrán de hulla y los productos derivados del cracking catalítico de destilados del petróleo, pueden obtenerse también por hidrogenación de la hulla. Del alquitrán de hulla se han aislado otros muchos hidrocarburos, como el criseno, benzo[a]antraceno y pireno, pero su recuperación comercial no resulta práctica. Otras fuentes que pueden producir HPA's son las siguientes:

- Diesel y gasolina automotriz.
 - Estaciones de servicio, hornos de coque y plantas que producen alquitrán.
 - Calentadores.
 - Desechos peligrosos municipales y de hospitales.
 - Humo de cigarro, estufa de madera, keroseno y calentadores de aceite.
 - Cracking del petróleo, fundidores de acero, aluminio y metales, la manufactura y producción de carbón negro.⁶
-

Los métodos de laboratorio para producir HPA's son más o menos específicos para los diferentes compuestos. En general, partiendo de compuestos que contienen un número más pequeño de anillos se producen estructuras condensadas por el cierre de cadenas laterales o la condensación de dos o más estructuras. Con frecuencia el producto inicial es una quinona, que es reducida después y convertida en el hidrocarburo correspondiente.⁷

Con la industrialización de Europa en el siglo pasado, se descubrió que los trabajadores del carbón y los deshollinadores de chimeneas desarrollaban cáncer en la piel. Se estima que más del 50% de los casos de cáncer en humanos es producido por sustancias carcinogénicas que se encuentran en el medio ambiente. De hecho, se ha sugerido que el cáncer es primordialmente una enfermedad ambiental. Así como el drenaje de pantanos y la eliminación de mosquitos pueden utilizarse para controlar la malaria y la fiebre amarilla, la eliminación de carcinógenos del ambiente podría reducir drásticamente la incidencia de este mal.⁸

Normalmente los HPA's pueden presentar una ligera toxicidad en el humano pero éste tiene efectos patogénicos. Gracias a la epidemiología se ha podido notar el incremento en los cambios de pulmón, hígado, vesícula y carcinomas gastrointestinales causados por HPA's.⁹

Los HPA's provocan un gran efecto en la reproducción celular causando una aceleración en este proceso, como es en las células de médula, piel y células de pulmón. Otros efectos de la exposición continua incluyen irritación y fotosensibilidad de los ojos, tos, bronquitis y cáncer de riñón, además de que estudios realizados han confirmado que los HPA's pueden atravesar la placenta y traer problemas al feto. Ello puede decrecer la actividad del ovocito, la cual puede causar infertilidad, así como también algunas veces se ha detectado en la leche materna.⁹

Cuando una sustancia extraña penetra en un organismo, éste trata de eliminarla. Si el intruso es de baja solubilidad en agua, dicha eliminación generalmente adopta la forma de una conversión más hidrosoluble que se excreta sin dificultad. Parece haberse establecido que los hidrocarburos polinucleares son convertidos en epóxidos en los que necesariamente ha sido destruida la aromaticidad de uno de los anillos. (Por ejemplo: fig. 1.1). Este se adsorbe, y entra al sistema linfático. Los HPA's son metabolizados en el hígado y riñón y es excretado por bilis u orina. La biotransformación puede ocurrir también en las glándulas adrenales, testículos, tiroides, pulmón, piel, glándulas sebáceas y en el intestino delgado. Esto probablemente es porque los HPA's son biotransformados primero a epóxidos, después, a derivados de dihidrodiol y fenoles.⁹

Los resultados en el trastorno en tumores de hígado en peces por los HPA's es debido a radicales hidroxilo, el cual altera la estructura del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) en las células del hígado. Esta alteración resulta en la activación de genes causantes del cáncer.⁹

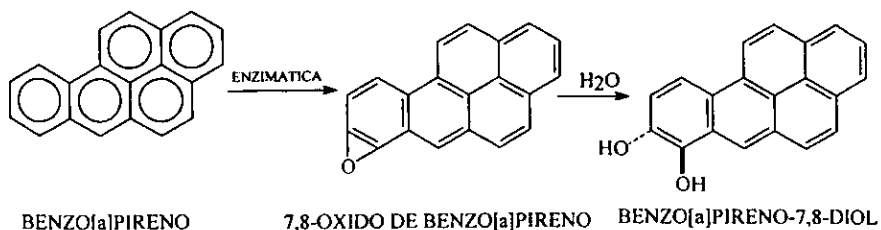


FIGURA 1.1. Conversión de Benzo[a]pireno a Benzo[a]pireno- 7,8-diol

No son del todo bien conocidas las razones por las que algunos hidrocarburos producen cáncer y otros no. Se manejan hipótesis relativas a la distribución de los electrones y otras relacionadas con el tamaño de las moléculas (para que se intercalen apropiadamente en el ADN de los núcleos celulares).⁹

Se sabe que un epóxido sufre típicamente la sustitución nucleofílica, una reacción que abre el anillo del epóxido.⁹

En la hidrólisis, el agua se comporta como un nucleófilo, y el producto es un 1,2-diol. En un organismo, la hidrólisis (catalizada enzimáticamente) es una de las reacciones principales de los epóxidos. Los dioles resultantes sufren otras reacciones y el material es finalmente excretado.⁹

Sin embargo, algunos de estos dioles sufren otra epoxidación, de una manera regio y estereoselectiva, para dar dihidroxi-epóxidos. Benzo[a]pireno, por ejemplo, se convierte en el diol-epóxido I. (figura.1.2)⁹

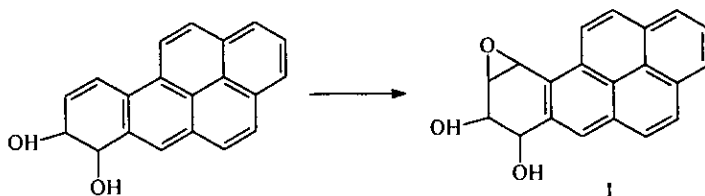


FIGURA 1.2. Conversión del benzo[a]pireno-7,8 diol al diol-epóxido.

Se cree que diol-epóxidos puede ser el verdadero carcinógeno que se forman durante la biotransformación de los hidrocarburos polinucleares.⁹

Los epóxidos causan cáncer cuando se hace reaccionar el diol-epóxido I con el ácido nucleico ADN en pruebas *in vitro* y se degrada el producto, obteniéndose el compuesto II.(figura 1.3)⁹

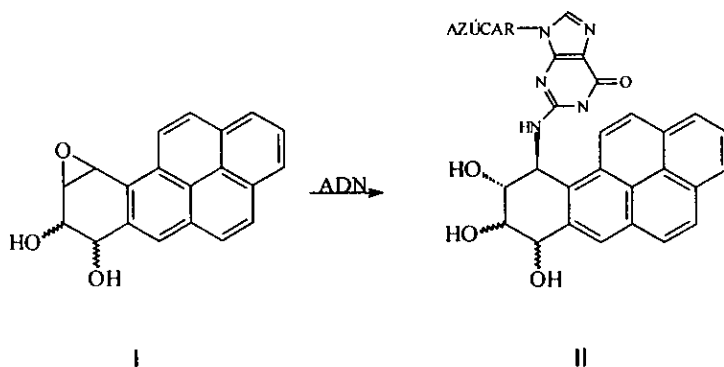


FIGURA.1.3. Reacción del diol-epóxido con el ADN

Aquí tiene lugar una reacción perfectamente simple y conocida: ataque nucleófilo a un epóxido. El NH₂ del nucleósido ha atacado al C-10 del epóxido mediante su base guanina, abriendo el anillo con inversión estereoquímica, para dar el producto II trans.⁹

Este mismo compuesto II es el producto principal de la acción del hidrocarburo original Benzo[a]pireno sobre ADN y ARN en células humanas. El daño que se observa en el ADN por esta reacción es fácil de comprender, la unión de este grupo hidrocarbonado tan grande a guanina, evidentemente impide que ésta se ajuste en la doble hélice del ADN y que establezca puentes de hidrógeno con una citosina en la cadena opuesta. Este daño implica mutaciones, y con ellas una probabilidad mayor de carcinogénesis.⁹

Se cree que muchas sustancias carcinógenas operan esencialmente de la misma manera, son electrófilas y sufren un ataque nucleofílico por medio de una base nucleosídica de ADN. Las nitrosaminas, que se generan por acción sobre las proteínas de la carne, parece que ejercen los efectos carcinógenos mediante su poder alquilante. En general, son cancerígenos los agentes metilantes. Por su poder alquilante, incluso la unión de los "pequeños" grupos metilo, es suficiente para interferir con el apareamiento de bases en la doble hélice.⁹

TABLA 1.1. Estructura química de los 15 HPA's más importantes para el análisis ambiental^{5, 10, 11, 12, 13}

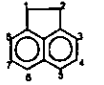
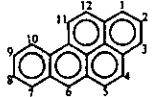
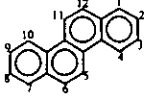
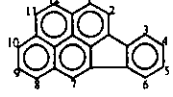
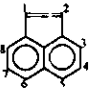
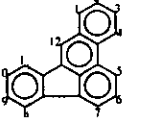
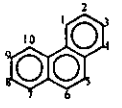

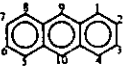
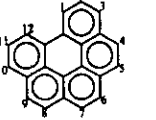
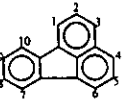
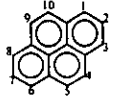
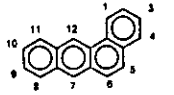
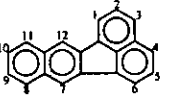
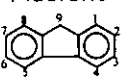
Compuesto	Compuesto	Compuesto	Compuesto
<p>Acenafteno</p> 	<p>Benzo[a]pireno</p> 	<p>Criseno</p> 	<p>Indeno [1,2,3-c,d]pireno</p> 
<p>Acenaftileno</p> 	<p>Benzo[b]fluoranteno</p> 	<p>Fenantreno</p> 	<p>Naftaleno</p> 
<p>Antraceno</p> 	<p>Benzo[g,h,i]pirileno</p> 	<p>Fluoranteno</p> 	<p>Pireno</p> 
<p>Benzo[a]antraceno</p> 	<p>Benzo[k]fluoranteno</p> 	<p>Fluoreno</p> 	

TABLA 1.2. Características fisicoquímicas de los 15 HPA's más comunes como contaminantes.^{10,14,15,16,17}

Compuesto	Sinónimos	Peso Molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)
Acenafteno	1,2-Dihidroacenafteno ó 1,8-Etilennaftaleno	154.21	95	279
Acenaftileno	1,2-Deshidroacenaftaleno	152.20	265-275	265-275
Antraceno	Paranaftaleno; Antracin; Aceite Verde; Tetraoliva ; Antraxceno	178.23	217.5	340
Benzo[a]antraceno	1,2-Benzantraceno; 2,3-Benzofenantraceno; Tetrafeno; Benzantreno; Naftantraceno.	228.29	159.8	437.6
Benzo[a]pireno	6,7-Benzopireno; B[a]P; Bp; 3,4-Benzopireno; Benzo[d,e,f]criseno; 3,4-Benzopireno.	252.31	176.5	495
Benzo[b]fluoranteno	3,4-Benzofluoranteno; Benzo[e]acefenantrileno; Benzo[e]fluoranteno; 3,4-Benzo[e]acefenantrileno.	252.31	167	357
Benzo[g,h,i]pirileno	1,12-Benzoperileno	276.34	278.3	500
Benzo[k]fluoranteno	Dibenzo[b,j,k]fluoreno; 8,9-Benzofluoranteno; 11,12- Benzo[k]fluoranteno; 2,3,1',8'-Binaftileno.	252.31	215.7	480

TABLA 1.2. Características fisicoquímicas de los 15 HPA's más comunes como contaminantes. (CONTINUACIÓN)^{10,14,15,16,17}

Compuesto	Sinónimos	Peso Molecular (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)
Criseno	1,2-Benzofenantreno; Benzo[a]fenantreno; 1,2,5,6-Dibenzonaftaleno; 1,2-Benzofenantraceno	228.28	255.8	448
Fenantreno	Fenantraceno	178.23	99.5	340
Fluoranteno	1,2-Benzacenafteno; Fa; Idril; Benzo[j,k]fluoreno; 1,2-(1,8-Naftalenedil)Benceno.	202.26	110.8	375
Fluoreno	9H-Fluoreno; o-Bifenilenemetano; Difenilenemetano; 2,2'-Metilénbifenilo.	166.22	116	295
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	o-Fenilenepireno; 2,3-o-Fenilenepireno; 1,10-(1,2-Fenilene)Pireno	276.34	162.5	536
Naftaleno	Nafteno; Alquitrán del Alcanfor; Alquitrán Blanco; Mothballs; Escamas de la Polilla, Naftalina	128.17	80.6	218
Pireno	Benzo[def]fenantreno; Pireno[def]fenantreno; Beta-Pireno	202.26	156	404

TABLA 1.3. Características fisicoquímicas de los 15 HPA's y usos^{10,14,15,16,17.}

Compuesto	Densidad (g/ml)	Solubilidad	Presión de vapor (mmhg)	Usos
Acenafteno	1.189	Etanol, metanol, propanol, Cloroformo, benceno, tolueno y Ac. Acético	4.47×10^{-3}	<ul style="list-style-type: none"> • Colorantes • En la manufactura de algunos plásticos. • Insecticidas. • Fungicidas.
Acenaftileno	0,8988	No reportados.	9.12×10^{-4}	<ul style="list-style-type: none"> • El acenaftileno es usado principalmente en aplicaciones de investigación.
Antraceno	1.25	Etanol, metanol, benceno, tolueno y disulfuro de carbono.	No reportado	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilizador para impedir la formación de goma en la gasolina • Producción de antraquinona y otros intermedios de colorantes. • Diversas composiciones de revestimiento contienen antraceno para prolongar la duración de la película por absorción de los rayos ultravioleta. • Se usa como componente de insecticidas y fungicidas, • En la composición de fórmulas de curtientes sintéticos • Tintas.

TABLA 1.3. Características fisicoquímicas de los 15 HPA's y usos (CONTINUACIÓN)^{10,14,15,16,17.}

Compuesto	Densidad (g/ml)	Solubilidad	Presión de vapor (mmhg)	Usos
Benzo[a]antraceno	1.351	Alcohol, éter y benceno	No reportado	<ul style="list-style-type: none"> • Es usado principalmente en aplicaciones de investigación.
Benzo[b]fluoranteno	No reportado	Poco soluble en benceno y acetona	No reportado	<ul style="list-style-type: none"> • Es usado principalmente en aplicaciones de investigación.
Benzo[g,h,i]pirileno	No reportado	1,4-dioxano, diclorometano, benceno y acetona	1.01×10^{-10}	<ul style="list-style-type: none"> • Es usado principalmente en aplicaciones de investigación.
Benzo[k]fluoranteno	No reportado	Ácido acético, benceno y etanol	9.59×10^{-11}	<ul style="list-style-type: none"> • Es usado principalmente en aplicaciones de investigación.
Criseno	1.274	Ligeramente soluble en alcohol, éter, disulfuro de carbono, ácido acético glacial.	6.3×10^{-9}	<ul style="list-style-type: none"> • Es usado principalmente en aplicaciones de investigación.

TABLA 1.3. Características fisicoquímicas de los 15 HPA's y usos (CONTINUACIÓN) ^{10,14,15,16,17.}

Compuesto	Densidad (g/ml)	Solubilidad.	Presión de vapor (mmhg)	Usos.
Fenantreno	1.063	Ácido acético glacial y en un número de solventes orgánicos incluyendo el etanol, benceno, disulfuro de carbono, tetracloruro de carbono, éter dietil y tolueno.	9.6×10^{-4}	<ul style="list-style-type: none"> Preparar colorantes, en especial flavindulina. Es un estabilizador para los explosivos a partir de nitroglicerina y nitrocelulosa y para las pólvoras. Se usa en la síntesis de productos farmacéuticos, medicamentos y compuestos intermedios orgánicos. El ciclopentanofenantreno es un derivado que puede usarse como un material primario de la síntesis de ácidos biliares colesterol y otros esteroides.
Fluoreno	1.203	No reportado.	No reportado	<ul style="list-style-type: none"> Formación de poliradicales para las resinas. Derivados de los colorantes. Herbicidas y reguladores de crecimiento.
Fluoranteno.	1.252	Alcohol, éter, benceno y ácido acético	1.91×10^{-3}	<ul style="list-style-type: none"> Es usado principalmente en aplicaciones de investigación.
Indeno [1,2,3-c,d]pireno	No reportado	Soluble en solventes orgánicos.	1×10^{-10}	<ul style="list-style-type: none"> Es usado principalmente en aplicaciones de investigación.
Naftaleno	0.997	Benceno, tolueno, éter y en otros solventes orgánicos.	0.082	<ul style="list-style-type: none"> Síntesis de antraquinona. Producción del ácido salicílico de la naftalina. Medicación (veterinario) externo, en ganado y ave de corral para controlar piojo. Desodorisantes.
Pireno	1.271	Benceno, disulfuro de carbono y etanol.	6.86×10^{-7}	<ul style="list-style-type: none"> Es usado principalmente en aplicaciones de investigación.

TABLA 1.4. Propiedades toxicológicas de los 15 HPA's más comunes.

Compuesto	Toxicidad
Acenafteno	Se absorbe por el tracto gastrointestinal y pulmones, provocando irritación en la piel y en las membranas mucosas de los humanos y animales. Su dosis letal 50 es de 10 g/kg en ratas. ¹⁰
Acenaftileno	No reportado.
Antraceno	En los estudios realizados se ha demostrado que este compuesto es tóxico para la piel, tracto gastrointestinal, sistema hematopoyético y linfoide. Su exposición en humanos puede causar una aguda dermatitis, dolor de cabeza, náusea, pérdida del apetito, inflamación del tracto gastrointestinal, movimientos lentos y debilidad. ⁸
Benzo[a]antraceno	Los efectos de la toxicidad son principalmente ocasionados en tejidos que contienen células en reproducción. Los estudios realizados en animales indican que la exposición de este compuesto puede dañar al sistema hematopoyético, provocando una anemia progresiva y agranulocitosis, también puede afectar el sistema linfoide provocando linfopenia. Se han observado efectos tóxicos en las células de rápida división del epitelio intestinal, espermatogonias y espermatoцитos en reposo que se encuentran en el testículo. ¹⁷
Benzo[a]pireno	Se absorbe rápidamente por vía oral, inhalatoria y dérmica. Los estudios realizados en ratones mostraron los efectos tóxicos ocasionados como son la producción de papilomas, carcinomas, tumores mamarios y adenomas pulmonares. La exposición por inhalación y administración intratraqueal ocasionó tumores benignos y malignos en vías respiratorias y tracto digestivo. Los numerosos estudios realizados en aplicaciones tópicas han mostrado que el Benzo[a]pireno induce tumores en piel. ¹⁴
Benzo[b]fluoranteno	Se absorbe en el tracto gastrointestinal, pulmones, y piel. En estudios realizados en aplicaciones dermales se observó una alta incidencia de papilomas de piel y carcinomas en ratones. ¹⁶

TABLA 1.4 Propiedades toxicológicas de los 15 HPA's más comunes
(CONTINUACIÓN).

Compuesto	Toxicidad.
Benzo[g,h,i]pirileno.	Se sugiere que se pueden absorber por tracto gastrointestinal, pulmones y piel. ¹⁵
Benzo[k]fluoranteno	Se absorbe por el tracto gastrointestinal, pulmones y piel. Se realizaron aplicaciones dérmicas en ratones provocando papilomas, pero en ensayos de promoción de la iniciación del carcinoma este fue activo como iniciador de carcinogénesis en piel. ⁹
Criseno	Se distribuye preferentemente en regiones altamente lipofílicas del cuerpo principalmente el tejido adiposo y mamario, ocasionando inmunosupresión, tumores hepáticos en humanos y carcinomas en piel, se a demostrado en pruebas realizadas <i>in vivo</i> el criseno provoca mutagenicidad y anomalías cromosómicas. ¹⁰
Fenantreno	Puede ser absorbido por vía oral y exposición dérmica. Existen datos de toxicidad del fenantreno por vía intraperitoneal ocasionando hepatotoxicidad en ratas. ¹⁶
Fluoranteno	Puede absorberse por la piel después de una exposición a este agente. Este compuesto presenta absorción desde el tracto gastrointestinal y pulmones. Una exposición subcrónica a fluoranteno a dosis grandes o un equivalente a 250 mg/kg produce nefropatía, incremento en el peso del hígado, y un incremento en los niveles de enzima hepática. ¹⁷
Fluoreno	No reportado.
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	Se absorbe por el tracto gastrointestinal, pulmones y piel. Los efectos tóxicos ocasionados por aplicaciones dérmicas provocan carcinomas y papilomas en piel de ratón. ¹⁴

TABLA 1.4 Propiedades toxicológicas de los 15 HPA's más comunes (CONTINUACIÓN).

Compuesto	Toxicidad.
Naftaleno	<p>Puede absorberse por vía oral, inhalatoria y por ruta dermal. Su exposición en cantidades pequeñas puede atravesar la placenta, ocasionando efectos tóxicos al feto.</p> <p>Los efectos tóxicos más comunes observados en humano son anemia hemolítica con hemoglobina y valores de hematocrito decrecientes, así como un incremento en los reticulocitos y en los niveles de bilirubina sérica. La anemia hemolítica se observa con frecuencia en infantes cuya madre estuvo expuesta al naftaleno durante el embarazo. Una exposición aguda por inhalación y vía oral trae como consecuencia efectos neurotóxicos (confusión y vértigo), dolores gastrointestinales, efectos hepáticos (con un elevado nivel de enzimas séricas), efectos renales y principalmente oculares como cataratas y atrofia óptica. La dosis letal 50 estimada es de 5 a 15 g/kg para adultos y de 2 a 3 g/kg para niños.¹⁶</p>
Pireno	<p>En estudios realizados en animales de experimentación se ha demostrado que a dosis orales subcrónicas se producen nefropatías, un decremento en el peso de riñones, un incremento en el peso del hígado, ligeros cambios hematológicos en ratón y una producción de grasas en el hígado de rata. En inyecciones intraperitoneales el pireno ocasionó un hinchamiento y congestión en el hígado, así como un incremento en el aspartato amino transferasa en suero y en los niveles de bilirubina en ratas.¹⁴</p>

C
A
P
Í
T
U
L
O
2

TEORÍA DE LA
CROMATOGRFÍA

2.1 GENERALIDADES

La solución de numerosos problemas, que se presentan en los campos de la química pura y aplicada, está dedicada al aislamiento e identificación de ciertos compuestos orgánicos e inorgánicos existentes en una mezcla. El proceso normal de análisis consiste en separar los productos deseados para proceder a continuación a su identificación, por medio de reacciones químicas o determinando ciertas propiedades físicas. Existen muchas técnicas de separación que varían considerablemente de un área de aplicación a otra, dependiendo del tipo de muestra, complejidad, matriz y concentración. Una de las herramientas más utilizadas es la cromatografía.¹⁸

La cromatografía es una técnica analítica, que se utiliza para la separación de 2 ó más compuestos, por distribución de los solutos entre dos fases, las cuales están en contacto. En cromatografía, la fase móvil es un líquido o un gas. La fase estacionaria es comúnmente un líquido que recubre la superficie de partículas sólidas. A veces, las partículas sólidas mismas pueden servir como fase estacionaria.¹⁹

Los componentes que se disolvieron en la fase móvil pasan por la fase estacionaria; los componentes que tengan una mayor afinidad a la fase estacionaria tardan más tiempo en salir de la columna, mientras que los que presenten una menor afinidad a la fase estacionaria saldrán de la columna rápidamente ya que presenta una afinidad mayor por la fase móvil logrando de esta manera la separación de los compuestos de la muestra.²⁰

Los componentes se separan en la columna y pueden ser cuantificados por un detector y/o colectados para el análisis adicional. Existen varios instrumentos analíticos que se puede combinar con un método de separación para el análisis en línea. Los ejemplos de tales técnicas incluyen la cromatografía líquida y la de gas con espectrometría de masas (CG-MS y CL-MS), la espectroscopía infrarroja (CG-FTIR), y la espectroscopía de absorción de UV-VIS (CLAR-UV-VIS).²⁰

2.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ESPECÍFICOS.

CROMATOGRAFÍA DE GASES.

El fundamento de las separaciones mediante la cromatografía de gases se encuentra en las diferencias en volatilidad de la mezcla de los solutos analizados y en su capacidad para ser absorbidos por el sólido activo. En la cromatografía de gases, la mezcla de solutos a separar, una vez volatilizada, se hace pasar a través de un largo tubo estrecho (columna) con la ayuda de un gas portador inerte, basándose la separación en las distintas velocidades de los solutos a su paso por la columna, las cuales van llegando a continuación al sistema de detección. Aplicado a los compuestos orgánicos volátiles. La fase móvil es un gas y la fase estacionaria es generalmente un líquido o a veces un adsorbente sólido.²⁰

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.

La cromatografía líquida (CL) es una técnica cromatográfica analítica que es útil para separar los iones o las moléculas que se disuelven en un solvente. Si la solución de la muestra está en contacto con una segunda fase sólida o líquida, los diversos solutos obrarán recíprocamente con la otra fase, lo que generará diferencias debido a las características en la adsorción, cambio iónico, coeficiente de reparto, o masa molecular. Estas diferencias permiten que los componentes de la mezcla sean separados de uno a uno usando estas diferencias para determinar el tiempo de reparto de los solutos a través de una columna.²⁰

La cromatografía líquida simple, consiste en una columna con un fondo sinterizado que lleve a cabo una fase estacionaria en equilibrio con un solvente. Las fases estacionarias típicas (y sus interacciones con los solutos) son: sólidos (adsorción), grupos iónicos en una resina (intercambio iónico), líquidos en un soporte sólido inerte y partículas inertes porosas (masa molecular). La mezcla que se separará se carga sobre la tapa de la columna seguida por más solvente. Los diversos componentes en la mezcla de la muestra pasan a través de la columna en diversas bandas debido a las diferencias en su comportamiento de partición entre la fase líquida móvil y la fase estacionaria. Los compuestos son separados en función de tiempo.²⁰

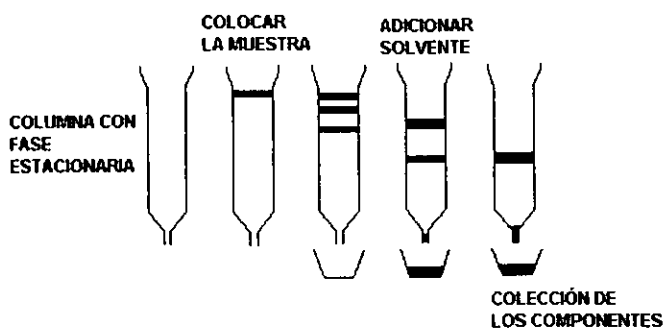


FIGURA 2.1 Esquema de una cromatografía líquida.

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

A diferencia de lo que ocurre en otras formas de cromatografía, en el caso ideal de cromatografía de exclusión molecular no existen interacciones por atracción entre la "fase estacionaria" y el soluto. Más bien, la fase móvil líquida o gaseosa pasa a través de un gel poroso. Los poros son suficientemente pequeños para excluir las moléculas grandes de soluto, pero no las pequeñas. La corriente de moléculas grandes pasa sin penetrar en el gel. Las moléculas pequeñas requieren más tiempo para pasar a través de la columna porque entran en el gel y, por tanto, deben fluir a través de un volumen más grande antes de dejar la columna. Esta técnica también se conoce como cromatografía de filtración en gel o de permeación en gel; en ella se separan moléculas por tamaño, y los solutos más grandes pasan más rápidamente.²¹

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Es un tipo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria está extendida sobre la superficie de un plano y la fase móvil fluye a través de ella. La fase móvil siempre es un líquido, mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido soportado en un sólido o un sólido sorbente. Este método es simple y rápido, sirve para vigilar el avance de una reacción o controlar la pureza de compuestos orgánicos.²⁰

2.3 ANTECEDENTES DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Antes de los años 70, pocos métodos cromatográficos confiables estaban comercialmente disponibles para el científico del laboratorio. Durante los años 70, la mayoría de las separaciones químicas eran realizadas usando una gran variedad de técnicas, incluyendo la cromatografía en columna, la cromatografía de papel, y la cromatografía de capa fina. Sin embargo, estas técnicas cromatográficas eran inadecuadas para la cuantificación de compuestos y de la resolución entre los compuestos similares.²⁰

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) fue desarrollada a mediados de los años setenta y mejorada rápidamente con el desarrollo de los materiales de empaque de la columna y de la adición de detectores en línea al sistema. En los años 70, los nuevos métodos incluyendo la cromatografía líquida de fase reversa permitieron la mejor separación entre compuestos muy similares.²⁰

Por los años 80 la CLAR se utilizaba comúnmente en la separación de compuestos químicos. Las nuevas técnicas mejoraron la separación, la identificación, la purificación y la cuantificación sobre las técnicas anteriores. Las computadoras y la automatización agregada al sistema de CLAR mejoraron el tipo de columnas y, por lo tanto, la reproducibilidad, así mientras que los términos tales como microcolumna, columnas de afinidad, comenzaron a emerger.²⁰

Actualmente, se tiene la opción de considerar diferentes tipos de columnas para la separación de compuestos, así como una variedad de detectores a utilizar con la CLAR para conseguir el análisis óptimo de los compuestos que se analicen.²⁰

Aunque la CLAR se considera extensamente una técnica principalmente para la investigación biotecnología, biomédica, y bioquímica así como para la industria farmacéutica, estos campos utilizan solamente sobre el 50% del uso del CLAR.²¹

La CLAR es utilizado actualmente por una variedad de campos incluyendo los cosméticos, la energía, el alimenticio y las industrias ambientales.²²

2.4 PARTES DEL CLAR

Los instrumentos del CLAR consisten básicamente de reservorios de la fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación, y uno o varios detectores. Los diversos componentes en la mezcla pasan a través de la columna a diferentes velocidades debido a las diferencias en su comportamiento con la fase líquida móvil y la fase estacionaria.²⁰

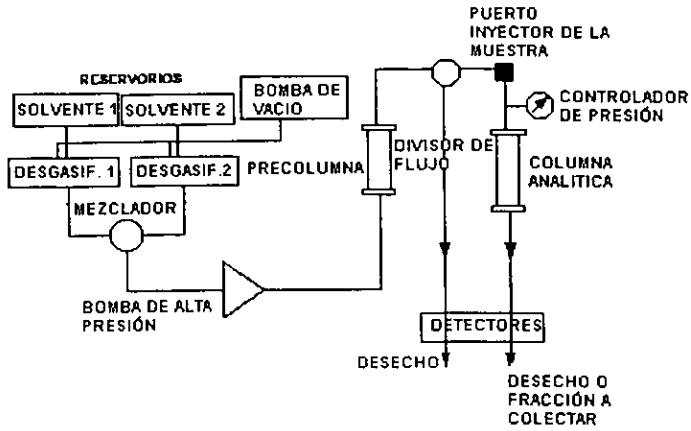


FIGURA 2.2 Diagrama esquemático de un instrumento del CLAR

Los solventes se deben degasificar para eliminar la formación de burbujas. Las bombas proporcionan una alta presión constante sin pulsar, y se pueden programar para variar la composición del solvente durante el proceso de la separación (figura. 2.3).²⁰

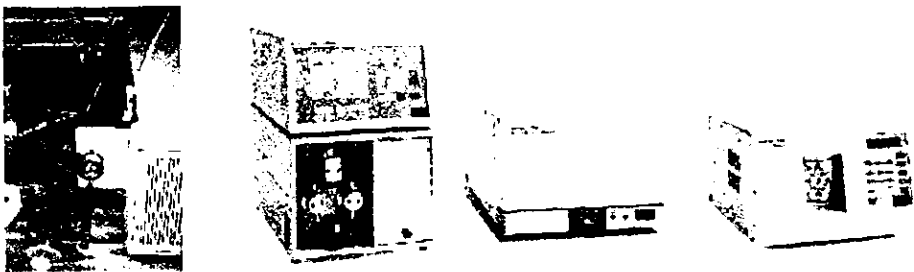


FIGURA 2.3 Cuadro de un instrumento del CLAR (de izquierda a derecha Inyector del CLAR, Sistema de bombas y controlador del sistema de flujo del CLAR, Detector de Fotodiodos, Detector de Fluorescencia)

INYECTOR

Es un módulo del sistema cromatográfico que tiene la función de colocar la muestra en solución dentro del sistema, sin interrumpir el flujo del solvente.²³

La introducción de la muestra se puede lograr de varias maneras. El método más simple es utilizar una válvula de inyección que es la que ha alcanzado mayor popularidad debido a su versatilidad, fácil operación y durabilidad. Estas válvulas se diseñan para resistir presiones altas y se fabrican sólo de material inerte, como acero inoxidable y teflón. En sistemas más sofisticados de CL, se incorporan los dispositivos automáticos del muestreo por medio de automuestreadores y/o por microprocesadores.²⁴

En cromatografía líquida, las muestras líquidas pueden ser inyectadas directamente y las muestras sólidas necesitan ser disueltas en un solvente apropiado. El solvente no necesita ser la fase móvil, pero se elige con frecuencia para evitar interferencias en el detector, interferencia en los componentes de la columna y pérdida en la eficacia. La disponibilidad de detectores altamente sensibles permite con frecuencia el uso de muestras pequeñas que rinden el funcionamiento más alto de la columna.²⁴

CARACTERÍSTICAS.

- Introducir cualquier muestra, tan pequeña como sea posible (μl), a la columna.
- Reproducible.
- Capacidad de operar a alta presión.
- No contribuir a ensanchamientos de bandas.
- Inerte al ataque químico.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes en la solución inyectada.



FIGURA 2.4. Se muestra el diagrama de un inyector donde la muestra es cargada, con ayuda de una microjeringa,

BOMBAS.

Básicamente existen, dos tipos de bombas: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa). Las primeras son las de uso más difundido; son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina del laboratorio. Las segundas no emiten pulsos en la entrega del solvente.²³

BOMBAS DE DOBLE PISTÓN.

Las bombas de CLAR impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de los microlitros/minuto para la cromatografía microbore, pasando a caudales de unos pocos mililitros/minuto para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas.²⁰

BOMBAS RECIPROCANTES.

La bomba reciprocante de doble cabeza, proporciona un flujo constante y casi libre de pulsaciones. Las dos cámaras de la bomba son manejadas por el mismo motor a través de una leva excéntrica común; este manejo común permite al pistón bombear mientras el otro está recambiando. Como resultado, los dos perfiles de flujo coinciden parcialmente reduciendo el flujo bajo, de la pulsación significativamente de la bomba.²⁰

Las ventajas de esta bomba son el depósito de solvente ilimitado que permite a largo plazo el uso desatendido y el cambio rápido de solvente, el cual tiene la capacidad de limpiar la tubería de la bomba. Sin embargo, a menos que el cuidado especial sea ejercido por el fabricante, esta bomba puede tener varias desventajas. Hay una tendencia para las pulsaciones incompleta compensada por el detector de índice de refracción de alta sensibilidades, sobre todo a las proporciones de flujo bajas donde se extienden ciclos del pistón ampliamente. Además, puesto que cada cabeza tiene dos válvulas del chequeo, la fiabilidad de la bomba depende de la limpieza de la fase móvil y la capacidad continua del sellado de las cuatro válvulas de chequeo en cada ciclo, con ciclos normalmente ocurriendo varios tiempos por minuto.²⁰

La válvula de la bomba proporciona el gradiente de elución, que mezcla hasta cuatro solventes o buffers en cualquier combinación. El caudal del flujo comienza desde los reservorios y pasa por la columna.²⁰

TIPOS DE COLUMNAS

Las columnas para el equipo de CLAR son tubos del acero inoxidable, típicamente de 10-30 centímetro en longitud y el diámetro interno de 3-5 milímetro. Las pre-columnas, que se colocan antes de que una columna analítica sirve para atrapar posibles interferencias del analito y para ampliar la vida media de la columna analítica, estas son de 3-10 centímetro largo.²⁴

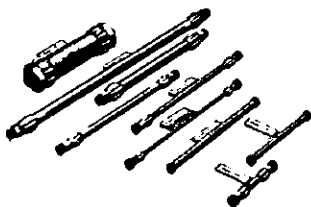


FIGURA 2.5. Columnas y pre-columnas para el CLAR.

FASES ESTACIONARIAS.

Los tipos de fase estacionaria dentro de las columnas para CLAR pueden ser de dos tipos: de cerámicas inorgánicas ó un sustrato polimérico orgánico.²⁴

Los empaques inorgánicos más usados son: la sílica y la alúmina; los empaques poliméricos usados son por lo general productos del estireno-divinil-benceno o metacrilatos.²⁴

La sílica es el material más usado en el empaque de columnas para CLAR, esto se debe a sus características de unirse fuertemente con otro ligando y partición con respecto a otros empaques inorgánicos, además de presentar una gran estabilización al momento de unirle ligandos en su superficie, volviéndola de esta manera muy versátil, ya que se puede usar en técnicas como son la de fase reversa, cambio iónico, interacción hidrofílica, interacción hidrofóbica y cromatografía de exclusión molecular. Otra ventaja de la sílica es que esta es compatible con una gran variedad de solventes desde los polares hasta los no polares y soporta un rango de pH de 2-8, el cual es el recomendado para uso en las rutinas con empaque con sílica.²⁴

La alúmina también presenta propiedades físicas muy favorables como la sílica con la diferencia de que esta presenta resistencia a mayor rango de pH, así como la sílica, es muy rígido y no se hincha ni se contrae en cualquier solvente. A diferencia de la sílica, las fases ligadas en la alúmina no son estables en fase móvil acuosa, sin embargo, las producidas con alúmina revestida muestran una excelente estabilidad al pH en sistema acuoso.²⁴

Los empaques poliméricos son redes de estireno divinilbenceno y de metacrilato los cuales están acondicionados para resistir las presiones típicas en un equipo de CLAR, sin embargo estas presiones serán aún más bajas que las usadas con empaques de material inorgánico. La matriz del estireno divinilbenceno es muy hidrofóbica, pero es compatible con todas las fases móviles incluyendo todo el rango de pH acuoso. Es compatible con eluentes ácidos ó bases fuertes y permite la limpieza completa del empaque con NaOH o con un ácido fuerte. La matriz del metacrilato es intrínsecamente más hidrofílica, pero a diferencia del estireno divinilbenceno es estable en un rango de pH muy pequeño. Todos los empaques poliméricos orgánicos se hinchan y contraen con un cambio de fase móvil.²⁴

La cromatografía de fase reversa utiliza una fase estacionaria relativamente no polar y una fase móvil polar, tal como metanol, acetonitrilo, agua, o mezclas de estos solventes. Las fases estacionarias más comunes son la octadecilsilona (C_{18}) y la octilsilona (encadenamientos de C_8), y grupos fenilos, la selectividad de la fase estacionaria se debe a la actividad que presente el grupo silano. Una de las vías para modificar los grupos silanol es por ligandos endcapping, también depende del tipo de pretratamiento que se le dé a los grupos silanol y la pureza de la sílica (figura 2.6). La cromatografía de la fase reversa es la forma más común de cromatografía líquida, sobre todo debido a la amplia gama de analitos que se pueden disolver en la fase móvil.²⁴

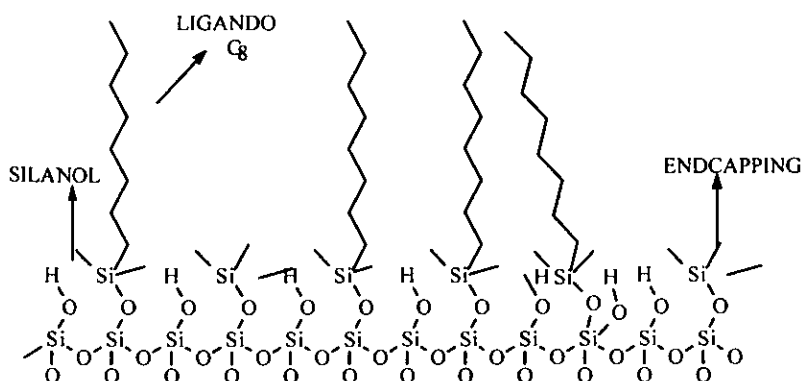


FIGURA 2.6. Fase estacionaria de octadecil silona (C₁₈).

La cromatografía de fase normal utiliza una fase estacionaria polar y un solvente orgánico no polar, tal como hexano, cloruro de metileno, o cloroformo, como la fase móvil. La fase estacionaria es un siloxano unido a un grupo funcional polar (figura 2.7). En la tabla 2.1 se muestran los grupos funcionales más comunes de las fases estacionarias.²⁴

TABLA 2.1. Los grupos funcionales más comunes de la fase estacionaria.

CIANO:	C ₂ H ₄ CN
DIOL:	C ₃ H ₆ OCH ₂ CHOHCH ₂ OH
AMINO:	C ₃ H ₆ NH ₂
DIMETILAMINO:	C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂

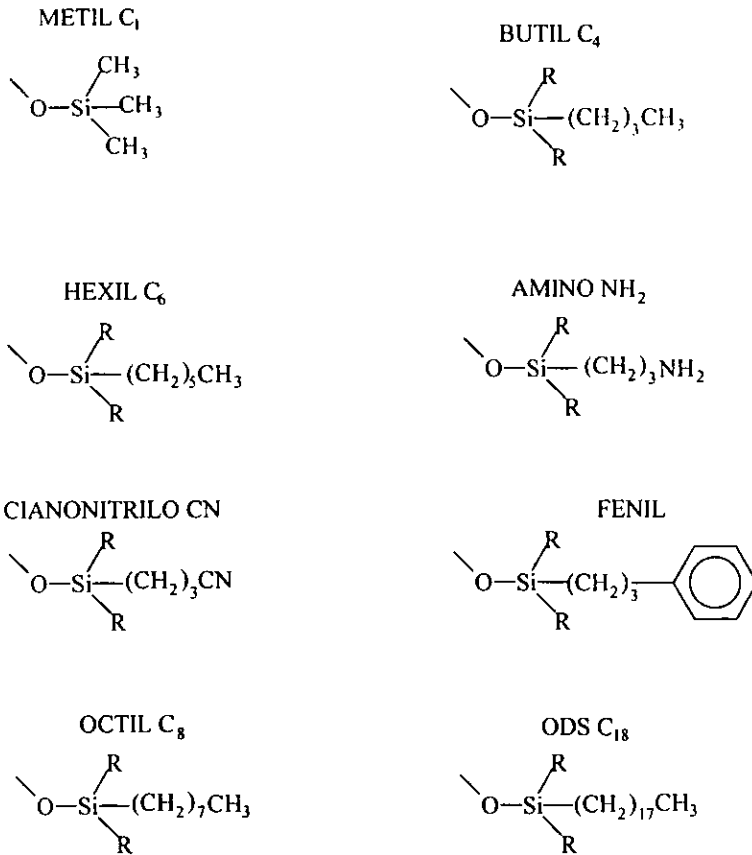


FIGURA 2.7 Grupos funcionales de las fases estacionarias usadas en las columnas

Para poder seleccionar de una manera adecuada la columna que se necesita para la separación es necesario conocer la hidrofobicidad de la columna con respecto a la fase móvil que se va a utilizar.²⁴

DETECTOR.

El detector cromatográfico es un sensor que mide una propiedad física o química de los componentes de la muestra, que tiene la función de generar una respuesta en presencia del compuesto eluido.²²

Características:

- No contribuir al ensanchamiento de los picos de elución
- No destruir la muestra
- Poseer una buena relación señal/ruido.
- Generar información cualitativa
- Tener respuesta rápida.
- Alta sensibilidad y especificidad para la detección de solutos a bajas concentraciones.
- Amplio intervalo de linealidad
- No ser afectado por cambios de temperatura o flujo
- Alta reproducibilidad.

El detector a utilizar para cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) depende de la muestra, la sensibilidad, selectividad y versatilidad requerida para el análisis.²²

DETECTOR CON ARREGLO DE DIODOS (DAD).

El detector con arreglo de diodos (DAD) es el más utilizado en CLAR, debido a que muchos solutos absorben radiación ultravioleta. En el sistema más simple se emplea la emisión intensa a 254 nm de una lámpara de mercurio y detección a una sola longitud de onda. En instrumentos más versátiles se utilizan una lámpara de deuterio y un monocromador para mediciones a longitud de onda variable. Esto permite al detector responder a compuestos que no absorben fuertemente a 254nm pero que lo hacen en alguna otra región.²²

Los detectores de ultravioleta son satisfactorios para la elución en gradiente con solventes que no absorben. Este sistema incluso puede buscar el máximo de absorbancia de cada soluto conforme se eluye.²²

En la figura 2.8 se muestra un diagrama simplificado de la óptica para un arreglo de diodos, donde la luz policromática de una lámpara de deuterio y es enfocada a través de un sistema de lentes acromáticos hasta llegar a la celda de flujo. La luz existente en la celda de flujo es dispersada por una rejilla de difracción hacia el arreglo de diodos. Al empezar cada rastreo el capacitor es asociado con el diodo, el cual descarga una fotocorriente y el diodo es iluminado. La intensidad de luz captada por el diodo es proporcional a la cantidad de corriente necesaria para recargar el capacitor y la lectura del diodo sea leída por la computadora.²²

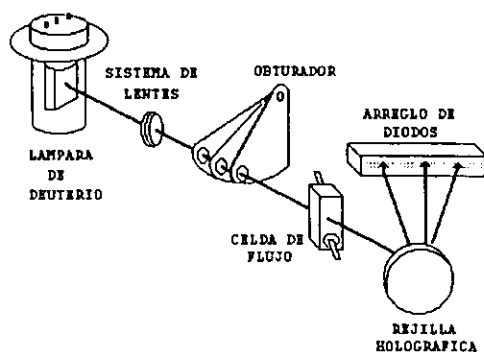


Figura 2.8. Esquema de un DAD UV/Visible.

DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

El detector de fluorescencia es muy sensible y selectivo para los solutos que despiden luz fluorescente debido a su capacidad de medir la energía emitida de ciertos solutos excitados por la radiación de UV. Una condición necesaria para que se dé la fluorescencia es, sin duda, que la molécula tenga fuerte absorción. Las estructuras aromáticas, heterocíclicas y altamente conjugadas, las cuales originan intensa absorción, son, por consiguiente, apropiadas para conferir propiedades fluorescentes a una molécula. Las áreas de aplicación principales para la detección consisten en el análisis de muestras biológicas, de productos farmacéuticos, de alimentos, de combustibles fósiles y en el análisis ambiental.²²

Cuando ciertas moléculas o átomos se exponen a una fuente de energía tal como luz de alta intensidad, las moléculas o los átomos absorben la energía y entran en un estado excitado. Mientras que una molécula o un átomo se mueve desde este estado excitado de nuevo a su estado normal, parte de la energía absorbida se libera en forma de un fotón. Este proceso se llama fluorescencia. Los átomos y las moléculas en diversos elementos y compuestos emiten diversos niveles de la fluorescencia cuando están expuestos a los mismos niveles de energía. El detector de la fluorescencia ilumina una muestra con una banda estrecha de la luz de alta intensidad de una fuente de luz cuidadosamente controlada. El detector entonces mide los niveles bajos de la fluorescencia emitidos de la muestra. La luz emitida se filtra, se amplifica, y se convierte a las señales eléctricas que pueden ser registradas y analizadas.²²

Un diagrama esquemático de un detector de fluorescencia se muestra en la figura 2.9, donde una lámpara proporciona la radiación suficiente para la excitación, para alcanzar determinado valor de excitación, y para reducir la luz extraña, se selecciona una banda de radiación más o menos estrecha a partir de la radiación emitida por la fuente de luz. Se efectúa esta selección mediante el filtro de excitación, se aísla la banda espectral de interés, y se enfoca sobre una celda de flujo. Posteriormente otra lente recoge la energía fluorescente de esta celda, obviamente la muestra emite luz fluorescente en todas direcciones, por lo que mediante un filtro de fluorescencia se separa nuevamente la luz indeseable, posteriormente la luz fluorescente alcanza un tubo fotomultiplicador, produciendo una señal eléctrica que se amplifica y mide con un medidor para indicar la intensidad de fluorescencia. En muchos casos el detector de fluorescencia es de cien veces más sensible que un detector de absorción UV; por lo tanto, el detector de fluorescencia es uno de los más utilizados para la cromatografía de líquidos debido a su alta sensibilidad.²²

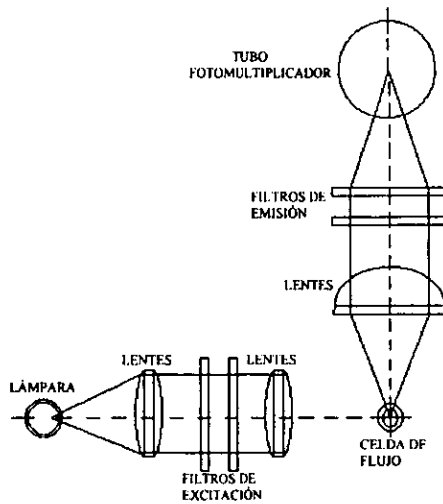


FIGURA 2.9. Esquema de un detector de fluorescencia.

2.5 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS.²²

- a) Tiempo de retención (t_R): es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que se obtiene el punto máximo del pico. Este tiempo es característico del soluto, de la fase líquida y de la temperatura de la columna.
- b) El área del pico: permite determinar la concentración de cada componente separado en la columna.
- c) El tiempo muerto (t_M o t_0): es el tiempo de tránsito de un soluto no retenido en la fase estacionaria. Tiempo que cualquier soluto permanece en la fase móvil.¹⁹
- d) El tiempo de retención corregido (t'_R): Mide el tiempo que el componente permanece en la fase estacionaria:

$$t'_R = t_R - t_0.$$

- e) Anchura de la base (W_A y W_B): es la porción de la línea base interceptada por las tangentes trazadas hacia el pico. Es 4σ de un pico gaussiano.
- f) Volumen de retención (V_R): es el volumen de fase móvil necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección, a través de la columna, hasta el detector. Se puede obtener directamente del cromatograma multiplicando el tiempo de retención correspondiente, (t_R), por el gasto o flujo volumétrico (F_c).

$$V_R = t_R F_c.$$

COEFICIENTE DE REPARTO (k).²¹

Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o se distribuye entre la fase móvil y la estacionaria. Si la fase móvil se para en cualquier momento, el soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases. La concentración en cada fase está dada por el coeficiente de reparto:

$$k = \frac{C_S}{C_M}$$

Donde: C_S = concentración de soluto en la fase estacionaria.

C_M = concentración de soluto en la fase móvil.

Cuando $k=1$, el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases.

FACTOR DE CAPACIDAD (K').²¹

Una vez que se elija el detector apropiado y el sistema está funcionando correctamente, el paso siguiente para tener un cromatograma adecuado, es saber cual es la retención de los componentes en la mezcla. La medida de retención de un compuesto en una columna se refiere como el factor de capacidad y es un

parámetro importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos, y se expresa como:

$$K' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V'_R}{V_M}$$

Donde: t'_R = tiempo de retención corregido.

t_M = tiempo muerto.

V'_R = volumen de retención corregido.

V_M = volumen muerto.

Cuando el factor de capacidad es menor que 1, la elución de los componentes es tan rápida que es difícil determinar con exactitud los tiempos de retención. Cuando el factor de capacidad es del orden de 20 o 30, los tiempos de retención son demasiado largos. Idealmente, las separaciones se realizan en unas condiciones en las que los factores de capacidad para los componentes de una mezcla oscilan entre: $2 < K' < 6$ para sistemas simples, con 2-3 picos, $2 < k' < 10$ para muestras con mayor número de picos, y $0.5 < k' < 20$ para muestras complejas.

Es conveniente recordar las siguientes reglas, para cromatografía en fase reversa:

- > A mayor proporción de agua, mayor K' , o sea mayor retención.
- > A mayor proporción de modificador (MeOH, CH₃CN, THF), menor K' , es decir menor retención.

FACTOR DE SELECTIVIDAD (α).²⁴

La retención relativa, α , de dos solutos, donde el soluto 1 eluye antes del soluto 2, es:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{V'_{R2}}{V'_{R1}}$$

La selectividad de un sistema depende de la naturaleza de cada uno de sus componentes, la fase móvil, la columna y la muestra, de su afinidad mutua y del modo en que interaccionan entre sí.

No existe separación cuando el valor de α es igual a la unidad, es decir, mientras mayor sea α a la unidad, será mayor la selectividad, y por lo tanto, habrá mayor separación de los componentes. Habitualmente las modificaciones de α se consiguen cambiando la polaridad de los solventes de elección para la fase móvil.

FACTOR DE COLEO (ASIMETRÍA).

Uno de los problemas frecuentemente encontrados en cromatografía es el coleo o asimetría de los picos, que puede ser anterior o posterior al máximo del tiempo de retención ($As < 1$ o $As > 1$, respectivamente).²⁴

La asimetría de los picos es muy común en cromatografía, un comportamiento gaussiano es realmente infrecuente pero la magnitud de la desviación de ese ideal es la que determina que pueda o no tolerarse.¹⁹

El efecto derivado por el factor de coleo se reduce a:

- Separaciones pobres.
- Baja precisión.
- Baja reproducibilidad.

El ensanchamiento de la base de los picos es consecuencia de separaciones deficientes y esto dificulta la integración de los picos por indefinición de los límites del mismo provocado una baja precisión en la cuantificación. En general, no debe aceptarse un método que presente picos con asimetría superior a 1.5 tomado al 10% de altura ó 2.0 tomado al 5% de altura.¹⁹

La solución del coleo de los picos depende de la(s) causa(s) que lo origina(n), entre éstas se encuentran:²¹

- Sobresaturación de la columna por inyectar una masa considerable de muestra.
- Solvente inapropiado. Falta de capacidad reguladora o fuerza iónica de la fase móvil, solvente de disolución de la muestra inadecuado.
- Columna deficiente. Disolución parcialmente de la columna o precolumna, formación de canales intracolumnares, taponamiento parcial de filtros.
- Columna dañada o contaminada.
- Contaminación por metales pesados.
- Desempeño de la columna, monitor de la forma de los picos, áreas y tiempos de retención en análisis rutinarios.
- En control de calidad, disminuye los errores relacionados con el procedimiento.
- Corrige variaciones instrumentales.

Desventajas.

- Separación más compleja a medida que aumente el número de picos en el cromatograma.
-

EFICIENCIA DE LA COLUMNA.²³

De acuerdo con la definición de coeficiente de reparto (K), una substancia que entre en la columna junto con la fase móvil hasta que se establezca un equilibrio de acuerdo con los valores de la concentración en la fase estacionaria y en la fase móvil. Durante el paso de la substancia a lo largo de la columna, este equilibrio se rompe por efecto de transporte y debe restablecerse consecutivamente. Desde el punto de vista teórico es conveniente considerar este proceso en varios pasos discontinuos de equilibrio, es como si dividiéramos la columna en un número de secciones iguales entre sí, en donde cada una de estas secciones se lleve un acabo el equilibrio. Se ha denominado a cada una de estas secciones: Platos Teóricos.

El poder de separación de una columna dependerá entre otros factores del intercambio entre la muestra y la fase líquida; en otras palabras, mientras más etapas de equilibrio existan, mayor será la eficiencia de separación. Es decir, que una columna eficiente será aquella que posea un gran número de platos teóricos.

RESOLUCIÓN (Rs).²²

El objetivo de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla y el grado de separación se mide por un parámetro, la resolución (Rs). Para mejorar la Rs, los picos deberán alejarse tanto como sea posible y sus anchos de base deberán ser pequeños. Un valor de Rs = 1.5 nos indica que hay separación hasta la línea base de los dos picos, mientras que una Rs=1.0 significa que la separación es aproximadamente del 90% , y una Rs menor a 1 indica una pobre separación.

Los parámetros relacionados con la Rs son: el factor de selectividad (α), el factor de eficiencia y el factor de capacidad (K'). Por consiguiente al modificar cada uno de estos factores se modificará también la Rs. La ecuación que la define es la siguiente:

$$Rs = 0.25 \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k'}{1 + k'} \right] N^{1/2}$$

C
A
P
Í
T
U
L
O
3

VALIDACIÓN

3.1 ESPECIFICACIONES PARA VALIDAR UN MÉTODO ANALÍTICO.

La validación del método se determina para asegurarse que la metodología analítica es exacta, específica y reproducible. La validación del método nos proporciona un aseguramiento de la confiabilidad durante uso normal, y se refiere alguna vez como " el proceso de proporcionar una evidencia documentada de que el método hace lo que se piensa que va a hacer ". Los laboratorios regulados deben realizar la validación del método para estar en conformidad con regulaciones internacionales.²⁴

Para la validación del método, pueden ser referidos los " ocho pasos de progresión de la validación del método", según lo mostrado en la figura 3.1. Estos términos se refieren como "parámetros para la optimización del tratamiento analítico"²⁴

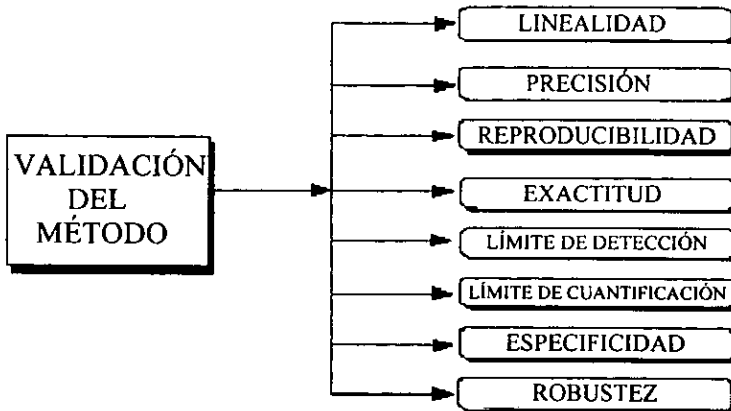


FIGURA 3.1: Los ocho pasos de progresión para la validación del método

3.2 LINEALIDAD²⁴

La linealidad de un sistema es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

La linealidad está señalada generalmente como la variación de la cuesta de la línea de regresión (figura 3.2). El rango es el intervalo entre los niveles superiores y más bajos del analito que se han demostrado para ser determinados con la precisión, la exactitud y linealidad es usando el método según lo escrito.

El rango se expresa en un mínimo de cinco niveles de concentración, junto con rangos especificados como mínimo. Para el análisis, el rango especificado mínimo es a partir del 80-120% de la concentración del blanco. Para una prueba de la impureza, el rango mínimo es del nivel que señala de cada impureza, a 120% de la especificación. (para las impurezas tóxicas o más potentes, el rango debe ser commensurado con el nivel controlado).

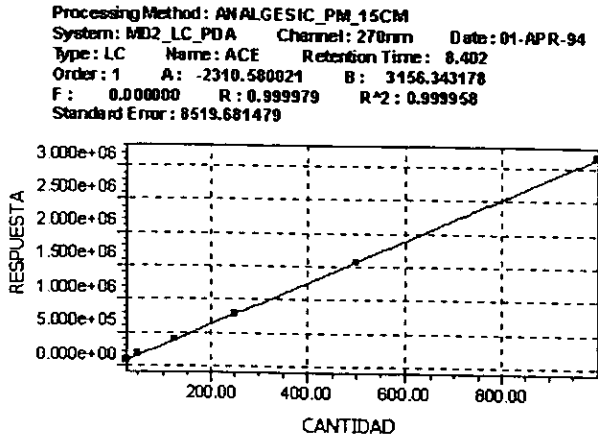


FIGURA 3.2. Curva de calibración de la respuesta en función de la cantidad

3.3 PRECISIÓN.

La precisión de un método analítico es la medida del grado de capacidad de repetición de un método analítico bajo operación normal y se expresa normalmente como la desviación estándar relativa porcentual para un número estadístico significativo de muestras. La precisión se debe realizar en tres diversos niveles: capacidad de repetición, precisión intermedia, y reproducibilidad. La capacidad de repetición son los resultados del método en función de un intervalo corto del tiempo bajo las mismas condiciones (precisión del inter-análisis ver figura 3.3). Debe ser determinado de un mínimo de nueve determinaciones que cubren el rango especificado del procedimiento (por ejemplo, tres niveles, tres repeticiones cada uno) o de un mínimo de seis determinaciones en el 100% de la concentración de la prueba o del blanco. La precisión intermedia son, los resultados dentro de las variaciones del laboratorio debido a los acontecimientos al azar tales como diversos días, analistas, equipo, etc.²⁴

3.4 REPRODUCIBILIDAD.²⁴

La reproducibilidad es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes. Esto se refiere a los resultados de estudios entre diferentes analistas, en diferentes días en el mismo laboratorio o en diferentes laboratorios. La documentación en la ayuda de los estudios de la precisión debe incluir la desviación estándar, el coeficiente de variación, y el intervalo de confianza.

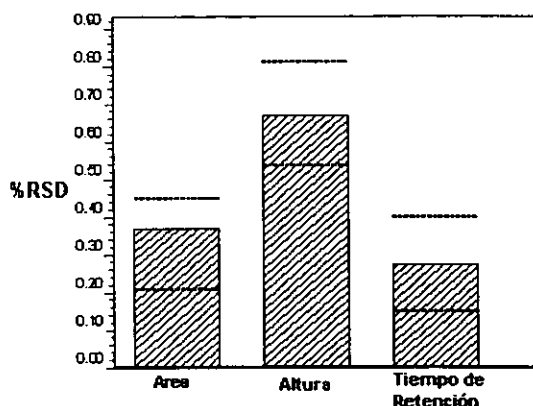


FIGURA 3.3: Documentando la precisión

3.5 EXACTITUD²⁵

La exactitud de un método analítico, es el grado de concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se determina como el por ciento de analitos recuperados en análisis, este se realiza por medio de un estudio a doble ciego. Para el análisis de la sustancia, las medidas de la exactitud son obtenidas por la comparación de los resultados con el análisis de un estándar. Para la cuantificación de impurezas, la exactitud es determinada analizando las muestras con cantidades sabidas de impurezas. (si las impurezas no están disponibles, vea la especificidad).

Para documentar exactitud de la metodología se recomienda el realizar la cantidad de un mínimo de nueve determinaciones con un mínimo de tres niveles de concentración que cubran el rango especificado (por ejemplo, tres concentraciones, con tres réplicas cada uno).

Los datos se deben señalar como la recuperación en por ciento de la cantidad sabida, agregada, o como la diferencia entre el valor malo y verdadero con intervalos de la confianza. La exactitud se puede documentar con el uso de las cartas del control, un ejemplo de las cuales se muestra en la figura 3.4.

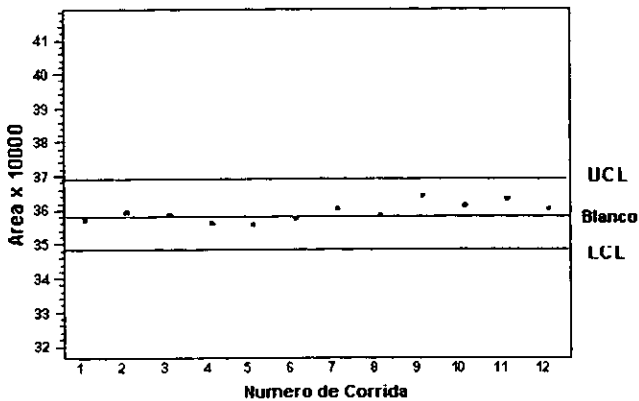


FIGURA 3.4. Carta de control para determinar la exactitud.

3.6 LÍMITE DE DETECCIÓN (LD)²⁵

El límite de la detección (LD) se define como la concentración más baja de un analito en una muestra que pueda ser detectada, pero no se cuantifica. Es una prueba de límite que especifica sobre si ó no un analito está por debajo de cierto valor. Se expresa como la concentración en una relación de transformación señal de ruido.

3.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LC)²⁵

Se define como la concentración más baja de un analito en una muestra que se pueda determinar con la precisión y la exactitud aceptables bajo condiciones operacionales indicadas en el método.

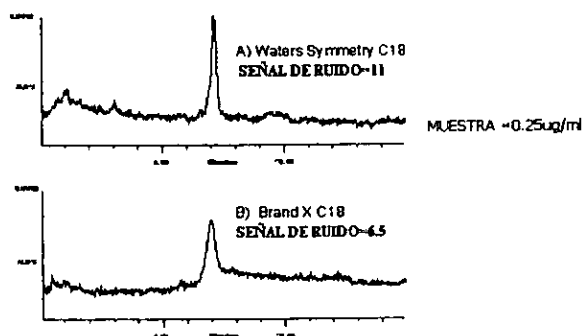


FIGURA 3.5: Efecto de la dimensión de una variable máxima en LD/LC

Picos más sostenidos dan lugar a una relación de transformación señal-ruido más alta, dando por resultado un LC y un LD más bajos. Por lo tanto, la determinación cromatográfica de LC/LD debe considerar el tipo y la edad de la columna, que se determina generalmente concluido el curso del tiempo mientras que la experiencia con el método crece (figura 3.5).

3.8 ESPECIFICIDAD.²⁴

La especificidad es una medida del grado de interferencia tales como otros ingredientes activos, excipientes, impurezas, y productos de la degradación, asegurándose de que una respuesta máxima es debida a un solo componente solamente, es decir que no existan coeluciones. La especificidad es medida y documentada en una separación por la resolución, los platos teóricos (eficiencia), y el factor de coleo. La especificidad se puede también evaluar con los detectores modernos del arsenal de fotiodo que comparan los espectros recogidos a través de un pico matemático como indicador de la homogeneidad máxima

3.9 ROBUSTEZ.²⁴

La robustez es la capacidad de un método de no ser afectado por pequeñas variaciones en los parámetros analíticos. La robustez de un método es evaluada variando parámetros del método tales como por ciento orgánicos, pH, fuerza iónica, temperatura, etc., y determinación del efecto (cualquiera) sobre los resultados del método, la robustez se debe considerar temprano en el desarrollo de un método. Además, si los resultados de un método o de otras medidas son susceptibles a las variaciones en parámetros del método, estos parámetros deben ser adecuadamente controlados y una declaración preventiva incluida en la documentación del método.

3.10. ANÁLISIS CUANTITATIVO.²⁵

Existen 4 métodos básicos de cuantificación, los cuales son, en orden creciente de complejidad (y de exactitud) los cuales se mencionan a continuación:

- a) Normalización de área.
- b) Normalización con factores de respuesta.
- c) Estándar externo.
- d) Estándar interno.

NORMALIZACIÓN DE ÁREA.²⁵

Nos indica la cantidad de un componente relativo a los otros componentes en la muestra. Todos los componentes de la muestra deben responder de igual manera frente al detector. Todos los componentes deben estar bien separados.

$$\% \text{ Area} = \frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

donde: A_i = área de un pico
 $\sum A$ = suma de todas las áreas.

Es el método más simple de todos es el de normalización de áreas. No requiere calibración y, por lo tanto, es usado con frecuencia para una determinación rápida de la composición aproximada.

Las etapas en el cálculo para la muestra son:

- 1.- Sumar todas las áreas
- 2.- Se expresa cada área de pico como un porcentaje del total.
- 3.- Establecer que el % de área es el mismo que el % de composición.

En este método se asume que:

- El detector responde cuantitativamente en la misma forma a todos los componentes de la muestra; es decir, que todos los factores de respuesta son iguales.
- Todos los componentes eluyen de la columna.
- Se detectan todos los componentes y por lo tanto aparecen como picos.

Las ventajas son:

- No requiere calibración.
- El cálculo es rápido y simple.
- La cantidad de muestra inyectada no es crítica.

Las desventajas son:

- Los detectores rara vez funcionan uniformemente, es decir responden vigorosamente a algunos componentes y pobremente a otros. Por lo tanto, no es el método más exacto.
- Deben medirse todos los componentes.

NORMALIZACIÓN CON FACTORES DE RESPUESTA.²⁵

Calcula el por ciento de composición de cada uno de los componentes. Se calculan los factores de respuesta con respecto a un compuesto de referencia para cada componente (A_{ref}).

Se prepara la mezcla de cantidades conocidas de los componentes, se corre un Cromatograma, se asigna un pico de referencia.

Donde:

$$f_i = \frac{conc_i}{A_i} \times \frac{A_{ref}}{conc_{ref}}$$

f_i = factor de respuesta para el pico i

$conc_i$ = concentración del pico i

A_i = área integrada del pico i .

A_{ref} = área integrada del pico elegido como referencia.

$conc_{ref}$ = concentración del pico de referencia

Los factores de respuesta se utilizan para calcular el por ciento de área normalizada para cada uno de los picos.

Cada pico se calcula por separado con su respectivo factor de respuesta.

$$\% A = \frac{A_i \times f_i}{\sum (A \times f)_n} \times 100\%$$

Las etapas del cálculo son:

1.- Para cada pico, se divide el área medida por su factor de respuesta relativo para obtener las áreas corregidas. Esto corrige la respuesta no uniforme del detector.

- 2.-Se suman todas las áreas corregidas.
- 3.-Se expresa cada una de las áreas como un % del área total corregida.
Estos son los % en peso.

Este método asume que todos los componentes salen y se detectan, pero no confía en la uniformidad de los factores de respuesta,

Sus ventajas son:

- Cálculo rápido y simple
- Insensible a la cantidad exacta de muestra inyectada.

Las desventajas son:

- Todos los picos deben ser calibrados. Esto no es una dificultad si son unos pocos, pero si el cromatograma es complejo la identidad de muchos picos puede ser desconocida. El trabajo de identificarlos, obtener muestras de los componentes puros, y realizar las calibraciones puede hacer impráctico este método.
- Todos los componentes deben eluir y todos los picos deben ser medidos.
- Los componentes no detectados pueden introducir errores grandes y desconocidos.

ESTÁNDAR EXTERNO.²⁵

Esta técnica consiste en la preparación de un estándar de concentración semejante al analito en la muestra, realizado bajo las mismas condiciones de operación del ensayo cromatográfico, posteriormente la altura o el área se traza contra la concentración para cada uno de los compuestos de interés.

Se calcula de la siguiente manera:

$$\% A = \left[\frac{A_m C_s}{A_s} \right] [D] [100]$$

Donde.

- %A . = Porcentaje del analito en la muestra.
- A_m = Área de la muestra.
- A_s = Área del estándar.
- C_s = Concentración del estándar.
- D = Factor de dilución.

Desventajas.

- La precisión y exactitud de los datos dependerá tanto de la calidad del estándar, de la preparación de la muestra así como de la inyección.

ESTÁNDAR INTERNO²⁵

Es una técnica extensamente usada para la cuantificación, la cual implica la adición de un estándar interno para compensar varios errores analíticos. Consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia denominada estándar interno tanto a la muestra como al estándar de referencia, preparado a la misma concentración que la muestra para obtener un pico separado en el cromatograma. Esta sustancia se utiliza como etiqueta interna para compensar el efecto de pequeñas variaciones en los parámetros de la separación sobre el tamaño del pico, incluyendo las fluctuaciones en las inyecciones. Se calcula de la siguiente manera:

$$\% A = \left[\frac{R_m C_s}{R_s} \right] [D] [100]$$

Donde:

%A = Porcentaje del analito en la muestra.

R_m = Relación del área del analito a estándar interno en la muestra.

R_s = Relación de área del estándar a estándar interno en la muestra de referencia.

C_s = Concentración del estándar.

D = Factor de dilución.

El estándar interno debe cumplir con ciertos requisitos:

- Debe ser estable (a las condiciones de análisis) de alta pureza, inerte y disponible fácilmente.
- Debe tener propiedades fisicoquímicas similares al analito.
- No debe reaccionar con los componentes de la muestra.
- Debe dar una respuesta en el detector similar a los analitos.
- Debe eluir cerca de los analitos.
- Debe resolverse completamente de los componentes de la muestra.
- No lo debe de contener la muestra

Ventajas

- Permite corregir las variaciones por volumen de inyección.
- Corrige la recuperación en extracciones líquido- líquido, perdidas por derrames incompletas recuperaciones de la fase orgánica en extracciones, corrige por solubilidad parcial de la fase orgánica en la fase acuosa, evaporaciones del disolvente.
- Corrección recuperaciones en extracciones por soxhelt, perdida por derrames, evaporación de disolventes volátiles.

C
A
P
Í
T
U
L
O

4

PARTE
EXPERIMENTAL

EQUIPOS Y REACTIVOS.

EQUIPO:

- Controlador para el sistema de bombas Waters 600.
- Sistema de Liberación para Multisolventes Waters 600E.
- Detector de Fotodiodos Waters PDA (Photodiode Array Detector) 996
- Detector de Fluorescencia Waters Scanning Fluorescence Detector 474
- Desgasificante Dagassit 6324
- Software Millennium Versión 2.15.01
- Columna: C₁₈ Spherisorb S5 (Waters) long. 250 mm. D.I 4.6 mm. Tamaño de partícula 5 µm, poro de 80 °Å, No. Serie 0101171501115
- Columna: C₁₈ Pinnacle PAH (Restek Corporation) long. 250 mm D.I: 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm, poro 120 °Å No. Serie 00020053P

REACTIVOS:

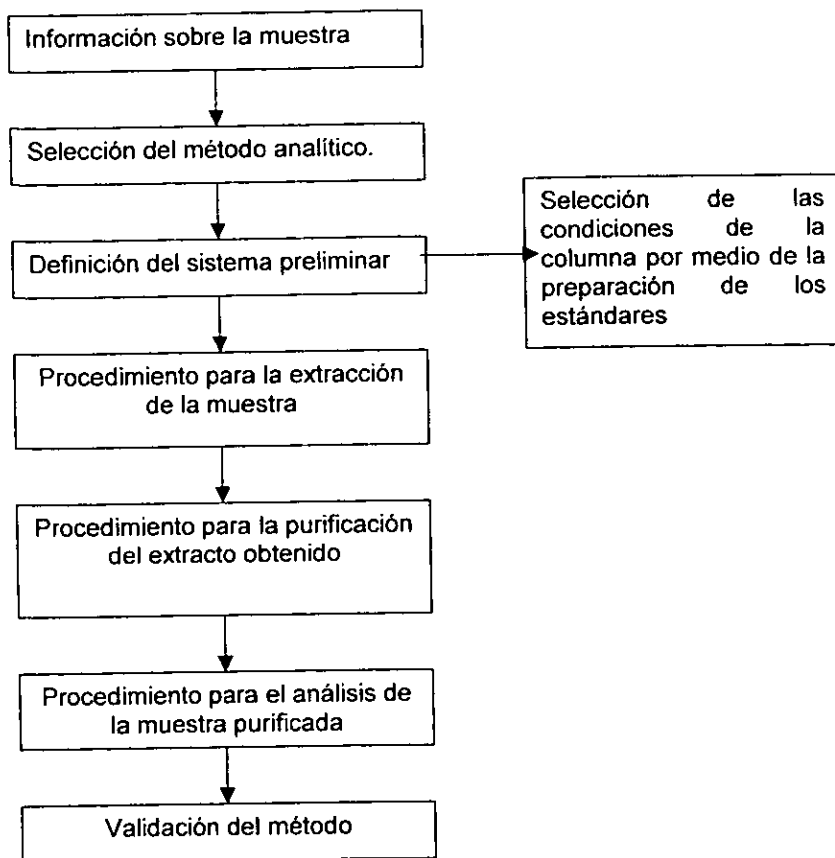
- Cloruro de metileno (Grado reactivo *Repro Qui Fin.*)
 - Acetonitrilo (grado HPLC *Prolabo.*)
 - Hexano (grado reactivo *Merck.*)
 - Éter etílico (grado reactivo *Backer Analyzed.*)
 - Sulfato de sodio anhidro (*Merck*)
 - Cobre (*Merck.*)
 - Alúmina malla 80-200 (*Sigma*)
 - Silicagel malla 60-200 (*J.T Baker*)
 - Fibra de Vidrio
 - Agua bidestilada.
 - Muestras de suelo colectadas en el Instituto Mexicano del Petróleo y de Villahermosa Tabasco.
-

ESTÁNDARES:

Los estándares son de la marca *Chem Service*.

Compuesto	Pureza %	Lote
Acenafteno	99.5	219-68A
Acenaftileno	90.0	212-117A
Antraceno	99.5	193-102A
Benzo[a]antraceno	99.0	211-56A
Benzo[a]pireno	99.5	219-67B
Benzo[b]fluoranteno	99.5	191-88A
Benzo[g,h,i]pirileno	98.9	208-18A
Benzo[k]fluoranteno	99.0	215-142A
Criseno	98.0	207-99A
Fenantreno	99.0	215-118C
Fluoranteno	98.1	214.73B
Fluoreno	99.0	193-88A
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	99.2	222-71A
Naftaleno	99.2	193-101B
Pireno	99.0	200-140A

DESARROLLO DEL MÉTODO (DIAGRAMA 1)



DESARROLLO DEL MÉTODO

La realización de este trabajo consta de diferentes etapas las cuales son (Diagrama 1):

I.-Información sobre la muestra

Recabar toda la información disponibles de los compuestos de la tabla anterior, (propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas, toxicológicas y métodos analíticos existentes) que nos permitan su identificación y cuantificación.

II.-Selección del método analítico.

Después de analizar los diferentes métodos analíticos se selecciono el método USEPA 8310 de acuerdo con el material con el que se contaba en el laboratorio.

III.-Definición del sistema preliminar.

En la selección de las condiciones de trabajo se emplearon dos columnas:

- 1.- Columna: C₁₈ Spherisorb S5 (Waters) long. 250 mm. D.I 4.6 mm. Tamaño de partícula 5 µm, poro de 80 °A, No. Serie 0101171501115
- 2.- Columna: C₁₈ Pinnacle PAH (Restek Corporation) long. 250 mm D.I: 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm, poro 120 °A No. Serie 00020053P.

La utilización de las dos columnas se debe a que en primera instancia, solamente se contaba con la primera columna en el Instituto, por lo que fue necesario trabajar en la optimización del método con esta columna, por medio de una mezcla en solución de los diferentes HPA's cuya concentración de cada uno aparece en la tabla 5.2 y 5.3 como el punto más concentrado.

Las características físicas de nuestra columna 1 en comparación con la recomendado por el método USEPA 8310¹⁴, presentan una gran similitud entre ellas, pero la diferencia es el diámetro interno, siendo de menor diámetro la recomendada por el método (2.6 mm). Basándonos en el método anterior las condiciones para el CLAR es una elusión isocrática por 5 minutos de acetonitrilo/agua (4:6)(v/v), para luego usar 100% de acetonitrilo por una elusión lineal de 25 min con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

De lo anteriormente dicho para la columna 1 se inicio con una velocidad de flujo de 1.8 mL/min porque al tener un diámetro interno mayor es necesario una velocidad de flujo mayor para aumentar la presión del equipo evitando que este se apague por presiones muy bajas, así como el evitar el ensanchamiento y coelusión de los picos cromatográficos. En estas condiciones se obtuvo como resultado que al tener el 100% de acetonitrilo los picos de (criseno, benzo[a]antraceno,

benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]pirileno e indeno[1,2,3-c,d]pireno no se resolvieron adecuadamente (fig. 4.1) , esto puede atribuirse a la velocidad de flujo tan elevada que se esta manejando lo que provoca que los analitos se retengan en un menor tiempo dentro de la columna

Se procedió a corregir esto, disminuyendo la velocidad de flujo a 1.5mL/min, como se observa en la figura 4.2 los compuestos siguen presentan una mala resolución. Se procedió a modificar el gradiente de concentración aumentando la velocidad de cambio de los solventes, con el propósito de disminuir el tiempo de exposición del acetonitrilo al 100% con los analitos. Se obtuvo como resultado que los picos siguen sin resolverse en el tiempo en que el acetonitrilo se encuentra al 100%, como se muestra en la fig. 4.3, provocando que los compuestos tengan un menor tiempo de retención por la velocidad del cambio de gradiente, por lo que fue necesario regresarnos a la condiciones de gradiente iniciales.

Como se ve en las figuras 4.4 a la 4.7 se continuo disminuyendo la velocidad de flujo y se realizaron variaciones en los gradientes de concentración, para obtener un mayor tiempo de retención de los analitos. Estas condiciones mejoran la resolución conforme se realizaban los cambios.

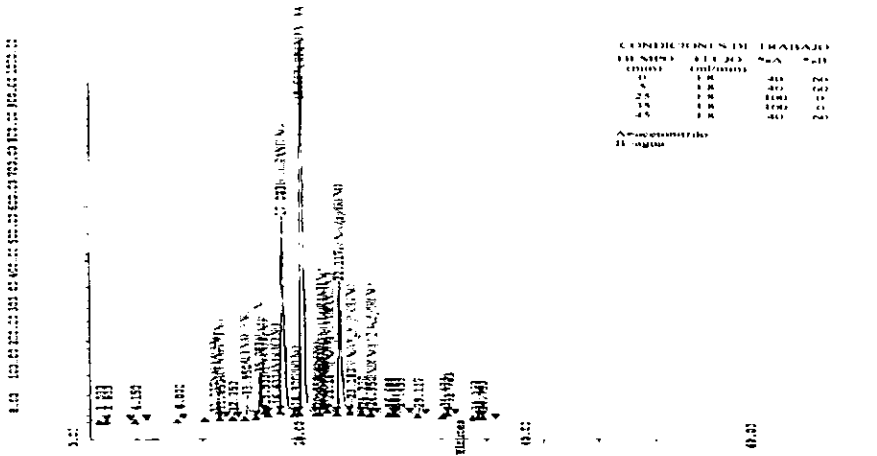


Figura 4.1 Cromatograma de separación de 15 estándares de HPA's a una velocidad de flujo de 1.8 mL/min

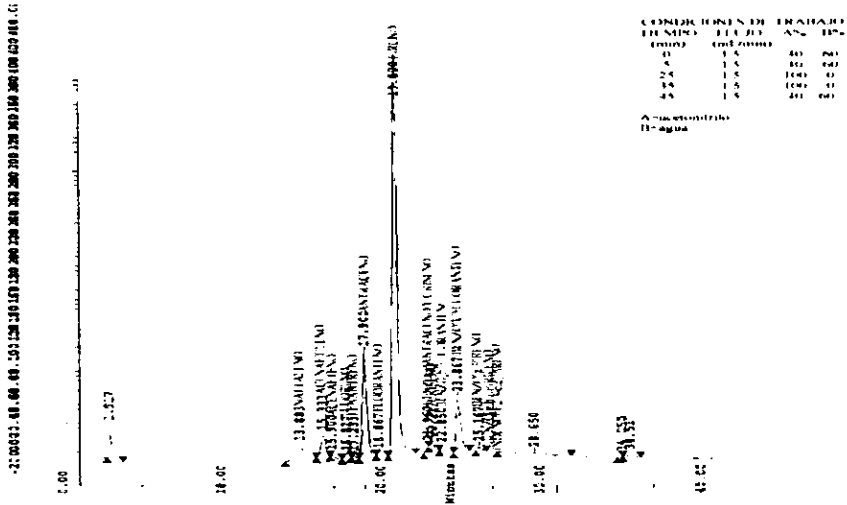


Figura 4.2 Cromatograma de separación de 15 estándares de HPA's a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min

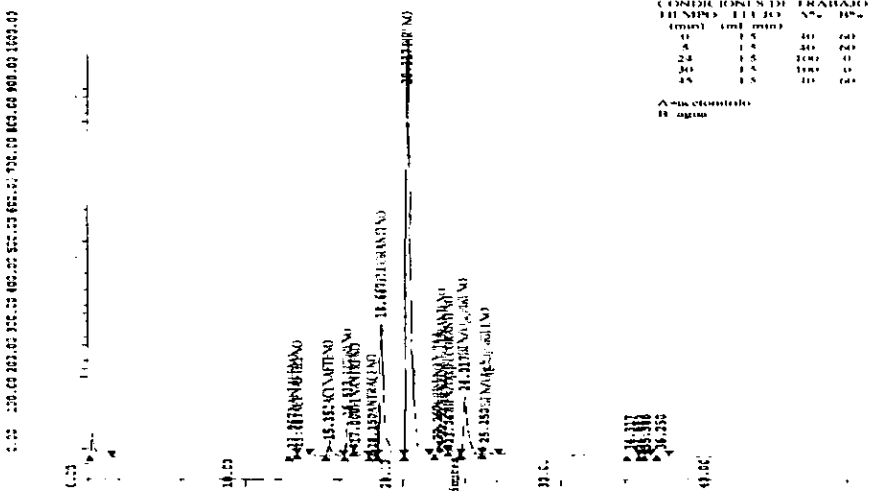


Figura 4.3 Cromatograma de separación de 15 estándares de HPA's a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min reduciendo un poco los tiempos.

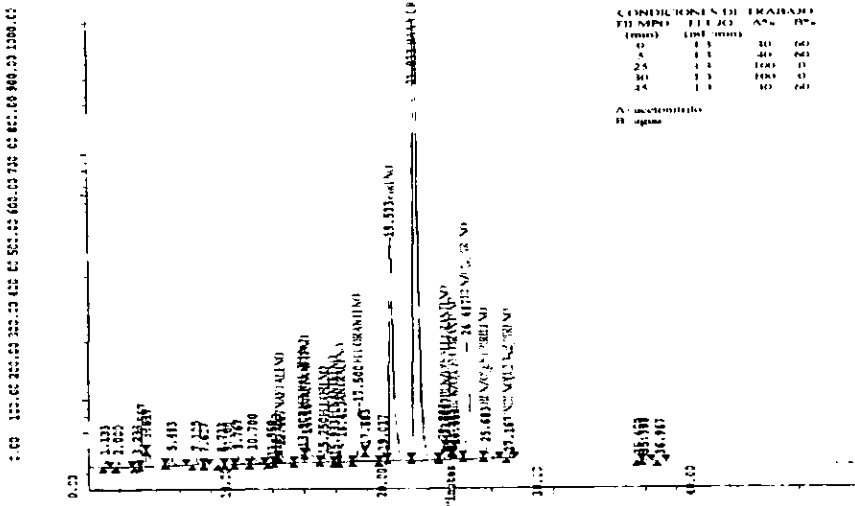


Figura 4.4 Cromatograma de separación de 15 estándares de HPA's a una velocidad de flujo de 1.3 mL/min.

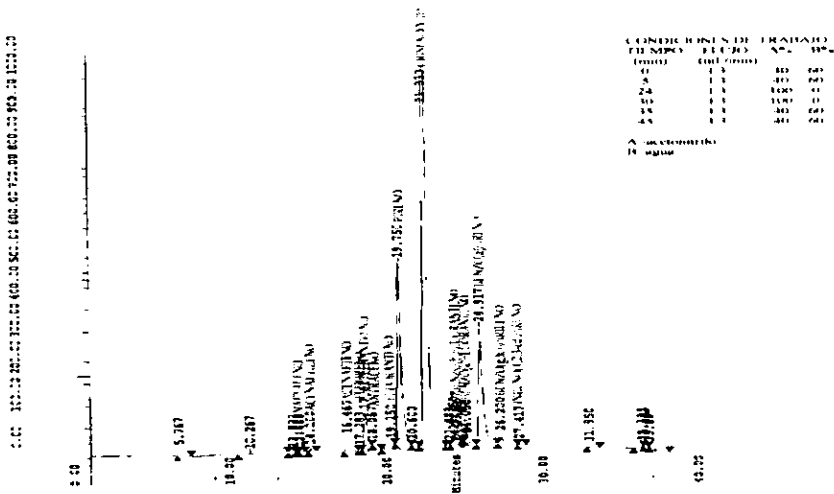


Figura 4.5 Cromatograma de separación de 15 estándares de HPA's a una velocidad de flujo de 1.3 mL/min presentando un cambio en los tiempos del gradiente de concentración.

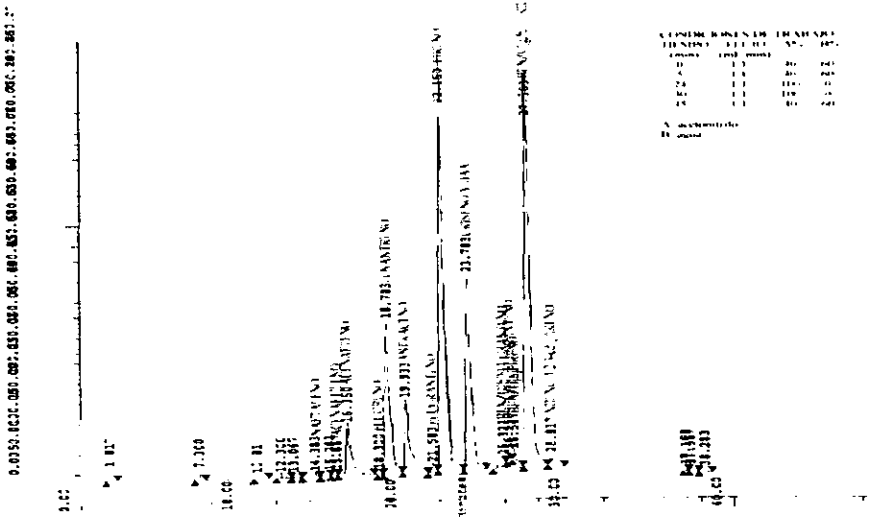


Figura 4.6 Cromatograma de separación de 15 estándares de HPA's a una velocidad de flujo de 1.1 mL/min.

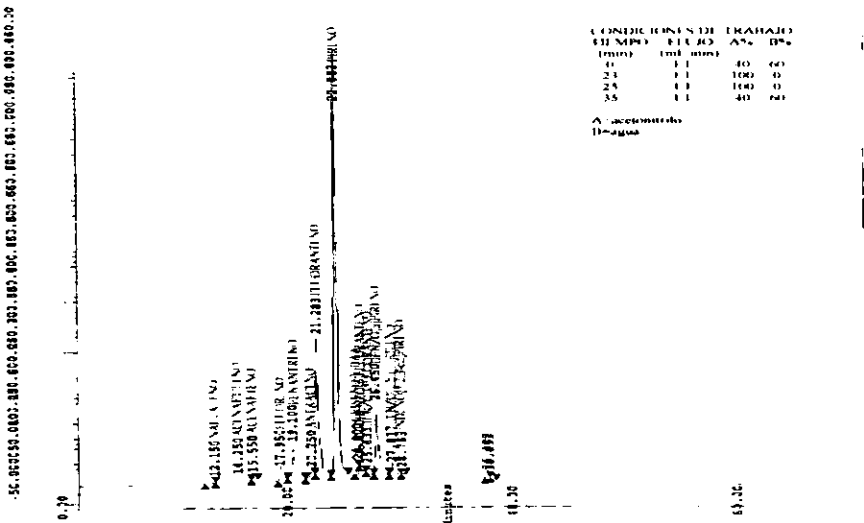


Figura 4.7 Cromatograma de separación de 15 estándares de HPA's a una velocidad de flujo de 1.1 mL/min.

Obteniéndose como las mejores condiciones para la columna 1 las descritas en la tabla 4.1:

Tabla 4.1 Condiciones de trabajo de la columna 1

Tiempo (min.)	Velocidad de flujo (ml/min)	A (%)	B (%)
0	1	40	60
23	1	100	0
25	1	100	0
35	1	40	60

donde A = Acetonitrilo y B = Agua

Para las condiciones de la columna 2 se usaron las especificadas por el proveedor.

Tabla 4.2 Condiciones de trabajo de la columna 2

Tiempo (min.)	Velocidad de flujo (ml/min)	A (%)	B (%)
0	1	50	50
25	1	100	0
50	1	100	0
55	1	50	50

donde A = Acetonitrilo y B = Agua

Con las condiciones obtenidas se determinaron los tiempos de retención para cada uno de los componentes de interés en las dos columnas diferentes que se presentan en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Tiempos de retención obtenidos de los compuestos de interés en las dos columnas estudiadas.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)			
	COLUMNA 1		COLUMNA 2	
	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA
ACENAFTENO	17.187	NA	15.322	NA
ACENAFTILENO	15.920	NA	13.222	NA
ANTRACENO	18.987	19.083	19.172	19.317
BENZO[a] ANTRACENO	22.770	22.800	26.205	26.417
BENZO[a] PIRENO	25.937	26.033	34.895	34.517
BENZO[b] FLUORANTENO	24.987	25.233	30.272	30.833
BENZO[g,h,i] PIRILENO	28.187	27.733	39.005	39.550
BENZO[k] FLUORANTENO	25.237	25.100	32.338	32.650
CRISENO	22.770	22.800	27.422	27.667
FENANTRENO	18.470	18.567	17.455	17.600
FLUORANTENO	20.320	20.417	20.688	20.850
FLUORENO	17.437	NA	15.872	NA
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	28.720	NA	40.688	NA
NAFTALENO	14.703	NA	11.822	NA
PIRENO	20.937	21.033	22.138	22.300

N.A.= NO APLICABLE

Como se puede observar la columna 1 nos presentó el mismo tiempo de retención, para el caso del benzo[a]antraceno y para el criseno, indicándonos que existe una coelución de ambos compuestos, mientras que al emplear la columna 2 este problema se pudo resolver, esto se aprecia mejor mediante las figuras 4.8 y 4.9 donde el pico cromatográfico de benzo[a]antraceno y del criseno se superponen por tener el mismo tiempo de retención.

Esto se corrobora al comparar los espectros de absorción en la figura 4.10, esta nos presenta un estudio espectral de los picos cromatográficos, indicándonos que el primer espectro (de arriba a abajo) se encuentra la elución del benzo[a]antraceno y del criseno; tomando en consideración los espectros encontrados en referencia^{10,23,26} los cuales se encuentran bajo las mismas condiciones de trabajo (ver anexo A); se observó que la señal de la figura 4.10 no corresponde a ninguno de los dos compuestos en cuestión y parece ser la combinación de los dos diferentes compuestos.

Por otra parte en la columna 2 se puede apreciar que todos los componentes son resueltos adecuadamente, esto se afirma con las figuras 4.11 y 4.16 los cuales presentan una correcta separación de nuestros compuestos de interés, así mismo al compararse los espectros de absorción obtenidos de estándares (figuras 4.12-4.15) con los espectros del anexo A, se pudo apreciar claramente que el perfil de cada uno de ellos es el mismo que el obtenido experimentalmente. Por otro lado, al hacer la comparación de las figuras 4.10 y 4.14 se puede observar que para la columna 2 no se presenta la superposición de los espectros de absorción, lo que nos lleva a, proponer que ésta es la mejor columna para realizar este tipo de separaciones.

Con base a lo anterior, podemos establecer que con la columna 2 se tiene una mejor resolución de los picos cromatográficos para los HPA's analizados; por lo que planteamos como la columna de trabajo para el resto del análisis por sus características de resolución.

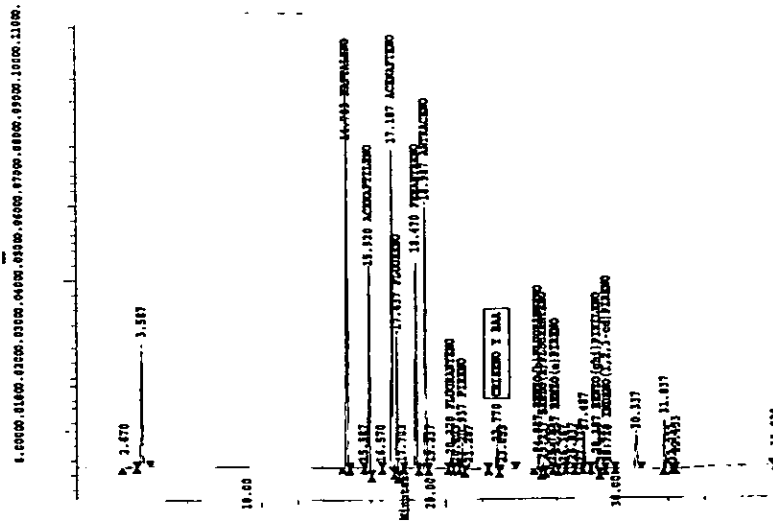


Figura 4.8 Cromatográma de separación de 15 estándares de HPA's en la columna 1 por medio de un detector de arreglo de diodos

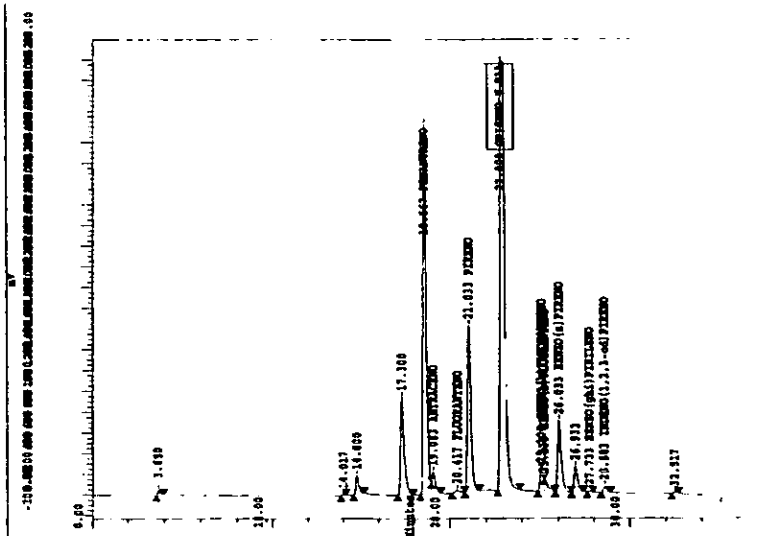


Figura 4.9 Cromatográma de separación de 15 estándares de HPA's en la columna 1 por medio de un detector de fluorescencia.

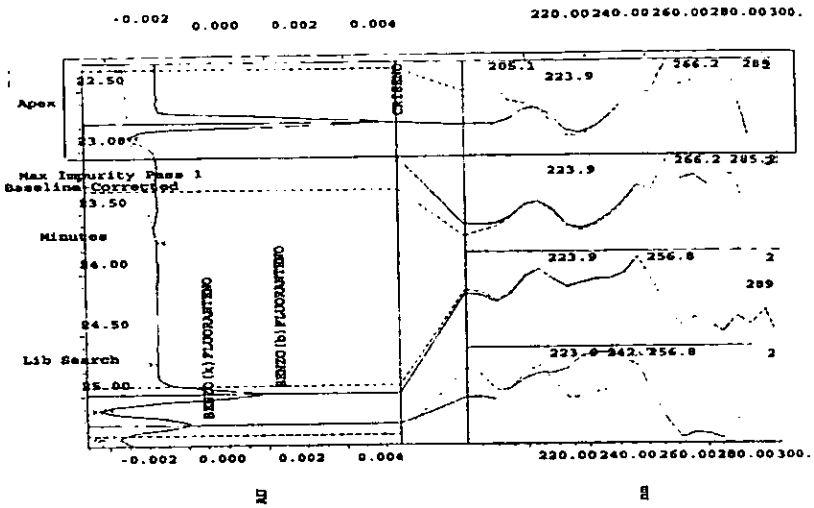


Figura 4.10. Espectro de absorción de estándares (lado derecho) donde se observa la sobreposición de los espectros de los estándares de Benzo[a]antraceno y Criseno (el primero de arriba abajo)

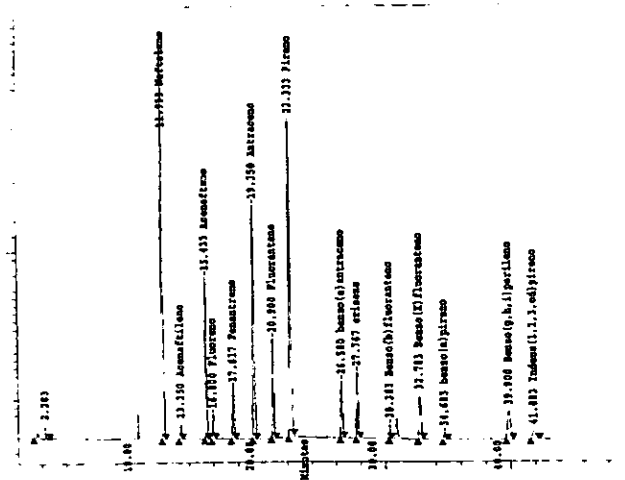


Figura 4.11. Cromatograma de separación de estándares de HPA's en la columna 2 por medio de un detector de arreglo de diodos

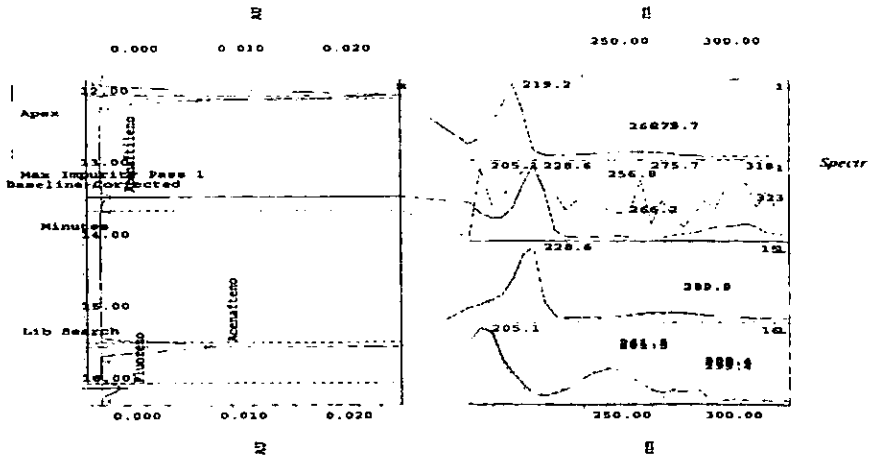


Figura 4.12. Espectro de absorción (derecha de la figura) de los estándares (de arriba a bajo) Naftaleno, Acenafiteno, Acenafeno, Pireno.

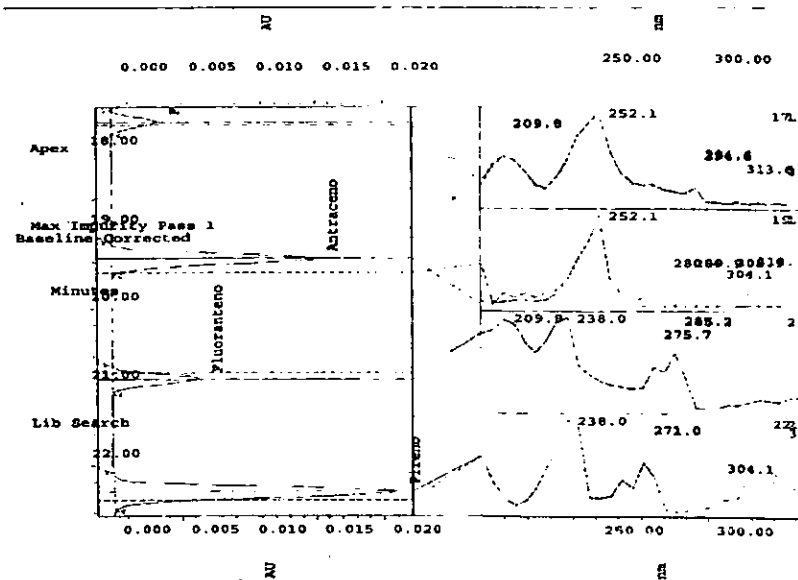


Figura 4.13 Espectro de absorción (derecha de la figura) de los estándares (de arriba a bajo) Fluoreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno.

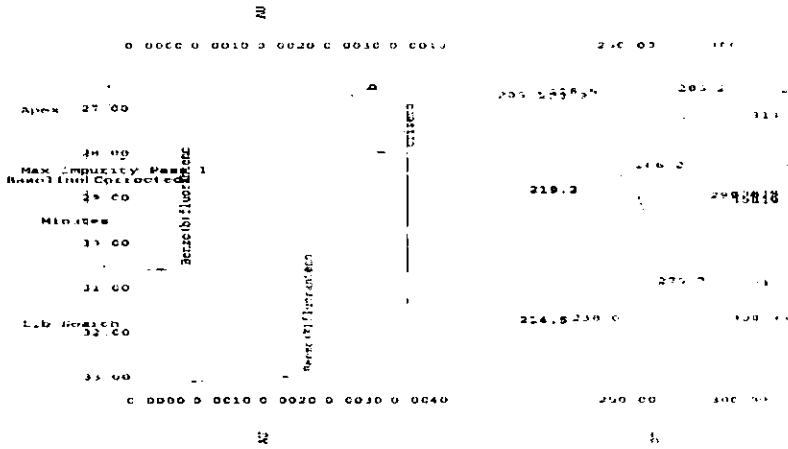


Figura 4.14 Espectro de absorción (derecha de la figura) de los estándares (de arriba a bajo) Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno

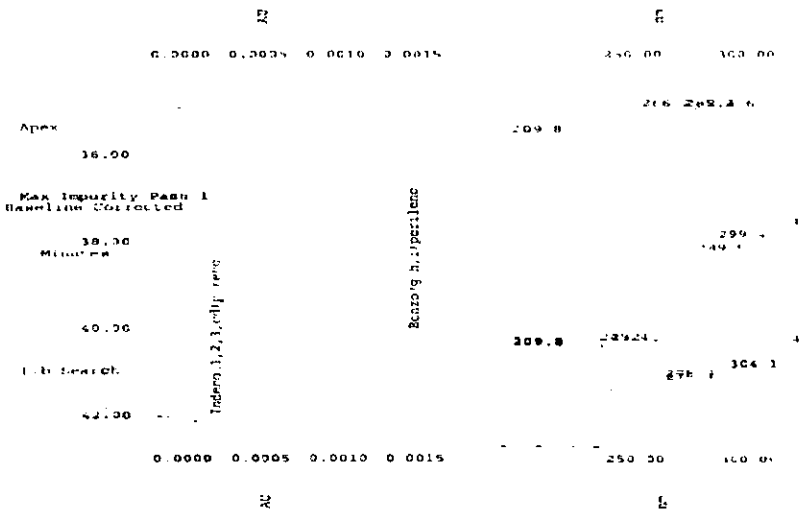


Figura 4.15 Espectro de absorción (derecha de la figura) de los estándares (de arriba a bajo) Benzo[a]pireno, Benzo[ghi]pirileno, Indeno[1,2,3-c,d]pireno

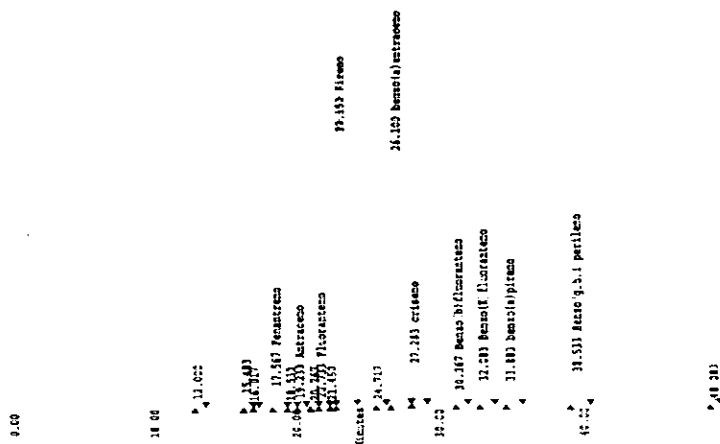


Figura 4.16 Cromatograma de separación de estándares de HPA's en la columna 2 por medio de un detector de fluorescencia.

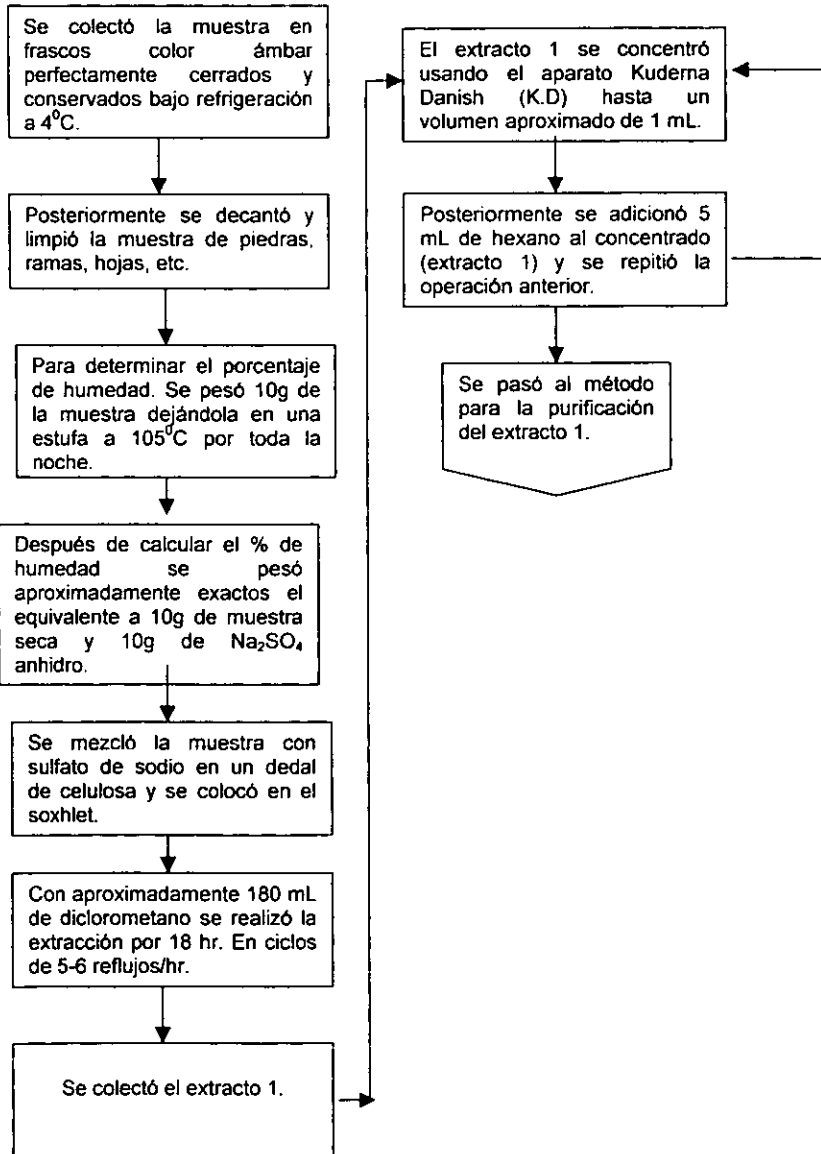
- IV. Procedimiento de la extracción (diagrama 2), basándonos en el mismo método se realizó por medio de soxhlet por 18 hr de 5-6 reflujos por hora, para posteriormente concentrar el extracto en un kuderna-Danish hasta un volumen de un mL realizándole posteriormente un cambio de solvente a hexano para la purificación de este extracto.(extracto 1)
- V. El método de purificación (diagrama 3) consiste de varios pasos en 3 días los cuales son:

Día 1 Activación de la fase estacionaria.

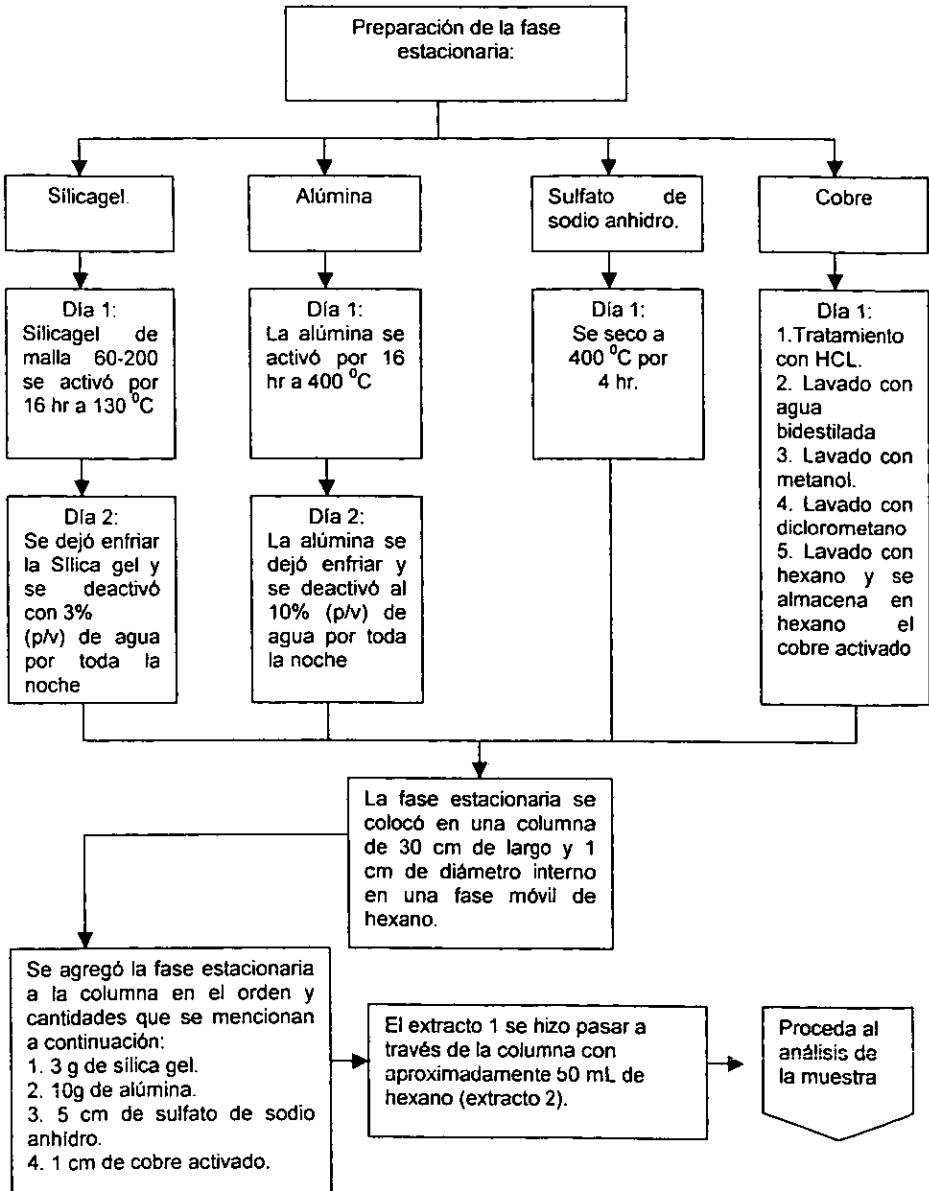
Día 2 Deactivación de la silicagel y alúmina al 3% y 10% respectivamente con agua.

Día 3 Preparación de la cromatografía en columna (diagrama 3): En una columna de vidrio de 1cm de diámetro interno y 30 cm de longitud se colocó en el fondo una pequeña cantidad de fibra de vidrio, posteriormente se adicionó la fase móvil (hexano); al mismo tiempo se pesó la cantidad de silicagel indicada en el diagrama y se formó el atole de silicagel con hexano, añadiendo toda la silicagel a la columna; después se agregó toda la alúmina (en seco), enseguida se completó con 5 cm de sulfato de sodio anhidro (en seco), por último se colocó 1 cm de cobre activado. (todo es en la misma columna). Se adicionó el extracto 1 a la columna.(extracto2)

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN.(DIAGRAMA 2) ^{2, 28 -30}



PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA .(DIAGRAMA 3)^{2, 26 -38}



- VI. Procedimiento para el análisis del extracto 2 (diagrama 4). El extracto recuperado de la etapa de purificación se lleva a concentrar en un Kuderna-Danish (figura 4.17) a un volumen de 1 mL; consecutivamente se le realiza un cambio de solvente agregando 5 mL de acetonitrilo y nuevamente se concentro hasta un volumen mínimo (extracto 3). Se inyecta un volumen de 5 μ l del extracto 3 en el CLAR.

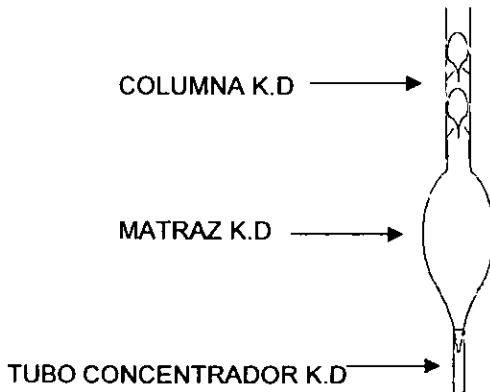
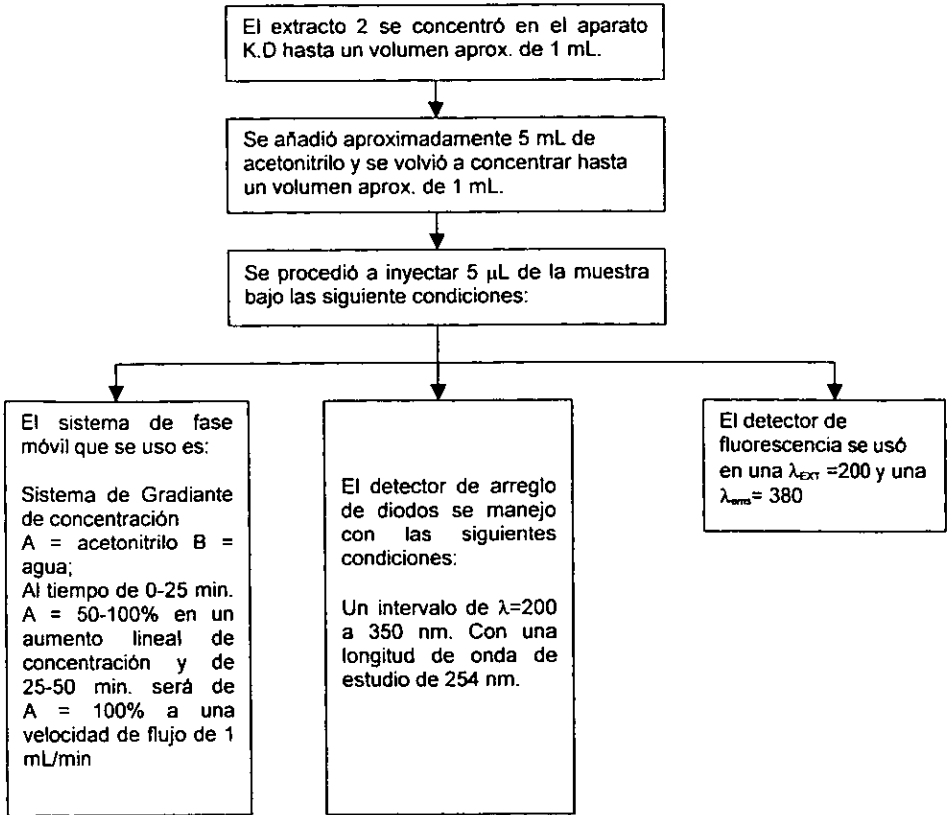


Figura 4.17 Equipo concentrador Kuderna-Danish (K.D)

PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE LA MUESTRA. (DIAGRAMA 4)^{2,26}
38.

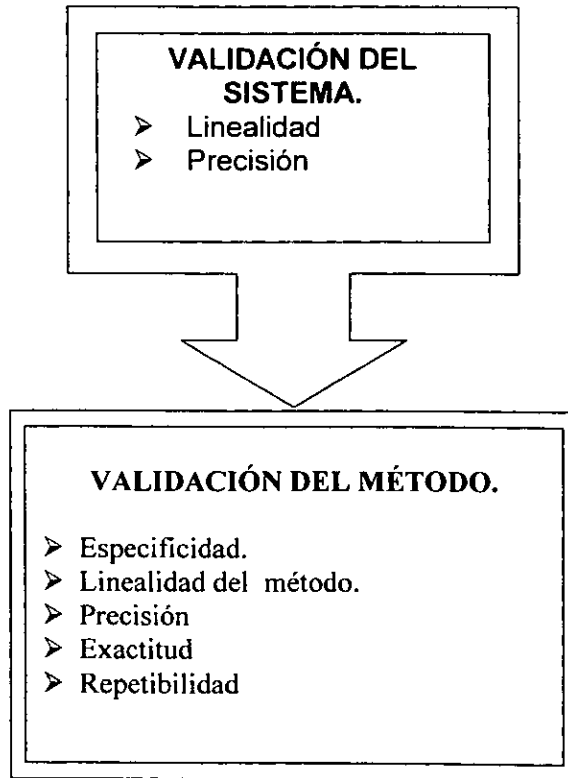


C
A
P
Í
T
U
L
O
5

RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

VALIDACION DEL SISTEMA Y MÉTODO.

Con la finalidad de contar con un método que permita la adecuada identificación y cuantificación de HPA's se procedió a la validación del sistema y del método evaluando los siguientes parámetros.



Por tal fin se consideraron los criterios estadísticos de aceptación que se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Criterios de evaluación y aceptación para la validación del sistema y del método.

CARACTERÍSTICA A EVALUAR	CRITERIO DE EVALUACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Linealidad del sistema	C.V. (coeficiente de variación). r^2 (coeficiente de determinación). r (coeficiente de correlación)	$C:V \leq 1.5\%$. $r^2 \geq 0.999$. $r \geq 0.999$.
Precisión del sistema	Coficiente de Variación.	$C:V < 1.5\%$
Linealidad del método	C.V. (coeficiente de variación). r^2 (coeficiente de determinación). r (coeficiente de correlación)	$C:V \leq 1.5\%$. $r^2 \geq 0.999$. $r \geq 0.999$.
Precisión del método	C.V.(coeficiente de variación)	$C.V. < 1.5\%$
Exactitud	Prueba de "t de student"	$t_{cal} < t_{critica} (\alpha = 0.05)$
Repetibilidad	Modelo factorial jerárquico	$F_{cal} \leq F_{critica} (\alpha = 0.05)$

VALIDACION DEL MÉTODO ANALITICO.

1.LINEALIDAD DEL SISTEMA.

La linealidad del sistema se determinó por medio de una curva de calibración (respuesta analítica en función de la concentración) utilizando cinco diferentes niveles de concentración de los compuestos de interés, empleando dos detectores diferentes (Arreglo de diodos y fluorescencia) preparadas a partir de la misma solución stock. La curva de calibración se preparó en cuatro días y por dos analistas diferentes, en la figura 5.1 podemos observar los cromatogramas obtenidos.

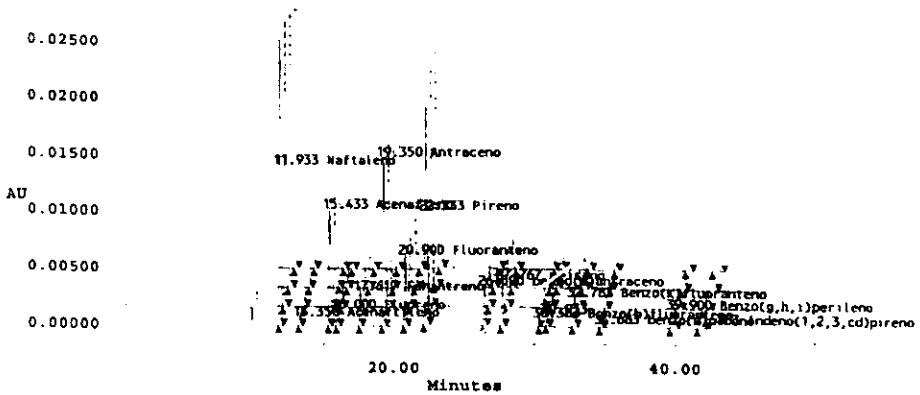


Figura 5.1. Curva de calibración de 15 HPA's en el detector de arreglo de diodos

En la tabla 5.2 y 5.3 se muestran las concentraciones utilizadas con sus respectivas respuestas, las cuales se utilizaron para evaluar el sistema. Los parámetros estimados para el análisis de la linealidad del sistema en el detector de arreglo de diodos y el detector de fluorescencia fueron el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación, intercepto, prueba del intercepto, pendiente prueba de la pendiente, análisis de variancia y coeficiente de variación, estos resultados se representan en las tablas 5.4, 5.5 y 5.6 las cuales nos ilustran una relación lineal significativamente alta, como nos lo dice el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación, los cuales son lo suficientemente grandes para pasar los criterios de aceptación, excepto en los casos de benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[g,h,i]pirileno y fenantreno que presentaron un coeficiente de correlación y de determinación bajos para el detector de arreglo de diodos, así como unos coeficientes de variación altos para los criterios de aceptación marcados al principio, en el análisis de los resultados en este mismo detector hallamos otros compuestos como el benzo[a]antraceno, fenantreno, fluoreno, e indeno[1,2,3-c,d]pireno que presentaron un coeficiente de variación alto, pero un coeficiente de correlación y de determinación buenos lo que nos indica que presentan una buena linealidad pero una pobre precisión.

Lo anterior se puede apreciar por medio de los gráficos de residuales (ver anexo B) el cual nos representa las desviaciones que presentan los datos experimentales con respecto a los valores estimados en la regresión lineal, todo esto nos indica que los datos son bajos en precisión y poco confiables para el análisis cuantitativo, esto se lo atribuimos a que estos compuestos son poco sensibles en el detector de arreglo de diodos a las concentraciones manejadas para estos compuestos mencionados, mientras que por el otro lado con el detector de fluorescencia el único componente que se encuentra por encima de los criterios de aceptación es el benzo[b]fluoranteno, mientras que los de más presenta una buena precisión así como un buen coeficiente de linealidad.

Por otra parte, se puede ver en los resultados (tabla 5.4 ,5.5 y 5.6) que ninguna curva de calibración parte de un intercepto igual a cero sino que presentan diferentes valores de intercepto y pendientes por lo que se evaluó si eran significativamente diferentes al valor de cero con un nivel de significancia (α)=0.05. Por lo que se establecieron las siguientes hipótesis:

Hipótesis.

- Ho: La ordenada al origen es igual a cero
- Hi: La ordenada al origen es diferente a cero

Criterio de aceptación:

- Si $t_{cal} < t_{critica}$ no se rechaza Ho
- Si $t_{cal} > t_{critica}$ se rechaza Ho

Analizando esta hipótesis y los intervalos de confianza se puede mencionar que la mayor parte de los componentes presentan un valor que es similar a cero para el intercepto, a excepción de benzo[a]antraceno para el detector de fluorescencia y, acenafteno, fenantreno y fluoreno para el detector de arreglo de diodos.

Esto se adjudica a las posibles interferencia que existieron en el material de vidrio, debido a que la limpieza con mezcla crómica que se le realizaba al material no era suficiente, porque este siempre quedaban con cierto aroma a gasolina, estas pequeñas impurezas dentro del material de vidrio nos pudo provocar dichas desviaciones del origen, de todas formas el análisis estadístico realizado con un intervalo de confianza del 95% acepta a estos valores como un valor semejante a cero, así mismo estos resultados nos dan una idea de que el tipo de errores presentes en el método son de tipo indeterminado presentes dentro del desarrollo los cuales pueden ser por ejemplo: la temperatura, la humedad, variaciones de voltaje, vibraciones, etc., originando las desviaciones del intercepto y las desviaciones en la precisión de ciertos compuestos que se trataron al principio, ya

que al manejarse concentraciones tan pequeñas, los mínimos errores posiblemente generarían una baja precisión en el sistema.

También, se puede mencionar que lo anterior se explica a partir de la variación que existe en los gráficos de residuales (anexo B) los cuales nos esquematizan que las variaciones en el sistema son al azar y no sistemáticos, porque de lo contrario los gráficos de residuales presentarían un mismo perfil en las variaciones de cada una de las concentraciones con respecto a su respuesta para cada uno de los compuestos.

Por otra parte se realizó un estudio de variancia (tabla 5.6) para poder determinar si existe una relación lineal entre la respuesta y la concentración dentro de las curvas de calibración por lo cual se tuvo que plantear la siguiente hipótesis:

Hipótesis

- Ho: No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica
- Hi: Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

Criterio de aceptación:

- Si $F_{cal} < C_{crítica}$ no se rechaza
- Si $F_{cal} > C_{crítica}$ se rechaza.

Comparando con los resultados podemos ver que todos los compuestos presentaron una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

De esta forma con los resultados de la Tabla 5.2 y 5.3 podemos hacer una comparación de respuestas obtenidas, entre detectores pues se consigue apreciar que las respuestas del detector de fluorescencia son mayores a las de detector de arreglo de diodos, ésta puede ser otra razón por la cual el sistema al ser más sensible para este detector los errores indeterminados se disminuyen en comparación con el otro detector confirmándonos lo anterior dicho.

Las tablas 5.7 y 5.8 exponen los resultados obtenidos para el estudio de repetibilidad, el cual se realizó por sextuplicado a una misma concentración en dos diferentes días por un mismo analista. De los resultados obtenidos en la tabla 5.7 y 5.8 se les realizó un estudio de coeficiente de variación los cuales se presentan en la tabla 5.9 estos datos nos exponen que el sistema es preciso y que presenta repetibilidad entre días.

Tabla 5.2. Respuestas obtenidas para cada una de la concentraciones de los diferentes compuestos en un detector de arreglo de diodos

COMPUESTO	CONCENTRACION ($\mu\text{g/Lt}$)	UNIDADES DE AREA BAJO LA CURVA			
		1	2	3	4
ACENAFTENO	99	10460	10656	10601	10676
	169	18076	18040	18080	18065
	441	46880	46984	46992	46970
	653	69561	69534	69541	69552
	792	84310	84362	84232	84378
ACENAFTILENO	159	852	877	886	882
	206	1179	1183	1135	1187
	259	1438	1470	1462	1438
	804	4406	4466	4498	4458
	1066	5919	5943	5921	5900
ANTRACENO	50	8134	8110	8194	8176
	300	48103	48239	48182	48343
	500	81603	81651	81936	81943
	700	113355	113417	113453	113398
	900	146382	146344	146234	146191
BENZO[a] ANTRACENO	60	3951	3933	3999	3942
	180	11035	11302	11053	11192
	300	19536	19641	19541	19574
	420	27019	27091	27278	27241
	540	35128	35058	35071	35150
BENZO[a]PIRENO	6.4	464	417	429	448
	19.2	1251	1252	1238	1222
	32	2261	2243	2225	2241
	44.8	2887	2863	2825	2874
	57.6	4233	4273	4259	4279

$\lambda=254$ nm La columna 1 y 2 representa valores obtenidos en dos días diferentes por un mismo analista la columna 3 y 4 representa los valores en los siguientes dos días por un analista diferente.

Tabla 5.2 (CONTINUACIÓN). Respuestas obtenidas para cada una de la concentraciones de los diferentes compuestos en un detector de arreglo de diodos

COMPUESTO	CONCENTRACION (µg/Lt)	UNIDADES DE AREA BAJO LA CURVA			
		1	2	3	4
BENZO[b] FLUORANTENO	42.4	0	0	0	0
	127.2	1540	1513	1595	1500
	212	2526	2583	2593	2542
	296.8	3547	3595	3543	3505
	381.6	4758	4701	4725	4775
BENZO[g,h,i]PIRILENO	104	0	0	0	0
	312	120	100	119	99
	520	300	320	350	321
	728	502	504	509	507
	936	799	785	784	781
BENZO[k] FLUORANTENO	56	3427	3489	3445	3445
	168	10042	10060	10079	10069
	280	16771	16929	16834	16455
	392	23766	23900	23953	23786
	504	30662	30545	30531	30453
CRISENO	44	4469	4474	4443	4446
	132	13564	13426	13072	13582
	220	22213	22207	22230	22185
	308	31195	31145	31182	31130
	396	40369	40410	40251	40317
FENANTRENO	60	3493	3540	3579	3566
	180	10602	10698	10627	10623
	300	17484	17662	17831	17336
	420	24371	24591	24583	24049
	540	29763	29747	29744	29765

$\lambda=254$ nm La columna 1 y 2 representa valores obtenidos en dos días diferentes por un mismo analista la columna 3 y 4 representa los valores en los siguientes dos días por un analista diferente.

Tabla 5.2 (CONTINUACIÓN). Respuestas obtenidas para cada una de la concentraciones de los diferentes compuestos en un detector de arreglo de diodos

COMPUESTO	CONCENTRACION ($\mu\text{g/Lt}$)	UNIDADES DE AREA BAJO LA CURVA			
		1	2	3	4
FLUORANTENO	50	8134	8110	8194	8176
	300	48103	48239	48182	48343
	500	81603	81651	81936	81943
	700	113355	113417	113453	113398
	900	146382	146344	146234	146191
FLUORENO	55	1573	1598	1551	1552
	126	3521	3501	3567	3554
	205	5913	5979	5851	5990
	300	8485	8408	8427	8419
	504	14154	14106	14101	14092
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	51.2	1133	1153	1121	1198
	153.6	3375	3310	3367	3344
	256	5650	5641	5563	5650
	358.4	8043	7851	7868	7873
	460.8	9964	10090	10120	10188
NAFTALENO	51	7740	7799	7715	7770
	310	46930	46950	46766	46876
	728	110389	110360	110209	110322
	1095	165807	165817	165824	165854
	1404	212708	212640	212629	212642
PIRENO	308	22515	22598	22582	22013
	882	65281	65336	65329	65202
	1540	112260	112142	112297	112156
	2156	156632	156316	156646	156482
	2772	206433	206740	206011	206124

$\lambda=254$ nm La columna 1 y 2 representa valores obtenidos en dos días diferentes por un mismo analista la columna 3 y 4 representa los valores en los siguientes dos días por un analista diferente

Tabla 5.3. Respuestas obtenidas para cada una de la concentraciones de los diferentes compuestos en un detector fluorescencia

COMPUESTO	CONCENTRACION ($\mu\text{g/Lt}$)	UNIDADES DE AREA BAJO LA CURVA			
		1	2	3	4
ANTRACENO	100	8690	8705	8749	8750
	300	26225	26415	26580	26641
	500	43037	43117	43381	43657
	700	59096	60502	60503	60517
	900	78009	78095	78328	78709
BENZO[a] ANTRACENO	60	1983136	1984427	1987432	1987581
	180	5805927	5808112	5825161	5846528
	300	9661174	9686955	9690684	9693873
	420	13556859	13565250	13569650	13574093
	540	17412791	17432846	17473968	17481280
BENZO[a]PIRENO	6.4	96162	96281	96386	96386
	19.2	278623	281181	283658	284653
	32	481426	481666	481764	485235
	44	661014	661744	664578	665081
	57.6	841149	841655	842947	843042
BENZO[b] FLUORANTENO	42.4	41117	41869	41906	41967
	127.2	130025	130231	130588	130658
	212	212145	211677	214718	214780
	296	294688	296935	297316	299179
	381	380723	386129	386384	389831
BENZO [g,h,i]PIRILENO	104	190888	191198	191306	193589
	312	577041	577620	577620	577883
	520	957594	953542	954175	958888
	728	1350097	1352252	1352600	1352109
	936	1735849	1738380	1738413	1739049

λ_{exc} =200 nm y λ_{ems} =380 nm La columna 1 y 2 representa valores obtenidos en dos días diferentes por un mismo analista la columna 3 y 4 representa los valores en los siguientes dos días por un analista diferente.

Tabla 5.3 (CONTINUACIÓN). Respuestas obtenidas para cada una de la concentraciones de los diferentes compuestos en un detector fluorescencia

COMPUESTO	CONCENTRACION ($\mu\text{g/Lt}$)	UNIDADES DE AREA BAJO LA CURVA			
		1	2	3	4
BENZO[k] FLUORANTENO	56	84038	84154	84158	84406
	168	257128	257765	258924	259542
	280	430986	436000	443320	443905
	392	598300	600173	600963	604559
	504	772928	779455	782583	783945
CRISENO	44	170039	170379	170621	173350
	132	509345	511310	511340	514413
	220	844503	853373	855481	855983
	308	1201224	1202235	1208191	1211604
	396	1537986	1540540	1540709	1540746
FENANTRENO	60	71114	71316	71561	71734
	180	214002	214155	214387	214416
	300	356197	356607	356822	356951
	420	499394	500814	505284	506907
	540	629951	630189	630634	631479
FLUORANTENO	144	12393	12426	12433	12558
	432	37556	37565	37783	37889
	720	62357	62380	62551	62595
	1008	89719	90153	90249	90281
	1296	111797	115089	115348	115442
PIRENO	308	1691664	1695762	1698131	1698515
	924	5060054	5092745	5062966	5088308
	1540	8520449	8534983	8498140	8506880
	2156	11517626	12050682	12085785	12086237
	2772	15166300	15400556	15404673	15471926

$\lambda_{\text{ext}}=200$ nm y $\lambda_{\text{em}}=380$ nm La columna 1 y 2 representa valores obtenidos en dos días diferentes por un mismo analista la columna 3 y 4 representa los valores en los siguientes dos días por un analista diferente.

Tabla 5.4. Parámetros estadísticos de cada una de las regresiones obtenidas en el detector de arreglo de diodos.

COMPUESTO	b	LIIC DE b	LSIC DE b	m	LIIC DE m	LSIC DE m	C.C. (r)	C.D. (r ²)
ACENAFTENO	65.684657	19.50140061	111.867914	106.4017	106.310683	106.492776	0.99992	0.99985
ACENAFTILENO	12.492705	-7.704151583	32.6895626	5.538306	5.50569334	5.57091971	0.99999	0.99999
ANTRACENO	171.41490	-457.074775	263.184503	162.5843	161.956043	163.212713	0.99996	0.99993
BENZO[a] ANTRACENO	-188.9375	-431.174128	53.2991275	65.25229	64.5494919	65.9550914	0.99976	0.99952
BENZO[a]PIRENO	-106.925	-266.318408	52.4684076	72.37890	68.0434639	76.7143486	0.99276	0.98557
BENZO[b] FLUORANTENO	-395.45	-533.445706	-257.454294	13.54952	12.9829724	14.1160842	0.99645	0.99292
BENZO[ghi] PIRILENO	-147.625	-189.121949	-106.128051	0.947355	0.8778972	1.01681434	0.98921	0.97854
BENZO[k] FLUORANTENO	-63.2625	-213.560053	87.0350529	60.69754	60.2303403	61.164749	0.99987	0.99975

LIIC= LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA; LSIC= INTERVALO SUPERIOR DEL INEVALO DE CONFIANZA;
C.C.=COEFICIENTE DE CORRELACIÓN; C.D. = COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN; b= INTERCEPTO; m= PENDIENTE.

Tabla 5.4.(CONTINUACIÓN) Parámetros estadísticos de cada una de las regresiones obtenidas en el detector de arreglo de diodos.

COMPUESTO	b	LIIC DE b	LSIC DE b	m	LIIC DE m	LSIC DE m	C C. (r)	C.D (r ²)
CRISENO	-58.4625	-172.75557	55.83057	101.7116	101.259469	102.163827	0.99995	0.99991
FENANTRENO	637.325	143.115406	1131.53459	55.15125	53.7174025	56.5850975	0.99862	0.99725
FLUORANTENO	-400.9436	-717.024569	-84.8627831	43.80632	43.4213732	44.191275	0.99984	0.99968
FLUORENO	72.601425	2.46402161	142.738829	27.91806	27.6716059	28.1645166	0.99984	0.99968
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	15.5375	-46.1581814	77.2331814	21.91235	21.702591	22.122116	0.99981	0.99962
NAFTALENO	-2.439862	-60.3747139	55.4949892	151.4629	151.396453	151.529383	0.99999	0.99999
PIRENO	-634.8049	-1136.91956	-132.690296	74.48518	74.2007032	74.769661	0.99997	0.99994

LIIC= LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA; LSIC= INTERVALO SUPERIOR DEL INTEVALO DE CONFIANZA;
C C.=COEFICIENTE DE CORRELACIÓN; C.D. = COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN; b= INTERCEPTO; m= PENDIENTE.

Tabla 5.5. Parámetros estadísticos de cada una de las regresiones obtenidas en el detector de fluorescencia

COMPUESTO	b	LIIC DE b	LSIC DE b	m	LIIC DE m	LSIC DE m	C.C. (r)	C.D. (r ²)
ACENAFTENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ACENAFTILENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ANTRACENO	182.1125	-280.296769	644.521769	86.40637	85.601423	87.2113262	0.99982	0.99964
BENZO[a] ANTRACENO	32839.975	11083.8458	54596.1042	32228.48	32165.367	32291.6088	0.99999	0.99998
BENZO[A]PIRENO	4687.6620	-3294.89466	12670.2188	14716.38	14498.115	14934.6606	0.99955	0.99910
BENZO[b] FLUORANTENO	-270.7210	-2535.64188	1994.19988	1010.362	1001.0493	1019.67635	0.99982	0.99965
BENZO[ghj] PIRILENO	-3639.975	-7397.38292	117.43292	1858.931	1852.6427	1865.22121	0.99997	0.99995
BENZO[k] FLUORANTENO	-5572.525	-5731.00997	2585.95997	1547.979	1535.0522	1560.90579	0.99985	0.99971

LIIC= LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA; LSIC= INTERVALO SUPERIOR DEL INTEVALO DE CONFIANZA;
C.C.=COEFICIENTE DE CORRELACIÓN; C.D. = COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN; NA= NO APLICABLE; b= INTERCEPTO;
m= PENDIENTE

ESTE TEXTO NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Tabla 5.5(CONTINUACIÓN). *Parámetros estadísticos de cada una de las regresiones obtenidas en el detector de fluorescencia*

COMPUESTO	b	LIIC DE b	LSIC DE b	m	LIIC DE m	LSIC DE m	C C. (r)	C.D (r ²)
CRISENO	-1833.275	-6604.56589	2938.01589	3900.008	3881.1318	3918.88523	0.99995	0.99990
FENANTRENO	3414.7625	-1218.27584	8047.80084	1172.603	1159.1613	1186.04493	0.99973	0.99946
FLUORANTENO	-655.6125	-1616.12619	304.901194	89.00529	87.844156	90.1664338	0.99965	0.99930
FLUORENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NAFTALENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PIRENO	-30569.83	-152049.085	90909.4105	5550.122	5481.4641	5618.7812	0.99968	0.99937

LIIC= LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA; LSIC= INTERVALO SUPERIOR DEL INTEVALO DE CONFIANZA;
 C C.=COEFICIENTE DE CORRELACIÓN; C.D. = COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN; NA= NO APLICABLE b= INTERCEPTO;
 m= PENDIENTE.

Tabla 5.6. Análisis de la varianza y coeficiente de variación de las curvas de calibración para los 15 HPA's que se estudiaron.

COMPUESTO	% C.V (COEFICIENTE DE VARIACIÓN)		F calculada		T calculada	
	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA
ACENAFTENO	0.84236186	NA	6028288.22	NA	2.98806236	NA
ACENAFTILENO	1.69489083	NA	127288.204	NA	1.29952004	NA
ANTRACENO	0.65852097	1.09177223	295526.082	50859.6066	-0.56555837	0.82741521
BENZO[a] ANTRACENO	2.26762018	1.00893322	38049.4954	1150677.42	-1.63865915	3.17125717
BENZO[a]PIRENO	5.90959523	1.45769018	1230.20576	20064.2841	-1.40935103	1.23374258
BENZO[b] FLUORANTENO	67.5431352	1.52478652	2524.5467	51945.5647	-6.02055157	-0.25111878
BENZO[g,h,i]PIRILENO	83.7759545	0.49132126	821.098094	385612.821	-7.47401593	-2.03526202
BENZO[k] FLUORANTENO	1.28500187	1.36827992	74498.7469	63295.1461	-0.88431036	-0.79446121

$F_{0.95, 4, 12} = 4.41$

$T_{0.025, 19} = 2.0930$

NA. No aplicable

Tabla 5.6 (CONTINUACIÓN) Análisis de la varianza y coeficiente de variación de las curvas de calibración para los 15 HPA's que se estudiaron

COMPUESTO	% C.V (COEFICIENTE DE VARIACIÓN)		F calculada		T calculada	
	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA
CRISENO	0.72374876	0.62374189	223327.098	188407.923	-1.07465177	-0.80723874
FENANTRENO	2.75483238	0.93781423	6530.18318	33589.7903	2.70931846	1.54847744
FLUORANTENO	1.24681269	1.43103995	57158.8482	25934.8678	-2.66498886	-1.4340158
FLUORENO	1.52535929	NA	56638.8602	NA	2.17473195	NA
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	1.78136559	NA	48166.2604	NA	0.52909865	NA
NAFTALENO	0.27891332	NA	22921562.4	NA	-0.0884780	NA
PIRENO	0.70851605	1.06314034	302593.946	28842.7654	-2.65611996	-0.52869026

$F_{0.95, 4, 12} = 4.41$

$T_{0.025, 19} = 2.0930$

NA. No aplicable

Tabla 5.7 Resultados obtenidos para la presión en el detector de arreglo de diodos

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (µg/Lt)	RESPUESTA					
		1	2	3	4	5	6
ACENAFTENO	440	47483	49473	47876	51924	49290	46867
ACENAFTILENO	260	1760	2540	1695	3136	1946	1433
ANTRACENO	530	87741	85314	85543	86718	86120	85578
BENZO[a] ANTRACENO	260	16299	18160	18201	17232	17302	17126
BENZO[a]PIRENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BENZO[b] FLUORANTENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BENZO[g,h,i] PIRILENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BENZO[k] FLUORANTENO	300	19689	18373	18103	19038	16993	16985

NA= NO APLICABLE

Tabla 5.7 (CONTINUACIÓN) Resultados obtenidos para la presión en el detector de arreglo de diodos

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/Lt}$)	RESPUESTA					
		1	2	3	4	5	6
FENANTRENO	340	20539	19676	19469	19600	19368	18229
FLUORANTENO	880	41074	38466	37628	39870	38764	38555
FLUORENO	200	6470	5827	5246	4629	4347	4053
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	256	13897	13113	15483	14399	7899	9586
NAFTALENO	730	110866	115848	113108	119324	114394	112322
PIRENO	1720	127895	128282	127209	129609	127569	127168

NA= NO APLICABLE

Tabla 5.8 Resultados obtenidos para la presión en el detector de fluorescencia

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/Lt}$)	RESPUESTA					
		1	2	3	4	5	6
ACENAFTENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ACENAFTILENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ANTRACENO	700	61350	57453	60735	57410	60275	68124
BENZO[a] ANTRACENO	350	11055076	10994346	11056986	10869784	11091365	11061360
BENZO[a]PIRENO	32	494482	489776	499413	494681	510925	515217
BENZO[b] FLUORANTENO	230	235401	236842	240170	238715	245485	241680
BENZO[g,h,i] PIRILENO	520	939112	965750	978946	966751	990748	992238
BENZO[k] FLUORANTENO	280	419758	423176	437728	440416	454495	463784

N.A.=NO APLICABLE

Tabla 5.8 (CONTINUACIÓN) Resultados obtenidos para la presión en el detector de fluorescencia

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (µg/Lt)	RESPUESTA					
		1	2	3	4	5	6
CRISENO	250	970159	963722	968063	952303	975517	974913
FENANTRENO	330	396238	382210	389410	380820	397563	394412
FLUORANTENO	800	72431	69659	69525	70602	75874	81891
FLUORENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NAFTALENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PIRENO	1600	8820174	8885089	9109649	8798669	8938216	8509658

N.A.=NO APLICABLE

Tabla 5.9 Resultados estadísticos de repetibilidad en los dos diferentes detectores.

COMPUESTO	% C.V (COEFICIENTE DE VARIACIÓN)	
	ARREGO DE DIODOS	FLUORESCENCIA
ACENAFTENO	0.60751594	NA
ACENAFTILENO	1.19120476	NA
ANTRACENO	0.63360543	0.97986593
BENZO[a] ANTRACENO	1.4491406	0.73275883
BENZO[a]PIRENO	NA	1.45668861
BENZO[b] FLUORANTENO	NA	1.50670709
BENZO[g,h,i] PIRILENO	NA	0.56502148
BENZO[k] FLUORANTENO	1.32049661	1.10752413
CRISENO	1.35086196	0.8913591
FENANTRENO	1.41735904	1.44305617
FLUORANTENO	0.61635802	1.06675997
FLUORENO	1.57073109	NA
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	0.72501894	NA
NAFTALENO	0.24308371	NA
PIRENO	0.70906881	0.89874004

N.A.=NO APLICABLE

EXACTITUD Y LINEALIDAD DEL MÉTODO.

La exactitud y linealidad del método se determinaron construyendo una curva de calibración a partir de placebos cargados de muestras de suelo de las áreas verdes del IMP (Instituto Mexicano del Petróleo) con diferentes concentraciones de las sustancias de interés a tres niveles diferentes y por duplicado cada una. Se determinó la respuesta analítica para cada concentración analizada, así como la correspondiente concentración recuperada. En la tabla 5.12 y 5.14 se presentan los resultados de las concentraciones adicionadas con sus correspondientes concentraciones recuperadas para el detector de arreglo de diodos, así como para el de fluorescencia.

Para la determinación de la linealidad del método, como se mencionó se uso como placebo muestras de suelo del IMP a los cuales se les trato como muestra blanco arrojando los resultados de la tabla 5.10, estos datos se tomaron en consideración para el análisis de los compuestos en las muestras cargadas, por otro lado cabe hacer mención que por medio de los resultados de la linealidad del sistema al no presentar una buena relación lineal los compuestos benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno y el benzo[g,h,i]pirileno en el detector de arreglo de diodos estos compuestos no fueron determinados en la linealidad del método en dicho detector.

Tabla 5.10 *Compuestos de la muestra blanco del IMP*

COMPUESTO	AREA BAJO LA CURVA		CONC. (µg/L)	
	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA
NAFTALENO	11297	—	74.6020	—
PIRENO	23325	1776272	321.6721	314.5339
BENZO(a) ANTRACENO	10418	5124940	162.5527	158
BENZO(g,h,i) PIRILENO	—	209532	—	110.7582

Los resultados obtenidos en la tabla 5.12 y 5.14 se les realizó un análisis de regresión (coeficiente de correlación y de determinación) en el cual se puede observar (tablas 5.13 y 5.15) que existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de los hidrocarburos poliaromáticos estudiados (anexo C). También se estableció una hipótesis para evaluar la relación existente entre las variables en estudio (concentración adicionada y concentración recuperada) .

Hipótesis.

- Ho: No existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de los analitos de interés
- Hi: Existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de los analitos de interés.

Criterio de aceptación:

- Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza Ho.
- Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza Ho.

Los resultados del análisis de varianza que se muestran en la tabla 5.16 nos indican que Ho se rechaza. Esto establece con un nivel de significancia (α) de 0.05 que la variación de la concentración adicionada está relacionada linealmente con la variación de la concentración recuperada. Por otro lado, se puede observar en la tabla 5.13 y 5.15 que los valores de la ordenada al origen de los compuestos estudiados son distintos a cero, por lo que se realizó un análisis estadístico ("*t de student*") para determinar si es significativamente diferente de cero con un $\alpha = 0.05$ para esto se estableció la siguiente hipótesis

Hipótesis.

- Ho: La ordenada al origen es igual a cero
- Hi: La ordenada al origen es diferente a cero.

Criterios de aceptación.

- Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza Ho.
- Si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza Ho.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 5.16 y a la hipótesis establecida, se logra determinar que para todos los compuestos estudiados la t_{cal} es menor que la $t_{crítica}$ por lo que no se rechaza Ho, por lo tanto podemos sugerir que las ordenadas al origen son similares a cero, por otro lado con relación a la pendiente el estudio de "*t de student*" nos indica que por medio de este método es muy difícil obtener el 100% de recuperación de nuestros compuestos esto lo podemos ver por los intervalos de confianza ya que ninguno tiene una pendiente igual a 1 o superior.

En el anexo C se muestran los gráficos de residuales obtenidos a partir de los residuos contra la concentración adicionada, el cual nos permite observar cuánto se están desviando las concentraciones pronosticadas por la ecuación de regresión con respecto a las concentraciones determinadas experimentalmente

La precisión y exactitud del método se determinó analizando seis muestras para tres niveles de concentración, realizadas por un analista, en un mismo día y bajo las mismas condiciones. Se registro y se calculó la respuesta obtenida en porcentaje de recobro (tablas 5.12 y 5.14). Los datos obtenidos para dicho análisis se evaluaron a partir del coeficiente de variación (tabla 5.16), donde se puede observar, que en el detector de fluorescencia todos los compuestos analizados presentan un coeficiente de variación (C.V) menor al estimado para el método cromatográfico (1.5%), mientras que en el detector de arreglo de diodos el único compuesto que presenta un coeficiente de variación mayor al estimado es el fluoranteno (C:V =1.5914); sin embargo es posible afirmar que la dispersión de los datos es, mínima para los demás compuestos, por lo que se puede decir que el método es preciso. Se puede demostrar que existe una diferencia significativa entre los coeficientes de variación obtenidos en el detector de arreglo de diodos y en el de fluorescencia, es decir los coeficientes de variación son mayores para el detector de arreglo de diodos, esto podría deberse a que el detector de fluorescencia es más selectivo y sensitivo para la determinación y cuantificación de los hidrocarburos poliaromáticos. Lo antes mencionado se puede deducir al comparar los porcentajes de recuperación obtenidos, donde se observa que son mayores para el detector de fluorescencia, en comparación con el detector de arreglo de diodos.

Mediante la prueba de "t de student" se determinó la exactitud del método a tres niveles de concentración y se demostró con un 95% de confianza que el método es exacto.

Hipótesis.

- Ho: El método es exacto.
- Hi: El método no es exacto-

Criterios de aceptación.

- Si $t_{cal} < t_{crítica}$ no se rechaza Ho
- Si $t_{cal} > t_{crítica}$ se rechaza Ho.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para el detector de fluorescencia y de arreglo de diodos (tablas 5.12 y 5.14) no son mayores al 86 %, esto podría deberse al manejo de la muestra como tal en todo el tratamiento; es decir, el procedimiento que se lleva a cabo es muy largo y es necesario realizar varios cambios de material, así mismo las interferencias que existen en la matriz del suelo como se puede observar en la figura 5.2, 5.3 y 5.4 para el detector de arreglo de diodos, se aprecia que existen interferencias en la muestra del suelo tomada del IMP, pero en comparación con el detector de fluorescencia existe una mayor interferencia en el detector de fluorescencia como nos lo demuestran las figuras 5.5, 5.6 y 5.7, estos nos enseñan que existe una mayor cantidad de interferencias en la muestra de Villahermosa Tabasco que en la muestra del IMP, todo esto nos refleja la gran diversidad de interferencias que existen para cada suelo, provocando que los componentes debido a sus concentraciones tan pequeñas no permitan ver la señal de estos en el detector.

La pérdida significativa de los HPA's en las muestras de suelo también se pueden deber a una influencia que existen con ciertas grasas en la matriz, estas al parecer se unen con los HPA's generando un efecto de enmascaramiento de los analitos, por lo que se aconseja que se realice un tratamiento de saponificación de las muestras durante la extracción en Soxhlet, para determinar si verdaderamente por medio de este tratamiento se obtiene un porcentaje de recuperación mayor.⁴

Los compuestos que presentaron un mayor porcentaje de recuperación son el fenantreno y benzo[a]pireno para el detector de fluorescencia mientras que en el detector de arreglo de diodos son el acenafteno, fenantreno y fluoranteno, al comparar los porcentajes de recuperación obtenidos para los dos diferentes detectores utilizados se puede ver que existe una diferencia significativa por lo antes ya mencionado.

Bajo condiciones de trabajo utilizadas se determinó que el método analítico resultó ser selectivo pero no específico para determinar HPA's por medio de los dos detectores el de arreglo de diodos y el de fluorescencia mediante CLAR esto se demostró al comparar los resultados de dos tipos de matrices de diferente lugar. El suelo 1 como ya se mencionó se obtuvo del Instituto Mexicano del Petróleo figura 5.2, 5.4, 5.5, 5.7 y tabla 5.10, el suelo 2 el cual es procedente de Villahermosa Tabasco figura 5.3 y 5.6 se analizó sin contaminarla obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 5.11 *Compuestos de la muestra de suelo de Villahermosa Tabasco*

COMPUESTO	AREA BAJO LA CURVA		CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/L}$)	
	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA
NAFTALENO	20659	-----	136.4125	-----
PIRENO	29025	2193688	398.1973	400.7588

Como se puede ver ambas muestras presentan algunos de los compuestos de interés, pero la segunda muestra nos refleja una gran cantidad de interferencias que se observan más en el detector de fluorescencia (Figura 5.6) y que de alguna manera nos puede complicar el análisis de las muestras a concentraciones menores, como puede ser el caso que aquí presentamos lo cual nos confirma lo anterior.

Como se ha revisado en este trabajo la necesidad de encontrar un método eficaz y confiable es doblemente importante para la industria mexicana, primero porque tiene que encargarse de proteger y preservar el medio ambiente y en segundo lugar tal vez el más importante para la industria, el económico, es por esta razón que grandes empresas se empiezan a preocupar en controlar la producción de estos compuestos, es aquí donde se encuentra la importancia de este trabajo, ya que al validar este método puede ser usado en el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) y ayudar de esta manera a PEMEX con el control de estos compuestos.

Tabla 5.12. Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método (Detector de arreglo de diodos).

COMPUESTO	CANTIDAD ADICIONADA (µg/Lt).	CANTIDAD RECUPERADA (µg/Lt).	RECUPERACIÓN (%)
ACENAFTENO.	132	112.4877	85.218
	132	112.1103	84.9321
	220	188.635	85.7432
	220	186.5729	84.8059
	308	256.3625	83.2346
	308	258.9648	84.0795
ACENAFTILENO.	72	53.2779	73.9971
	72	54.3849	75.5347
	120	90.6012	75.501
	120	90.4737	75.3948
	168	125.7123	74.8288
	168	126.4572	75.2722
ANTRACENO.	150	104.3923	69.5949
	150	101.8474	67.8983
	250	173.3642	69.3457
	250	171.3915	68.5566
	350	244.3556	69.8159
	350	239.0104	68.2887
BENZO[a] ANTRACENO.	90	71.3872	79.3192
	90	71.3304	79.256
	150	134.9215	79.9477
	150	118.0275	78.685
	210	162.7367	77.4937
	210	162.7571	77.5034

Tabla 5.12 (CONTINUACIÓN). Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método (Detector de arreglo de diodos).

COMPUESTO	CANTIDAD ADICIONADA (µg/Lt)	CANTIDAD RECUPERADA (µg/Lt).	RECUPERACIÓN %
BENZO[k] FLUORANTENO.	84	51.2179	60.9738
	84	50.0632	59.598
	140	83.2125	59.4375
	140	82.1703	58.6931
	196	116.0533	59.2109
	196	118.5178	60.4683
CRISENO.	66	40.1931	60.8987
	66	40.5457	61.4329
	110	68.5852	62.3502
	110	68.3168	62.1062
	154	92.8137	60.2687
	154	96.1010	62.4033
FENANTRENO.	90	75.4773	83.8636
	90	74.2568	82.5076
	150	124.6802	83.1201
	150	123.5245	82.3497
	210	171.5145	81.6736
	210	174.7868	83.2318
FLUORANTENO.	216	146.8374	67.9802
	216	152.4913	70.5978
	360	249.487	69.3019
	360	254.8649	70.7958
	504	246.2358	68.6975
	504	347.543	68.957
FLUORENO.	84	72.4332	86.2301
	84	71.0255	84.5542
	140	121.3826	86.7019
	140	120.398	85.9986
	196	165.3261	84.3501
	196	167.2814	85.3477

Tabla 5.12 (CONTINUACIÓN). Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método (Detector de arreglo de diodos).

COMPUESTO	CANTIDAD ADICIONADA (µg/Lt).	CANTIDAD RECUPERADA (µg/Lt).	RECUPERACIÓN (%)
INDENO (1,2,3 -c.d)PIRENO.	76.8	59.3196	77.2391
	76.8	58.4782	76.1436
	128	99.2419	77.5328
	128	99.7615	77.9387
	179.2	138.2076	77.1248
	179.2	136.646	76.2534
NAFTALENO.	234	171.2084	72.1660
	234	167.5330	71.5953
	390	274.3716	70.3517
	390	278.6031	71.4367
	546	387.2941	70.933
	546	396.0187	72.5309
PIRENO.	462	292.6192	63.3375
	462	290.6497	62.9112
	770	491.6811	63.8547
	770	485.1161	63.0021
	1078	667.5299	61.923
	1078	684.0653	63.4569

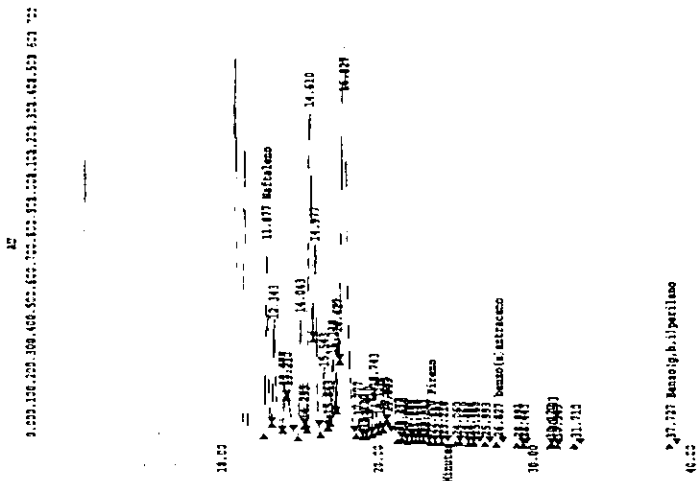


Figura 5.2 Cromatograma obtenido de una corrida en una muestra de suelo del IMP en el detector de arreglo de diodos

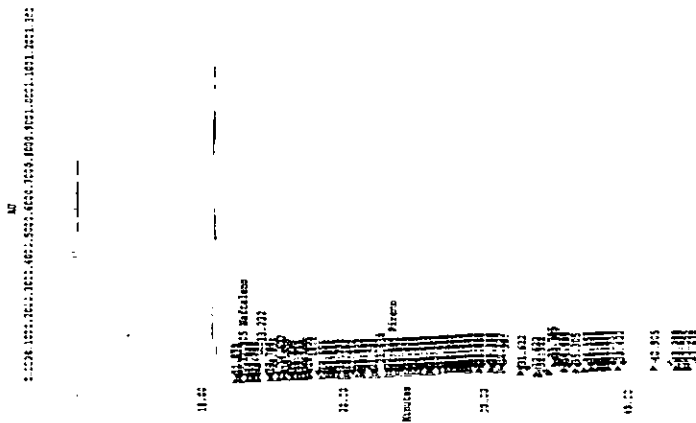


Figura 5.3 Cromatograma obtenido de una corrida en una muestra de suelo de Villahermosa Tabasco en el detector de arreglo de diodos



Figura 5.4 Cromatograma obtenido de una corrida en una muestra de suelo del IMP contaminada con estándar en el detector de arreglo de diodos

Tabla. 5.13 Parámetros estadísticos de las regresiones obtenidas para cada compuesto en el detector de arreglo de diodos

COMPUESTO	b	LIIC DE b	LSIC DE b	m	LIIC DE m	LSIC DE m	C.C. (r)	C.D. (r ²)
ACENAFTENO	4.1497208	-2.86218999	11.1616317	0.825935	0.79563812	0.85623291	0.99965	0.99930
ACENAFTILENO	-0.165487	-2.2832537	1.952278703	0.752639	0.73586306	0.76941506	0.99987	0.99974
ANTRACENO	-0.810370	-8.8653669	7.244625325	0.692815	0.66218787	0.72344362	0.99949	0.99898
BENZO[a] ANTRACENO	5.958275	-23.5368559	35.4534059	0.761567	0.5746497	0.9484853	0.98472	0.96968
BENZO[A]PIRENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BENZO[b] FLUORANTENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BENZO[g,h,i] PIRILENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BENZO[k] FLUORANTENO	0.2329166	-4.38623356	4.85206689	0.595044	0.56368106	0.62640822	0.99928	0.99856

LIIC= LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA; LSIC= INTERVALO SUPERIOR DEL INTEVALO DE CONFIANZA;
C.C.=COEFICIENTE DE CORRELACIÓN; C.D. = COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN; NA= NO APLICABLE; b= INTERCEPTO;
m= PENDIENTE

Tabla. 5.13 (CONTINUACIÓN). *Parámetros estadísticos de las regresiones obtenidas para cada compuesto en el detector de arreglo de diodos*

COMPUESTO	b	LIIC DE b	LSIC DE b	m	LIIC DE m	LSIC DE m	C.C. (r)	C.D. (r ²)
CRISENO	0.1493125	-4.65865335	4.95727835	0.614635	0.57308682	0.65618477	0.99881	0.99763
FENANTRENO	1.1855166	-3.56715243	5.93818576	0.81903	0.78891118	0.84914882	0.99964	0.99929
FLUORANTENO	3.0452541	-10.063838	16.15434659	0.684809	0.65019441	0.71942399	0.99933	0.99867
FLUORENO	1.4231333	-3.76213908	6.60840574	0.844414	0.80920679	0.87962178	0.99954	0.99909
INDENO[1,2,3-c,d]PIRENO	0.4492583	-3.24629843	4.14481509	0.766874	0.73942913	0.79431891	0.99966	0.99933
NAFTALENO	1.3143583	-14.5348227	17.1635393	0.712454	0.67382336	0.75108498	0.99923	0.99847
PIRENO	5.0729458	-20.0521402	30.1980319	0.623641	0.59262386	0.65465909	0.99935	0.99871

LIIC= LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA; LSIC= INTERVALO SUPERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA;
C.C.=COEFICIENTE DE CORRELACIÓN; C.D. = COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN; NA= NO APLICABLE; b= INTERCEPTO;
m= PENDIENTE

Tabla 5.14. Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método (detector de fluorescencia).

COMPUESTO	CANTIDAD ADICIONADA (µg/Lt).	CANTIDAD RECUPERADA (µg/Lt)	RECUPERACIÓN (%)
ANTRACENO	150	111.8895	74.5930
	150	110.5861	73.7241
	250	183.9155	73.5662
	250	183.2185	73.2874
	350	262.9588	75.1311
	350	255.6193	73.0341
BENZO[a] ANTRACENO	90	72.0497	80.0553
	90	73.0213	81.1348
	150	121.7248	81.1498
	150	122.4108	81.6072
	210	172.1999	81.9999
	210	169.0971	80.5224
FLUORANTENO	216	157.646	72.9842
	216	157.9163	73.1094
	360	263.2905	73.1362
	360	266.7928	74.1091
	504	371.2299	73.6567
	504	370.4496	73.5019
BENZO[a]PIRENO.	9.75	7.9928	81.9782
	9.75	8.036	82.42084
	16	13.118	81.9876
	16	13.2478	82.75
	22.4	18.2519	81.4819
	22.4	18.7139	83.5445
BENZO [b] FLUORANTENO	63.3	44.9945	70.746
	63.3	44.2392	69.5585
	106	74.2889	70.0838
	106	74.2741	70.0699
	148.4	103.3385	69.6351
	148.4	104.2921	70.2776

Tabla 5.14 (CONTINUACIÓN). Resultados obtenidos para determinar la exactitud del método (detector de fluorescencia).

COMPUESTO	CANTIDAD ADICIONADA (µg/Lt)	CANTIDAD RECUPERADA (µg/Lt)	RECUPERACIÓN (%)
BENZO[g,h,i] PERILENO	260	169.1744	65.067
	260	169.6798	65.2614
	364	237.4901	65.2445
	364	232.908	63.9858
	468	295.6971	63.1831
	468	303.4534	64.84047
BENZO[k] FLUORANTENO	84	57.1198	67.9998
	84	57.8775	68.9019
	140	95.3160	68.0829
	140	94.3527	67.3948
	196	134.0361	68.3858
	196	131.9352	67.3139
CRISENO	66	49.9740	75.7183
	66	50.8196	76.9995
	110	84.8558	77.1417
	110	85.1592	77.4175
	154	118.6480	77.0442
	154	119.7134	77.7360
FENANTRENO	90	78.7397	87.4886
	90	78.2202	86.9113
	150	133.2203	88.81353
	150	133.2106	88.8071
	210	186.89966	88.9998
	210	186.7846	88.945
PIRENO	462	349.3748	75.6222
	462	341.2586	75.8829
	770	571.7686	74.2556
	770	572.5438	74.3563
	1078	810.644	75.0258
	1078	828.9255	76.8947

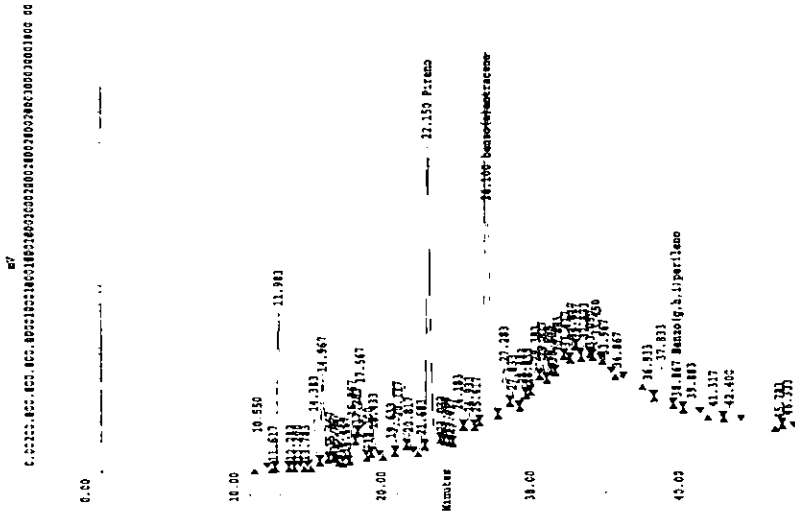


Figura 5.5 Cromatograma obtenido de una corrida en una muestra de suelo del IMP en el detector de fluorescencia

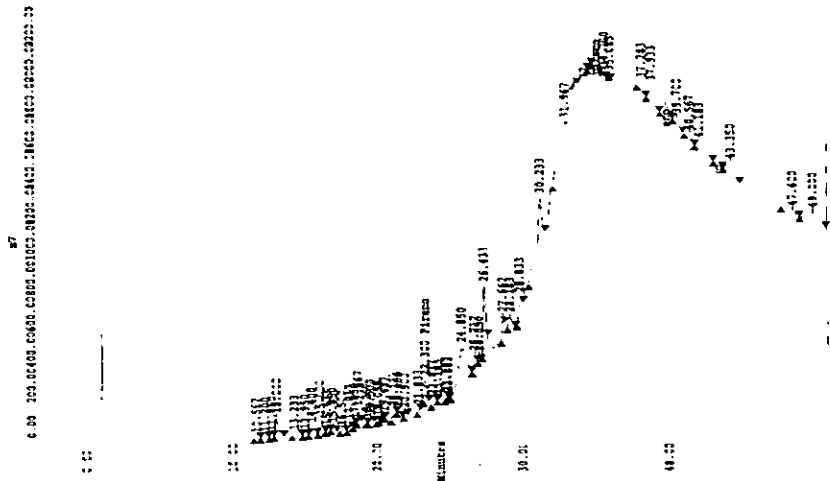


Figura 5.6 Cromatograma obtenido de una corrida en una muestra de suelo de Villahermosa Tabasco en el detector fluorescencia



Figura 5.7. Cromatograma obtenido de una comida en una muestra de suelo del IMP contaminada con estándar en el detector de fluorescencia

Tabla. 5.15. *Parámetros estadísticos de las regresiones obtenidas para cada compuesto en el detector de fluorescencia.*

COMPUESTO	b	LIIC DE b	LSIC DE b	m	LIIC DE m	LSIC DE m	C.C. (r)	C.D. (r ²)
ACENAFTENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ACENAFTILENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ANTRACENO	-0.366112	-10.6705875	9.93836253	0.740256	0.70107508	0.77943742	0.99927	0.99854
BENZO[a] ANTRACENO	-0.89065	-5.29564661	3.514346619	0.817608	0.78969280	0.84552386	0.99969	0.99939
BENZO[a]PIRENO	-0.055471	-0.68590458	0.57496138	0.827551	0.79016044	0.86494298	0.99947	0.99894
BENZO[b] FLUORANTENO	0.5703607	-0.99580285	2.136524429	0.695632	0.68158067	0.70968509	0.99989	0.99978
BENZO[g,h,i] PIRILENO	6.9745375	-9.06785915	23.01693415	0.625712	0.58279216	0.66863235	0.99878	0.99756
BENZO[k] FLUORANTENO	0.7474666	-2.50766292	4.00259625	0.673991	0.65188906	0.69609308	0.99972	0.99944

LIIC= LÍMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA; LSIC= INTERVALO SUPERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA;
C.C.=COEFICIENTE DE CORRELACIÓN; C.D. = COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN; NA= NO APLICABLE; b= INTERCEPTO;
m= PENDIENTE

Tabla. 5.15 (CONTINUACIÓN). *Parámetros estadísticos de las regresiones obtenidas para cada compuesto en el detector de fluorescencia*

COMPUESTO	b	LIIC DE b	LSIC DE b	m	LIIC DE m	LSIC DE m	C.C. (r)	C.D (r ²)
CRISENO	-1.118208	-2.97526307	0.7388464	0.781635	0.76558713	0.79768333	0.99989	0.99978
FENANTRENO	-2.606881	-3.96246159	-1.25130174	0.903018	0.89442752	0.91160880	0.99997	0.99995
FLUORANTENO	-1.769066	-6.66289680	3.12476347	0.739786	0.72686456	0.75270905	0.99992	0.99984
FLUORENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NAFTALENO	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PIRENO	-13.99917	-47.8768177	19.8784593	0.770240	0.72841746	0.81206323	0.99923	0.99847

LIIC= LIMITE INFERIOR DEL INTERVALO DE CONFIANZA; LSIC= INTERVALO SUPERIOR DEL INTEVALO DE CONFIANZA;
C.C.=COEFICIENTE DE CORRELACIÓN; C.D. = COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN; NA= NO APLICABLE; b= INTERCEPTO;
m= PENDIENTE

Tabla 5.16. Análisis de varianza y coeficiente de variación para la determinación de la linealidad del método para los 15 HPA's.

COMPUESTO	F CALCULADA		% CV (COEFICIENTE DE VARIACIÓN)		" t DE STUDENT " CALCULADA"	
	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA
ACENAFTENO	5728.773891	NA	1.0495	NA	1.643132128	NA
ACENAFTILENO	15515.893	NA	0.7891	NA	0.216958751	NA
ANTRACENO	3944.40642	2751.625	1.1265	1.0932	-0.27932413	-0.098645818
BENZO[a] ANTRACENO	127.9662596	6612.69951	1.2878	1.0137	0.560867411	-0.561372952
BENZO[a]PIRENO	NA	3775.981062	NA	0.8779	NA	-0.244299026
BENZO[b] FLUORANTENO	NA	18890.8296	NA	0.6223	NA	1.011119568
BENZO[g,h,i] PIRILENO.	NA	1638.35473	NA	1.2976	NA	1.207080278
BENZO[k] FLUORANTENO.	2774.7752	7168.439149	1.4086	0.8834	0.14000014	0.637548955

$F_{0.95,1,4} = 7.71$

$t_{crit,ca} 0.975, 5 = 2.5706$

NA. NO APLICABLE

Tabla 5.16 (CONTINUACIÓN). Análisis de varianza y coeficiente de variación para la determinación de la linealidad del método para los HPA's.

COMPUESTO	F CALCULADA		% CV (COEFICIENTE DE VARIACIÓN)		" t DE STUDENT " CALCULADA"	
	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA	ARREGLO DE DIODOS	FLUORESCENCIA
CRISENO	1686.9225	18286.939	1.4070	0.8959	0.086223328	-1.671814204
FENANTRENO	5700.3798	85176.9426	0.9319	1.0137	0.692564262	-5.339322833
FLUORANTENO	13.815636	25264.8773	1.5914	0.7929	0.938434467	-1.003656957
FLUORENO	4434.2571	NA	1.1043	NA	0.762015849	NA
INDENO [1,2,3-c,d]PIRENO	6018.7326	NA	0.9214	NA	0.33752524	NA
NAFTALENO	2621.961053	NA	1.1117	NA	0.2302486	NA
PIRENO.	3116.256	2614.595584	1.0471	1.3318	0.560586529	-1.147306444

$F_{0.95,1,4} = 7.71$

$t_{critica} 0.975, 5 = 2.5706$

NA. NO APLICABLE

*C
O
N
C
L
U
S
I
O
N
E
S*

-
- ☞ Mediante la modificaciones de algunas variables en las condiciones de trabajo para el CLAR (flujo y gradiente de concentración) en dos columnas de C₁₈ fue posible encontrar las condiciones optimas de trabajo para cada una de ellas obteniendo, como resultado que en la columna de la marca Spherisorb S5 (Waters) no fue posible separar el criseno y el benzo(a)antraceno, mientras que en la columna Pinnacle PAH (Restek Corporation) se obtuvo una buena separación para todos los compuestos analizados.
 - ☞ Para la linealidad del sistema se determinó que la mayoría de los compuestos (HPA's) existe una relación lineal significativamente alta entre la concentración y su respectiva respuesta, excepto en los casos de Benzo[a]pireno, Benzo[g,h,i]pirileno, Fenantreno y Benzo[b]fluoranteno presentando también un coeficiente de variación alto con respecto al estimado para los métodos cromatográficos (C.V = 1.5) en el detector de arreglo de diodos, en el caso del último este presentó un C.V un poco alto en el detector de fluorescencia. Otros compuestos que presentan un coeficiente de variación alto en el detector de arreglo de diodos son Benzo[a]antraceno, Fenantreno, Fluoreno, e Indeno[1,2,3-c,d]pireno.
 - ☞ Por medio de los coeficientes de variación obtenidos para cada compuesto se determinó que la linealidad del sistema es preciso y presenta repetibilidad entre días.
 - ☞ Los resultados obtenidos para determinar la linealidad del método nos indican que existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración recuperada de los hidrocarburos poliaromáticos estudiados, excepto para el fluoranteno en el detector de fotodiodos. De acuerdo al coeficiente de variación y a la prueba de "t de student" se determinó que el método es preciso y exacto, aunque cabe resaltar que el método no presenta un buen porcentaje de recuperación.
 - ☞ Al confrontar los resultados obtenidos con muestras reales de Villahermosa Tabasco nos percatamos que el procedimiento de purificación no elimina totalmente las interferencias que acompañan a los analitos de interés provocando que el análisis sea más complicado y tardado, por lo cual proponemos el realizar ensayos con cartuchos de C₁₈.
 - ☞ Mediante las condiciones de trabajo establecidas para la extracción y cuantificación de los HPA's en muestras de suelo y en base a los porcentajes de recuperación obtenidos se sugiere que para tratar de incrementar la especificidad, así como los porcentajes de recuperación se realice una saponificación al extraer las muestras.⁴
-

A

N

E

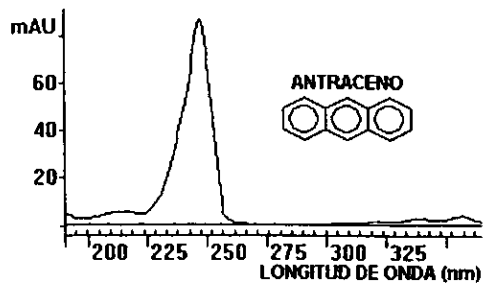
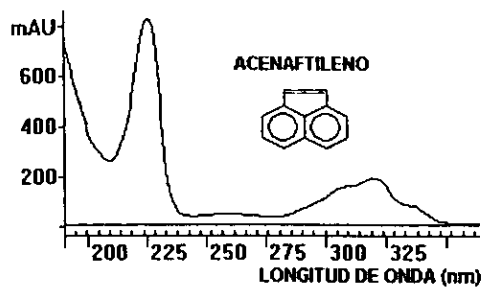
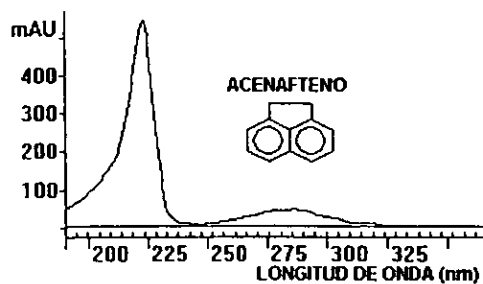
X

O

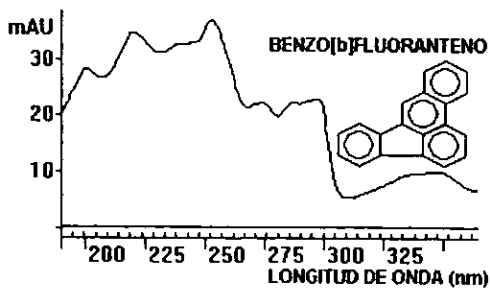
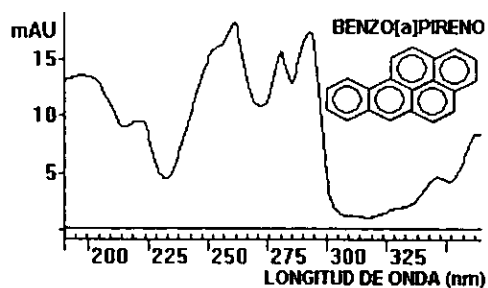
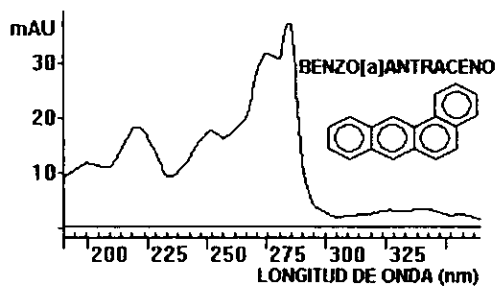
A

ESPECTROS DE
ABSORCIÓN DE LOS HPA'S

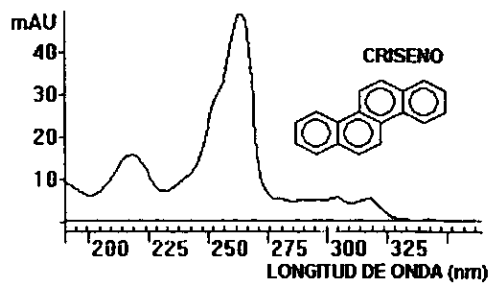
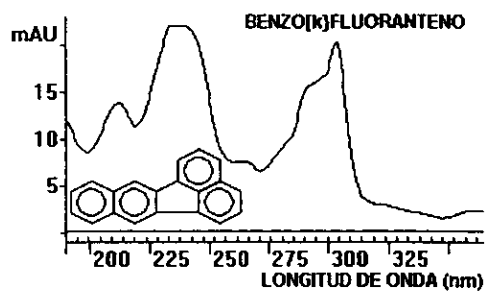
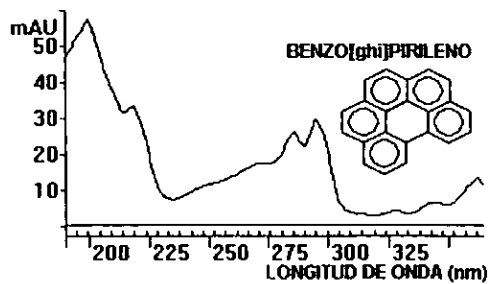
(10, 23, 26)



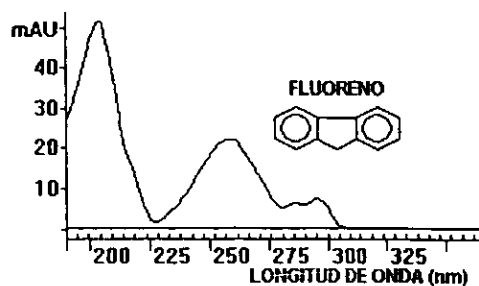
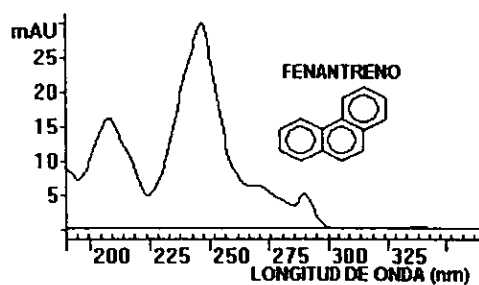
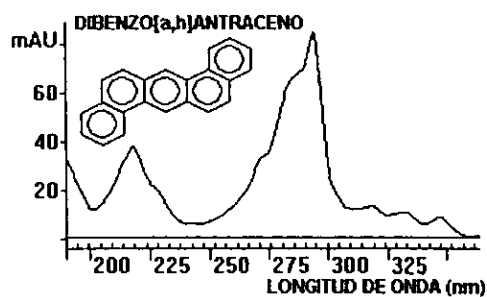
ANEXO A (ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS HPA's)



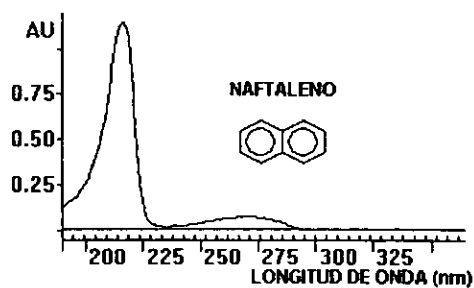
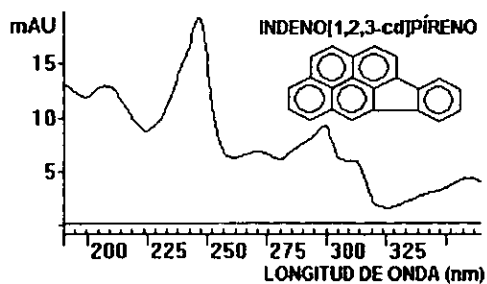
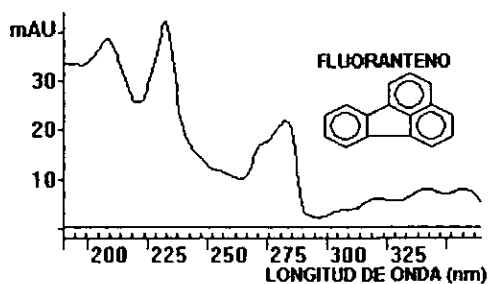
ANEXO A (ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS HPA's)



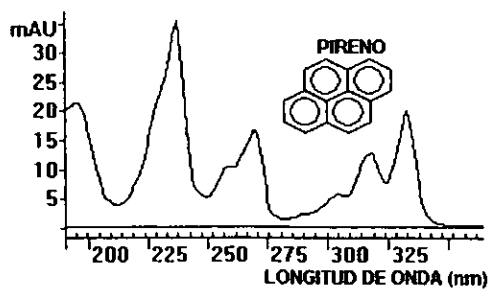
ANEXO A (ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS HPA's)



ANEXO A (ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS HPA'S)



ANEXO A (ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS HPA 's)



A
N
E
X
O

B

GRÁFICOS DE CURVAS
DE CALIBRACIÓN Y
RESIDUALES DE CADA
UNO DE LOS HPA'S ANALIZADOS

GRAFICOS DE CURVA DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES PARA EL ARREGLO DE DIODOS

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ACENAFTENO.

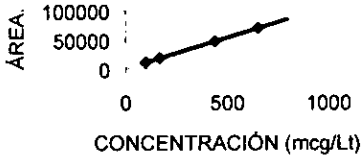
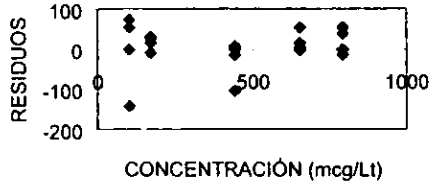


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE ACENAFTILENO.

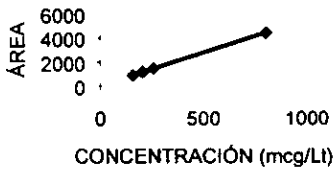
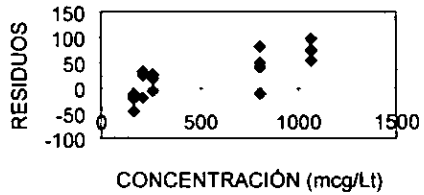


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE ANTRACENO

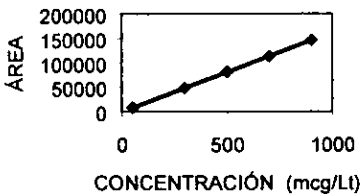
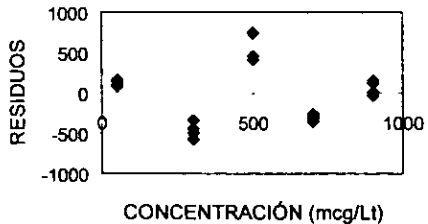


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



ANEXO B (GRÁFICOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES DE CADA UNO DE LOS HPA'S ANALIZADOS)

CURVA DE CALIBRACIÓN DE BENZO[a]ANTRACENO

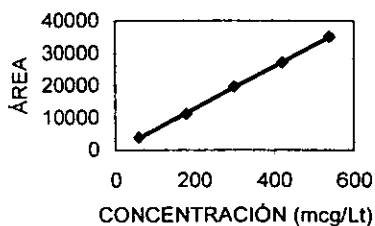
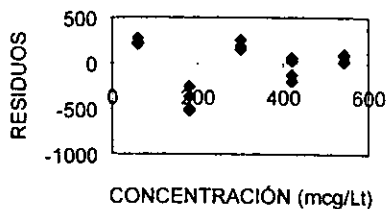


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE BENZO[a]PIRENO

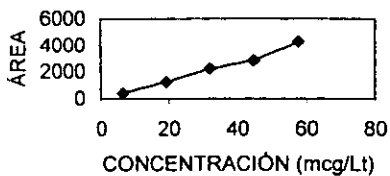
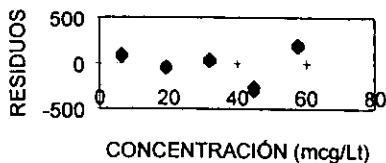


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE BENZO(b)FLUORANTENO

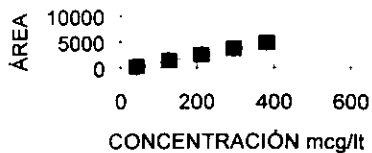


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



ANEXO B (GRÁFICOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES DE CADA UNO DE LOS HPA'S ANALIZADOS)

CURVA DE CALIBRACIÓN DE
BENZO(ghi)PIRENO

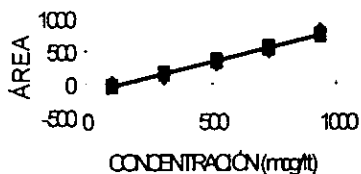


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE
BENZO(k)FLUORANTENO

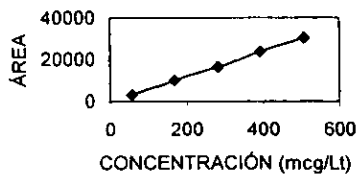
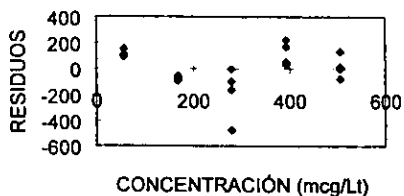


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE
CRISENO

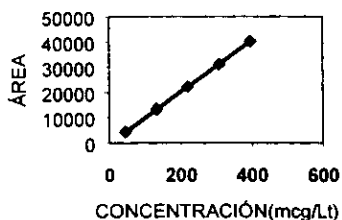
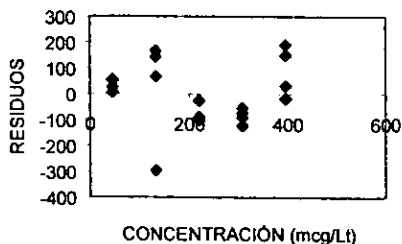


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL

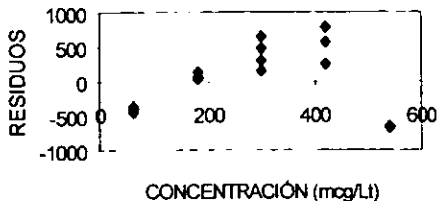


ANEXO B (GRÁFICOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES DE CADA UNO DE LOS HPA'S ANALIZADOS)

CURVA DE CALIBRACIÓN DE FENANTRENO



GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE FLUORANTENO

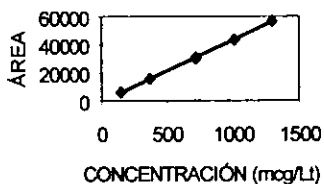
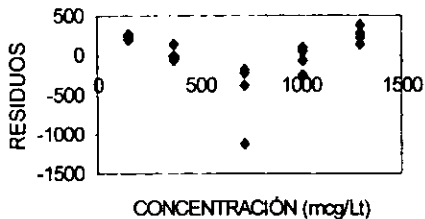


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE FLUORENO

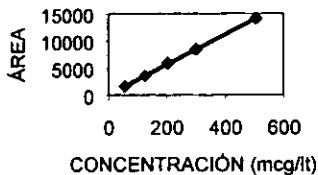
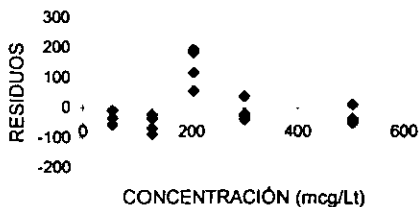


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



ANEXO B (GRÁFICOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES DE CADA UNO DE LOS HPA'S ANALIZADOS)

CURVA DE CALIBRACIÓN DE INDENO[1,2,3-c,d]PIRENO

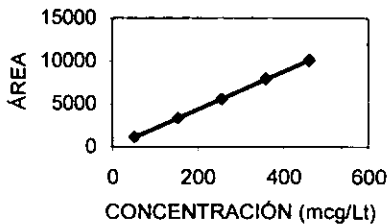
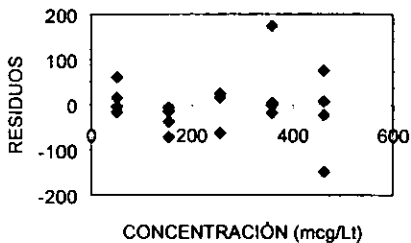


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE NAFTALENO.

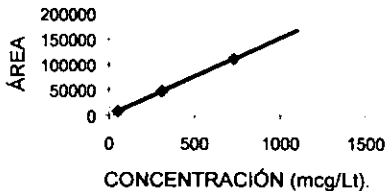
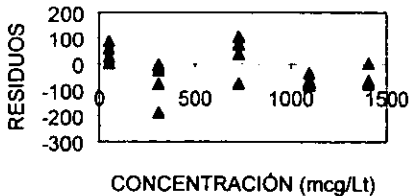


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE PIRENO

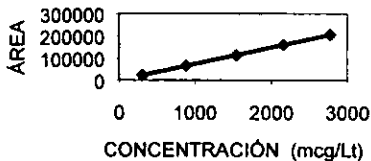
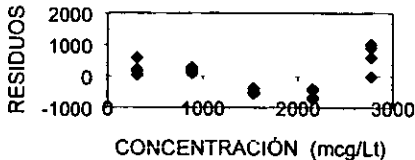


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



GRAFICOS DE CURVA DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES PARA EL DETECTOR DE FLUORESCENCIA

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ANTRACENO

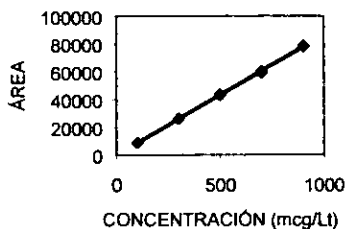
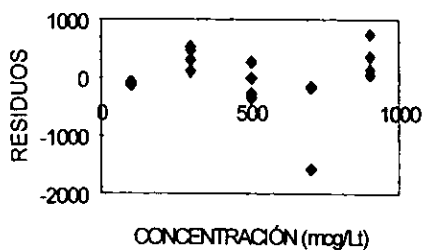


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



□

CURVA DE CALIBRACIÓN DE BENZO[a]ANTRACENO

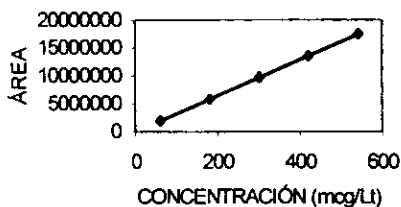
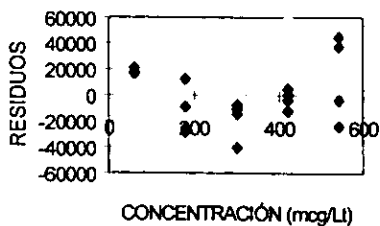


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE BENZO[a]PIRENO

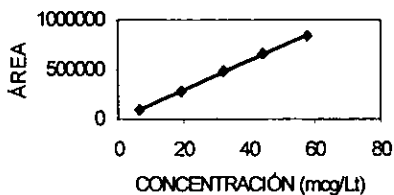
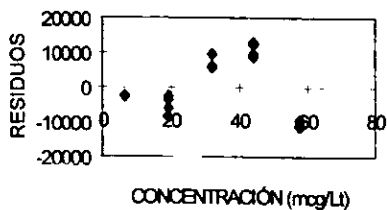


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



ANEXO B (GRÁFICOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES DE CADA UNO DE LOS HPA'S ANALIZADOS)

CURVA DE CALIBRACIÓN DE
BENZO[b]FLUORANTENO

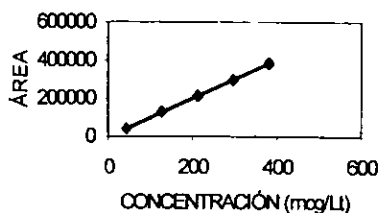
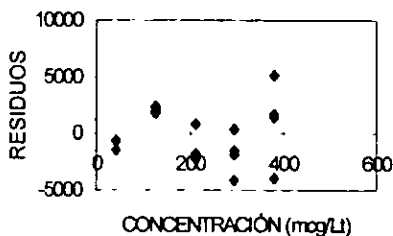


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE
BENZO[g,h,i]PIRILENO

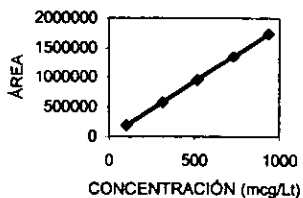
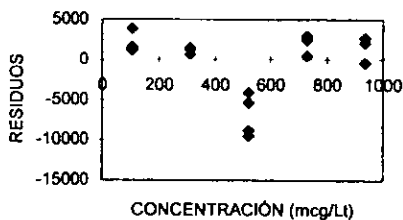


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE
BENZO[k]FLUORANTENO

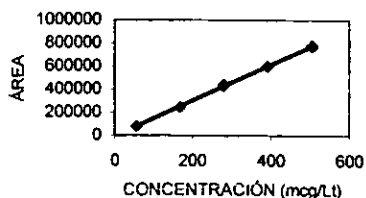
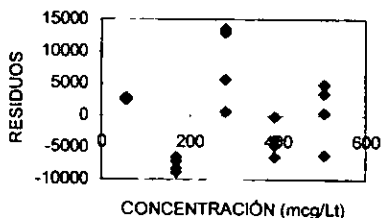


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



ANEXO B (GRÁFICOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES DE CADA UNO DE LOS HPA'S ANALIZADOS)

CURVA DE CALIBRACIÓN DE CRISENO

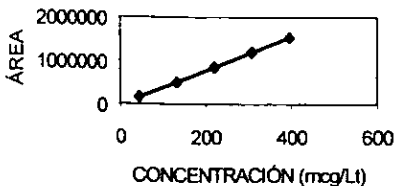
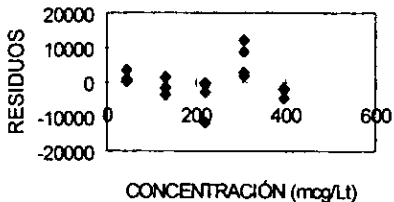


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE FENANTRENO

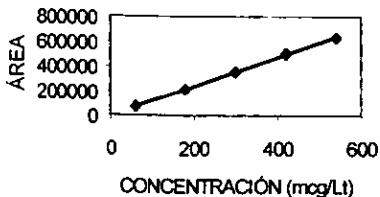
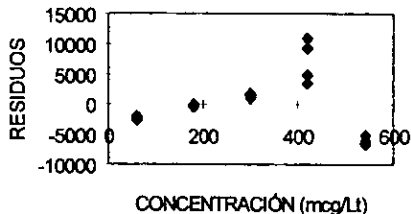


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



CURVA DE CALIBRACIÓN DE FLUORANTENO

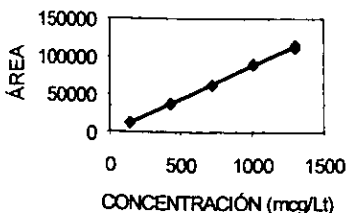
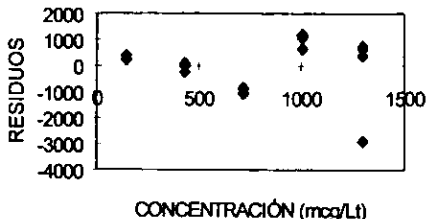


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



ANEXO B (GRÁFICOS DE CURVAS DE CALIBRACIÓN Y RESIDUALES DE CADA UNO DE LOS HPA'S ANALIZADOS)

CURVA DE CALIBRACIÓN DE PIRENO

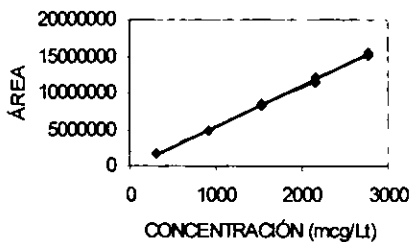
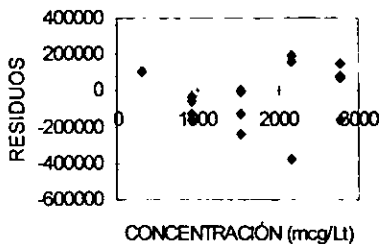


GRÁFICO DE RESIDUALES GLOBAL



A
N
E
X
O

C

GRÁFICOS PARA LA
EXACTITUD DEL MÉTODO

GRÁFICOS DE PARA LA LINEALIDAD DEL MÉTODO Y RESIDUALES PARA DETERMINAR EXACTITUD EN EL DETERECTOR DE FLUORESCENCIA.

Gráfico. Linealidad del método para Antraceno.

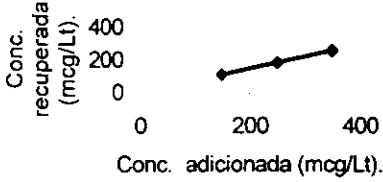


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Antraceno).

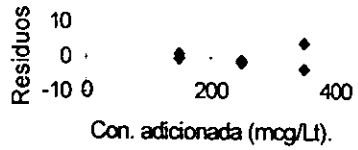


Gráfico Linealidad del método para Benzo[*a*]antraceno.

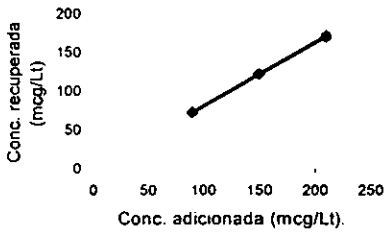


Gráfico. Curva de residuales de los residuales para la linealidad del método (Benzo[*a*]antraceno).

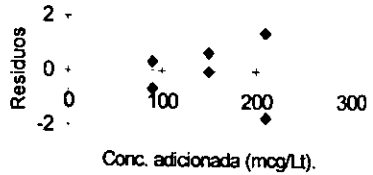


Gráfico. Linealidad del método para Benzo[*a*]pireno.

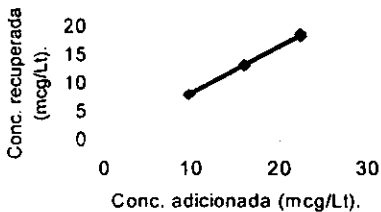
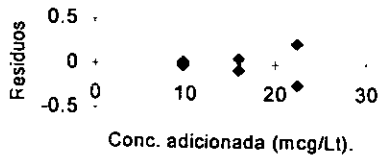


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Benzo[*a*]pireno).



ANEXO C (GRÁFICOS PARA LA EXACTITUD DEL MÉTODO)

Gráfico . Linealidad del método para Benzo[b]fluranteno.

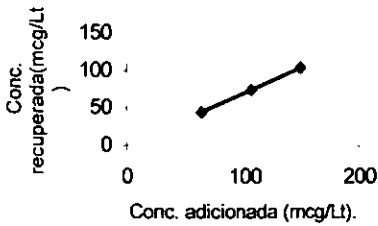


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Benzo[b]fluranteno).

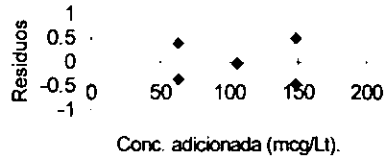


Gráfico. Linealidad del método para Benzo[g,h,i]perileno.

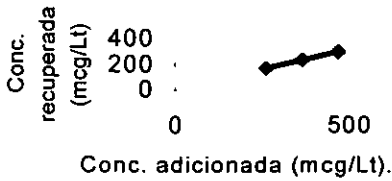


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Benzo[g,h,i]perileno)

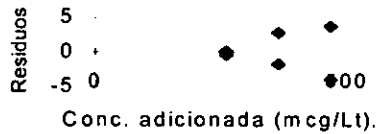


Gráfico. Linealidad del método para Benzo[k]fluranteno.

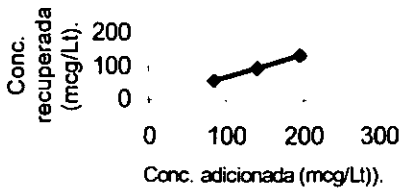


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Benzo[k]fluranteno).

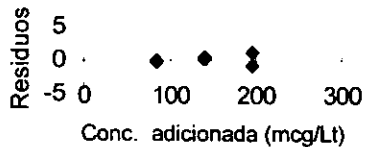


Gráfico. Linealidad del método para Criseno.

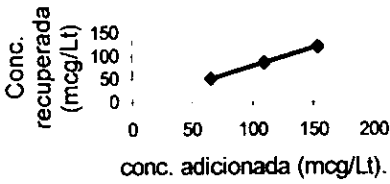


Gráfico. Curva de residuos para la linealidad del método (Criseno).

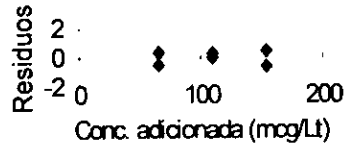


Gráfico. Linealidad del método para Fenantreno.

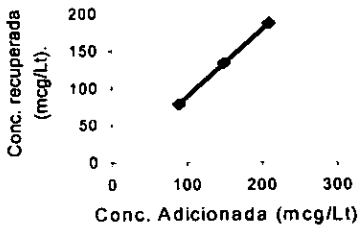


Gráfico. Curva de residuos para la linealidad del método para Fenantreno

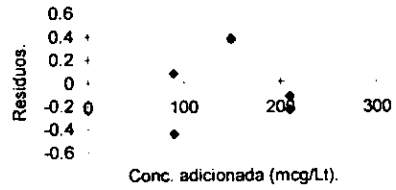


Gráfico. Linealidad del método para Fluranteno.

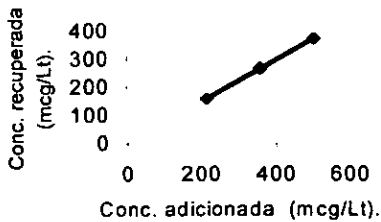


Gráfico. Curva de residuos para la linealidad del método (Fluranteno)

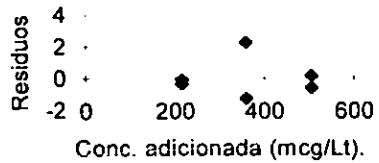


Gráfico . Linealidad del método para Pireno

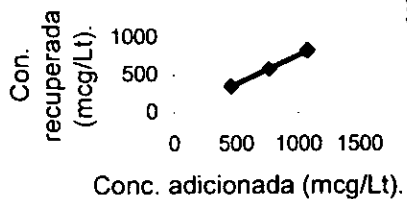


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Pireno).



GRÁFICOS DE PARA LA LINEALIDAD DEL MÉTODO Y RESIDUALES PARA DETERMINAR EXACTITUD EN EL DETERCTOR DE ARREGLO DE DIODOS.

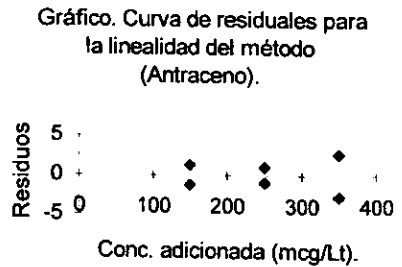
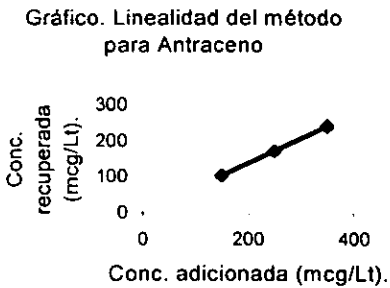
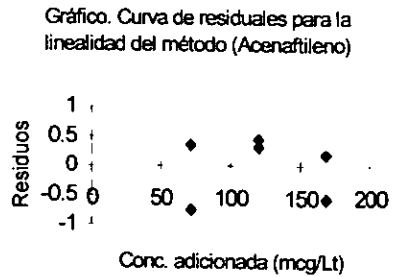
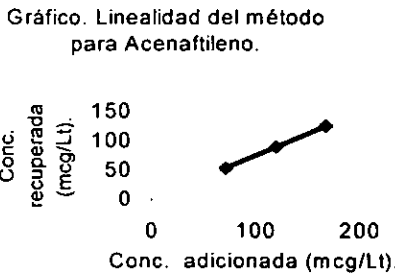
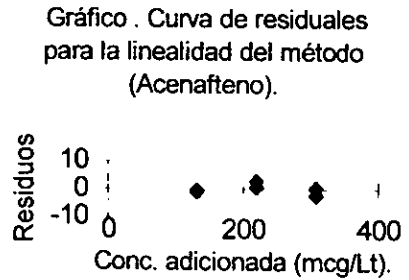
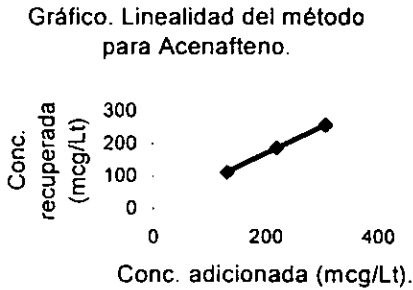


Gráfico. Linealidad del método para Benzo[a]antraceno.

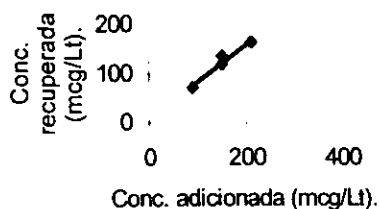


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Benzo[a]antraceno).

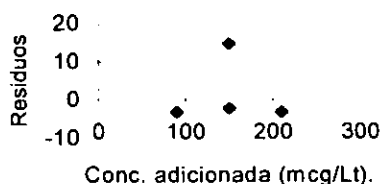


Gráfico. Linealidad del método Benzo[k]fluoranteno.

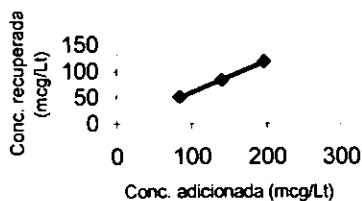


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Benzo[k]fluoranteno).

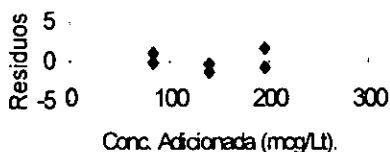


Gráfico. Linealidad del método para criseno.

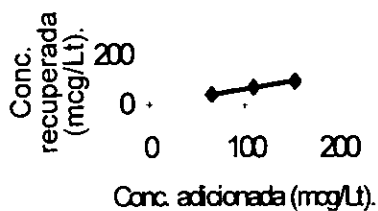


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Criseno).

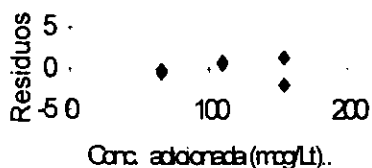


Gráfico. Linealidad del método para Fenantreno.

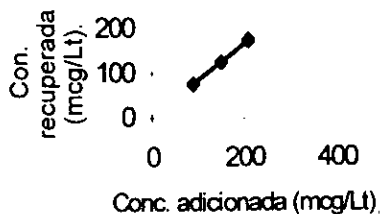


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Fenantreno)

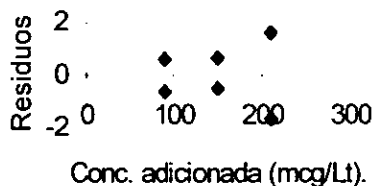


Gráfico. Linealidad del método para Fluoranteno.

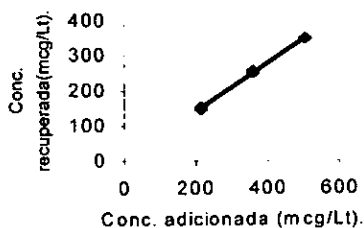


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Fluranteno).



Gráfico. Linealidad del método para Fluoreno

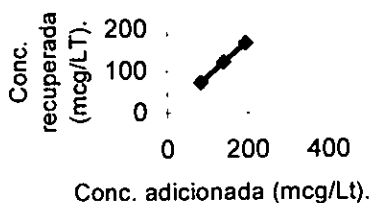


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Fluoreno).

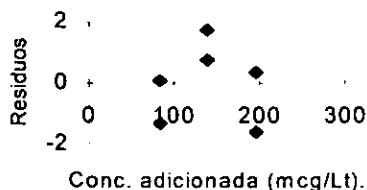


Gráfico. Linealidad del método para Indeno[1,2,3-c,d]pireno.

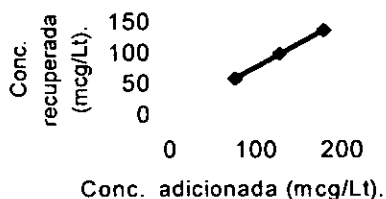


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Indeno[1,2,3-c,d]pireno).

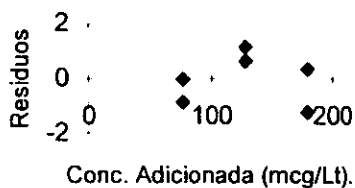


Gráfico. Linealidad del método para Naftaleno.

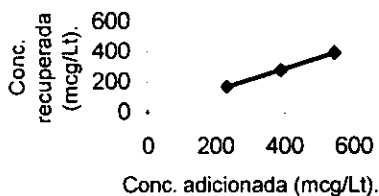


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Naftaleno).

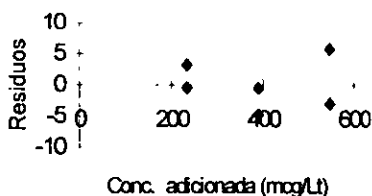


Gráfico. Linealidad del método para pireno.

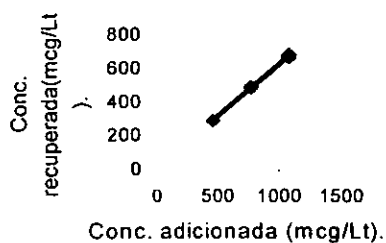
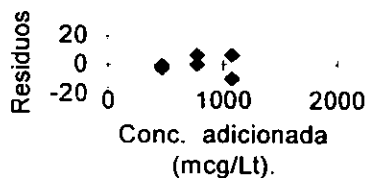


Gráfico. Curva de residuales para la linealidad del método (Pireno).



A

N

E

X

O

D

FORMULARIO EMPLEADO
PARA LA VALIDACIÓN

(51)

FORMULAS UTILIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

LINEALIDAD

Para calcular los valores de linealidad se tabularon los resultados bajo el siguiente formato:

Concentración Adicionada (x)	Concentración Recuperada(y)
X1	y11, y12,
X2	y21, y22,
X3	y31, y32,
X4	Y41, Y42
X5	Y51, Y52
X6	Y61, Y62

Para el calculo de la pendiente:

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum xy - (\sum x)^2}$$

Para el calculo del valor del intercepto:

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

Para el calculo del coeficiente de correlación y determinación

$$r^2 = \frac{[n(S_{xy}) - (S_x)(S_y)]^2}{[n(S_x)^2 - (S_x)^2][n(S_y)^2 - (S_y)^2]}$$

$$r = \sqrt{r^2}$$

Para la construcción de la tabla de (ANAEVA):

Se calcula la suma de cuadrados de la regresión (SCr) y la suma de cuadrados del error de regresión (Scer) con la siguientes ecuaciones

$$SCr = m * S_{xy} + b(S_y) - [(S_y)^2 / n]$$

$$Scer = S_y^2 - m (S_{xy}) - b(S_y)$$

Después se calcula la suma de cuadrados del error puro (Scep) y la suma de cuadrados de la falta de ajuste (Scfa) con las siguientes ecuaciones:

$$Scep = Sy^2 - [(Syi.^2) / r]$$

Donde r= número de réplicas

$$Scfa = Scer - Scep$$

TABLA DE ANADEVA

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}
REGRESIÓN	1	SCr	SCr	MCr/MCer
ERROR DE REGRESIÓN	n-2	SCer	Scer/Gler	Mcfa/Mcep
FLATA DE AJUSTE	(n-2) - t (r-1)	SCfa	Scfa/Glfa	
ERROR PURO	T (r-1)	Scep	Scep/Glep	

Para la prueba de t de student y los intervalos de confianza se usaron las siguientes formulas:

Para el intercepto:

Prueba de t

$$t = \frac{b - B}{S_{y * x} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\sum x^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}}$$

Intervalo de confianza:

$$b = B \pm t_{(95\%, n-2)} (S_{x * y} \cdot \sqrt{\frac{1 + \sum x^2}{n + \left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right)}})$$

$$Sy^*x = \frac{n-1}{n-2} (Sy - bSx)$$

Para la pendiente:

La prueba de t

$$t = \frac{m - M}{Sy^*x \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-2}}}$$

Intervalo de confianza

$$m = M \pm t_{(95\%, n-2)} \frac{Sy^*x}{\sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-2}}}$$

Para encontrar los valores de repetibilidad y precisión se manejaron las siguientes formulas:

Precisión y repetibilidad

Media aritmética

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Coefficiente de variación

$$C.V. = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Para el análisis de exactitud se tabularon los porcentajes de recuperación y se usaron las siguientes formulas.

Exactitud .

Para la prueba de t

$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - 100}{\frac{S}{\sqrt{n}}}$$

Intervalo de confianza

$$\bar{x} \pm t_{(95\%, n-2)}$$

*R
E
F
E
R
E
N
C
I
A
S*

-
1. **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water by column liquid chromatography with fluorescence detection, using on-line micelle-mediated sample preparation.** E.R. Brouwer, A.N.J. Hermans, H. Lingeman, U.A. Th. Brinkman. *Journal of Chromatography A*, 669(1994) 45-57
 2. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/8100.pdf>.
 3. **Química Orgánica.** Solomons Graham, 2ed, Limusa, México, 1982, pag 436-453.
 4. **Evaluation of New, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples.** A Eschenbach, M. Kastner, R. Biert, G. Schaefer and B. Mahro, *Chemical abstract* 6535(1994) 683-692.
 5. **Química Orgánica.** Wingore Alan S. Caret Robert I, Harla, México D.F, 1984. pag. 626-629.
 6. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3610b.pdf>
 7. **March, Jerry, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure** 3ed New York: John Wiley and Sons, 1985, pag 37-47.
 8. <http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/>
 9. **Organic Chemistry.** Morrison and Boyd. 3ed, Allyn and Bacon, Inc. New York U.S.A, 1974, pag 967-997.
 10. <http://www.chemfinder.com/>
 11. <http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/>
 12. http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/79/r79_74.htm
 13. http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature/93/r93_690.htm
 14. <http://www.speclab.com/compound/m8310.htm>
 15. <http://www.speclab.com/compound/m8100.htm>
 16. <http://www.atsdr.cdc.gov/mrls.html>
 17. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
-

-
18. Optimization of automated soil-phase extraction for quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous media by high-performance liquid chromatography-UV detection. Nanette C. Fladung, Journal of Chromatography A, 692 (1995) 21-26.
19. Análisis Instrumental. Skoog. 4 ed, Mc.Graw-Hill, México D.F, 1994, pag. 730 -775.
20. <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/history.html>
21. Análisis Químico Cuantitativo, Daniel C. Harris, 3ª. ed., Ed Iberoamericana S.A. de C.V México D.F 1992, pag. 619-633.
22. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Snyder Kirkland, John Wiley and Sons, Inc. Editorial, New York U.S.A 1979. pag 130-140 y 145-147.
23. <http://www.varianinc.com/csb/hplcnote/1c07.htm>
24. http://www.waters.com/waters Website/Applications/validate/term_def.html
25. Manual de Taller de Validación de Métodos Analíticos. Hewlett Packard.
26. Comparison of various extraction and clean-up methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge-amended soils. G. Codina, M.T.Vaquero, L. Comellas, F. Broto- Puig, Journal of Chromatography A, 673 (1994) 21-29.
27. <http://www.epa.gov/swerust1/cat/samb-1.htm>.
28. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/sw846.htm>.
29. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/8310.pdf>.
30. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3540c.pdf>.
31. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3600c.pdf>.
32. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3630c.pdf>.
33. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3660b.pdf>.
34. <http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/subst/index.html>.
35. <http://www.epa.gov/ostwater/Tools/guide/methods.html>.
36. <http://www.epa.gov/OST/Tools/guide/610.pdf>.
-

-
37. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/tx8xxx.htm>.
38. **Comparison of four methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates.** C. Escrivá, E. Viana, J.C. Moltó, Y. Picó, J. Mañes, *Journal of Chromatography A*, 676(1994) 375–388.
39. **Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from a marine sediment and analyte collection via liquid-solid trapping.** Anja Meyer, Wolfgang Kleibohmer, *Journal of Chromatography A*, 657 (1995).327-335.
40. **Reversed-phase high-performance liquid chromatography using enhanced-fluidity mobile phases.** Yi Cui, Susan V. Olesik, *Journal of Chromatography A*, 691(1995) 151-162.
41. **Solvent modulation in liquid chromatography: extension to serially coupled columns.** Patrick H. Lukulay, Victoria L. Mc Guffin. *Journal of Chromatography A*, 691 (1995) 171-185.
42. **Solid-phase extraction of polycyclic aromatics hydrocarbons from soil samples.** P.R Kootstra, M.H.C. Straub, G.H. Stil, E.G van der Velde, W. Hesselink, C.C.J. Land. *Journal of Chromatography A*, 697 (1995) 123-129.
43. **Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the analysis of native polycyclic aromatic hydrocarbons in soils.** Gerry Reimer, Agripina Suarez. *Journal of Chromatography A*, 699 (1995) p.p. 253-263.
44. **Separation of planar organic contaminants by pyrenyl-silica high-performance liquid chromatography.** D.E.Wells, I. Echarrí, C. McKenzie, *Journal of Chromatography A*, 718(1995) 107-118.
45. **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography.** Gyula Kiss, Zita Varga-Puchony, József Hlavay, *Journal of Chromatography A*, 725 (1996) 261-272.
46. **Analysis of 23 polynuclear aromatic hydrocarbons from natural water at the sub-ng/l level using solid-phase disk extraction and mass-selective detection.** Gary Michor, John Carron, Shelley Bruce, Devon A. Cancilla, *Journal of Chromatography A*. 732 (1996) 85-99.
47. **Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water.** Ralf Eisert, Karten Levens, *Journal of Chromatography A*, 733 (1996) 143-157.
-

-
48. Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofuran in solid waste. Peter Popp, Petra Keil, Monica Möder, Albrecht Paschke, Uwe Thuss M, Journal of Chromatography A, 774 (1997) 203-211.
49. New, High-capacity carboxylic acid functionalized resins for solid-phase extraction of a broad range of organic compounds. Dianna L. Ambrose, James S. Fritz, Michel R. Buchmeiser, Norbert Atzl, Günther K. Bonn. Journal of Chromatography A, 786 (1997) 259-268.
50. Contemporary Heterocyclic Chemistry Syntheses, Reactions and Applications. George R. Newkome, William W. Paudler. Wiley- Interscience Publication, New York U.S.A. 1982. pag 5-8.
51. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Wayne W. Daniel. Limusa, México D.F, 1985. Pag 193-211 y 243-274.
-