

14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA REDUCCION DE HAP EN UN SUELO CONTAMINADO CON PETROLEO POR LA PRESENCIA DE UNA PLANTA DEL GENERO Cyperus Y UTILIZANDO LA TECNICA CG-EM.

T E S I S

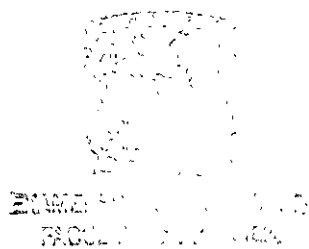
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

QUIMICA

PRESENTA:

ANEL MELODI FLORES VALVERDE

2001



MEXICO, D. F.

2001



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.

**Presidente** Prof. Ernestina Cervera Flores

**Vocal** Prof. Humberto Ramón Gómez Ruiz

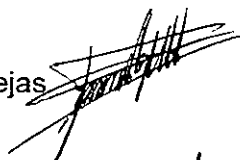
**Secretario** Prof. Francisco Rojo Callejas

**Primer suplente** Prof. Alain Quere Thorent

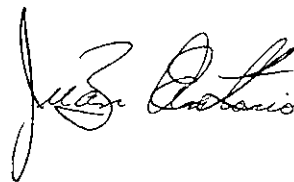
**Segundo suplente** Prof. Lucía Hernández Garcíadiago

**Sitio donde se realizó la investigación:** Conjunto José Lopez Portillo. Ala A. Lab. 311. Laboratorio de Residuos peligrosos. Instituto Mexicano del Petróleo. Av. Eje Central Lázaro Cárdenas No. 152 Apartado Postal 14-05 07730. México D.F.

**Asesor del tema** Francisco Rojo Callejas



**Supervisor Técnico** Juan Antonio Zermeño Eguía Lis.



**Sustentante** Anel M. Flores Valverde



## AGRADECIMIENTOS



Mural de David Alfaro Siqueiros

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto Mexicano del Petróleo por el apoyo otorgado mediante el "Programa maestro para la formación de recursos humanos para la industria petrolera".

A los miembros del jurado, así como al maestro Fernando Jauregui, sin cuya orientación no hubiera sido posible la culminación de este trabajo.

A mis asesores, M. en C. Juan Zermeño y M. en C. Francisco Rojo, por su invaluable apoyo.

A la I.Q. Marilú González, al M. en C. Benjamín Chávez y al M. en C. Víctor Ugalde, por toda su ayuda y amistad.

A mis padres, que me sostienen en sus manos y me hacen frágil.

A mis hermanos y mis cuñados por todo su respaldo.

A mis sobrinos, por ser promesas de flores.

A mi Abuela Porfiria, por estar en mi corazón.

A Adolfo Huidobro, por pertenecer a un cielo lejano y cada minuto latir igual.

A mis amigos:

por luchar incansablemente por sus sueños y  
al mismo tiempo ser peces en el viento.

Perla González, Oscar Pérez, Martín Ibarra, Greys Vega, Luz Ma. López, Marina Vega,  
Dessireé Argot, Rafael Camacho, Víctor Maya, Estela Mayoral y Raúl Perusquía (Rulo),  
Radamez García, Fernando Ortega, Markos Flores (el Sub), Alex, Enrique,  
Jorge Carranza (Angustias), Ivonne, Mauricio y Karla.

A Josefa Vidales y Victoria Mata por su innegable soporte.

A todos los miembros del Laboratorio de Cromatografía y del Laboratorio de  
Biotecnología del IMP por todo su apoyo.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
Resumen	1
Objetivos	2
Abreviaciones empleadas	3
Definiciones	4
1. Introducción	5
1.1 El suelo	5
1.1.1 La fracción mineral	5
1.1.2 La materia orgánica y los compuestos químicos orgánicos en el suelo.	7
1.1.2.1 Productos metabólicos e intermediarios.	7
1.1.2.2 Polímeros orgánicos.	7
1.1.2.3 Sustancias húmicas.	7
1.1.2.4 Compuestos orgánicos combinados.	9
1.2 Problemática.	9
1.2.1 Efecto de la contaminación del petróleo en ecosistemas terrestres.	10
1.3 Los hidrocarburos aromáticos policíclicos.	11
1.3.1 Toxicidad y propiedades físicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos	11
1.3.1.1 Narcosis.	12
1.3.1.2 Efecto tóxico de los productos derivados de la fotólisis de los HAP.	12
1.3.1.3 Activación bioquímica y formación de aductos.	12
1.3.1.4 Disturbios en la regulación hormonal.	13
1.3.1.5 Propiedades físicas.	13
1.4 Los hidrocarburos aromáticos policíclicos en los suelos.	13
1.4.1 Adsorción.	17
1.4.2 Volatilización y fotodegradación de hidrocarburos volátiles.	18
1.4.3 Lixiviación.	18
1.4.4 Polimerización.	18
1.4.5 Biorremediación	19
1.4.5.1 Algunas vías metabólicas de degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos por microorganismos.	20

---

ÍNDICE	Pág.
1.4.5.2 Velocidades de desaparición de HAP	21
1.4.5.2 Fitorremediación de los suelos.	23
1.4.5.3 La planta <i>cyperus odoratus</i>	24
1.5 Fundamentos de la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas.	25
Componentes funcionales	
1.5.1 Cromatografía de gases.	25
1.5.1.1 Gas portador.	25
1.5.1.2 Sistema de inyección.	25
1.5.1.3 Configuración de columnas y hornos.	26
1.5.1.4 La fase estacionaria.	27
1.6.1.5 Temperatura del horno	27
1.5.2 Espectrómetro de masas.	28
1.5.2.1 Interfase	28
1.5.2.2 Sistema de vacío	29
1.5.2.3 Producción de iones	29
1.5.2.4 Fuente de iones de impacto electrónico.	29
1.5.2.5 Interpretación de espectros de masas y cuantificación empelando CG acoplada a detector de masas	31
1.5.2.6 Ventajas y desventajas de las fuentes de ie.	32
1.5.2.7 El filtro de masas.	33
1.5.2.8 El detector	35
1.5.2.9 La computadora.	36
2 Parte Experimental	37
2.1 Diseño experimental biológico.	37
2.2 Materiales y aparatos	39
2.3 Equipo	39
2.4 Reactivos.	39
2.5 Obtención de los individuos de la planta <i>cyperus odoratus</i> .	40
2.6 Análisis de HAP por CG-EM.	40
2.6.1 Preparación de la mezcla de estándares de HAP.	41

ÍNDICE	Pág.
2.6.2 Condiciones de operación del equipo.	44
2.6.3 Identificación de los espectros de masas obtenidos por impacto de electrones.	45
2.6.4 Resolución de los picos cromatográficos de los HAP	51
2.7 Implantación método de cuantificación de HAP por cg	53
2.7.1 Cuantificación de los HAP.	53
Curvas de calibración de los HAP empleando cg-em.	53
2.7.2 Determinación de la repetibilidad de la inyección de la muestra y la variabilidad de la respuesta del equipo para cada HAP.	71
2.8 Preparación del suelo empleado.	71
2.9. Tratamiento de las muestras.	72
2.9.1 Muestreo	72
2.9.2 Extracción:	72
2.9.3 Purificación:	72
2.9.4. Determinación de la concentración de las muestras.	75
2.10. Control de calidad.	76
2.11 Diagrama de flujo	77
Resultados	78
3.1 Resultados de la implantación método de cuantificación de HAP por CG-EM.	78
3.1.1 Evaluación del método.	78
3.2 Resultados de los muestreos de suelo contaminado sometidos al proceso de fitorremediación.	81
3.2.1 Identificación de los HAP presentes en las muestras de suelo contaminado por petróleo.	81
3.2.2 Cuantificación de los HAP presente en las muestras.	85
4 Conclusiones y Recomendaciones.	93
A1. Fórmulas estadísticas	96
A1.1 Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.	

ÍNDICE	Pág.
A.1.2 Comprobación de la idoneidad del modelo a.1.2.1 coeficientes de correlación ( $r^2$ ) y de determinación ( $r$ ).	96
A1.2.2 Prueba de linealidad de las curvas de calibración.	97
A1.2.3 Análisis de residuales.	97
A1.3. Estimación del límite de detección.	98
A1.4 Determinación de $\bar{x}$ media muestral, la desviación estándar y coeficiente	98
A2. Propiedades fisicoquímicas del suelo empleado.	99
A2.1 Determinación de la textura (método de bouyoucos)	100
A2.2 Determinación del pH.	100
A2.3 Cantidad de materia orgánica.	101
A2.4 Densidad del suelo.	103
A2.4.1 Densidad aparente	103
A2.4.2 Densidad real.	104
A2.4.3 Pruebas de esterilización.	105
A.3 Nomenclatura de los hidrocarburos aromáticos policíclicos	107
A.3.1 Nombres triviales y semitriviales	
A.3.2 Numeración	110
Bibliografía	112



---

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1.1 Propiedades físicas y toxicas de HAP.	<b>14-16</b>
Tabla 1.2 Tiempo de vida media (en días) para HAP en varios sistemas.	<b>22</b>
Tabla 2.1 Resumen del diseño experimental biológico para la determinación de la contribución de las plantas en el comportamiento de la concentración de HAP en un suelo contaminado con petróleo.	<b>38</b>
Tabla 2.2 Pureza e identificación de los estándares de HAP usados.	<b>39</b>
Tabla 2.3 Concentraciones y diluciones de los estándares HAP empleados para elaborar las curvas de calibración.	<b>42-43</b>
Tabla 2.4. Programa de temperatura para la separación de HAP por CG.	<b>44</b>
Tabla 2.5 Adquisición de los iones de HAP en el MSI.	<b>44</b>
Tabla 2.6 % de la altura del valle de los pares de HAP que coeluyen.	<b>52</b>
Tabla 2.7. Tiempos de retención y iones seleccionados para la cuantificación de HAP.	<b>53</b>
Tabla 2.8. Valores de las pruebas de repetibilidad de la inyección con una mezcla de estándares de HAP (~0.5 mg/Kg)	<b>71</b>
Tabla 2.9 Elución de las muestras en los cartuchos de EFS de LC-Si acoplada a LC-NH <sub>2</sub>	<b>73</b>
Tabla 2.11. Enumeración de HAP.	<b>73</b>
Tabla 3.1 % de Recuperación para HAP en suelo extraídos con Soxhlet y purificados con cartuchos acoplados de EFS de LC-Si y LC-NH <sub>2</sub> y cuantificados por CG-EM.	<b>80</b>
Tabla 3.2 Intensidades de los iones de B[ghi]perileno en la muestra.	<b>85</b>
Tabla 3.3 Resultados de la muestras de suelo contaminado con petróleo. SUELO NO ESTERILIZADO (M101 ne-M103 ne) Y ESTERILIZADO (M101e-M103e)	<b>87</b>
Tabla 3.4 Resultados de la muestras de suelo contaminado con petróleo. PLANTAS CON SUELO NO ESTERILIZADO (M201 pne -M203 pne) Y SUS CONTROLES (M201 cne-M203 cne)	<b>88</b>

---

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 3.5 Resultados de la muestras de suelo contaminado con petróleo. PLANTAS CON SUELO ESTERILIZADO (M201 pe-M203 pe) Y SUS CONTROLES (M201ce-M203ce)	<b>88</b>
Tabla 3.6 Resultados de la muestras de suelo contaminado con petróleo. PLANTAS CON SUELO NO ESTERILIZADO (M301 pne-M303 pne) Y SUS CONTROLES (M301 cne-M 303 cne)	<b>88</b>
Tabla 3.7 Resultados de la muestras de suelo contaminado con petróleo. PLANTAS CON SUELO ESTERILIZADO (M301 pe-M303 pe) Y SUS CONTROLES (M301 ce-M103 ce).	<b>88</b>
Tabla 3.7 Análisis de Varianza de las muestras entre los muestreos y tratamientos para el B[K]fluoranteno	<b>89</b>
Tabla 3.8 Análisis de Varianza de las muestras entre muestreos y tratamientos para el B[ghi]perileno.	<b>90</b>
Tabla 3.8 Análisis de Varianza de las muestras entre muestreos y tratamientos para el Criseno.	<b>91</b>
Tabla A2.1 Textura del suelo empleado.	<b>100</b>
Tabla A2.2 Valor del pH del suelo emplado.	<b>101</b>
Tabla A2.3 Determinación de la materia orgánica	<b>103</b>
Tabla A2.4 Determinación de la densidad aparente del suelo empleado.	<b>101</b>
Tabla A2.5 Valor de la determinación real del suelo empleado	<b>105</b>
Tabla A2.6 Resumen de las propiedades de fisicoquímicas del suelo contaminado.	<b>106</b>

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1.1 Procesos de transformación del suelo .	5
Figura 1.2 Interacciones por Fuerzas de VW de la materia orgánica con silicatos.	6
Figura 1.3. Estructura cristalina de silicatos.	6
Figura 1.4 Modelo de la estructura del ácido fúlvico con 15 % de aromaticidad.	8
Figura 1.5 Esquema de la interacción de las sustancias húmicas que resultan de la formación de enlaces éster-éster con productos de metabolismo de HAP.	8
Figura 1.6. Zona contaminada por petróleo en el edo. de Veracruz, Mex.	10
Figura 1.7. Activación metabólica del benzo[a]pireno en mamíferos.	12
Figura 1.8. Representación esquemática del destino de los HAP en suelos.	13
Figura 1.9. Mecanismo propuesto para la polimerización del benceno.	19
Figura 1.10. Rutas metabólicas de gradación de HAP en microorganismos	21
Figura 1.11. Mecanismo hipotético y diagrama de la fitorremediación	23
Figura 1.12. Planta <i>Cyperus odoratus</i>	24
Figura 1.13. Componentes de un cromatógrafo de gases.	25
Fig. 1.14. Vista transversal de un inyector de vaporización instantánea	26
Figura 1.15. Componentes principales de un espectrómetro de masas de cuadrupolo.	28
Figura 1.16. Fuente de impacto de electrones.	30
Figura 1.17. Mecanismos de fragmentación.	31
Figura 1.18 Diagrama esquemático de una analizador de cuadrupolo.	33
Figura 1.19 Diagrama de estabilidad para un analizador de masas de cuadrupolo.	35
Figura 1.20. Detector DAE / EM <sup>4</sup>	36
Figura 2.1 Espectros de masas de HAP	45-50
Figura 2.2. Cromatograma de estándares de HAP .	51
Figura 2.3 Cromatograma del par Fenantreno y Antraceno respectivamente.	52
Figura 2.4 Cromatograma del par B[a]antraceno y Criseno repectivamente	52

## RESUMEN

El suelo constituye un ecosistema dinámico y muy complejo que puede ser deteriorado por la presencia de contaminantes químicos, tales como el petróleo. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos carcinogénicos<sup>37</sup>, persistentes<sup>33</sup> y bioacumulables<sup>37</sup>, por lo que es de suma importancia realizar estudios sobre su presencia y desarrollar tecnologías encaminadas para su remoción en aquellos sitios contaminados por petróleo. Una de las tecnologías prometedoras de remediación, consiste en el uso de especies vegetales para eliminar contaminantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de la remoción de los HAP presentes en una muestra de suelo que provino de una zona contaminada por desechos de una refinería en el estado de Veracruz, con plantas *Cyperus odoratus*. Para ello se implantaron los métodos de: extracción de HAP con equipos Soxhlet, de purificación a través de extracción fase sólida de LC-Si LC-NH<sub>2</sub> y para la detección y cuantificación de estos por medio de cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas. El método que se desarrolló para la detección y cuantificación de 16 HAP por CG-EM es confiable ya que las curvas de calibración presentan una tendencia lineal, hay una buena resolución de la mayoría de los picos cromatográficos y así como una buena repetibilidad entre las inyecciones. Sin embargo, el método tiene cierta incertidumbre en cuanto a la identidad de los analitos. El método desarrollado para el tratamiento de las muestras de suelos con HAP en suelos es confiable para los siguientes HAP: Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[g,h,i]perileno, Benzo[k]fluoranteno, Criseno, Dibenzo[a,h]antraceno, Fenantreno, Fluoranteno, Fluoreno, e Indeno[1,2,3-c,d]pireno porque tienen rendimientos de extracción aceptables, sin embargo, para el Acenafteno, Antraceno, Benzo[a]pireno, Naftaleno, y el Pireno el método no es confiable ya que presentan % de recuperación bajos de acuerdo a lo establecido en la EPA. Estadísticamente no se observó cambio de la concentración de los HAP encontrados en las muestras a lo largo del tiempo y conforme con los resultados estadísticos obtenidos, la presencia de la planta *Cyperus odoratus* no influye en la reducción de la concentración de los HAP.

## OBJETIVOS

### **Objetivo General.**

Determinar la efectividad en la remoción de HAP en un suelo contaminado por petróleo de un sistema de plantas *Cyperus odoratus*.

### **Objetivos particulares para la evaluación de HAP .**

Realizar el análisis físicoquímico del suelo que se empleó.

Implantar y evaluar el método de extracción por Soxhlet para 16 HAP en suelos.

Determinar las mejores condiciones de purificación de 16 HAP en las muestras por medio de Extracción en Fase Sólida.

Determinar las mejores condiciones de cuantificación de 16 HAP en suelos por el método de análisis por CG-EM.

Evaluar muestras de control para verificar el buen desempeño del analista durante la ejecución del método.

**ABREVIACIONES EMPLEADAS**

<b>CG-EM</b>	cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas.
<b>CD</b>	corriente directa
<b>CV</b>	coeficiente de variación.
<b>EFS</b>	extracción en fase sólida.
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency.
<b>DAE</b>	dinodo de alta energía
<b>DE</b>	desviación estándar
<b>KD</b>	equipo de concentración Kuderna Danish
<b>HAP</b>	hidrocarburos aromáticos policíclicos.
<b>LD</b>	Límite de detección estimado
<b>ppm</b>	partes por millón (mg/Kg de suelo).
<b>m / z</b>	relación de masa carga.
<b>Rs</b>	resolución de dos picos cromatográficos.
<b>Rf</b>	radio frecuencia
<b>t<sub>R</sub></b>	tiempo de retención.
<b>MSI</b>	monitoreo selectivo de iones
<b>R</b>	coeficiente de determinación
<b>R<sup>2</sup></b>	coeficiente de correlación
<b>% R</b>	% de recuperación.
<b>%MO</b>	% de materia orgánica.
<b>B[a]antraceno</b>	Benzo[a]antraceno
<b>B[a]pireno</b>	Benzo[a]pireno
<b>B[b]fluoranteno</b>	Benzo[b]fluoranteno
<b>B[ghi]perileno</b>	Benzo[g,h,i]perileno
<b>B[k]fluoranteno</b>	Benzo[k]fluoranteno
<b>Db[a,h]antraceno</b>	Dibenzo[a,h]antraceno
<b>I[123cd]pireno</b>	Indeno[1,2,3 c-d]pireno

---

**DEFINICIONES**

**Adsorción:** Acumulación de un compuesto llamado adsorbato sobre la superficie del suelo o de otro adsorbente debida a interacciones de Van der Waals.<sup>14</sup>

**Biorremediación:** Es el uso de organismos para la remoción de contaminantes.<sup>14</sup>

**Carcinogénico:** Compuesto que induce alteraciones en el ADN que progresan hasta convertirse en cáncer después de un periodo de latencia de varios años.<sup>40</sup>

**Creosota** Mezcla que se obtiene de la destilación del carbón (en forma de alquitrán de hulla)<sup>40</sup>

**Contaminación:** Presencia de sustancias que dañan o alteran nocivamente un ecosistema.<sup>40</sup>

**Compuestos persistentes:** son aquellos que se resisten a cualquier tipo de degradación.<sup>33</sup>

**Cooxidación:** Oxidación biológica de un compuesto, el cual no puede ser usado como única fuente de energía por un microorganismo pero si puede oxidarlo cuando está presente otro sustrato, que es fácilmente metabolizado.<sup>24</sup>

**Fitorremediación:** Empleo de plantas y árboles para remover contaminantes de suelos y aguas.

31

**Fuerzas de van der Waals:** Fuerzas intermoleculares que son relativamente débiles y de corto alcance.<sup>14</sup>

**Hidrocarburos aromáticos policíclicos:** Compuestos aromáticos que tienen varios anillos de benceno fusionados.<sup>35</sup>

**Hidrofobicidad:** Migración y acumulación preferente de los compuestos orgánicos en solventes o sobre superficies no afines al agua, tales como la materia orgánica, por sobre los solventes acuosos o de las superficies hidrofílicas.<sup>14</sup>

**Lixiviación:** Proceso de lavado que realiza el agua que se infiltra en el suelo.<sup>40</sup>

**Lignina:** Polímero formado por unidades fenólicas que son abundantes en la madera y en las plantas.<sup>14</sup>

**Mineralización:** Conversión de los compuestos que se encuentran en la materia orgánica del suelo, a minerales o formas iónicas (dióxido de carbono y agua).<sup>14</sup>

**Rizósfera:** Zona del suelo en la que se encuentran las raíces de las plantas.<sup>4</sup>

**Pico base:** En espectrometría, pico más intenso en el espectro de masas.<sup>34</sup>

**Presión de vapor:** Presión ejercida por el vapor confinado de un líquido o sólido.<sup>14</sup>

**Volatilización:** En este contexto es la pérdida de un compuesto de la superficie del suelo a la atmósfera.<sup>14</sup>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 El suelo

El suelo es la capa más externa de la superficie continental de la Tierra, que está formado por un agregado de minerales no consolidados, materia orgánica, agua y gases<sup>40</sup>. Debido a las múltiples transformaciones químicas, biológicas y físicas así como por la fuerte dependencia con el clima, el suelo se considera como la porción más compleja de la biosfera. <sup>40</sup>(Figura 1.1.)

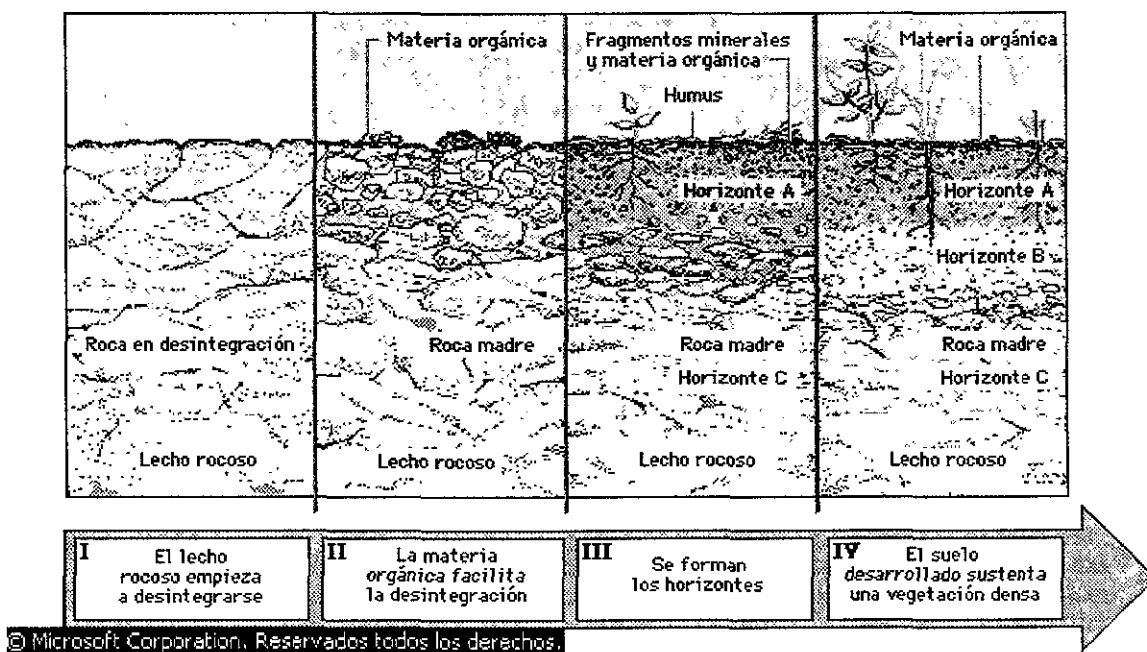


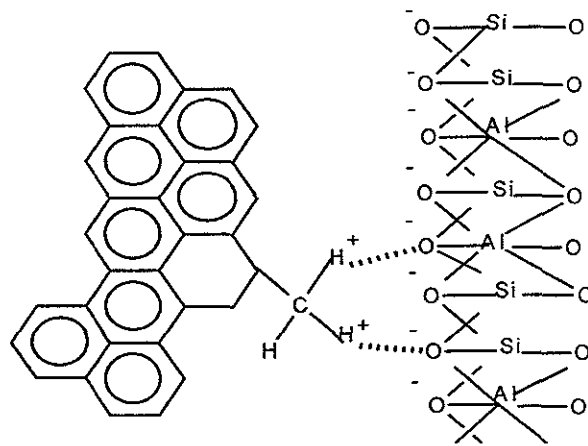
Figura 1.1 Procesos de transformación del suelo.<sup>40</sup>

#### 1.1.1 La fracción mineral

Los minerales constituyen aproximadamente el 50% del volumen típico del suelo; son compuestos inorgánicos que poseen estructuras internas ordenadas con características y composiciones químicas definidas<sup>14</sup>. Los minerales pueden clasificarse de acuerdo a su grupo aniónico que contengan, algunos de ellos son los carbonatos, haluros, óxidos, hidróxidos, fosfatos, sulfitos, silicatos, boratos, nitratos, sales de azufre y tungstatos.<sup>14</sup>

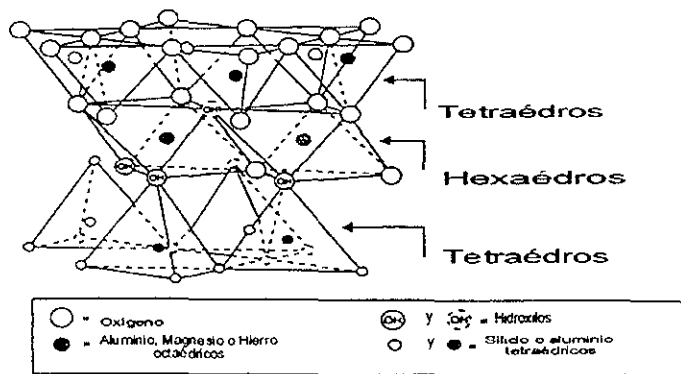
De entre todos los minerales, algunos silicatos interaccionan con los HAP a través de fuerzas de Van der Waals. <sup>14</sup>





**Figura 1.2 Interacciones por Fuerzas de VW de la materia orgánica con silicatos.**

Los silicatos son una porción importante de los minerales comunes y de los que están presentes en las rocas ígneas.<sup>14</sup> La unidad fundamental de su estructura química es el tetraedro de  $\text{SiO}_4$ , el cual forma estructuras más complejas mediante la unión de iones compartidos de  $\text{O}^{2-}$ . Las arcillas del suelo son silicatos que contienen Al, Mg, Fe y además poseen cargas negativas superficiales provocadas por defectos en su estructura cristalina y por reacciones químicas.<sup>14</sup>



**Figura 1.3. Estructura cristalina de silicatos.<sup>14</sup>**

Los silicatos interactúan fuertemente con la materia orgánica,<sup>14</sup> fundamentalmente con el humus del suelo produciéndose un complejo arcilla-materia orgánica. El mecanismo propuesto para la explicación de tal comportamiento consiste en el intercambio de ligante entre el grupo protonado del hidroxilo de los metales de la superficie de las arcillas ( $\text{OH}_2^+$ ) y el carboxilo de los ácidos húmicos o fúlvicos del suelo.<sup>21</sup>

## **1.1.2 La materia orgánica y los compuestos químicos orgánicos en el suelo.**

La materia orgánica del suelo se divide específicamente en las siguientes clases de compuestos orgánicos: productos metabólicos e intermediarios, polímeros orgánicos, sustancias húmicas y combinaciones de compuestos orgánicos.<sup>14</sup>

### **1.1.2.1 Productos metabólicos e intermediarios.**

Muchos de los compuestos básicos de los bloques de construcción de metabolitos de vegetales, macroorganismos y microorganismos se pueden encontrar en los suelos. Estos pueden ser divididos en tres grupos generales: aminoácidos, azúcares, moléculas orgánicas combinadas, etc. Además se encuentran varios compuestos organo-fosforados y organo-sulfurados.<sup>14</sup>

### **1.1.2.2 Polímeros orgánicos.**

Los polímeros orgánicos son macromoléculas que poseen grandes pesos y volúmenes moleculares. Estos compuestos son sintetizados al polimerizarse pequeñas moléculas orgánicas tales como azúcares y aminoácidos, entre otros.<sup>14</sup>

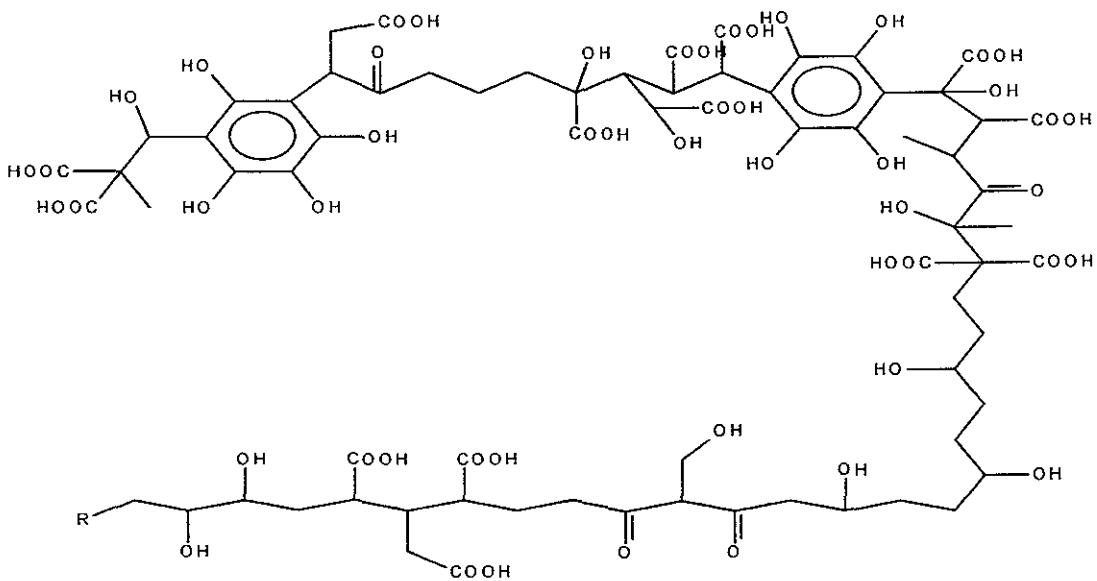
### **1.1.2.3 Sustancias Húmicas.**

Las sustancias húmicas, también conocidas como humus, se originan por la degradación de los residuos de plantas y animales y se encuentran en la naturaleza, disueltas en la fase acuosa en aguas subterráneas y en aguas superficiales o asociadas a minerales tales como las arcillas.<sup>14</sup>

Estas sustancias son una mezcla compleja de compuestos orgánicos naturales de alto peso molecular, persistentes, de color negro o café y cuya estructura no está bien definida, ya que las moléculas que las constituyen no son idénticas unas de otras.<sup>14, 54</sup>

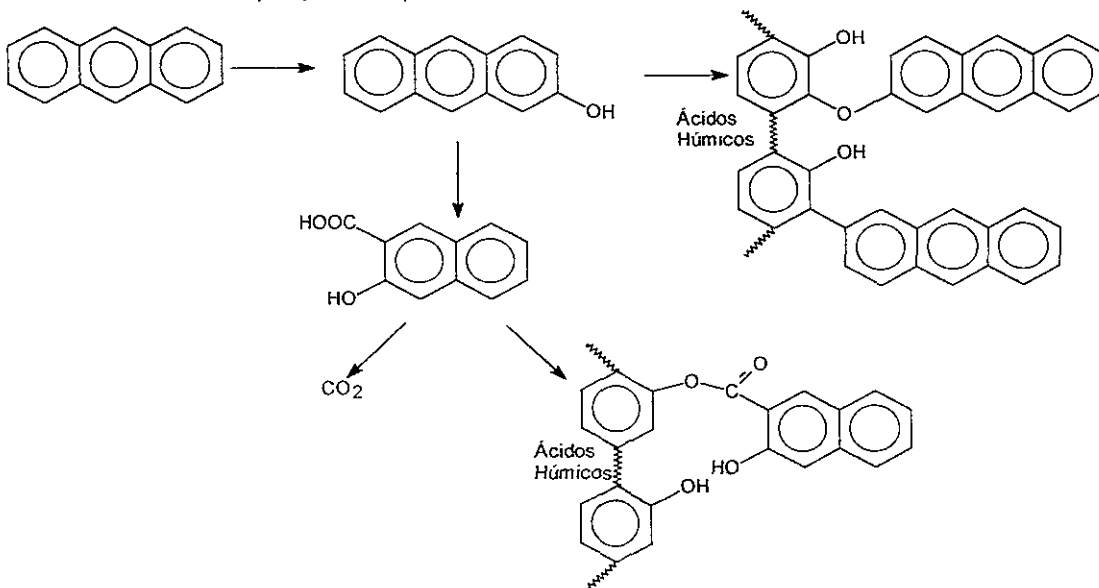
Con base en su resistencia a la degradación, su solubilidad en agua a diferentes pH y a sus características estructurales semicuantitativas, el humus se divide en tres clases de compuestos: los ácidos fúlvicos, los ácidos húmicos y las huminas.<sup>14</sup>(Figura 1.4)

La biodegradación de los ácidos fúlvicos puede tomar de 15 a 50 años, la de los ácidos húmicos, cientos de años, mientras que las huminas son altamente resistentes.<sup>14</sup>



**Figura 1.4 Modelo de la estructura del ácido fúlvico con 15 % de aromaticidad.**

Se ha encontrado que las sustancias húmicas tienen una gran capacidad de adsorción de HAP.<sup>55</sup> El mecanismo propuesto para tal fenómeno se muestra a continuación:



**Figura 1.5 Esquema de la interacción de las sustancias húmicas que resultan de la formación de enlaces éster-éster con productos de metabolismo de HAP.<sup>54</sup>**

#### **1.1.2.4 Compuestos orgánicos combinados.**

Esta clase de compuestos está conformada de varios alcanos, ácidos de alcanos, alcoholes de alcanos, alcanos cíclicos, acetonas de alcanos y numerosos derivados aromáticos.<sup>14</sup>

Algunos autores indican que los HAP pueden interactuar con el humus del suelo por medio de enlaces covalentes de ésteres.<sup>54,55</sup> (Figura 1.5)

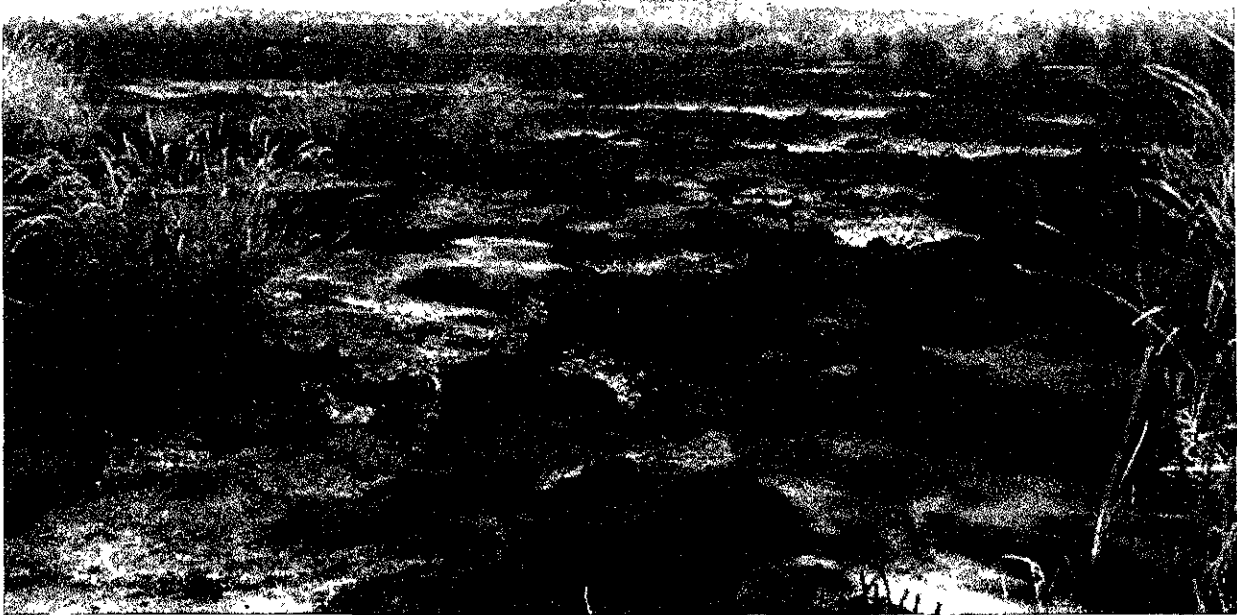
Como consecuencia, se obtienen tres tipos de adsorbentes para un compuesto orgánico: el complejo materia orgánica-silicatos, los silicatos y la materia orgánica independiente.

### **1.2 Problemática.**

La contaminación por petróleo se presenta principalmente por procesos antropogénicos<sup>6</sup>. Los sitios contaminados son considerados de alto riesgo para la salud humana por la presencia de los HAP en ellos, por lo que es indispensable la búsqueda de soluciones a la contaminación de petróleo. La fitorremediación es una alternativa de remoción de contaminantes a bajo costo en la que se tiene grandes expectativas. La determinación de los HAP en suelos contaminados por derrames de petróleo no es fácil debido, en primer término, a que la matriz en la que se encuentran es muy compleja y en segundo término a que los HAP pueden participar en varios procesos con el suelo que provocan que estos estén cada vez menos accesibles, aunque no necesariamente sean menos peligrosos, aún empleando métodos de extracción exhaustivos. Por lo tanto es necesario implementar y desarrollar las técnicas analíticas adecuadas que nos permitan evaluar correctamente la concentración de los analitos en los suelos.

### 1.2.1 Efecto de la contaminación del petróleo en ecosistemas terrestres.

La contaminación por petróleo de ecosistemas terrestres afecta la biota residente.<sup>6</sup> (Figura 1.6.)



**Figura 1.6. Zona contaminada por petróleo en el edo. de Veracruz, Mex.**

El daño y la duración de los efectos de un derrame de petróleo sobre las plantas dependen principalmente de la cantidad y la calidad del petróleo derramado, del tratamiento posterior al derrame y del tipo de suelo contaminado. El clima y el nivel de nutrientes del suelo contaminado también juegan un papel importante en la regeneración de su vegetación.<sup>6</sup>

Es conveniente mencionar que la fitotoxicidad de los hidrocarburos no se puede generalizar ya que varía con el tipo de suelo, petróleo y planta.<sup>27</sup>

Algunos estudios de fitotoxicidad con hidrocarburos del petróleo revelan que altas concentraciones de hidrocarburos ligeros (octano, decano), aromáticos, cicloalcanos y compuestos fenólicos, reducen la respiración, la transpiración y la fotosíntesis en pastos y plantas de cultivo tales como zanahorias, cítricos, etc.<sup>12 y 30</sup>

Otros estudios demostraron que la regeneración de plantas en un suelo contaminado con petróleo crudo fue más exitosa después de que se plantaron pastos.<sup>27</sup>

### 1.3 Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Los HAP son productos formados de la pirólisis incompleta de materiales orgánicos y están presentes en cantidades considerables durante procesos de combustión de combustible fósil.

Las principales fuentes de contaminación de HAP son<sup>10</sup>:

- Refinerías y almacenes de residuos de petróleo.
- Desechos de procesos de alquitrán de hulla.
- Combustión de gasolina, queroseno, carbón y diesel.
- Combustión de cigarrillos.
- Incendio de bosques o pastos.
- Incineración de desechos.
- Desechos de creosota y derivados del petróleo que son utilizados como conservadores.

y los principales mecanismos por los cuales se dispersan los HAP en el ambiente son las siguientes.<sup>10</sup>

- Filtración natural de petróleo.
- Derrames accidentales de tanques de petróleo o barcos.
- Contaminación de aguas subterráneas.
- Afluentes industriales petroquímicos.
- Emisión de partículas de motores de automóviles viejos.
- Deposito de partículas volátiles de cenizas de la atmósfera.

#### 1.3.1 Toxicidad y propiedades físicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos :

##### **Toxicidad:**

Los HAP presentan diferentes mecanismos de toxicidad que dependen del compuesto, del tipo de exposición (inmediata o crónica), organismo que se expone y de las condiciones ambientales.<sup>28</sup>

### 1.3.1.1 Narcosis.

Este modo de toxicidad no se origina por la reactividad de los compuestos, sino que se debe a su acumulación en la membrana celular, por su alta solubilidad en los lípidos y su baja o nula solubilidad en agua. Esto ocasiona disturbios en la estructura de la membrana y en los procesos de transporte a través de ella, tales como la regulación osmótica y la neurotransmisión.<sup>28</sup>

### 1.3.1.2 Efecto tóxico de los productos derivados de la fotólisis de los HAP.

La exposición de los HAP a la luz UV induce la formación de radicales libres y desencadena una serie de reacciones que atacan una variedad de macromoléculas y en consecuencia la toxicidad de los HAP modificados se incrementa.<sup>28</sup>

### 1.3.1.3 Activación bioquímica y formación de aductos.

Este mecanismo de toxicidad es específico en dos aspectos:

- Solo ciertos HAP son carcinogénicos<sup>28</sup>, por ejemplo, el benzo[e]pireno es casi inactivo mientras que el benzo[a]pireno es un carcinogénico potencial.<sup>8 y 9</sup>
- No todos los organismos cuentan con el sistema enzimático necesario para llevar a cabo el metabolismo de los HAP. Los organismos expuestos que tienen una velocidad alta para metabolizar los HAP son víctimas de este tipo de toxicidad, particularmente, si su sistema celular de reparación está pobremente desarrollado.<sup>28</sup> A continuación se presenta el mecanismo de activación del Benzo[a]pireno en mamíferos. (Figura 1.7)

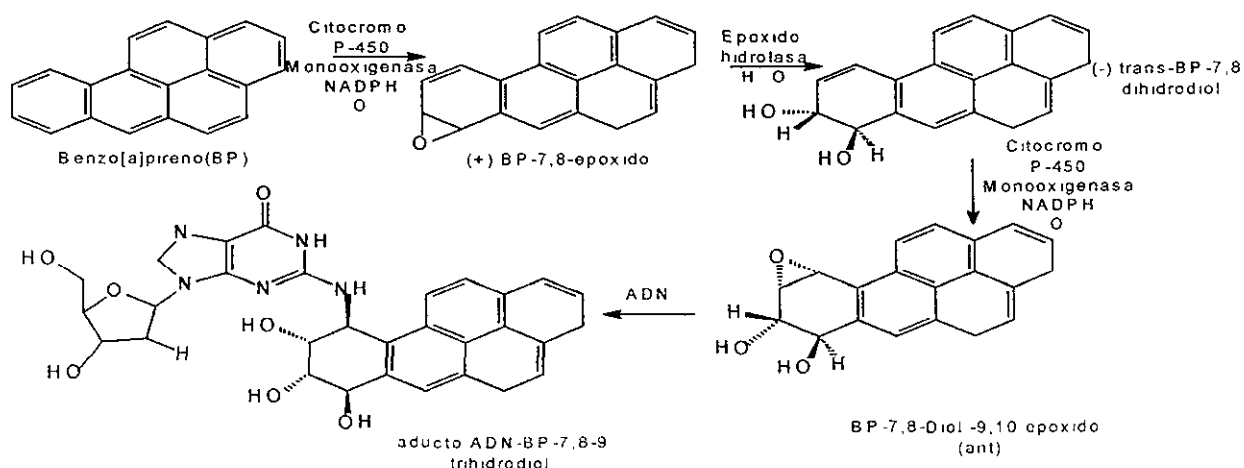


Figura 1.7. Activación metabólica del benzo[a]pireno en mamíferos. <sup>9</sup>

#### 1.3.1.4 Disturbios en la regulación hormonal.

Ciertos metabolitos de HAP que tienen una estructura similar a ciertas hormonas del grupo de los esteroides, pueden interaccionar con los receptores de éstas provocando alteraciones en los organismos. Sin embargo, para que se presente este tipo de toxicidad es necesario que los organismos se expongan de forma crónica.<sup>28</sup>

#### 1.3.1.5 Propiedades físicas.

Los HAP son generalmente hidrofóbicos. En general, la solubilidad en agua, presión de vapor y punto de ebullición tienden a disminuir a medida que aumenta el peso molecular de los compuestos.<sup>36</sup>

La estructura, los datos de toxicidad y las propiedades fisicoquímicas de los 16 HAP, listados por la EPA como contaminantes prioritarios, se muestran en la Tabla 1.1

### 1.4 Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en los suelos.

Con el fin de tratar de entender el comportamiento de los HAP en los suelos se describen a continuación los fenómenos en los que pueden estar involucrados. (Figura 1.8)

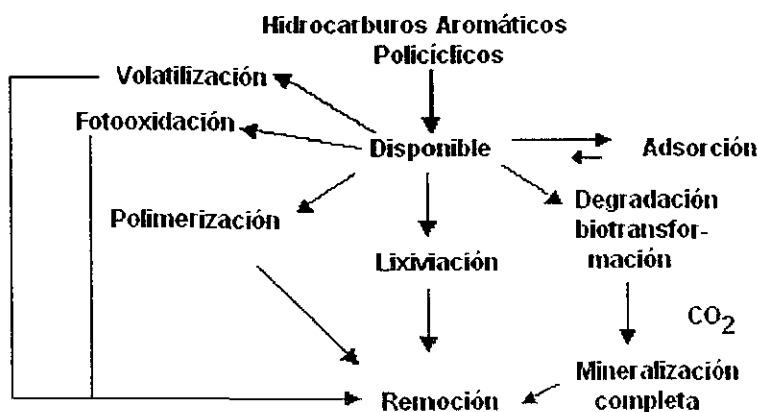


Figura 1.8. Representación esquemática del destino de los HAP en suelos. (Modificado de Cerniglia<sup>10</sup>)



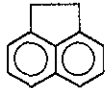

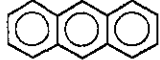
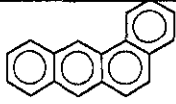
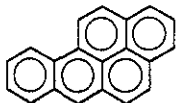
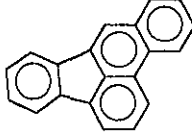
Compuesto	Estructura	PM g/mol	Formula molecular	PF / PE ( ° C)	Presión de vapor ( torr) a 20 <sup>33</sup> y 25 <sup>51</sup> ° C.	Velocidades de volatiliza- ción en suelo. 14	Solubilidad en agua (mg/L) <sup>33</sup>	Datos de toxicidad <sup>45</sup>	Potencial carcino- génico <sup>43</sup>	Genotoxi- cidad <sup>10</sup>
Acenafteno		154	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	93-95 <sup>43</sup> / 277-279 <sup>43</sup>	0.0141 <sup>(51)</sup>		3.5	Ataca directamente el riñon, el hígado y piel.		ERST
Acenaftileno		152	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	92-95 <sup>46</sup> / 265 <sup>46</sup>	0.0126 <sup>(51)</sup>		3.9			
Antraceno		178	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	- / 217 <sup>43</sup>	1.75x 10 <sup>-5</sup> <sup>(51)</sup>	en suelo arenoso < 0.1% en 48 h	7.3 x 10 <sup>-2</sup>	Irrita la piel y puede causar alergia	--	-
B[a] Antraceno		228	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	160 <sup>45</sup> / 437 <sup>45</sup>	5.0 x 10 <sup>-9</sup> <sup>(33)</sup>	en suelo arenoso por debajo del límite de detección	1.4 x 10 <sup>-2</sup>	Carcinogénico confirmado. Produce tumores en la piel por contacto. Venenoso por ruta intravenenosa.	++	ERST+ AC+ICH
B[a] pireno		252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	179 <sup>43</sup> / 495 <sup>43</sup>	5.0 x 10 <sup>-7</sup> <sup>(33)</sup>	en suelo arenoso por debajo del límite de detección	3.8 x 10 <sup>-3</sup>	Carcinogénico confirmado. Venenoso por vía subcutánea, intraperitoneal e intrarrenal. Irrita la piel	++	ERS+ AC+DSA+ AA
B[b] Fluoranteno		252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	168 <sup>46</sup> / -	5.0x 10 <sup>-7</sup> ( <sup>33,51</sup> )	en suelo arenoso por debajo del límite de detección	1.2 x 10 <sup>-3</sup>		++	

Tabla 1. Propiedades físicas y toxicas de HAP.


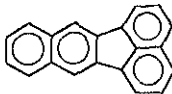
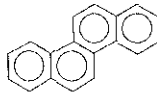
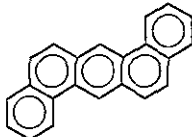
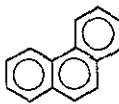
Compuesto	Estructura	PM g/mol	Formula molecular	PF / PE ( ° C)	Presión de vapor ( torr) a 20 <sup>33</sup> y 25 <sup>51</sup> ° C)	Velocidades de volatiliza- ción en suelo, <sup>14</sup>	Solubilidad en agua (mg/L) <sup>33</sup>	Datos de toxicidad <sup>45</sup>	Potencial carcino- génico <sup>43</sup>	Genotoxi- cidad <sup>10</sup>
B[ghi] Perileno		276	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	272 <sup>46</sup> />500	1.03x 10 <sup>-16</sup> ( <sup>51</sup> )		2.6 x 10 <sup>-4</sup>		±	
B[k] Fluoranteno		252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	217 <sup>46</sup> /480 <sup>46</sup>			5.5 x 10 <sup>-4</sup>	Comprobado como carcinogénico	++	
Criseno		228	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	254 <sup>43</sup> / 448 <sup>44</sup>	6.3 x 10 <sup>-7</sup> ( <sup>33</sup> )	en suelo arenoso por debajo del limite de detección	2.0 x 10 <sup>-3</sup>	Comprobado como carcinogénico en animales y humanos	+	15
Db[a,h] antraceno		278	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	Sublima <sup>43</sup> / 266 <sup>43</sup> /524 <sup>43</sup>	1.0 x 10 <sup>-10</sup> ( <sup>33</sup> )	en suelo arenoso por debajo del limite de detección	5.0 x 10 <sup>-4</sup>	Comprobado como carcinogénico	++	
Fenantreno		178	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	100 <sup>43</sup> / 340 <sup>43</sup>	6.59x10 <sup>-4</sup> ( <sup>51</sup> )	en suelo arenoso < 0.1% en 48 h	1.3	Venenoso por ruta intravenosa, y moderadamente tóxico por ingestión. Cuestionable como carcinogénico	±	-

Tabla 1. Propiedades físicas y toxicas de HAP. (continuación)

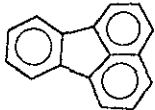
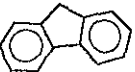
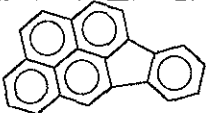

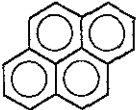
Compuesto	Estructura	PM g/mol	Formula molecular	PF / PE ( ° C)	Presión de vapor ( torr) a 20 <sup>33</sup> y 25 <sup>51</sup> ° C.	Velocidades de volatiliza- ción en suelo. 14	Solubilidad en agua (mg/l) <sup>33</sup>	Datos de toxicidad <sup>45</sup>	Potencial carcinogé- nico <sup>43</sup>	Genotoxi- cidad <sup>10</sup>
Fluoranteno		202	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	120 <sup>43</sup> / 367 <sup>43</sup>	1.1x10 <sup>-4</sup> ( <sup>51</sup> )	en suelo arenoso por debajo del límite de detección	0.26	Venenosos por ruta intravenosa. Moderadamente tóxico por ingestión y por vía cutánea.	-	
Fluoreno		166	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	116 <sup>43</sup> / 295 <sup>43</sup>	4.01x10 <sup>-3</sup> ( <sup>51</sup> )		2		±	
1[1,2,3- c,d]pireno		276	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	161 <sup>46</sup> /-	1x10 <sup>-11</sup> ( <sup>33</sup> )	en suelo arenoso por debajo del límite de detección	6.2 x 10 <sup>-2</sup>	Comprobado como carcinogénico	++	
Naftaleno		128	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	80 <sup>43</sup> / 217.9 <sup>43</sup>	0.270( <sup>51</sup> )	en suelo arenoso 3.2% en 48 h	30	Puede provocar envenenamiento en los hombres. Es moderadamente tóxico por ruta subcutánea		
Pireno		202	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	156 <sup>43</sup> / 404	3.61x10 <sup>-5</sup> ( <sup>51</sup> )	en suelo arenoso por debajo del límite de detección	0.14	Venenosos por inhalación. Tóxico moderado por ingestión y por rutas intraperitoneales. Irrita la piel,	--	ERST+ DSA+ ICH

Tabla 1. Propiedades físicas y tóxicas de HAP. (última parte)

Notas:

- ++: suficiente evidencia como causa de cáncer en el hombre.
- + : evidencia limitada, hay una interrelación de causa de cáncer pero no ha sido probada.
- ± : evidencia inadecuada, datos tanto negativos como positivos.
- : suficiente evidencia para excluirlo como agente carcinogénico.

- DSA: Desincrocación de la síntesis de ADN
- ICH: Intercambio de cromátidas hermanas.
- AC: aberraciones cromosómicas
- AA: Aductos de ADN.
- ERST: ensayos revertantes en *Salmonella typhimurium*

#### 1.4.1 Adsorción.

El grado de adsorción al suelo de un compuesto dado afecta su movilidad, su volatilización y las reacciones que puede presentar. Para las moléculas orgánicas, éste fenómeno depende del tamaño de la molécula, generalmente las moléculas más grandes son más propensas a adsorberse en la materia orgánica debido a que presentan mayores interacciones por fuerzas de van der Waals.<sup>14</sup>

Aunque usualmente las sustancias húmicas están implicadas como las responsables de la adsorción de los compuestos orgánicos, es importante reconocer que las superficies minerales del suelo también pueden acumular preferentemente compuestos orgánicos. La influencia de las arcillas sobre la adsorción puede ser importante especialmente en suelos con contenidos de materia orgánica menores al uno por ciento.<sup>14</sup> La adsorción de solutos sobre superficies minerales está determinada por la ocupación de sitios libres. Cuando los solventes polares como el agua y el metanol ocupan los sitios de adsorción sobre las superficies minerales los HAP no son adsorbidos significativamente, sin embargo, cuando los sitios de adsorción están saturados con agua, la principal interacción de los compuestos orgánicos no polares es con la materia orgánica del suelo.<sup>23</sup> Asimismo, procesos abióticos provocan que a medida que el tiempo pasa la cantidad de HAP que puede extraerse de suelos con alto contenido de arcillas o de materia orgánica disminuye y además es menos susceptible a la degradación microbiana.<sup>1, 19 y 28</sup> En resumen, los HAP pueden ser adsorbidos fuertemente al suelo debido a que éste es una mezcla de material orgánico y mineral y su capacidad de adsorción es influida por la naturaleza y las características de su materia orgánica, su composición mineral, el tamaño de sus partículas, su contenido de humedad y el tiempo en que han estado en contacto.<sup>23</sup>

Es importante mencionar que los efectos que provoca el transcurso del tiempo en la toxicidad de los HAP son muy importantes: la asimilación, la penetración y la toxicidad crónica declina con el tiempo como consecuencia de su biodisponibilidad decreciente. Evidencia de ello, es la disminución rápida -dentro de un periodo de 15 días- de la genotoxicidad de carcinogénicos como el Benzo[a]pireno en suelos.<sup>1</sup>

Es importante resaltar que aunque el transcurso del tiempo reduce la exposición y como consecuencia la toxicidad y el riesgo, estos no están eliminados por completo.<sup>1</sup>

#### **1.4.2 Volatilización y fotodegradación de hidrocarburos volátiles.**

La presión de vapor es una medida de la fuerza con la que las moléculas de un compuesto se atraen simultáneamente. Si un compuesto tiene altas fuerzas intermoleculares actuando entre sus moléculas entonces sólo las que se encuentran cercanas a la superficie y poseen una alta energía cinética, escaparán a la fase gaseosa y en consecuencia su presión de vapor será pequeña. La masa molecular es otro factor que afecta la volatilización, para compuestos de una misma serie, se ha encontrado que aquellos con mayor masa molecular presentan menor volatilización.<sup>14</sup> (Tabla 1.1)

En los suelos la pérdida de los hidrocarburos volátiles está limitada por los fenómenos de adsorción, por la densidad y humedad del suelo así como por su infiltración a los poros del suelo.<sup>7 y 14</sup>

Las reacciones fotoquímicas en las que los HAP se encuentran involucrados radican en la adsorción energética de radiación electromagnética en la región UV por los electrones deslocalizados de los anillos bencénicos que más tarde ceden a moléculasceptoras, tales como el oxígeno, generando su desestabilización y una mayor reactividad en el ambiente.<sup>25</sup> Tal reactividad, sin embargo, disminuye por la adsorción de los compuestos a la materia orgánica y por la pequeña penetración de la luz en suelos y sedimentos después de 0.2 mm de profundidad.<sup>25 y 26</sup>

#### **1.4.3 Lixiviación.**

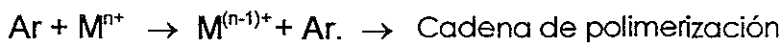
El transporte de los hidrocarburos desde la superficie hasta las aguas del subsuelo depende principalmente de la solubilidad en agua de éstos, la textura del suelo, la cantidad e intensidad con que cae la lluvia así como del tiempo que han estado en contacto con el suelo.<sup>7</sup>

Estudios realizados en un suelo con una textura entre arcilloso y arenoso, contaminado con 4 HAP demuestran que su transporte por lixiviación después de 30 semanas fue nula.<sup>36</sup>

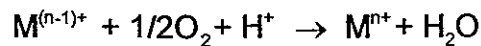
#### **1.4.4 Polimerización.**

La adsorción de compuestos orgánicos no polares en suelos secos, es debida principalmente a las superficies minerales, particularmente a las arcillas. Cuando esto

ocurre los metales de transición que se encuentran en las arcillas pueden actuar como donadores o como aceptores de electrones dependiendo de su estado de oxidación y de su potencial químico. El hierro, el aluminio y los metales en trazas que se encuentran entre las placas de silicatos y el oxígeno adsorbido en el suelo, pueden promover reacciones de radicales libres.<sup>23</sup> Estos procesos son relacionados con la polimerización de los compuestos aromáticos, por medio de la transferencia de los electrones  $\pi$  de los compuestos aromáticos a aceptores de electrones que se encuentran en las superficies de minerales. (Figura 1.9.)



y el ión del metal puede ser oxidado como sigue:



**Figura 1.9. Mecanismo propuesto para la polimerización del benceno.<sup>23</sup>**

#### 1.4.5 Biorremediación

Una vez que los hidrocarburos se incorporan al suelo, la degradación por los microorganismos parece ser el proceso de descomposición más importante ya que además de que tienen una mayor área superficial con el suelo pueden producir enzimas -internas y/o externas- que degradan contaminantes orgánicos<sup>14</sup> o que pueden actuar como surfactantes y permitir así su desorción del suelo<sup>9</sup>. Sin embargo, a medida que el número de anillos en los HAP incrementa, la biodegradabilidad disminuye. A pesar de ello, los HAP de peso molecular elevado pueden ser degradados por microorganismos mediante procesos de cooxidación y de simbiosis metabólica.<sup>24 y 36</sup> La capacidad de degradación de los HAP por un microorganismo, depende de la presencia de las enzimas involucradas en dicho proceso.<sup>36</sup>

#### 1.4.5.1 Algunas vías metabólicas de degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos por microorganismos.

La oxidación de los HAP involucra la incorporación de oxígeno molecular, en el caso de las bacterias transforman inicialmente a los HAP por un ataque inicial de enzimas dioxigenasas e incorporan los dos átomos de oxígeno para posteriormente producir cis-dihidrodiolos. Estos son deshidrogenados estereoselectivamente por las deshidrogenasas cis-dihidrodiolos, las cuales re-aromatizan el núcleo de benceno para formar intermediarios dihidroxilados. Después ocurre un ataque enzimático al anillo aromático que es catalizado también por las enzimas regio y estereo selectivas dioxigenasas, las cuales puede ocasionar una ruptura orto o meta.<sup>10</sup>(Figura 1.10)

Un grupo diverso de hongos lignolíticos y no-lignolíticos tienen la habilidad de oxidar los HAP.

El hongo no lignolítico *Cunninghamella elegans*, utiliza la enzima citocromo P-450 monooxigenasa para incorporar un átomo de oxígeno molecular a un núcleo aromático y reducir el átomo de oxígeno remanente a agua. El óxido de areno resultante puede metabolizarse adicionalmente por la hidrolasa epóxido para formar un dihidrodiol con la configuración *trans* o puede sufrir un rearrreglo no enzimático para formar fenol, el cual puede conjugarse con sulfato o con glucosa. *C. elegans* oxida HAP y sus derivados metilo, nitro y fluoro sustituidos a *trans*-dihidrodiolos, fenoles, quinonas y a los conjugados de sus metabolitos primarios.<sup>10</sup>

El hongo *Tanerochaete chrysosporum* produce lignina peroxidasas extracelulares que no sólo degradan compuestos relacionados a la lignina sino que también catalizan la oxidación de los HAP a quinonas.<sup>10</sup> (Figura 1.10)

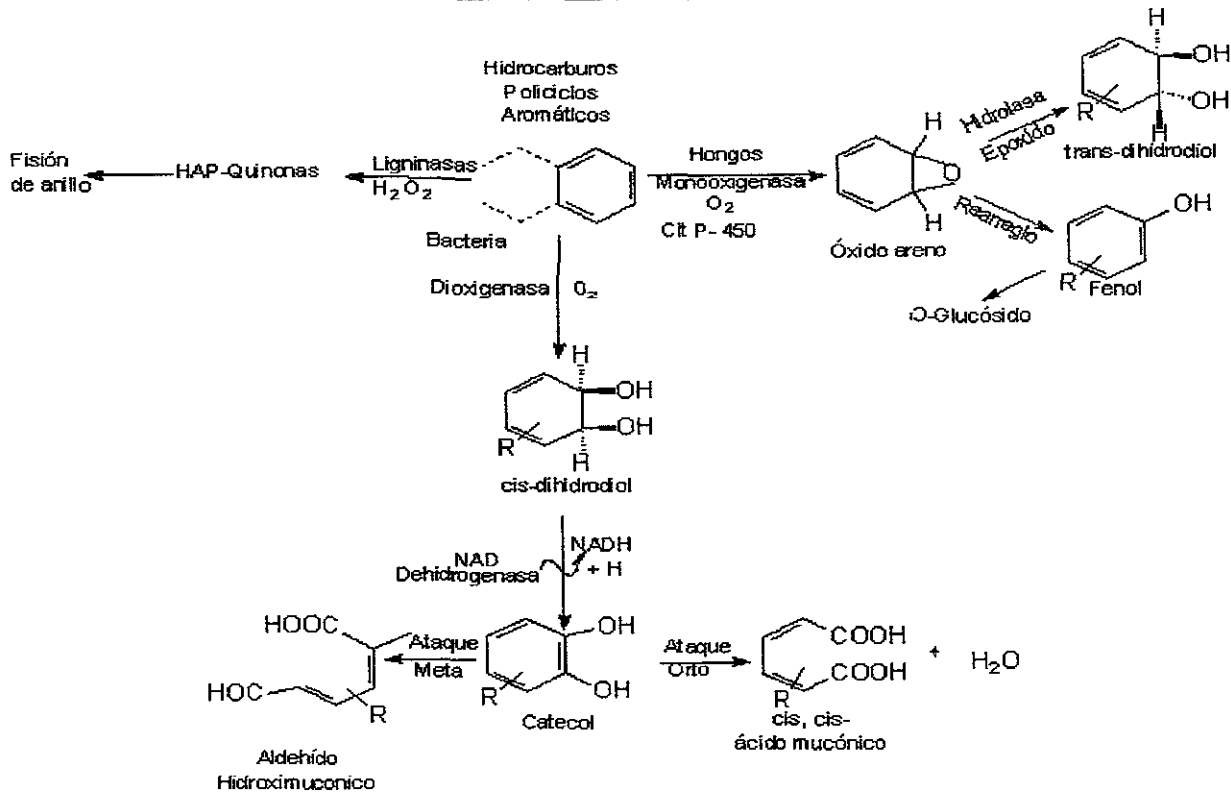


Figura 1.10. Rutas metabólicas de gradación de HAP en microorganismos.<sup>10</sup>

#### 1.4.5.2 Velocidades de desaparición de HAP<sup>57</sup>

Los HAP de bajo peso molecular son capaces de ser biodegradados, sin embargo los HAP de alto peso molecular parecen tener una baja capacidad de degradación por microorganismos. Las velocidades de biodegradación de HAP son altamente variables y no solo dependen de la estructura de los HAP, sino también de las propiedades fisicoquímicas del suelo y así como del número presente de microorganismos presentes.

En la tabla 1.2 se presentan ejemplos representativos de tiempos de vida media de HAP en varios sistemas. Sin embargo, estos datos no dan suficiente información para determinar la efectividad de la biorremediación de los HAP, ya que frecuentemente las velocidades de degradación no son lineales. Además, el tiempo transcurrido desde el derrame, es otro factor importante en la biodegradación de los HAP. El tiempo de contacto entre los HAP y el suelo puede tener un efecto significativo sobre la biodisponibilidad de los HAP. El equilibrio entre los HAP y la matriz del suelo parece ser un proceso lento y todavía no son



bien entendidos los mecanismos que causan que los HAP sean menos susceptibles a la biodegradación. Debido a que los HAP tienen una baja solubilidad de agua y pueden ser adsorbidos fuertemente a la materia orgánica, las velocidades en degradación son controladas por la transferencia de masa, las velocidades de disolución y la solubilidad. De esto resulta que las velocidades de desaparición de los HAP en diversos tipos de suelo sean variables y en consecuencia no puedan extrapolarse.

HAP	Suelo tratado con HAP y lodo <sup>a</sup>	Suelo mezclado con desechos aceite, nutrientes, y microbios <sup>b</sup>	HAP adicionados a un suelo arenoso-arcillosos <sup>c</sup>		HAP adicionado a dos suelos arenosos arcillosos <sup>d</sup>		HAP como fuente en un fermentador <sup>e</sup>	HAP adicionados a un sedimento de lago <sup>f</sup>		
			A	B	A	B		A	B	C
Acenaftaleno	-	19.7	-	-	-	-	-	-	-	-
Naftaleno	28±16	-	2.1	2.2	-	-	0.92	30.8	22.4	16.8
Fenantreno	124±48	24.4	16	35	-	-	1.54	126	56	28
Antraceno	141±78	18.9	134	50	33	26	3.71	-	-	-
Fluoranteno	137±35	-	377	268	-	-	-	-	-	-
Fluoreno	-	-	-	-	24	21	-	-	-	-
Pireno	225±92	19.4	260	199	35	34	-	nd	630	238
Bk]fluoranteno	301±105	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B[a]pireno	211±69	-	309	229	-	-	-	nd	>2100	>1400
Criseño	-	-	371	387	129	407	-	-	-	-

**Tabla 1.2 Tiempo de vida media (en días) para HAP en varios sistemas. <sup>57</sup>**

**a** Promedio y desviación estándar para 4 tipos de suelos con lodos con HAP. La humedad y la temperatura se mantuvieron entre 25-60% y 20-30 °C respectivamente. En estos valores están incluidas las pérdidas de procesos abióticos.

**b** Un suelo contaminado con petróleo fue mezclado con un suelo no contaminado, nutrientes y microbios autóctonos. Los datos incluyen pérdidas abiótica.

**c** Los datos provienen de dos suelos arcillosos-arenosos que no habían sido previamente expuestos a HAP. Los HAP se adicionaron a los suelos y fueron incubados a 20° C. Los valores fueron corregidos al considerar las pérdidas de los procesos abióticos.

**d** Los HAP fueron adicionados a suelos no contaminados, arcilloso ligero y arcilloso-arenoso. Los suelos fueron incubados a 25 ° C y los valores incluyen pérdidas abióticas.

- e Los datos obtenidos de un fermentador con HAP como única fuente de carbono y energía y se utilizó un cultivo mixto.
  - f Los datos obtenidos de los HAP adicionados a sedimentos de lago que se mantuvieron a 22° C. Los sedimentos provinieron de A) un lago libre previamente de HAP; b) Un lago expuesto a un derrame C) bahía con un contenido de HAP de aprox. 2 ppm.
- no determinado; **n.d.** no detectado.

### 1.4.5.3 Fitorremediación de los suelos.

Las raíces secretan sustancias que pueden ser una fuente importante de materia orgánica y de nutrientes. La cantidad de tales sustancias depende de la especie y edad de la planta, así como del tipo de suelo. Estudios realizados en la rizósfera han demostrado que hay una mayor cantidad de microorganismos en estas áreas que pueden forjar relaciones simbióticas entre ellos o entre ellos y la planta.<sup>36</sup> En la rizósfera se puede llegar a degradar los HAP de alto peso molecular por medio de cometabolismo microbiano con ciertos exudados de las raíces y/o la formación de relaciones simbióticas entre los organismos por medio de mecanismos de mineralización o de polimerización.<sup>28</sup> y <sup>36</sup> Las raíces, además, permiten airear los suelos al remover el agua a través de la transpiración y transforman la estructura arcillosa del suelo mediante aglomeración. <sup>28</sup> (Figura 1.11)

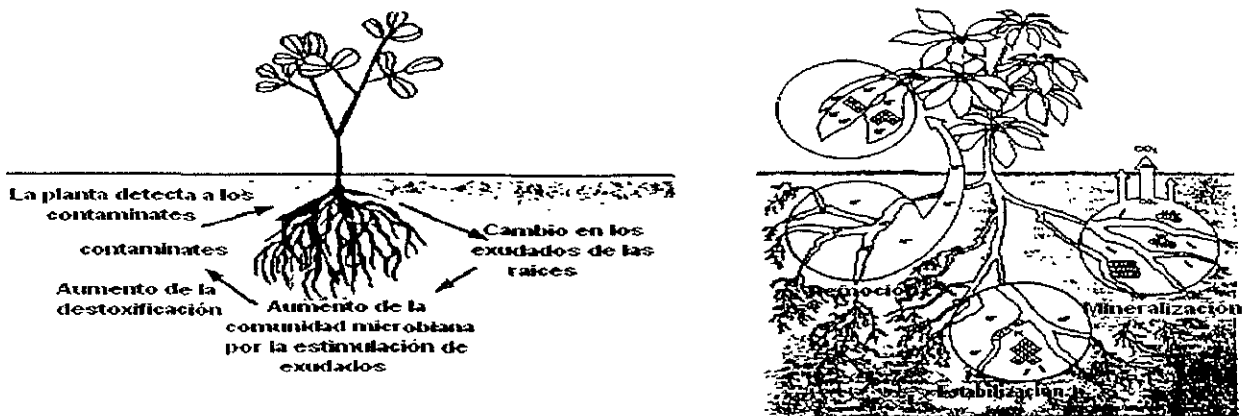


Figura 1.11. Mecanismo hipotético y diagrama de la fitorremediación

### 1.5 La planta *Cyperus odoratus*

Para el desarrollo de este trabajo se seleccionó una de las plantas que crecen en un sitio contaminado por petróleo de una refinería en el estado de Veracruz, la cuál fue clasificada como *Cyperus odoratus*.

A continuación se indican sus características taxonómicas. Perteneciente a la familia de las Cyperaceas. Son hierbas anuales o perennes, solitarias o cespitosas, de 40 a 90 cm de alto, bulbosas en la base. Tallos trígonos, de 0.5 a 1 cm de ancho en la base, glabros. Hojas de 3 a 8, de 10 a 50 cm de largo y 4 a 10 mm de ancho, márgenes escábridos; vainas color pardo rojizo o pardo claro, de 17 a 20 cm de largo. Brácteas de 3 a 10, desiguales, de 5 a 50 cm de largo y 1 a 15 mm de ancho, márgenes escábridos;

bractéolas de 1 a 10 cm de largo. Inflorescencias en umbelas o corimbos abiertos de espigas, de 2 a 45 cm de largo y 6 a 20 cm de ancho; radios primarios de 6 a 15, de 0.5 a 20 cm de largo o ausentes; radios secundarios de 0.5 a 2 cm de largo o ausentes; espigas ovadas o cilíndricas, de 10 a 35 mm de largo y 10 a 30 mm de ancho, con 15 a 60 espiguillas laxas. Espiguillas lineares o subcilíndricas, divergentes o reflexas, de 5 a 20 mm de largo y 0.8 a 1.5 mm de ancho, con 4 a 30 glumas; raquillas zigzag, articuladas, que se fragmentan en varios segmentos,

con alas membranosas, hialinas en estado inmaduro o engrosadas como corcho blanquecino esponjoso en la

madurez, que cubren parcial o totalmente al aquenio, o se reducen basal; glumas color pardo o pardo rojizo, ovadas o elípticas, mucronuladas, de 2 a 3.5 mm de largo y 1.5 a 2 mm de ancho, con 5 a 7 nervios; estambres 3, filamentos de 2 a 3 mm de largo, enteras de 0.4 a 0.6 mm de largo; ovario tricarpelar, estilo de 0.4 a 0.6 mm de largo, estigmas de 1.5 a 2.5 mm de largo. Se localiza en suelos fangosos o arenosos cercanos a ríos y arroyos.<sup>13</sup>



**Figura 1.12. Planta *Cyperus odoratus***

## 1.5 Fundamentos de la cromatografía de gases acoplada a un detector de Masas.

### Componentes funcionales

#### 1.5.1 Cromatografía de Gases.

La cromatografía de gases es una técnica de separación en la cual la elución de los analitos se produce por el flujo de una fase móvil (un gas inerte) que permite transportar el analito a través de una columna.<sup>34</sup>

Se muestran a continuación los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases. (Figura 1.13.)

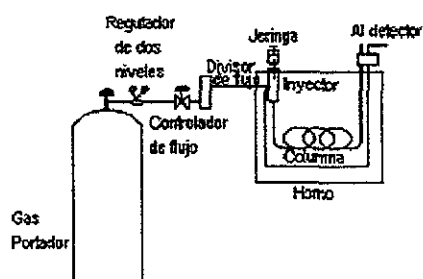


Figura 1.13. Componentes de un cromatógrafo de gases.<sup>34</sup>

#### 1.5.1.1 Gas portador.

El helio, el hidrógeno, y el nitrógeno se utilizan como gases portadores pero llegaron a utilizarse el dióxido de carbono y la mezcla argón/metano. Los flujos de los gases se controlan normalmente mediante un regulador de presión de dos niveles colocado en el cilindro de gas como primera etapa y por reguladores de flujo instalados en el cromatógrafo como etapa final. El intervalo de presiones de entrada normalmente oscila entre 10 y 50 psi lo que produce flujos de 0.5 a 2 ml/min en las columnas capilares.<sup>34</sup>

#### 1.5.1.2 Sistema de inyección.

La capacidad y eficiencia óptima de la columna, requiere que la muestra sea del tamaño adecuado; la inyección lenta de muestras demasiado grandes provoca un ensanchamiento de las bandas y una mala resolución. Además para los trabajos

cuantitativos, se requiere que las inyecciones sean reproducibles. Por ello se usan microjeringas, que permiten inyectar la muestra gaseosa o líquida a través de un diafragma o septum de goma de silicona, en una cámara de evaporación instantánea situada en la cabeza de columna. La figura 1.14. muestra una representación esquemática de un bloque de inyección típico.<sup>34</sup>

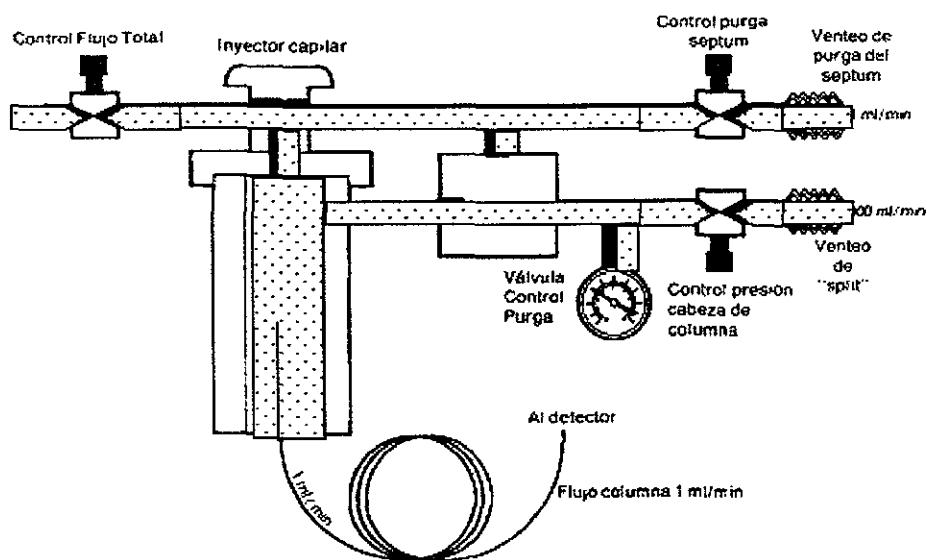


Fig. 1.14. Vista transversal de un inyector de vaporización instantánea

### 1.5.1.3 Configuración de columnas y hornos.

En cromatografía de gases se usan dos tipos generales de columnas las empacadas o de relleno y las capilares. Las columnas cromatográficas varían de longitud desde menos de 2 m hasta 50 m, o más. Sólo se profundizará en las columnas capilares, que son las columnas actualmente en uso y que se usaron para la elaboración de este trabajo.<sup>34</sup>

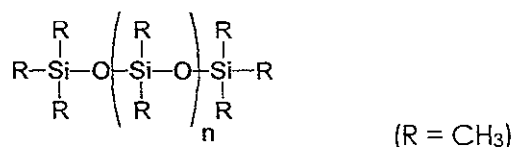
Las columnas capilares son de dos tipos básicos, denominados capilares de pared recubierta (WCOT) y capilares de lecho poroso (PLOT). Las primeras son tubos capilares cuya pared interna está recubierta de una fina capa de fase estacionaria líquida. En las columnas abiertas de lecho poroso, la superficie interna del capilar está revestida de partículas muy finas de un material sólido, tal como mallas moleculares. Las actuales columnas WCOT son columnas tubulares abiertas de sílice fundida. Las capilares de sílice fundida se fabrican a partir de sílice sintética, con un contenido mínimo de óxidos

metálicos. La resistencia de los tubos se refuerza con un recubrimiento externo protector de poli-imida. Estas columnas tienen mayor resistencia física, una reactividad mucho menor frente a los componentes de la muestra y una alta flexibilidad.<sup>34</sup>

En las superficies siloxano de las columnas capilares se pueden adsorber moléculas de agua (silanoles), lo que provoca que los picos se distorsionen. Para evitar este fenómeno, los materiales soporte se desactivan por sililación, por ejemplo con dimetilclorosilano (DMCS).<sup>34</sup>

#### 1.5.1.4 La fase estacionaria.

El tiempo de retención de un soluto en una columna depende, entre otros, de la naturaleza química de la fase estacionaria. Las fases estacionarias del tipo hidrocarburo y dialquil siloxanos son no polares, mientras que las fases poliéster son altamente polares. Generalmente, la polaridad de la fase estacionaria debe ser parecida a la de los componentes de la muestra. La estructura general de los polidimetil siloxanos es la siguiente:<sup>34</sup>



Se pueden encontrar comercialmente fases estacionarias polimerizadas y/o entrecruzadas, proporcionándole a la fase estacionaria una larga duración porque evita el sangrado de la columna, en el cual una pequeña cantidad de líquido inmovilizado es arrastrada fuera de la columna durante el proceso de elución.<sup>34</sup>

#### 1.5.1.5 Temperatura del horno

La temperatura de la columna es una variable importante. La temperatura óptima de separación depende de los componentes de la muestra, del grado de separación requerido, de la fase y de las dimensiones de la columna. Para muestras con un amplio intervalo de temperaturas de ebullición, es conveniente emplear un programa de temperatura, de tal manera que al aumentar la temperatura de la columna ya sea de forma continua o por etapas, se obtiene la separación de los analitos.<sup>34</sup>

En general, la resolución óptima se asocia con una menor temperatura; sin embargo, como consecuencia de una reducción de temperatura hay un aumento en los tiempos de elución y por lo tanto del tiempo necesario para completar un análisis.<sup>34</sup>

### 1.5.2 Espectrómetro de masas.

La objetivo inicial del detector es el de informar la aparición de los picos al final de la columna. Sin embargo el acoplamiento de un espectrómetro de masas al cromatógrafo de gases nos proporciona además información acerca de la identidad de los compuestos eluidos.

Ya que las propiedades dependientes de la masa de las moléculas neutras no son lo suficientemente selectivas como para basar en ellas un método analítico, se recurre a la separación y medida de la masa de sus iones. Estos son afectados fácilmente por campos eléctricos y magnéticos que pueden controlarse de manera que permitan una separación de la masa de los iones suficientemente rápida y precisa.<sup>32</sup> La figura 1.15 muestra los componentes principales de un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo:

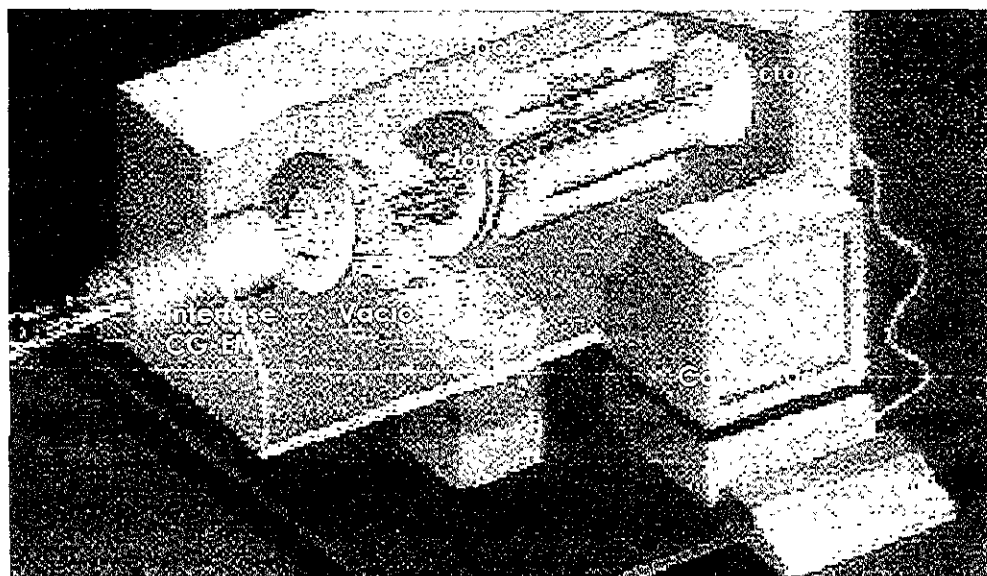


Figura 1.15. Componentes principales de un espectrómetro de masas de cuadrupolo.<sup>41</sup>

#### 1.5.2.1 Interfase

La interfase direcciona el efluente de la columna de CG en el espectrómetro de masas a través de una entrada especialmente diseñada para mantener un flujo controlado. <sup>41</sup>

### 1.5.2.2 Sistema de vacío

Un requerimiento importante de los espectrómetros de masas es que la fuente de iones, el filtro de masas y el detector se deben encontrar en un vacío con el fin de que no se lleven a cabo colisiones de las molécula de la muestra con otras moléculas -agua o aire- y así los iones sean seleccionados y detectados eficientemente.

Razones por las cuales se usa el alto vacío.<sup>41</sup>

- Provee trayectorias libres de colisiones de iones.
- Incrementa el tiempo de vida del filamento.
- Evita descargas eléctricas.
- Incrementa la sensibilidad.

La mayor dificultad en el acoplamiento entre un CG y un detector de masas se debe a la gran diferencia de presiones entre los sistemas. El CG opera típicamente de alrededor de 1-3 atmósferas de presión mientras que el espectrómetro de masas opera a presiones que deben ser de alrededor de  $10^{-5}$  torr. Sin embargo, para el caso de las columnas capilares, para las cuales su caudal es suficientemente bajo, la salida de la columna puede introducirse directamente en la cámara de ionización del espectrómetro de masas. El equipo cuenta además, con un dispositivo selectivo que permite controlar el efluente de la columna.<sup>41</sup>

### 1.5.2.3 Producción de iones

Hay varios tipos de ionización, los más comunes son el ionización electrónica (IE) y la ionización química (IQ).

Solo se hará referencia al IE, que es la técnica que se empleó para la realización de este trabajo.

### 1.5.2.4 Fuente de iones de la ionización electrónica.

Los electrones son emitidos por un filamento caliente de tungsteno o renio y son acelerados por un potencial aproximadamente de 70 eV que se aplica al filamento y al ánodo. Las trayectorias de los electrones y las moléculas están en ángulo recto y se cruzan en el centro de la fuente, donde colisionan y tiene lugar la ionización. (Figura 1.16.) Los productos primarios son iones de una única carga positiva que se forman cuando los



electrones de elevada energía se acercan suficientemente a las moléculas como para causarles la pérdida de electrones por repulsiones electrostáticas. La ionización por IE no es muy eficaz y sólo alrededor de una molécula entre un millón experimenta la reacción primaria:<sup>34</sup>

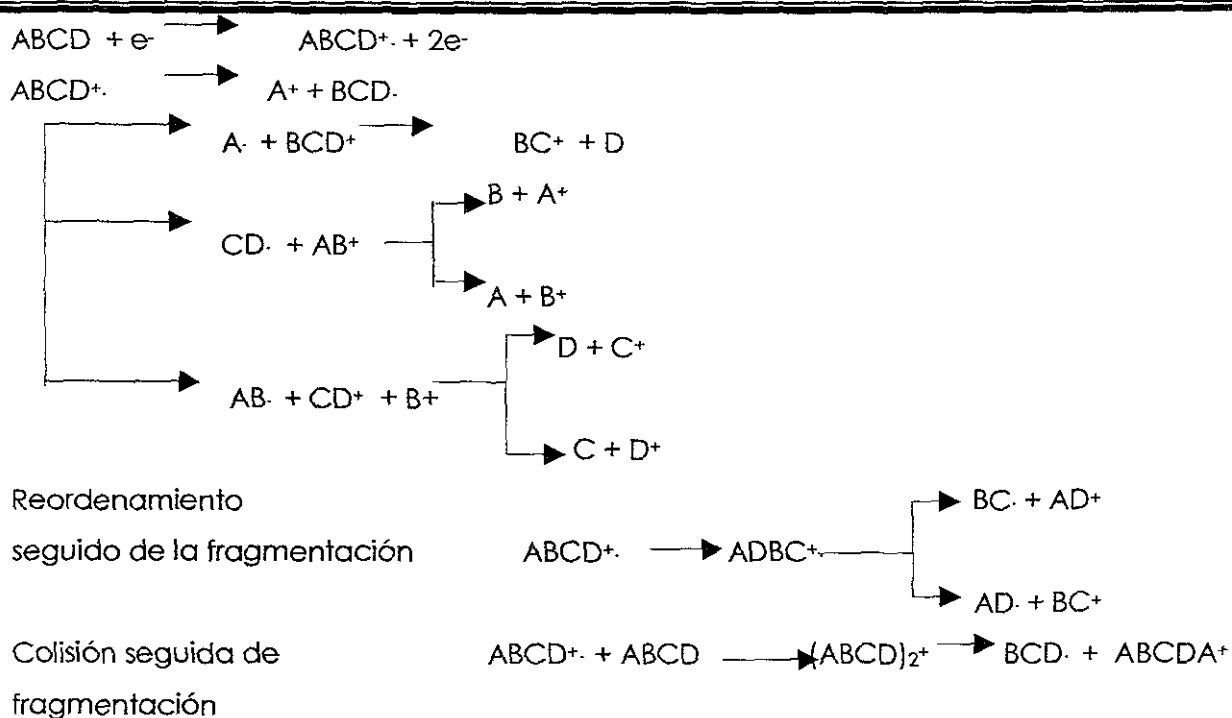


Donde M representa la molécula de analito y  $M^{\cdot+}$  es su ion molecular. Como indica el punto, el ion molecular es un ion radical, que tiene el mismo peso molecular que la molécula. Los iones positivos producidos en un ionización electrónica son atraídos a través de la rendija hacia la primera placa de aceleración mediante una diferencia de potencial (normalmente de 5 V para el caso de analizadores de cuadrupolo) que se aplica entre esta placa y los repulsores.<sup>34</sup> (Figura 1.16)



**Figura 1.16. Fuente de impacto de electrones.**<sup>41 y 34</sup>

Con el objetivo de formar un número significativo de iones gaseosos en una proporción reproducible, es necesario que los electrones generados por el filamento de la fuente sean acelerados por un potencial de 50 eV. La pequeña masa y la alta energía cinética de los electrones produce aumentos muy pequeños en la energía translacional de las moléculas con las que chocan. Sin embargo, estas moléculas adquieren estados vibracionales y rotacionales excitados. La subsecuente relajación tiene lugar normalmente mediante una elevada fragmentación, que da lugar a un número de iones positivos de varias masas que son menores que (y en raras ocasiones mayores) a la del ion molecular. La figura 1.17 muestra algunas reacciones típicas que se producen después de la formación del ion molecular por ionización electrónica.<sup>34</sup>



**Figura 1.17. Mecanismos de fragmentación.** <sup>34</sup>

Los complejos espectros de masas que se obtienen en la ionización por ionización electrónica son útiles para la identificación de compuestos. Pero, para cierto tipo de moléculas la fragmentación es tan efectiva que no queda ningún ion molecular y por tanto la información más importante para la determinación del peso molecular del analito se pierde.<sup>34</sup>

El pico del ión molecular es de gran importancia en las determinaciones estructurales, debido a que su masa proporciona el peso del analito. Desafortunadamente, no siempre es posible identificar el pico del ión molecular del analito, dado que, con la ionización por IE, ciertas moléculas no dan el pico de ión.<sup>34</sup>

#### 1.5.2.5 Interpretación de espectros de masas y la cuantificación empleando Cromatografía de Gases acoplada al detector de masas

Los espectros de masas son una representación gráfica de la abundancia (cantidades relativas de los fragmentos cargados positivamente frente a la relación carga masa ( $m/z$ )) de los fragmentos. La carga iónica de la mayor parte de las partículas detectadas en el espectrómetro de masas es + 1, por lo cual, su relación  $m/z$  es igual a su masa.<sup>47</sup>

La manera en que se fragmente una molécula es algo que depende de su esqueleto carbonado y de los grupos funcionales que contenga. Por este motivo, la masa y la abundancia de los fragmentos proporciona información acerca de la estructura de la molécula. Una información que puede inferirse del espectro de masas es el peso molecular.<sup>47</sup>

Un espectro de masas se presenta en forma de gráfico de barras. Cada pico del espectro representa un fragmento de la molécula. Los fragmentos se detectan de modo que los picos aparezcan en el espectro de izquierda a derecha, por orden creciente de  $m/z$ . Las intensidades de los picos son proporcionales a la abundancia relativa de los fragmentos correspondientes, los cuales a su vez dependen de sus estabilidades relativas. Por acuerdo, se da un valor de 100 % al pico más intenso del espectro, al que se le denomina el pico base; los picos de menor intensidad se registran según sus porcentajes correspondientes con respecto al pico base: 20%, 30% o el valor del que se trate. A veces el pico base coincide con el pico molecular pero generalmente corresponde a un fragmento menor.<sup>47</sup>

La cuantificación empleando Cromatografía de Gases acoplada al detector de masas:

La espectrometría de masa ha sido ampliamente utilizada para la cuantificación de uno o de más componentes en sistemas complejos orgánicos. Generalmente, los análisis se llevan a cabo pasando la muestra a través de una columna cromatográfica y posteriormente se detectan por el espectrómetro. Con el espectrómetro se obtiene un valor adecuado de  $m/z$ , entonces se registra la corriente de iones en función del tiempo. La gráfica de los datos, llamada cromatograma de masas, consiste en una serie de picos cromatográficos apareciendo cada pico a un tiempo que es característico de uno de los diversos componentes de la muestra que da iones del valor o valores elegidos para  $m/z$ . Generalmente, las áreas bajo los picos son directamente proporcionales a las concentraciones del componente y por tanto sirven como parámetro analítico.<sup>48</sup>

#### 1.5.2.6 Ventajas y desventajas de las fuentes de IE.

Las fuentes de IE para el uso y producción de corrientes de iones elevadas, dan buenas sensibilidades. La extensa fragmentación y consecuentemente el elevado número de picos es también una ventaja debido a que, a menudo, permite identificaciones

inequívocas de los posibles analitos. Sin embargo, esta fragmentación también puede ser una desventaja cuando da lugar a la desaparición del pico del ión molecular, por lo que no se puede establecer el peso molecular del analito. Otra limitación de la fuente de iones es el hecho de que la muestra debe ser volatilizada provocando que algunos analitos se degraden antes que se lleve a cabo la ionización.<sup>34</sup>

### 1.5.2.7 El Filtro de masas.

La parte más importante del analizador del filtro másico es el conjunto de las 4 barras cilíndricas de metal paralelas que sirven como electrodos del filtro de masas.<sup>34,49</sup>

Los iones que se producen en la fuente son acelerados por un potencial de 5 a 15 V y son introducidos en el espacio entre las barras.<sup>53</sup>

Un voltaje compuesto de un componente  $U$  de CD y una componente  $V_0 \cos \omega t$  de RF se aplica entre las barras adyacentes. Las barras opuestas están conectadas eléctricamente entre sí. Los iones que entran en el filtro por medio del pequeño voltaje, oscilan en el eje X y en el eje Y por este campo eléctrico. (Figura 1.18)<sup>53</sup>

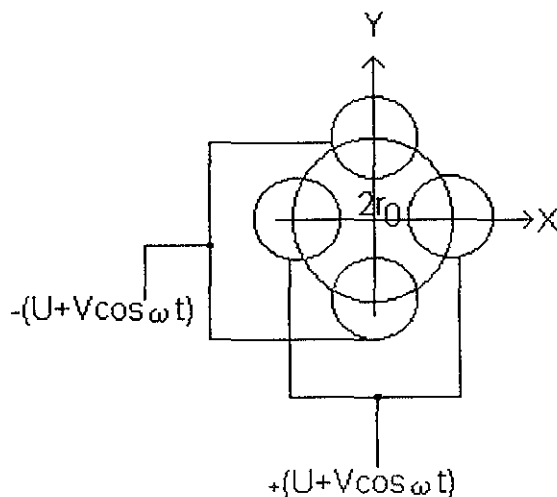


Figura 1.18 Diagrama esquemático de una analizador de cuadrupolo

Los parámetros  $a$  y  $q$  son definidos por:

$$a = \frac{8eU}{\omega^2 r_0^2 m}$$

$$q = \frac{4eU}{\omega^2 r_0^2 m}$$

En estas ecuaciones  $2 r_0$  es el espacio entre las barras y  $\omega$  es la frecuencia del voltaje de la RF.

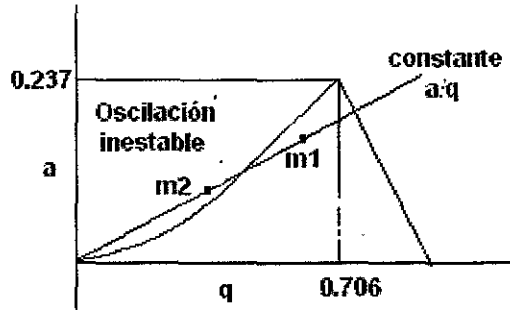
Para ciertos valores de  $a$  y  $q$  las oscilaciones de los iones son estables y su amplitud es finita, pero para otros valores de  $a$  y  $q$  las oscilaciones son inestables y las amplitudes llegan a ser infinitas. El diagrama de estabilidad (Figura 1.19), el cuál también es conocido como el diagrama de Mathieu, muestra los valores de  $a$  y  $q$  para los cuales estas condiciones se aplican. Para los iones de masas tales como la masa  $m_1$ , que cae dentro de la región de las oscilaciones estables en la Figura 1.19, pueden continuar oscilando en el espacio entre las barras hasta alcanzar el detector, sin embargo para los iones de masas tales como  $m_2$ , la oscilación llega a ser inestable, lo que provoca que los iones choquen con las barras y sean neutralizados eléctricamente. De esta manera se logra la separación de las masas.<sup>53</sup>

El espectro de masas es un barrido que se obtiene al variar la  $U$  y el  $V_0$  manteniendo una relación constante de  $U/V_0$ . El registro de la masa  $m$  debe ser proporcional a un valor de  $V_0$  para que el incremento lineal de  $V_0$  presente una escala lineal de masas fácilmente calibrada. Al variar la frecuencia  $\omega$  y mantener constantes  $U$  y  $V_0$  el barrido de las masas también es posible pero es menos conveniente.<sup>53</sup>

La resolución requerida es seleccionada al ajustar el voltaje de  $U$ . Una alta resolución, corresponde a valores altos de  $a/q$ , como consecuencia una proporción significativa de los iones seleccionados se pierden al oscilar provocando que la sensibilidad disminuya. A bajos valores de  $a/q$ , el intervalo de ionización aumenta y la resolución disminuye. Cuando los voltajes de la CD se apagan todos los iones presentan oscilaciones estables para un voltaje de RF relativamente pequeño.<sup>53</sup>

En teoría, el cuadrupolo de masas puede tener una alta resolución al operar con valores de  $a/q$  cercanos al ápice del triángulo de estabilidad. Sin embargo, en la práctica, la resolución que se puede alcanzar depende de los valores iniciales de las velocidades en las direcciones de  $X$  y de  $Y$  y de las posiciones sobre las cuales los iones entran al

cuadrupolo, lo que ocasiona que éste sea esencialmente un analizador de masas de baja resolución.<sup>53</sup>



**Figura 1.19 Diagrama de estabilidad para un analizador de masas de cuadrupolo.<sup>53</sup>**

Aprovechando el fundamento del funcionamiento del cuadrupolo, éste puede ser operado en dos modos: Modo de barrido (SCAN) y por el monitoreo selectivo de iones (MSI).

En el modo MSI, el filtro de las masas establece el paso de ciertos iones al detector de acuerdo a una prioridad. Esto provee una gran sensibilidad y es usada para aplicaciones cuantitativas.<sup>34</sup>

En el modo SCAN, el filtro de masas se establece para operar secuencialmente en todo un intervalo de masas. Este modo tiene menor sensibilidad porque muchos de los iones golpean las barras durante el trayecto. Es usado para generar espectros para su interpretación o para una búsqueda en librerías.<sup>34</sup>

### 1.5.2.8 El Detector

El dinodo de alta energía (DAE) atrapa los iones cargados positivamente que existen en el cuadrupolo. Cuando los iones alineados chocan con el DAE, se emiten electrones, los cuales son atrapados por el multiplicador de electrones; en el cual éstos golpean su superficie interna y liberan más electrones de su superficie ocasionando que la señal se amplifique.<sup>34</sup> (Figura 1.20)

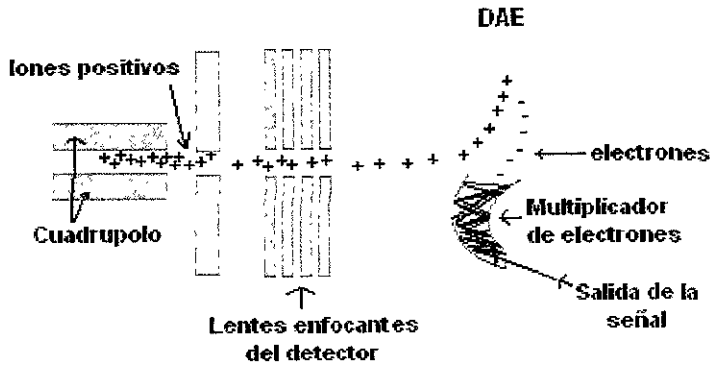


Figura 1.20. Detector DAE / EM<sup>41</sup>

### 1.5.2.9 La computadora.

La computadora sirve de control principal del instrumento y permite al operador comunicarse a través de un teclado con el espectrómetro. La computadora también controla los programas que manipulan y dan salida a los resultados. La interfase entre el espectrómetro de masas y la computadora normalmente tiene la capacidad para digitalizar la señal de corriente de iones amplificada y de otras señales que se utilizan para el control de las variables instrumentales, ejemplos de estas son: la temperatura de la fuente, el potencial de aceleración, la velocidad de barrido, y la fuerza del campo magnético o los potenciales del cuadrupolo. La señal de corriente de iones una vez digitalizada necesita un proceso considerable para ser mostrada. Primero, los picos deben ser normalizados, proceso por el cual se calcula la altura de cada pico relativa a algún tipo de referencia. El valor de  $m/z$  para cada pico debe también asignarse; la asignación se basa frecuentemente en el tiempo al que aparecen los picos y la velocidad de barrido. Normalmente los resultados se adquieren como intensidad en función del tiempo durante un barrido de los campos magnéticos y /o eléctricos controlado cuidadosamente. La conversión del tiempo a  $m/z$  requiere de una cuidadosa calibración periódica con perfluorotri-butil-amina (PFTBA).<sup>34</sup>

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Diseño experimental biológico.

Para la realización de todo el experimento se empleó una muestra de suelo contaminado de una zona al sur del estado de Veracruz, Mex. Este suelo se caracteriza por que ha estado en contacto con hidrocarburos por más de 80 años, debido a las actividades petroleras que fueron realizadas en esta zona. La muestra de suelo contaminado se obtuvo por personal del Instituto Mexicano del Petróleo desde en el mes de febrero del 2000 y se conservó a 4 ° C hasta que fue necesario acondicionarlo para la realización de este trabajo. (Ver inciso 2.8 Preparación del suelo empleado).

La concentración de HAP presentes en el suelo de estudio puede presentar cualquiera de los procesos a lo largo del tiempo:

1. disminuir por la presencia de las raíces de las plantas
2. disminuir por la actividad de microorganismos.
3. disminuir por adsorción, volatilización o lixiviación (procesos abióticos)
4. disminuir por contribución de dos o más factores
5. permanecer constante.

Para determinar la contribución de las plantas en el comportamiento de la concentración de los HAP presentes en el suelo contaminado se desarrolló el siguiente diseño experimental:





Parte de la muestra de suelo se esterilizó en autoclave para diferenciar la contribución de los microorganismos. En la mitad de las macetas (unas con suelo esterilizado y otras con suelo no esterilizado) se sembraron las plantas *Cyperus odoratus*. Así mismo, fueron sometidos al experimento suelos testigos, tanto esterilizados como no esterilizados, con el fin de medir el efecto de los procesos abióticos. Ya que cada uno de los cuatro tratamientos se realizó por triplicado se prepararon en total 12 macetas con 500 gramos cada una (Tabla 2.1)

Las macetas se mantuvieron en un invernadero bajo las mismas condiciones de temperatura durante toda la prueba y para mantener húmedo el suelo sólo se les agregó agua destilada.



De cada una de las macetas se tomaron pequeñas muestras de suelo. (Ver inciso 2.9 Tratamiento de las muestras) y fueron realizados 3 muestreos: el 5 de mayo (muestreo 1), el 7 de julio (muestreo 2) y el 18 de Noviembre del 2000 (muestreo 3).

Las claves de las muestras se indican por una nomenclatura MX-YAB donde X indica el número de muestreo, Y, el número correspondiente del triplicado y estos números están seguidos por letras que señalan el tipo de tratamiento: control del suelo no esterilizado (CNE), suelo no esterilizado con planta (PNE), suelo esterilizado con planta (PE), control del suelo esterilizado (CE).

<p style="text-align: center;"><b>Clave/Características</b></p> <p style="text-align: center;"><b>MPNE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Suelo contaminado</li> <li>- No esterilizado</li> <li>- Planta</li> </ul> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">  <div style="text-align: left; padding-left: 10px;"> <p>Su comportamiento determina la contribución de las plantas, microorganismos y procesos abióticos.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <span><b>MPNEm1</b></span> <span><b>MPNEm2</b></span> <span><b>MPNEm3</b></span> </div>	<p style="text-align: center;"><b>Clave/Características</b></p> <p style="text-align: center;"><b>MCNE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Suelo contaminado</li> <li>- No esterilizado</li> <li>- Control</li> </ul> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">  <div style="text-align: left; padding-left: 10px;"> <p>Su comportamiento determina la contribución de microorganismos y procesos abióticos.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <span><b>MCNEm1</b></span> <span><b>MCNEm2</b></span> <span><b>MCNEm3</b></span> </div>
<p style="text-align: center;"><b>Clave/Características</b></p> <p style="text-align: center;"><b>MPE</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Suelo contaminado</li> <li>- Esterilizado</li> <li>- Planta</li> </ul> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">  <div style="text-align: left; padding-left: 10px;"> <p>Su comportamiento determina la contribución de las plantas y procesos abióticos.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <span><b>MPEm1</b></span> <span><b>MPEm2</b></span> <span><b>MPEm3</b></span> </div>	<p style="text-align: center;"><b>Clave/Características</b></p> <p style="text-align: center;"><b>MEC</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Suelo contaminado</li> <li>- Esterilizado</li> <li>- Control</li> </ul> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">  <div style="text-align: left; padding-left: 10px;"> <p>Su comportamiento determina la contribución de los procesos abióticos.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <span><b>MCEm1</b></span> <span><b>MCEm2</b></span> <span><b>MCEm3</b></span> </div>

**Tabla 2.1 Resumen del diseño experimental biológico para la determinación de la contribución de las plantas en el comportamiento de la concentración de HAP en un suelo contaminado con petróleo, .**

La concentración de los HAP en el suelo de cada maceta fue cuantificada por cromatografía de gases-espectrometría de masas en cada uno de los muestreos realizados. Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza (SPSS para Windows 7.5), con el fin de determinar si existieron diferencias significativas entre los promedios de cada tratamiento y los promedios entre los muestreos.

## 2.2 Materiales y aparatos

Extractor Soxhlet 40 mm D.I. de 250 ml de capacidad con matraz bola de 250 ml; aparato Kuderna-Danish (K-D) con tubo concentrador graduado de 10 mL; matraz de evaporación de 500 ml, columna Snyder con bolas macro, perlas de ebullición, baño de agua, viales de vidrio de 2 ml de capacidad con tapa y septa recubierta de teflon, jeringa de 10  $\mu$ l, mortero, tamizador de 1.68 mm de tamaño de partículas (No. 12), columna HP5-MS 5 % fenil-metil-siloxano de 0.25 mm de diámetro interno, con un espesor de película de 0.25  $\mu$ m y de 30 m de longitud, balanza analítica, balanza ultra-microanalítica de 2.1 g de capacidad máxima y  $d = 0.1 \mu$ g marca Mettler, matraces volumétrico, micropipetas y pipetas. Suelo sin contaminación proveniente de Samaria, Tabasco, Mex.

## 2.3 Equipo

Cromatógrafo de gases marca Hewlett Parckart (modelo 6890) acoplado a un detector selectivo de masas marca Hewlett Parckart (modelo 5973).

## 2.4 Reactivos.

Hexano anhidro, grado reactivo (Mallinckrodt spectrar), diclorometano grado reactivo (EM), cartuchos EFS de LC-Si y LC-NH<sub>2</sub> de 3 mL (SUPELCLEAN), Agrolifita, helio de 99.995% de pureza, estándares sólidos de 16 HAP (SUPELCO):

Estándar	% pureza	Clave lote	Estándar	% pureza	Clave lote
Acenaffeno	99.9	La-81553	Acenaffileno	99.0	La-68470
Antranceno	99.7	La-80815	B [a]antranceno	96.3	La-81393
B[a]pireno	99.2	La-81600	B[b]fluoranteno	99.0	La-55046
B[k]fluoranteno	99.6	La-84149	B[ghi]perileno	99.2	La-84629
Críseno	98.6	La-86249	Db[a,h]antranceno	96.7	La-82935
Fenantreno	98.6	La-83014	Fluoranteno	99.0	La-77199
Fluoreno	98.9	La-74473	I[1,2,3-c,d]pireno	99.7	La-63804
Naftaleno	96.9	La-83011	Pireno	97.4	La-74472

**Tabla 2.2 Pureza e identificación de los estándares de HAP usados. Todos estándares fueron usados durante el año de vigencia que inició a partir de Febrero 2000.**

## **2.5 Obtención de los individuos de la planta *Cyperus odoratus*.**

Los individuos de la planta *Cyperus odoratus* que se emplearon para el desarrollo de este trabajo, se obtuvieron al germinar semillas de la planta en cajas petri con agua destilada a una temperatura promedio de 25°C. Una vez que las plántulas alcanzaron 1 cm de longitud, se procedió a plantarlas en una mezcla de suelo contaminado con agrolita al 30% p/p. Cuando las plantas alcanzaron un tamaño de 4-8 cm de altura se plantaron en las macetas problema.

## **2.6 Análisis de HAP por CG-EM.**

Los HAP fueron extraídos del suelo con diclorometano por medio de un equipo Soxhlet y posteriormente fueron purificados a través de cartuchos de extracción sólida de sílice y amina acoplados, para obtener el extracto.

La identificación y cuantificación de los HAP en los extractos, se realizó por CG-EM con una columna HP5-MS. La temperatura de la columna del CG se programó para lograr la separación de los analitos, los cuales se detectaron en el espectrómetro de masas acoplado.

La identificación de los analitos en las muestras de suelo contaminado se realizó a partir de:

1. los tiempos de retención de los estándares.
2. de la comparación de los espectros de masas obtenidos por IE y en el modo SCAN de los estándares contra los espectros de masas de los analitos en la muestra.

Así, una vez que fueron identificados los HAP presentes en las muestras, su cuantificación se realizó por medio del MSI del pico base que se obtuvo por IE en el tiempo de retención correspondiente.

Para convertir la respuesta del espectrómetro de masas del ion seleccionado de cada compuesto fue necesario obtener empíricamente la curva de calibración de cada compuesto a partir de las 5 concentraciones diferentes de la mezcla de estándares que se describe a continuación (~0.005, ~0.1, ~0.25, ~0.5, ~1 mg/L por compuesto en la mezcla).

### **2.6.1 Preparación de la mezcla de estándares de HAP.**

Se pesaron alrededor de 1.25 mg de cada uno de los estándares de 16 HAP en una balanza microanalítica y a partir de ellos se preparó una mezcla de estándares de aprox. 50 ppm para cada estándar en hexano empleando un matraz volumétrico de 25 ml de capacidad. Posteriormente, a partir de ésta primera disolución, se realizó una dilución para obtener una mezcla de alrededor de ~ 5 ppm de cada estándar y a partir de la cual se realizaron las diluciones correspondientes para obtener los cinco niveles de la curva de las curvas de calibración. Todas las disoluciones de estándares de los HAP se mantuvieron en recipientes ámbar selladas, a 4 °C.

A continuación se presentan las cantidades pesadas para cada estándar, así como las diluciones correspondientes para la obtención de las curvas de calibración de HAP.

#	Compuesto	masa (mg)	Vfinal (L)	Cfinal (ppm)	Vinicial (ml)	Vfinal (ml)	Cfinal (ppm)	Vinicial (ml)	Vfinal (ml)	Cfinal (ppm)
1	Acenafteno	1.3676	0.025	54.704	1	10	5.470	1	5	1.094
								0.2	2	0.547
								0.1	2	0.274
								0.04	2	0.109
								0.01	10	0.005
2	Acenaftileno	1.5020	0.025	60.080	1	10	6.080	1	5	1.202
								0.2	2	0.601
								0.1	2	0.300
								0.04	2	0.120
								0.01	10	0.006
3	Antraceno	1.2484	0.025	49.936	1	10	4.994	1	5	0.999
								0.2	2	0.499
								0.1	2	0.250
								0.04	2	0.100
								0.01	10	0.005
4	B[a]antraceno	1.2214	0.025	48.856	1	10	4.886	1	5	0.977
								0.2	2	0.489
								0.1	2	0.244
								0.04	2	0.098
								0.01	10	0.005
5	B[a]pireno	1.3742	0.025	54.968	1	10	5.497	1	5	1.099
								0.2	2	0.550
								0.1	2	0.275
								0.04	2	0.110
								0.01	10	0.005
6	B[b]fluoranteno	1.3732	0.025	54.928	1	10	5.493	1	5	1.099
								0.2	2	0.549
								0.1	2	0.275
								0.04	2	0.110
								0.01	10	0.005
7	B[ghi]perileno	1.2930	0.025	51.720	1	10	5.172	1	5	1.034
								0.2	2	0.517
								0.1	2	0.259
								0.04	2	0.103
								0.01	10	0.005
8	B[k]fluoranteno	1.3902	0.025	55.608	1	10	5.561	1	5	1.112
								0.2	2	0.556
								0.1	2	0.278
								0.04	2	0.111
								0.01	10	0.006

**Tabla 2.3 Concentraciones y diluciones de los estándares HAP empleados para elaborar las curvas de calibración.**

#	Compuesto	masa(mg)	Vfinal	Cfinal	Vinicial (ml)	Vfinal (ml)	Cfinal (ppm)	Vinicial (ml)	Vfinal (ml)	Cfinal (ppm)
9	Críseno	1.4236	0.025	56.944	1	10	5.694	1	5	1.139
								0.2	2	0.569
								0.1	2	0.285
								0.04	2	0.114
								0.01	10	0.006
10	D[a,h] antraceno	1.4755	0.025	59.020	1	10	5.902	1	5	1.180
								0.2	2	0.590
								0.1	2	0.295
								0.04	2	0.118
								0.01	10	0.006
11	Fenantreno	1.4606	0.025	58.424	1	10	5.842	1	5	1.168
								0.2	2	0.584
								0.1	2	0.292
								0.04	2	0.117
								0.01	10	0.006
12	Fluoranteno	1.3582	0.025	54.328	1	10	5.433	1	5	1.087
								0.2	2	0.543
								0.1	2	0.272
								0.04	2	0.109
								0.01	10	0.005
13	Fluoreno	1.3101	0.025	52.400	1	10	5.240	1	5	1.048
								0.2	2	0.524
								0.1	2	0.262
								0.04	2	0.105
								0.01	10	0.005
14	I[1,2,3-c,d]pireno	1.4250	0.025	57.000	1	10	5.700	1	5	1.140
								0.2	2	0.570
								0.1	2	0.285
								0.04	2	0.114
								0.01	10	0.006
15	Naftaleno	1.3512	0.025	54.048	1	10	5.405	1	5	1.081
								0.2	2	0.540
								0.1	2	0.270
								0.04	2	0.108
								0.01	10	0.005
16	Pireno	1.2661	0.025	50.644	1	10	5.064	1	5	1.013
								0.2	2	0.506
								0.1	2	0.253
								0.04	2	0.101
								0.01	10	0.005

**Tabla 2.3 Concentraciones y diluciones de los estándares HAP empleados para elaborar las curvas de calibración. (Continuación)**

### 2.6.2 Condiciones de operación del equipo.

Se empleó una columna HP 5-MS, con un flujo de 1.0 ml/min del gas acarreador (helio).

Se estableció el siguiente programa de temperatura para separar los compuestos:

	Temperatura (°C)	°C / min	Tiempo de isoterma (minutos)
Temperatura inicial	60		1
Programa de temperatura	60-128	15	
	128		0.5
	128-280	8	
	280		10

**Tabla 2.4. Programa de temperatura para la separación de HAP por CG.**

La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C. La inyección fue de modo splitless, con un flujo de la purga del septum 2.8 mL/min tiempo de apertura de la válvula 2 min y la relación de split después de la inyección fue de 26:1. El volumen inyectado fue de 1 µl y se realizó por medio de un automuestreador. La interfase entre el CG y el EM así como la fuente se mantuvieron a 280°C y a 230°C respectivamente.

En el modo SCAN, el intervalo de las masas registradas comprendió de 50 a 550 m/z. y se adquirieron 2.51 scans/sec.

En el MSI los iones fueron adquiridos de acuerdo a la Tabla 2.5.

m/z	Intervalo de tiempo (min)	HAP que salen en el intervalo de tiempo.
128*	0- 8.00	Naftaleno
152**,153*,154*	8.00-10.50	Acenaffileno, Acenaffeno
166*,165**	10.50-13.00	Fluoreno
178*	13.00-16.80	Fenantreno, Antraceno
202*	16.80-20.00	Fluoranteno, Pireno
228*	20.00-24.00	B[a]antraceno, Criseno
252*	24.00-28.00	B[b]fluoranteno, B[k]fluoranteno, B[a]pireno
276*,138**,278*	28.00-32.03	i[1,2,3-c,d]pireno, Db[a,h]antraceno y B[g,h,i]perileno

**Tabla 2.5 Adquisición de los iones de HAP en el MSI. \* iones moleculares; \*\* iones calificadores.**

### 2.6.3 Identificación de los espectros de masas obtenidos por impacto de electrones. <sup>52</sup>

Ya que los compuestos aromáticos son relativamente estables, sus espectros de masas presentan una baja tendencia a la fragmentación y una intensidad grande de las señales de sus iones moleculares ( $M^+$ ) o del ión con una unidad de masa menor ( $M-1$ )<sup>+</sup>, esté último debido a la pérdida de un átomo de hidrógeno. Así mismo, se presentan otras fragmentaciones, donde las más importantes, son debidas a iones  $M^{++}$ , o a iones  $(M-2)^{++}$ . Los espectros de masas de los 16 HAP obtenidos en este trabajo a partir de los estándares disueltos en hexano se muestran a continuación.

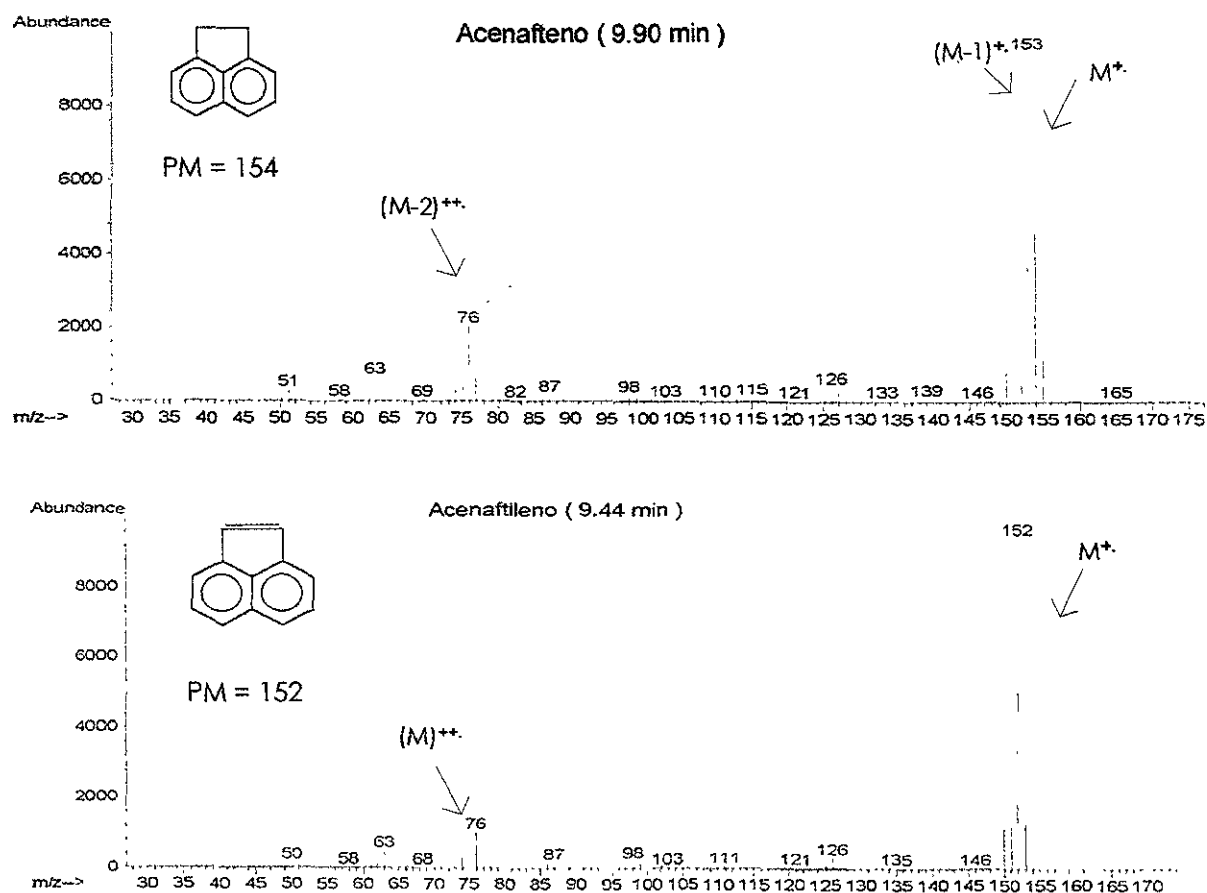


Figura 2.1 Espectros de masas de HAP



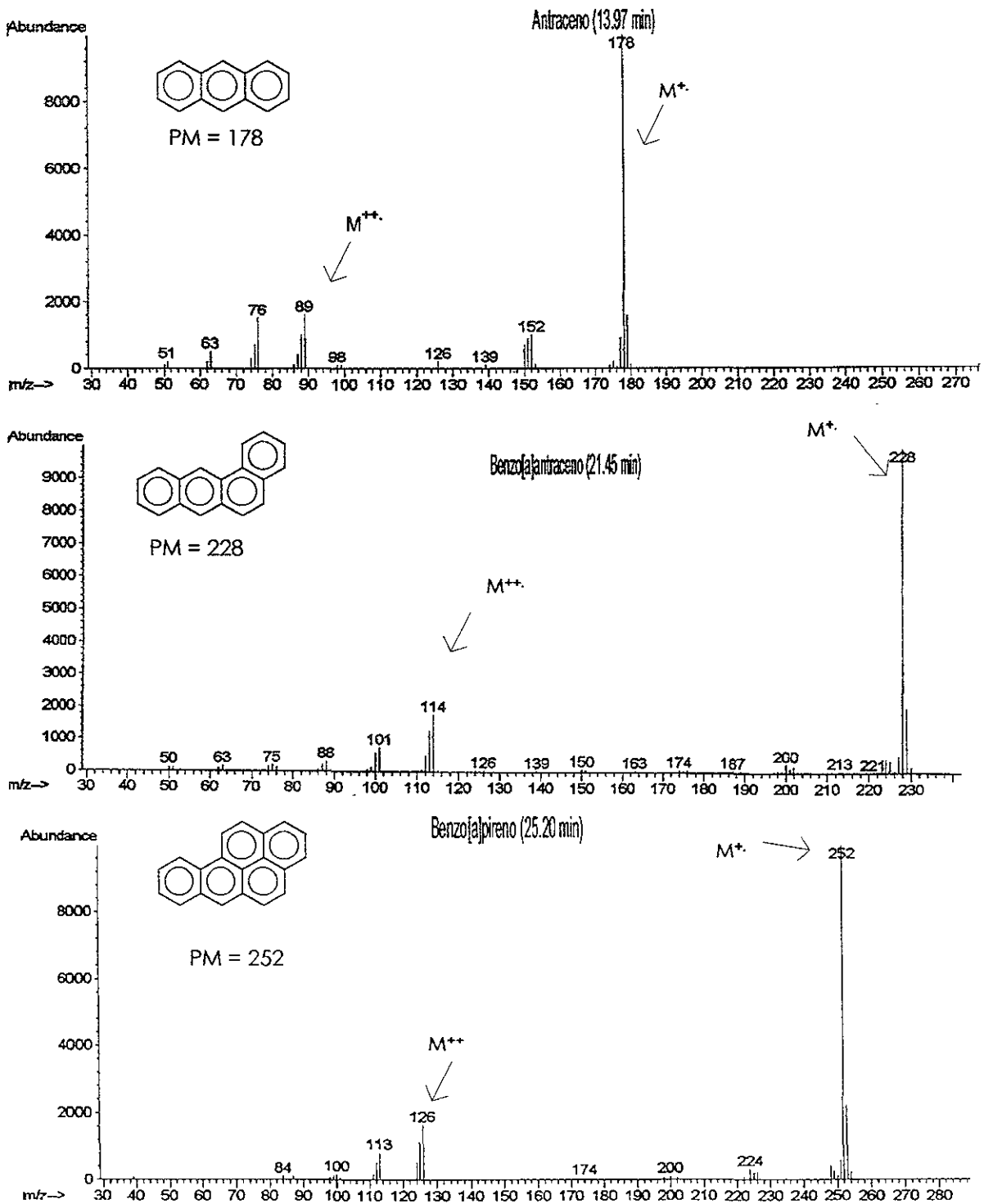


Figura 2.1 Estructuras y espectros de masas de HAP. (Continuación)

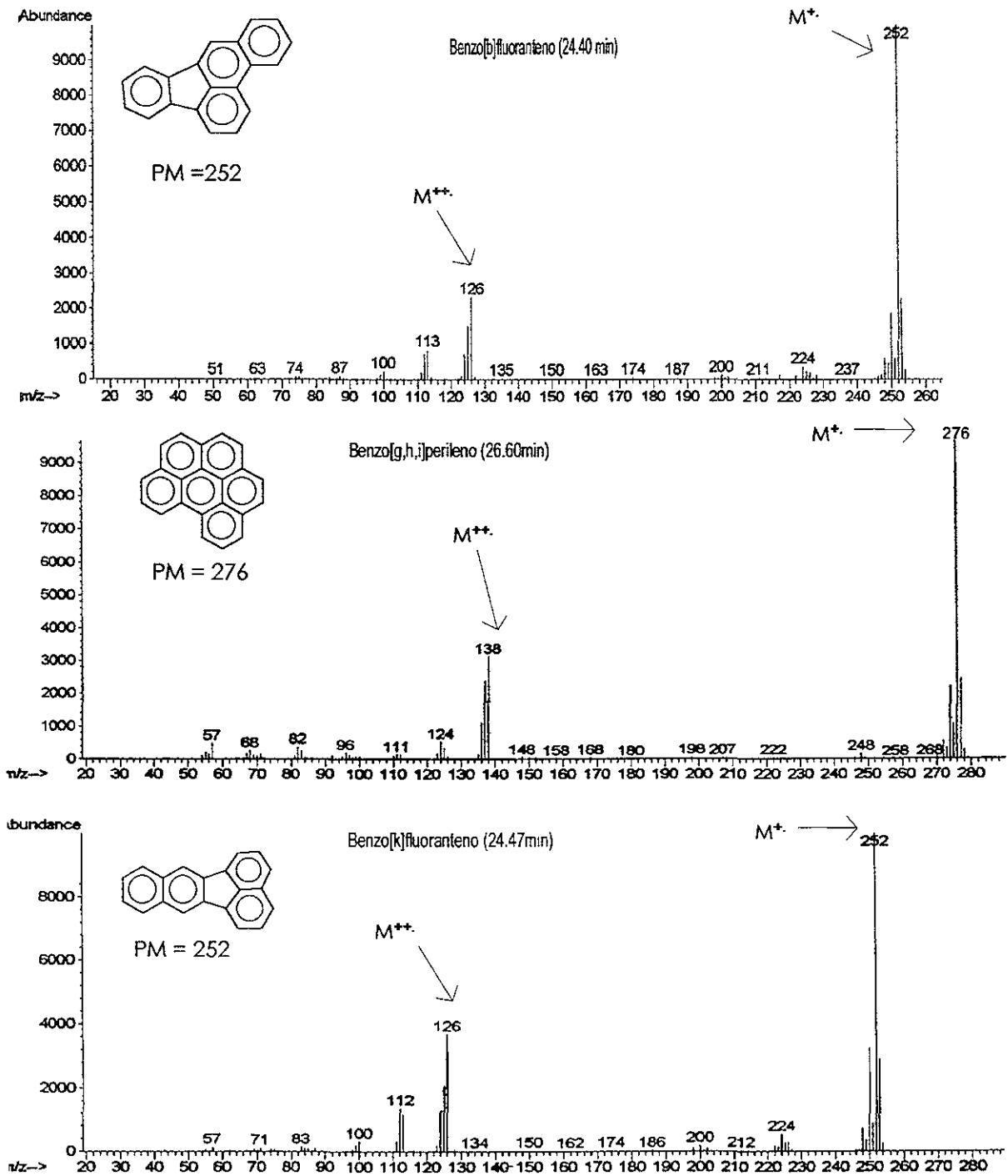


Figura 2.1 Estructuras y espectros de masas de HAP. (Continuación)

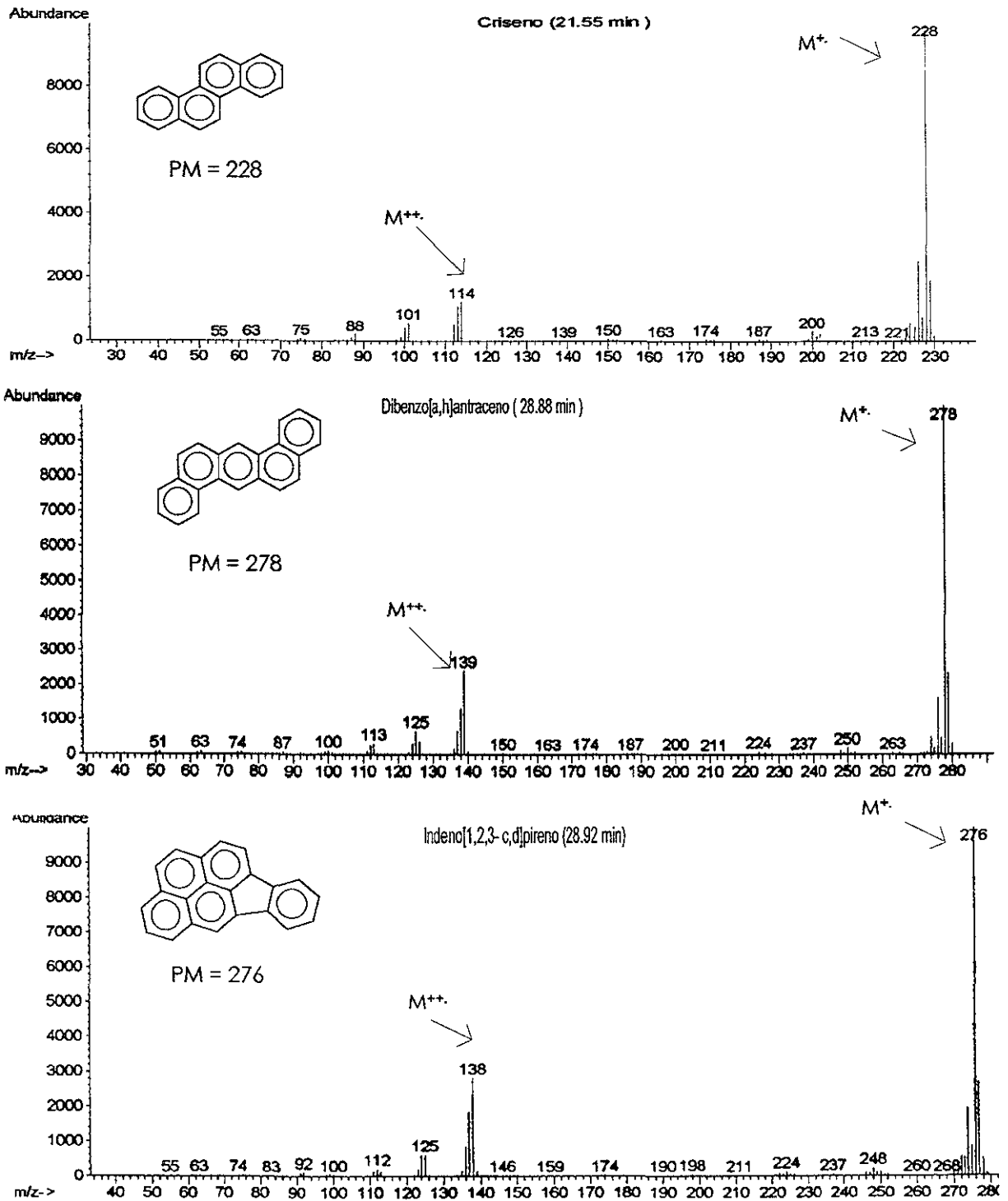


Figura 2.1 Estructuras y espectros de masas de HAP. (Continuación)

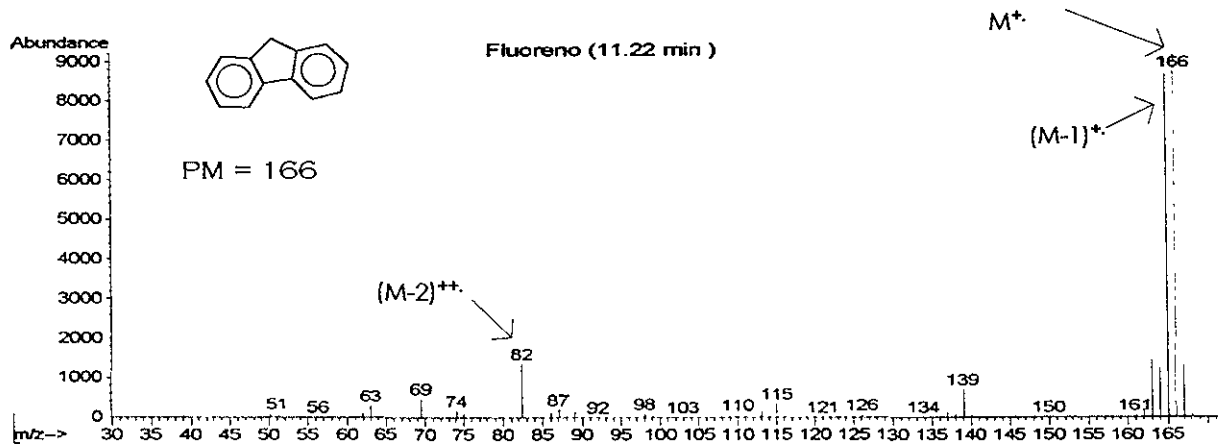
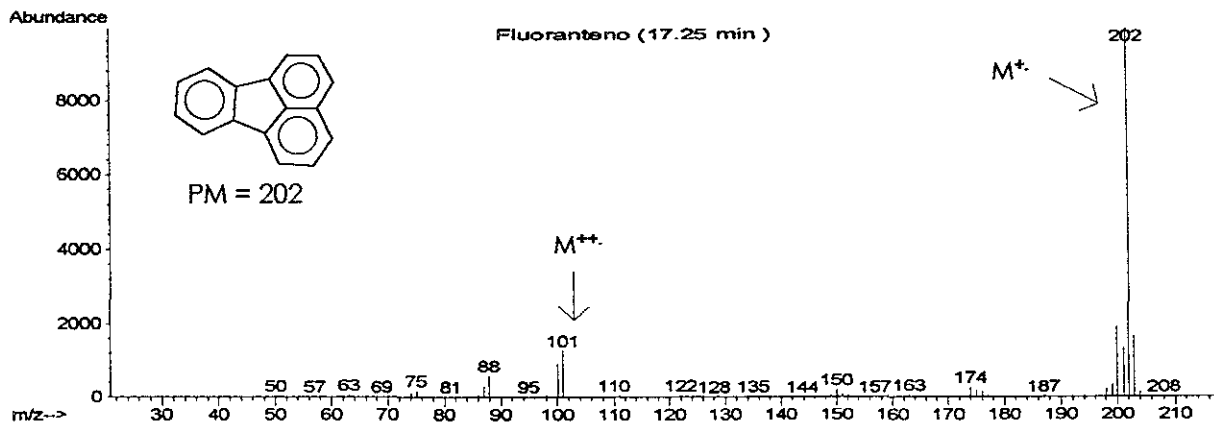
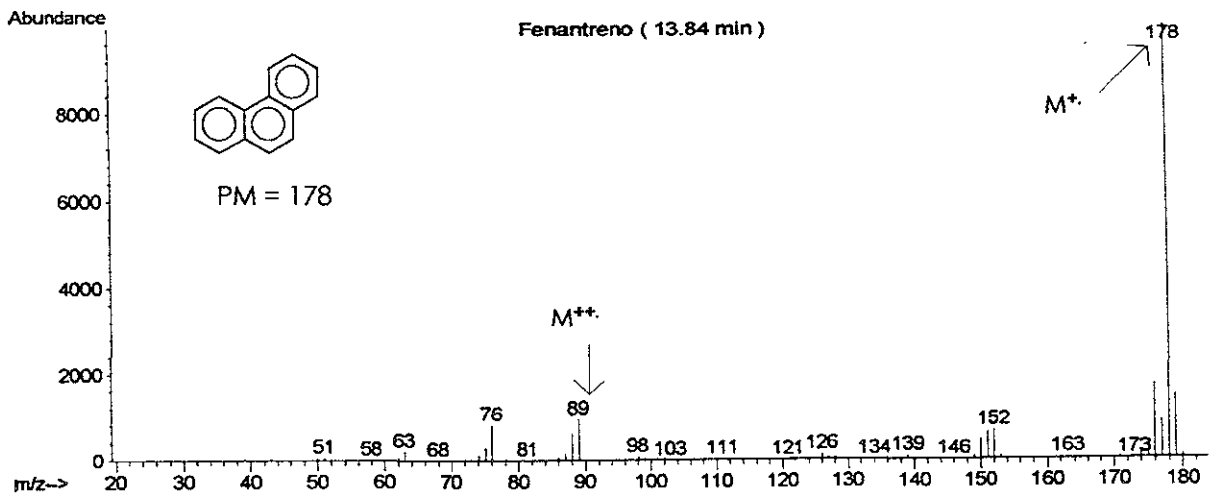
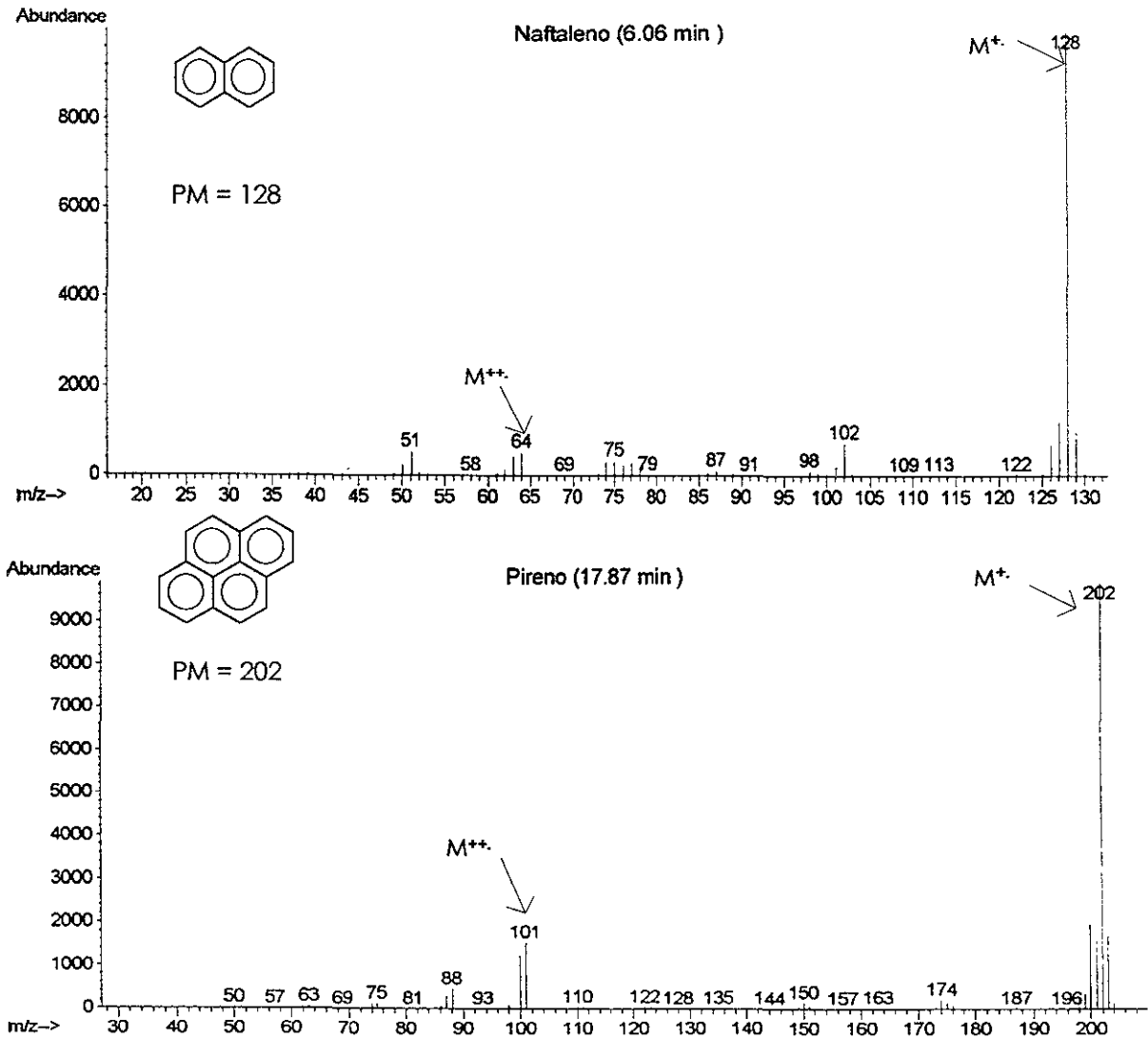


Figura 2.1 Estructuras y espectros de masas de HAP. (Continuación)



**Figura 2.1 Estructuras y espectros de masas de HAP.**

Los espectros obtenidos fueron cotejados con los espectros de masas de la biblioteca Wiley275 proporcionada por los proveedores del equipo encontrándose que coinciden unos con otros.

### 2.6.4 Resolución de los picos cromatográficos de los HAP.

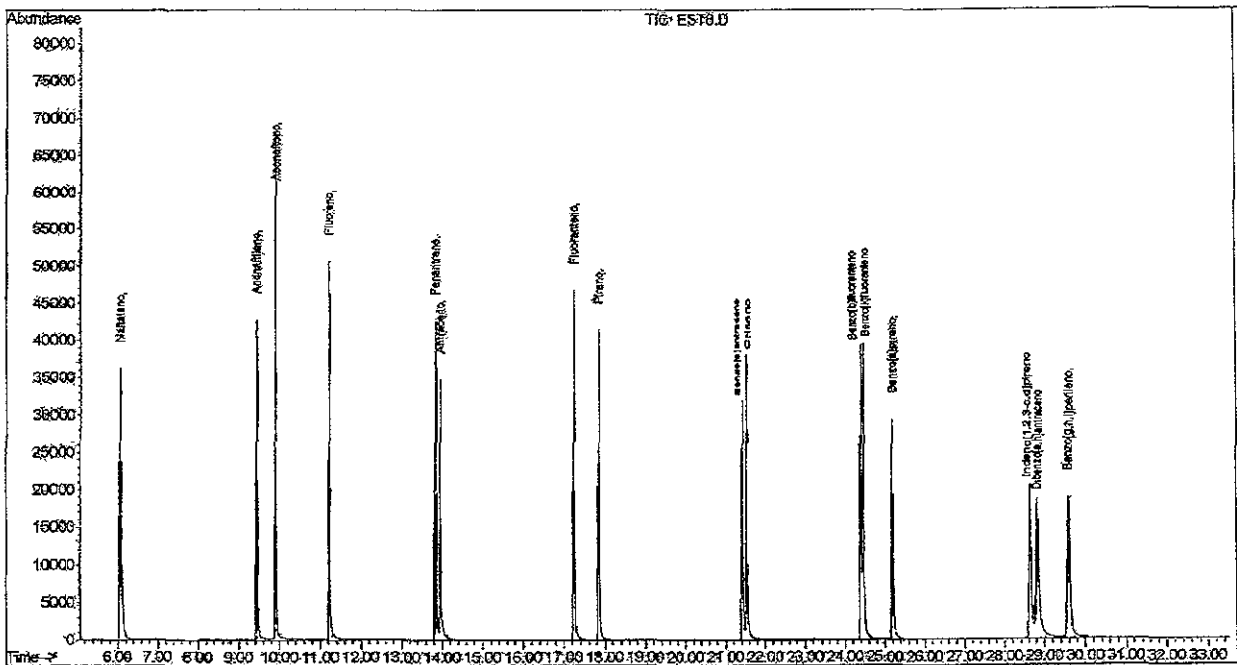


Figura 2.2. Cromatograma de estándares de HAP .

La figura 2.2 muestra el cromatograma de los estándares de los 16 HAP que se obtiene por este método y en el cual se observa que los picos cromatográficos de los siguientes compuestos, están separados: Nafaleno, Acenafileno, Acenafeno, Fluoreno, Fluoranteno, Pireno, B[a]pireno y el B[g,h,i]perileno. Sin embargo, los pares Fenantreno-Antraceno, B[a]antraceno-Criseno, B[b]fluoranteno-B[k]fluoranteno, I[1,2,3-c,d]pireno-Db[a,h]antraceno solo muestran una separación parcial.

El par de compuestos I[1,2,3-c,d]pireno-Db[a,h]antraceno a pesar de no estar bien resueltos cromatográficamente, son resueltos por sus masas ya que los iones que se utilizan para su cuantificación son distintos, 276 y 278 m/z respectivamente. Esta es una de las ventajas que nos proporciona el detector de masas. Sin embargo, para los isómeros B[b]fluoranteno-B[k]fluoranteno no hay una resolución completa ya que para su cuantificación se emplea la misma m/z (252).

Es importante mencionar que, la cuantificación de pares compuestos que coeluyen y que no pueden ser separados por sus masas se realizó de forma individual ya que la altura del

valle en el par es menor del 25 % de la suma de la altura de cada compuesto, de acuerdo a lo establecido en el método EPA 8270 c.<sup>46</sup>

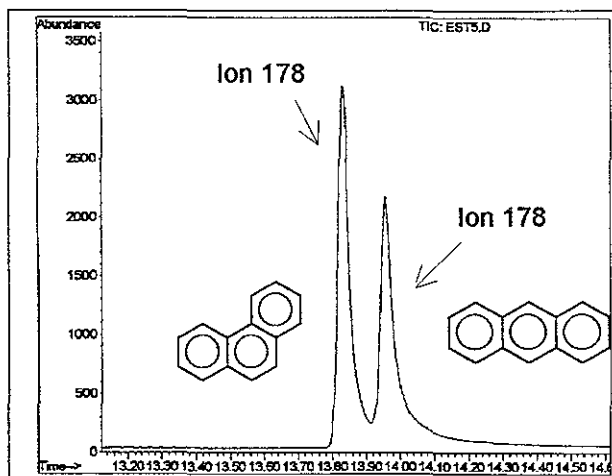


Figura 2.3 Cromatograma de masas del par Fenantreno-Antraceno respectivamente.

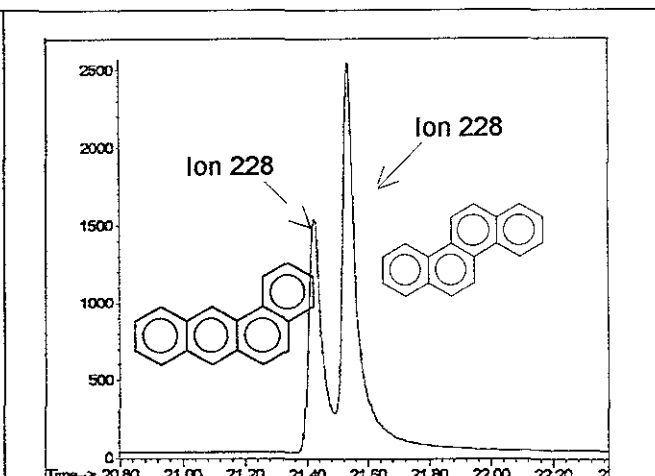


Figura 2.4 Cromatograma de masas del par B[a]antraceno-Criseno respectivamente

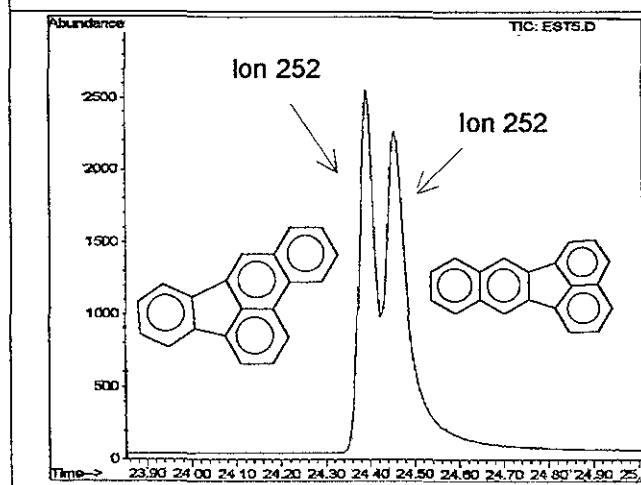


Figura 2.5 Cromatograma de masas del par B[b]fluoranteno-B[k]fluoranteno respectivamente.

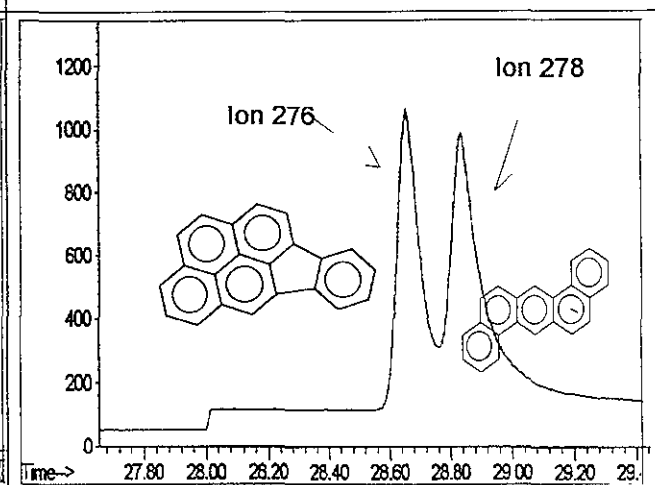


Figura 2.6 Cromatograma de masas del par I[1,2,3-c,d]pireno-Db[a,h]antraceno respectivamente.

Par de compuestos

% de la altura del valle respecto a la suma de los picos.

Fenantreno y Antraceno

3.57

B[a]antraceno y Criseno

6.4

B[b]fluoranteno y B[k]fluoranteno

19.35

Tabla 2.6 % de la altura del valle de los pares de HAP que presentan los mismos iones moleculares y que coeluyen.

## 2.7. Implantación método de cuantificación de HAP por CG-EM.

### 2.7.1 Cuantificación de los HAP.

Para la cuantificación de cada HAP se seleccionaron, el ion de mayor abundancia de cada compuesto en el intervalo de tiempo de retención correspondiente (Tabla 2.7).

#	Compuesto	m/z	t <sub>r</sub> (min)	#	Compuesto	m/z	t <sub>r</sub> (min)
1	Acenafteno	153	9.92	9	Criseno	228	21.54
2	Acenaftileno	152	9.45	10	Db[a,h] antraceno	278	28.85
3	Antraceno	178	13.97	11	Fenantreno	178	13.84
4	B[a]antraceno	228	21.43	12	Fluoranteno	202	17.26
5	B[a]pireno	252	25.20	13	Fluoreno	166,165	11.24
6	B[b]fluoranteno	252	24.40	14	I[1,2,3]pireno	276	28.64
7	B[ghi]perileno	276	29.61	15	Naftaleno	128	6.07
8	B[k]fluoranteno	252	24.47	16	Pireno	202	17.87

**Tabla 2.7. Tiempos de retención y iones seleccionados para la cuantificación de HAP.**

### 2.7.2 Curvas de calibración de los HAP empleando CG-EM.

- ✓ Se puede observar de los gráficos de la respuesta en función de la concentración de cada uno de los HAP que presentan coeficientes de correlación mayores al 0.99 y esto indica que más del 99% de la variación total en los valores de Y es explicada por la regresión.<sup>26 y 50</sup>
- ✓ De los gráficos de residuales se observa que los puntos se distribuyen de forma aleatoria y por lo tanto el modelo de regresión lineal es aceptable.<sup>26 y 50</sup>
- ✓ Para probar que los datos de las curvas de calibración siguen una tendencia lineal se establecieron las siguientes hipótesis:<sup>50</sup>

$H_0 = X$  y  $Y$  no están linealmente relacionadas:

$H_A = X$  y  $Y$  están linealmente relacionadas.

y los criterios de aceptación fueron:

Si  $F_{Calculada} < F_{Teórica}$  entonces se acepta la  $H_0$

Si  $F_{Calculada} > F_{Teórica}$  entonces se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_A$ .



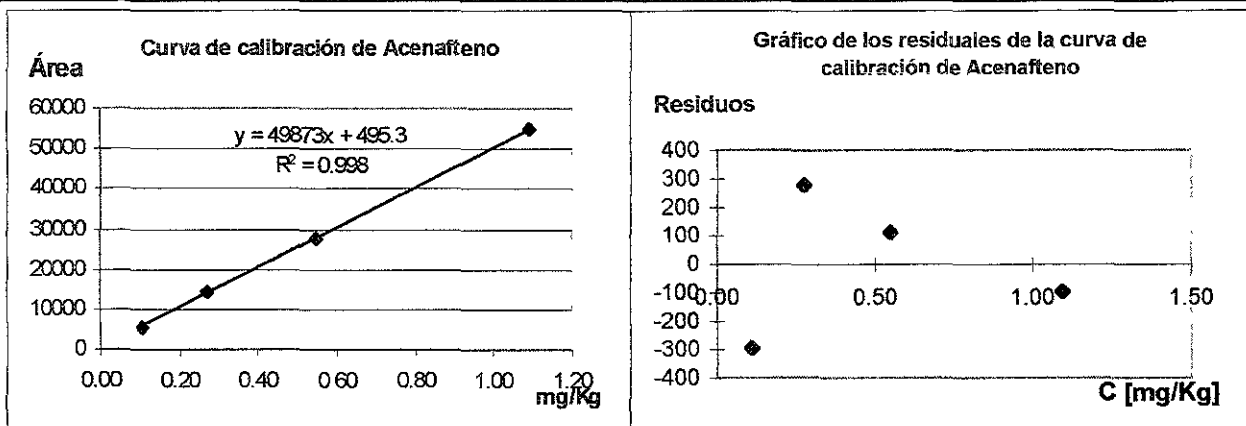
Se puede observar de los análisis de varianza para cada una de las regresiones lineales que el  $F_{calculada}$  es mayor que la  $F_{tablas}$  para 1 y 4 grados de libertad con una  $\alpha = 0.05$  y por tanto se rechaza la hipótesis nula de no relación lineal entre X y Y y se concluye que las dos variables están linealmente relacionadas.

✓ Se puede observar de los resultados de los valores del LD estimado de los HAP son mayores al primer nivel de la curva de calibración, por lo que éste no se considera como un valor confiable. Las curvas de calibración y todos los análisis estadísticos fueron recalculados tomando en cuenta solo las 4 concentraciones más altas.

Los datos correspondientes de cada uno de los HAP se encuentran a continuación y las ecuaciones correspondientes se presentan en el anexo A1.

#### **Nota general de las curvas de calibración:**

\* Valor de la curva de calibración que fue obtenido experimentalmente, pero que se omitió para los cálculos ya que es inferior al límite de cuantificación estimado.



#	Compuesto	C [mg/kg]	Área
1	Acenafteño	0.005	257*
		0.109	5657
		0.274	14416
		0.547	27889
		1.094	54964

Resumen

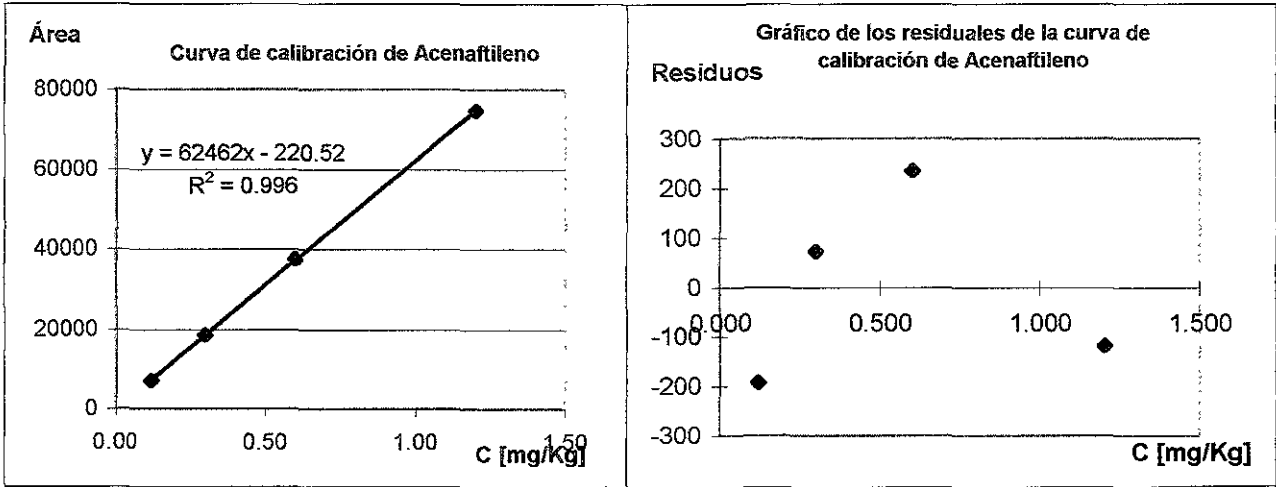
Estadísticas de la regresión	
ordenada=	495.29585
pendiente=	49872.7385
Límite de detección estimado (ppm) =	0.018
Coefficiente de correlación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.996
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	1390033315	1390033315	14895.47	10.13
Residuos	2	186638.396	93319.1981		
Total	3	1390219953			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	5951.77242	-294.77242
2	14136.4873	279.512718
3	27777.6787	111.321285
4	55060.0616	-96.06158



#	Compuesto	C(ppm)	Área
2	Acenafitileno	0.006	310*
		0.120	7093
		0.300	18616
		0.601	37543
		1.202	74717

Resumen

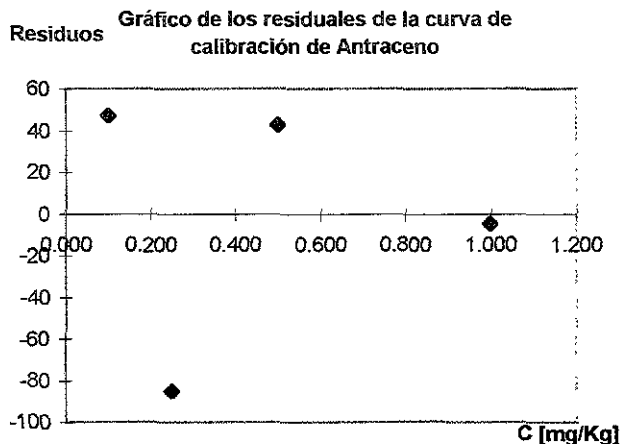
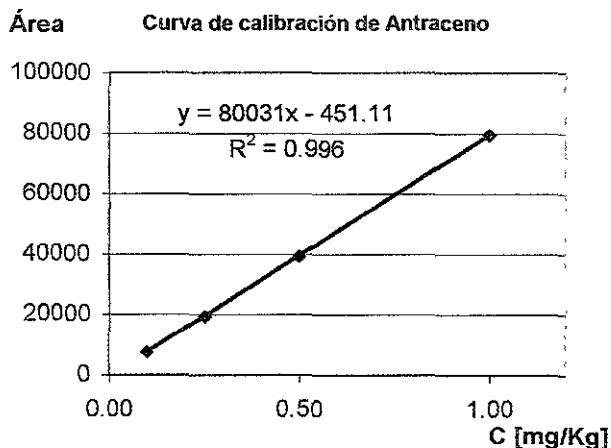
Estadísticas de la regresión	
ordenada=	-220.523
pendiente=	62462.254
Límite de detección estimado (ppm)=	0.011
Coefficiente de determinación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.996
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión					
n	1	2630000144	2630000144	47107.88	10.13
Residuos	2	111658.613	55829.3066		
Total	3	2630111803			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	7284.9411	-191.9411
2	18543.1379	72.8621151
3	37306.7992	236.200803
4	74834.1218	-117.12182



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
3	Antraceno	0.005	339*
		0.100	7589
		0.250	19446
		0.499	39556
		0.999	79473

Resumen

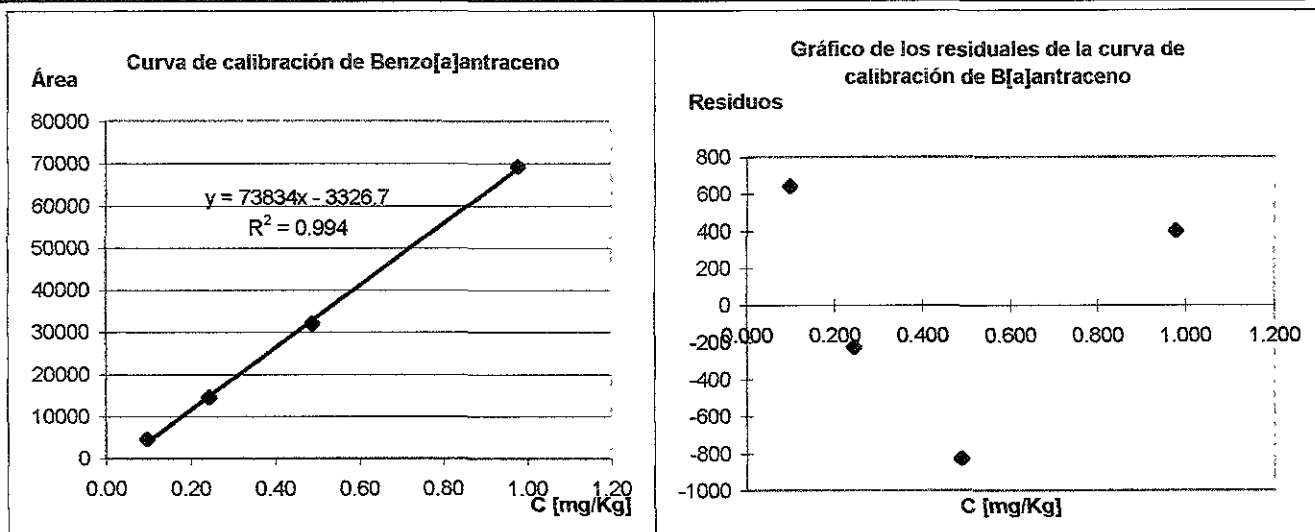
Estadísticas de la regresión	
Ordenada=	-451.111
Pendiente=	80031.321
Límite de detección estimado (ppm)=	0.003
Coefficiente de correlación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.996
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	2982690361	2982690361	527111.6156	10.13
Residuos	2	11317.11111	5658.555556		
Total	3	2982701678			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	7541.777778	47.22222
2	19531.11111	-85.11111
3	39513.33333	42.66666
4	79477.77778	-4.77777



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
4	B[a]antraceno	0.005	165*
		0.098	4530
		0.244	14486
		0.489	31925
		0.977	69220

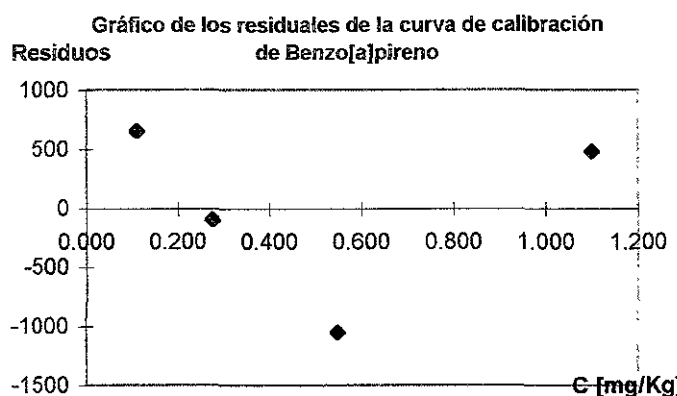
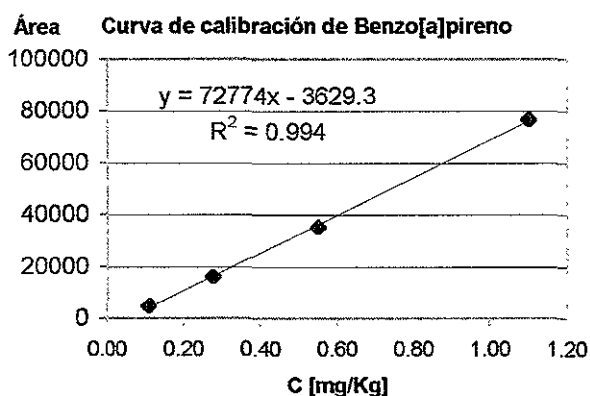
Resumen	
Estadísticas de la regresión	
ordenada=	-3326.654
pendiente=	73833.980
Límite de detección estimado (ppm)=	0.033
Coefficiente de correlación múltiple	0.997
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.994
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	2430015170	2430015170	3745.772	10.13
Residuos	2	1297470.867	648735.4337		
Total	3	2431312641			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	3887.811245	642.188755
2	14709.51004	-223.5100402
3	32745.6747	-820.6746988
4	68818.00402	401.9959839



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
5	B[a]pireno	0.005	210*
		0.110	5029
		0.275	16280
		0.550	35327
		1.099	76856

Estadísticas de la regresión

Resumen	
ordenada=	-3629.327
pendiente=	72774.189
Límite de detección estimado (ppm)=	0.039
Coefficiente de correlación múltiple	0.997
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.994
Observaciones	4

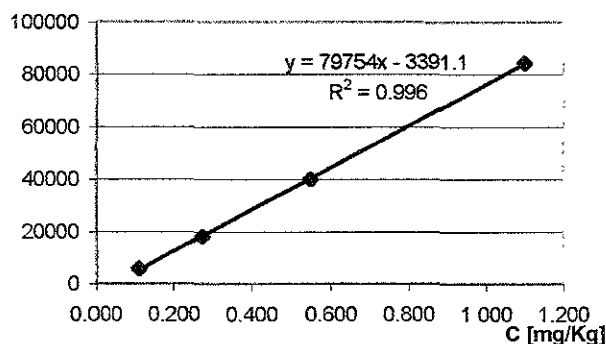
ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	2988376012	2988376012	3383.62	10.13
Residuos	2	1766378.171	883189.0857		
Total	3	2990142390			

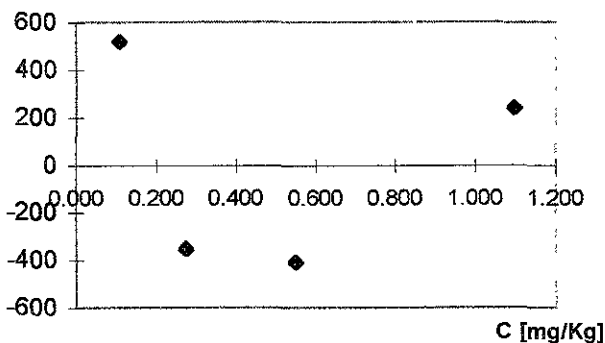
Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	4371.175368	657.8246319
2	16371.93039	-91.93038822
3	36373.18876	-1046.188755
4	76375.70549	480.2945114

Área Curva de calibración de Benzo[b]fluoranteno



Residuos Gráfico de los residuos de la curva de calibración de Benzo[b]fluoranteno



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
6	B[b]fluoranteno	0.005	203*
		0.110	5891
		0.275	18160
		0.549	40008
		1.099	84464

Resumen

Estadísticas de la regresión

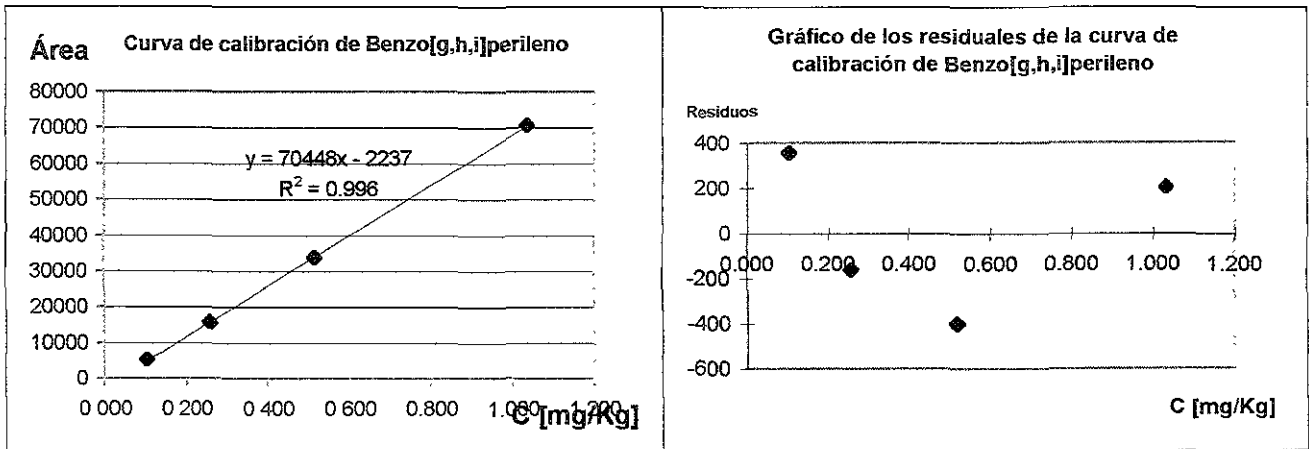
ordenada=	-3391.147
pendiente=	79754.326
Límite de detección estimado (ppm)=	0.021
Coefficiente de correlación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación RA2	0.996
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	3583906634	3583906634	11564.25477	10.13
Residuos	2	619824.9183	309912.4592		
Total	3	3584526459			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	5370.344043	520.6559572
2	18512.58099	-352.5809906
3	40416.30924	-408.3092369
4	84223.76573	240.2342704



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
7	B[ghi]perileno	0.005	229*
		0.103	5407
		0.259	15819
		0.517	33799
		1.034	70839

Resumen

Estadísticas de la regresión	
ordenada=	-2237.037483
pendiente=	70448.02049
Límite de detección estimado (ppm)=	0.018
Coefficiente de correlación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.996
Observaciones	4

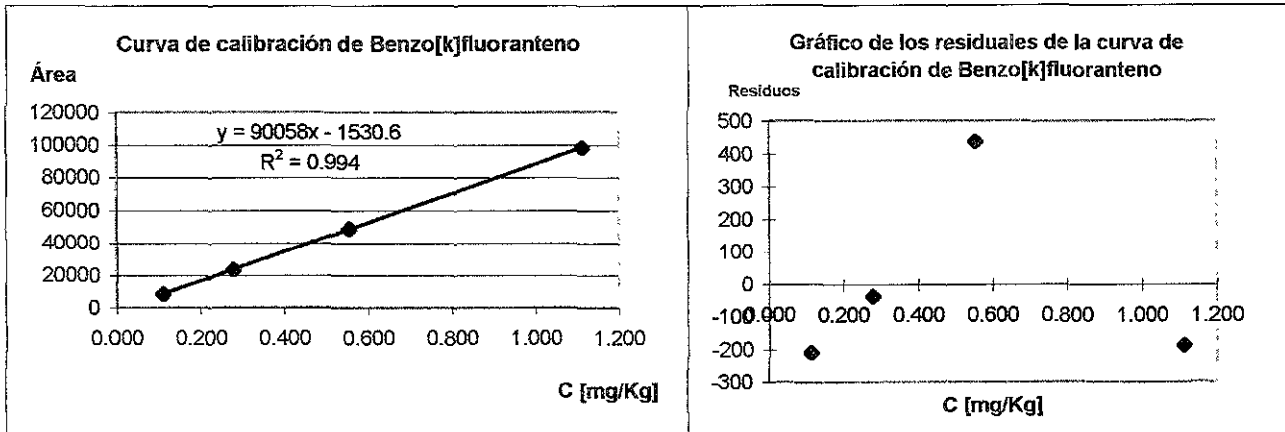
ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	2479220942	2479220942	13960.92436	10.13
Residuos	2	355165.7296	177582.8648		
Total	3	2479576108			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	5050.105756	356.8942436
2	15980.82062	-161.8206158
3	34198.67871	-399.6787149
4	70634.39491	204.605087





#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
8	B[k]fluoranteno	0.006	315*
		0.111	8274
		0.278	23471
		0.556	48986
		1.112	98440

Resumen

Estadísticas de la regresión

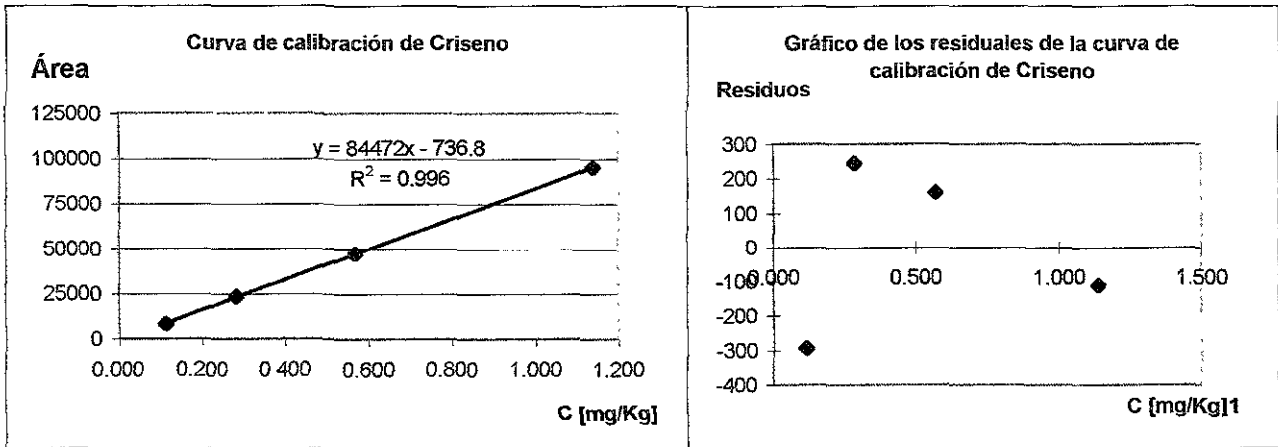
ordenada=	-1530.618
pendiente=	90057.756
Límite de detección estimado (ppm)=	0.012
Coefficiente de correlación múltiple	0.997
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.994
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	4683574249	4683574249	34355.4565	10.13
Residuos	2	272653.8795	136326.9398		
Total	3	4683846903			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	8485.24498	-211.2449799
2	23509.04016	-38.04016064
3	48548.6988	437.3012048
4	98628.01606	-188.0160643



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
9	Criseno	0.006	374*
		0.114	8591
		0.285	23559
		0.569	47524
		1.139	95355

Resumen

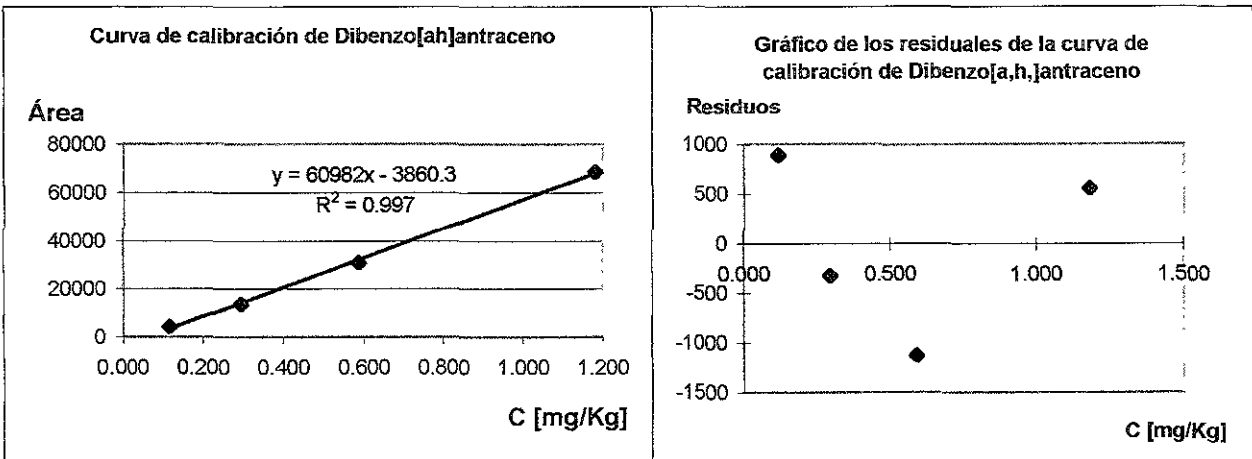
Estadísticas de la regresión	
ordenada=	-736.797
pendiente=	84471.890
Límite de detección estimado (ppm)=	0.011
Coefficiente de correlación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.996
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	4320967305	4320967305	47134.2	10.13
Residuos	2	183347.521	91673.7604		
Total	3	4321150653			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	8883.53681	-292.536814
2	23314.0388	244.961178
3	47364.8755	159.124498
4	95466.5489	-111.548862



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
10	D[a,h] antraceno	0.006	157*
		0.118	4232
		0.295	13816
		0.590	31001
		1.180	68678

Resumen

Estadísticas de la regresión	
ordenada=	-3860.287
pendiente=	60981.687
Límite de detección estimado (ppm)=	0.055
Coefficiente de correlación múltiple	0.997
Coefficiente de correlación múltiple	0.994
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	2419122738	2419122738	1945.4187	10.13
Residuos	2	2486994.38	1243497.19		
Total	3	2421609733			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	3337.990629	894.0093708
2	14135.4083	-319.4082999
3	32131.10442	-1130.104418
4	68122.49665	555.5033467

Curva de calibración de Fenantreno

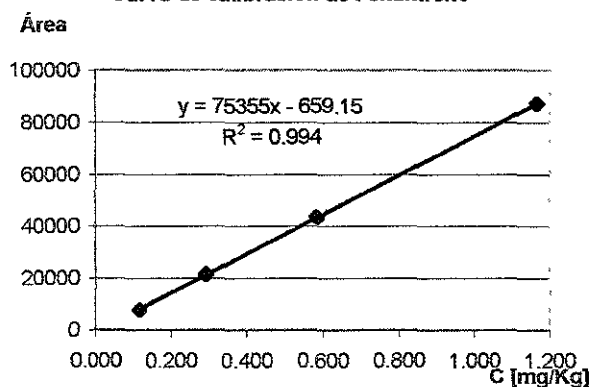
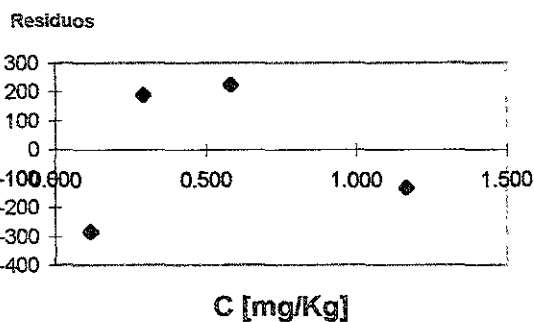


Gráfico de los residuales de la curva de calibración de Fenantreno



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
11	Fenantreno	0.006	371*
		0.117	7862
		0.292	21544
		0.584	43592
		1.168	87260

Resumen

Estadísticas de la regresión	
ordenada=	-659.151
pendiente=	75355.2802
Límite de detección estimado (ppm)=	0.012
Coefficiente de correlación múltiple	0.997
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.994
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	3619683221	3619683221	39093.2337	10.13
Residuos	2	185182.083	92591.0415		
Total	3	3619868403			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	8145.962517	-283.9625167
2	21353.6332	190.3668005
3	43366.41767	225.5823293
4	87391.98661	-131.9866131

Curva de calibración de Fluoranteno

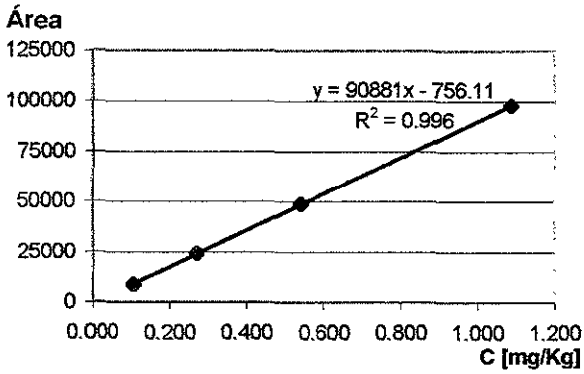
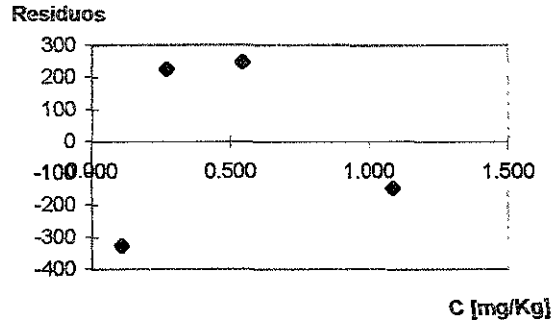


Gráfico de los residuales de la curva de calibración de Fluoranteno



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
12	Fluoranteno	0.005	409*
		0.109	8792
		0.272	24157
		0.543	48866
		1.087	97843

Resumen

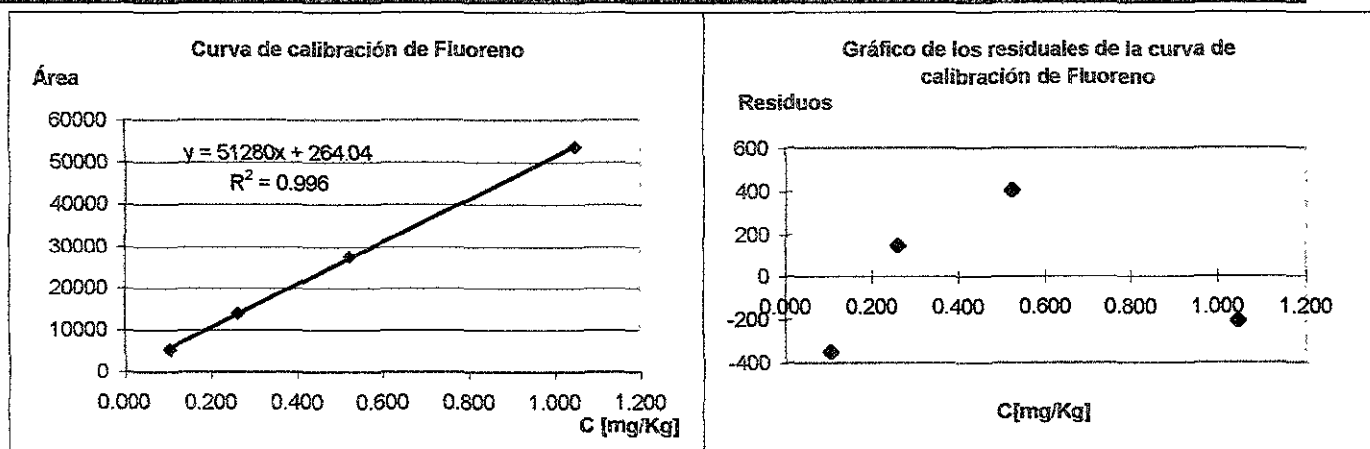
Estadísticas de la regresión	
ordenada=	-756.105
pendiente=	90880.628
Límite de detección estimado (ppm)=	0.011
Coefficiente de correlación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.996
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	4552507699	4552507699	37689.7	10.13
Residuos	2	241578.1714	120789.0857		
Total	3	4552749277			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	9118.619813	-326.6198126
2	23930.70817	226.291834
3	48617.52209	248.4779116
4	97991.14993	-148.1499331



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
13	Fluoreno	0.005	252*
		0.105	5289
		0.262	13849
		0.524	27539
		1.048	53801

Resumen

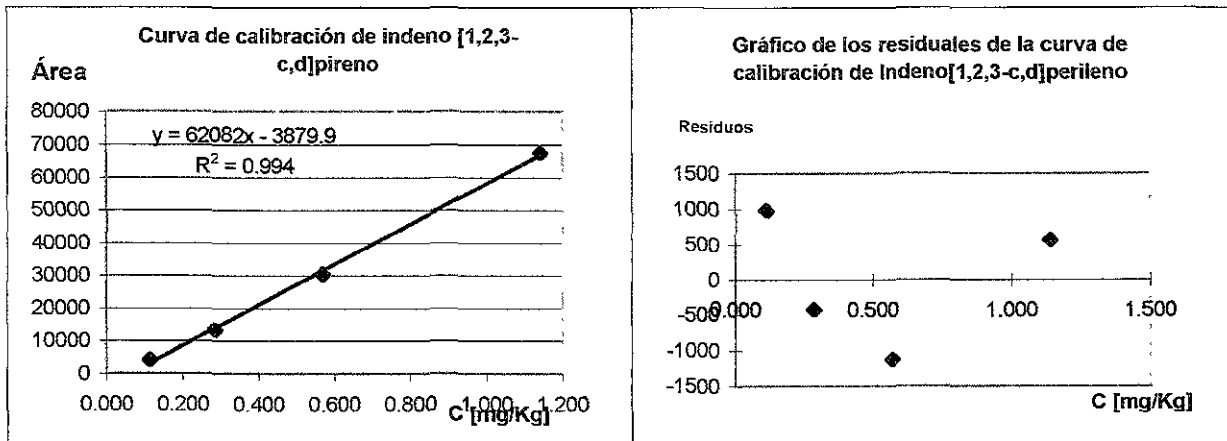
Estadísticas de la regresión	
ordenada=	264.044
pendiente=	51280.082
Límite de detección estimado (ppm)=	0.025
Coefficiente de correlación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.996
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	1348405791	1348405791	7715.5	10.13
Residuos	2	349531.6627	174765.8313		
Total	3	1348755323			

Análisis de los residuos

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	5638.196787	-349.1967871
2	13699.4257	149.5742972
3	27134.80723	404.1927711
4	54005.57028	-204.5702811



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
14	I[1,2,3]pireno	0.006	162*
		0.114	4176
		0.285	13392
		0.570	30378
		1.140	67466

Resumen

Estadísticas de la regresión

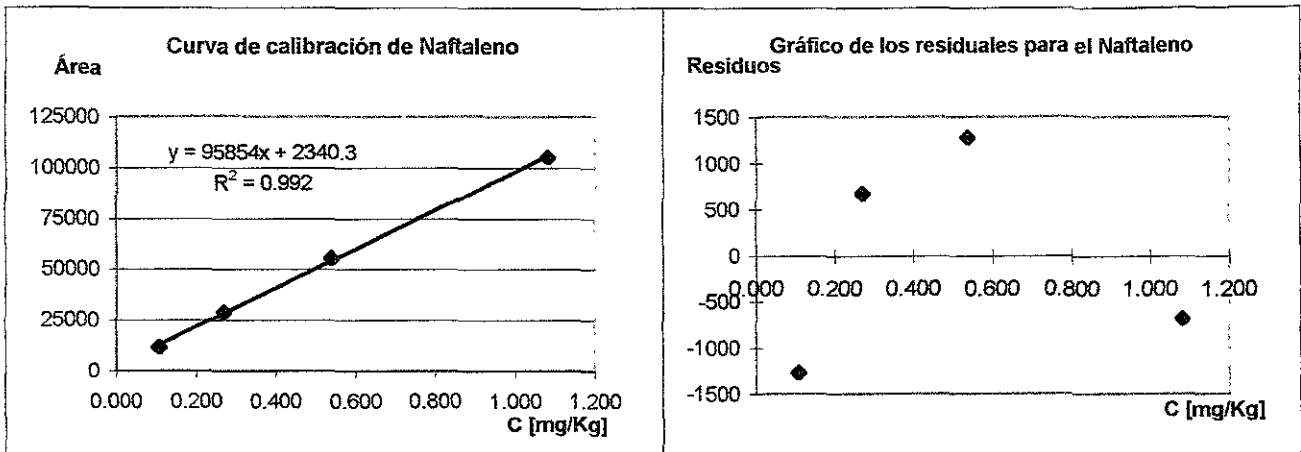
ordenada=	-3879.914
pendiente=	62082.341
Límite de detección estimado (ppm)=	0.056
Coefficiente de correlación múltiple	0.997
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.994
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	2338549099	2338549099	1708.75	10.13
Residuos	2	2737145.199	1368572.6		
Total	3	2341286244			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	3197.472557	978.5274431
2	13813.55288	-421.5528782
3	31507.02008	-1129.02008
4	66893.95448	572.0455154



#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
15	Naftaleno	0.005	559*
		0.108	11435
		0.270	28913
		0.540	55424
		1.081	105276

Resumen

Estadísticas de la regresión	
ordenada=	2340.263
pendiente=	95854.208
Límite de detección estimado (ppm)=	0.045
Coefficiente de correlación múltiple	0.996
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.992
Observaciones	4

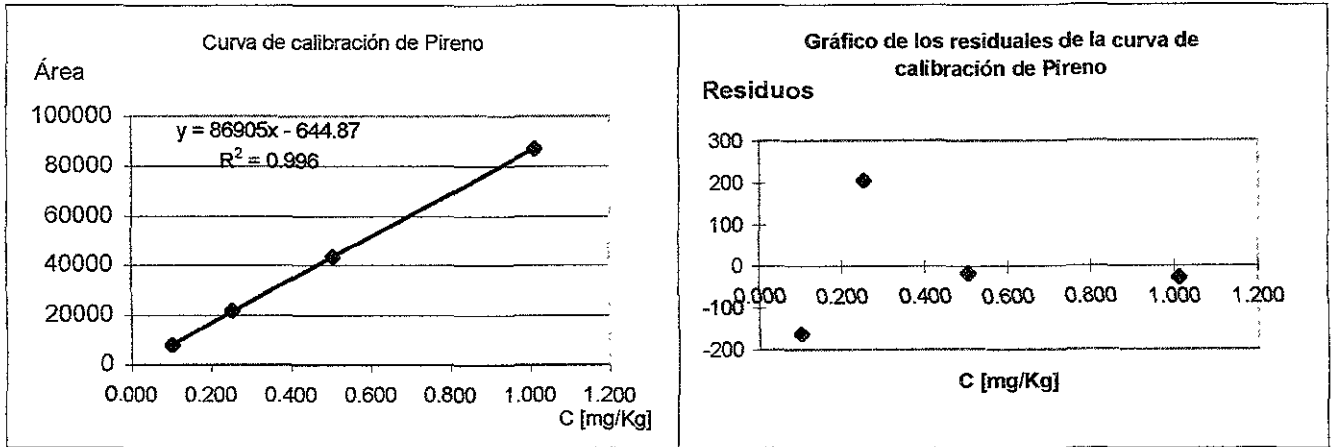
ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	5012359759	5012359759	2420.021	10.13
Residuos	2	4142410.959	2071205.479		
Total	3	5016502170			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	12701.72021	-1266.720214
2	28243.90495	669.0950469
3	54147.54618	1276.453815
4	105954.8286	-678.8286479





#	Compuesto	Cfinal (ppm)	Área
16	Pireno	0.005	384*
		0.101	7995
		0.253	21568
		0.506	43350
		1.013	87353

Resumen

Estadísticas de la regresión	
ordenada=	-644.867
pendiente=	86905.238
Límite de detección estimado (ppm)=	0.006
Coefficiente de correlación múltiple	0.998
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.996
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F experimental	F tablas
Regresión	1	3617499882	3617499882	103081.817	10.13
Residuos	2	70186.96386	35093.48193		
Total	3	3617570069			

Análisis de los residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos
1	8157.590361	-162.5903614
2	21361.27711	206.7228916
3	43367.42169	-17.42168675
4	87379.71084	-26.71084337

### 2.7.2 Determinación de la repetibilidad de la inyección de la muestra y la variabilidad de la respuesta del equipo para cada HAP.

Se determinó la repetibilidad de la inyección del automuestreador junto con la variabilidad de la respuesta del equipo, con una mezcla de estándares de los 16 HAP de una concentración de cada uno, de aproximadamente de 0.5 mg/Kg en hexano. Los resultados que se presentan en la tabla 2.8, muestran que entre las inyecciones el error existe un alto grado de repetibilidad y que el compuesto con el mayor coeficiente de variación fue el I[1,2,3-c,d]pireno (CV=3.56). Sin embargo, en general, la contribución en el error debida a la inyección para los compuestos fue pequeña.

Compuesto	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Inyección 5	Inyección 6	promedio	s	CV
Acenaffeno	27890	27573	27487	26678	26804	27278	27285	466.69	1.71
Acenaffileno	37533	35408	35849	37663	38107	36721	36882	1078.36	2.92
Antranceno	39566	38477	39353	38044	38559	38789	38796	567.96	1.46
B[a]antranceno	31945	29411	31001	29278	29933	30277	30304	1010.12	3.33
B[a]pireno	35357	35465	35730	35674	36558	35746	35750	428.67	1.20
B[b]fluoranteno	40028	37635	39287	36633	37141	38098	38134	1290.56	3.38
B[ghi]perileno	33809	32972	32911	31596	32245	32688	32702	741.92	2.27
B[k]fluoranteno	48976	50191	53111	51667	52103	51170	51205	1456.39	2.84
Críseno	47504	44450	45918	44735	44755	45448	45471	1141.33	2.51
fenantreno	31101	33356	32989	32052	33088	32474	32493	867.84	2.67
Fluoranteno	43602	42502	42672	41246	41218	42227	42243	907.34	2.15
Fluoreno	48876	46963	47167	45587	45670	46820	46845	1197.06	2.56
Db[a,h]antranceno	27509	27130	27043	26200	26215	26815	26824	531.69	1.98
I[1,2,3-c,d]pireno	30368	31941	33608	32719	33282	32344	32379	1152.36	3.56
Naftaleno	55448	56106	55507	53715	56301	55388	55407	912.08	1.65
Pireno	43360	41330	42447	41235	40231	41691	41714	1076.06	2.58

**Tabla 2.8. Valores de de las pruebas de repetibilidad de la inyección con una mezcla de estándares de HAP (~0.5 mg/Kg)**

### 2.8 Preparación del suelo empleado.

Se molieron 6 Kg de una porción de una muestra de suelo contaminado por petróleo que se obtuvo de una zona aledaña a una refinería en el estado de Veracruz, los cuales se tamizaron. Para evitar el crecimiento de otro tipo de plantas, el suelo se empaquetó y se calentó en una estufa a 80 ° C durante 24 horas y posteriormente se mantuvieron a 4 °C. La mitad del suelo se esterilizó en una autoclave durante 45 minutos 3 veces, realizando pruebas de esterilidad para determinar la presencia de microorganismos capaces de

consumir hidrocarburos (Anexo A2). Una vez que se disponía de los dos tipos de suelo se colocaron 0.5 Kg del suelo correspondiente en macetas (ver Figura 2.1).

## **2.9. Tratamiento de las muestras.**

### **2.9.1 Muestreo**

En cada muestreo se tomó 1 g aprox. de suelo cercano a las raíces de la planta para aquellas macetas con plantas o del suelo de distintos puntos de los controles. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 8 h y se almacenaron a 4 ° C hasta su extracción.

### **2.9.2 Extracción:** <sup>17</sup>

La extracción de los HAP de cada una de las muestras se llevó a cabo con equipos Soxhlet<sup>17</sup>, mediante el siguiente procedimiento:

1. Se colocó en el extractor Soxhlet, un cartucho de papel filtro con 1 g aproximadamente de las muestras de suelo y se agregaron 100 ml de di-cloro-metano y de 1 a 2 perlas de ebullición al matraz bola correspondiente. Posteriormente el equipo Soxhlet se terminó de ensamblar y se calentó durante 18 h a una temperatura que permitiera de 5-6 reflujos cada hora y que el disolvente no se evaporara. Una vez que el tiempo de extracción concluyó, el sistema se dejó enfriar a temperatura ambiente.
2. Después, el extracto y las perlas de ebullición se colocaron en el concentrador Kuderna-Danish (K-D) y se calentaron con un baño de agua, de forma que el tubo del concentrador estuvo parcialmente inmerso en agua caliente y la superficie de su matraz estuvo bañada por el vapor del agua. Cuando el volumen aparente del líquido llegó a 1 ml el aparato K-D se removió.
3. Enseguida se realizó el cambio de disolvente, para lo cual se adicionaron 10 ml de hexano y se concentró nuevamente como se indica en el inciso anterior hasta alcanzar volumen aparente de 1 ml, posteriormente el sistema se dejó enfriar y el concentrado se purificó.

### **2.9.3 Purificación:**

La determinación de las mejores condiciones de purificación fue importante porque ellas nos permitieron separar la fracción en la que se encontraban los analitos de interés del

resto de los componentes del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la muestra. Se realizaron pruebas independientes con los cartuchos de EFS de LC-Si y LC-NH<sub>2</sub> y con 3 ml de una mezcla en hexano de los estándares de ~ 0.33 ppm de cada uno de los 16 HAP de acuerdo a la siguiente tabla:

Comentarios	Volumen (mL)	Disolvente
Acondicionamiento	2	Hexano
Muestra	3	Hexano
Elución	8	Hexano
	3	Hexano / CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (9:1)

**Tabla 2.9 Elución de las muestras en los cartuchos de EFS de LC-Si acoplada a LC-NH<sub>2</sub>**

El seguimiento de las dos pruebas se realizó por CG-EM. Los cromatogramas de los estándares (figuras 2.3 y 2.4) muestran que en ambas columnas los HAP ya no eluyen a partir del mililitro 11. De esta manera se siguió el siguiente procedimiento para la purificación de las muestras:

1. Los cartuchos EFS de LC-Si y de LC-NH<sub>2</sub> se acoplaron y se acondicionaron con 2 ml de hexano.
2. Más tarde, el concentrado de la muestra se agregó en la parte superior del cartucho de LC-Si y cuando la muestra se cargó totalmente se agregaron 8 ml de hexano.
3. Posteriormente se agregaron 3 ml de una mezcla hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 9:1 y se recolectaron del mililitro 3 al 13.
4. Una vez purificada la muestra se concentró en el aparato K-D.
5. Las muestras se guardaron en los frascos de 2 ml y a 4 °C hasta su análisis.

Por comodidad los HAP fueron identificados en los cromatogramas de la figura 2.7 y 2.8 de acuerdo al siguiente orden:

#	Compuesto	#	Compuesto	#	Compuesto
1	Acenaffeno	6	B[b]fluoranteno	11	Fenantreno
2	Acenaffileno	7	B[ghi]perileno	12	Fluoranteno
3	Antraceno	8	B[k]fluoranteno	13	Fluoreno
4	B[a]antraceno	9	Críseno	14	I[1,2,3]pireno
5	B[a]pireno	10	Db[a,h] antraceno	15	Naftaleno
				16	Pireno

Tabla 2.11. Enumeración de HAP.

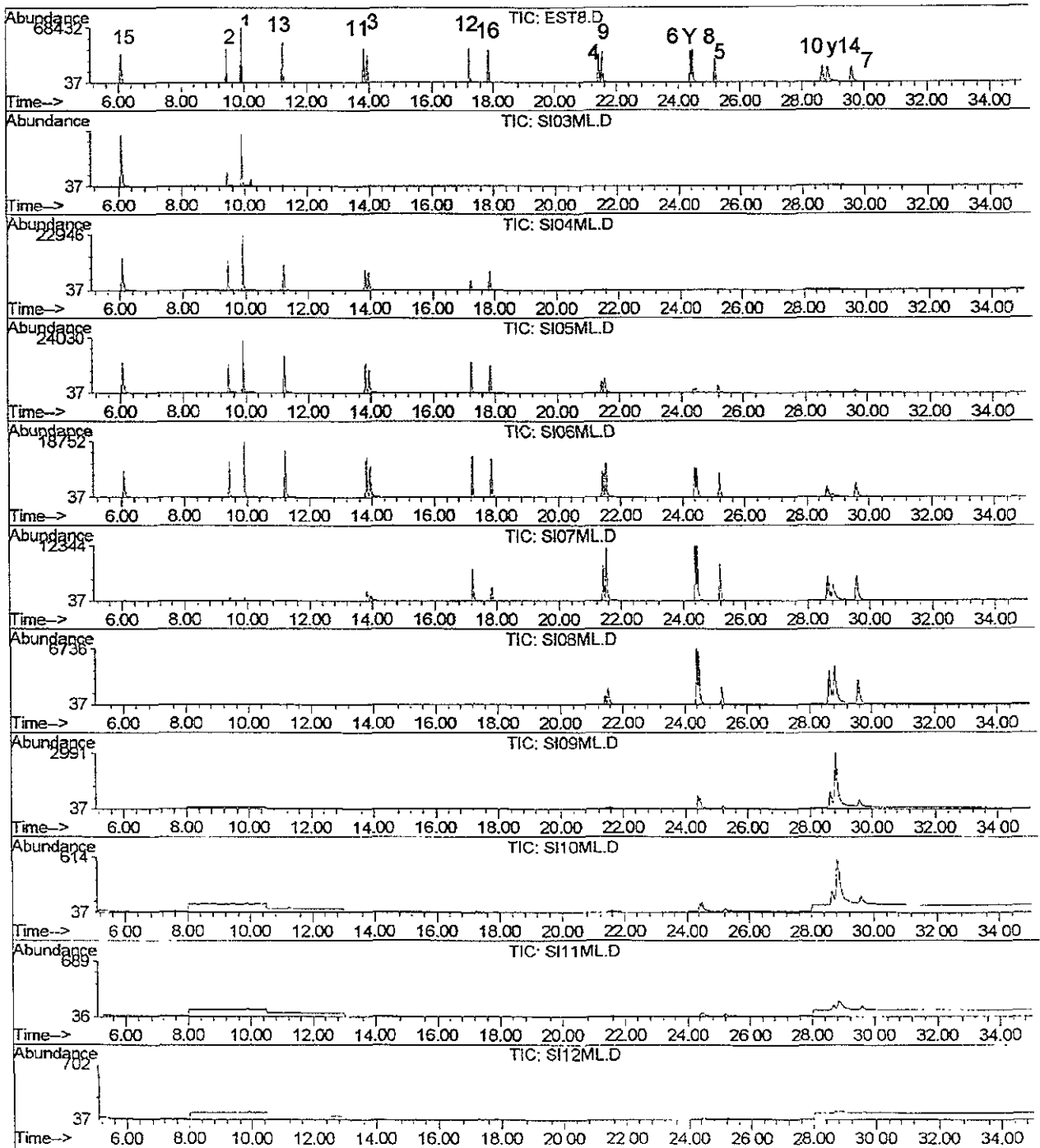


Figura 2.7. Elución de los 16 HAP en cartuchos de EFS de LC-Si. El mililitro al que corresponden los cromatogramas están señalados en el título de cada uno.

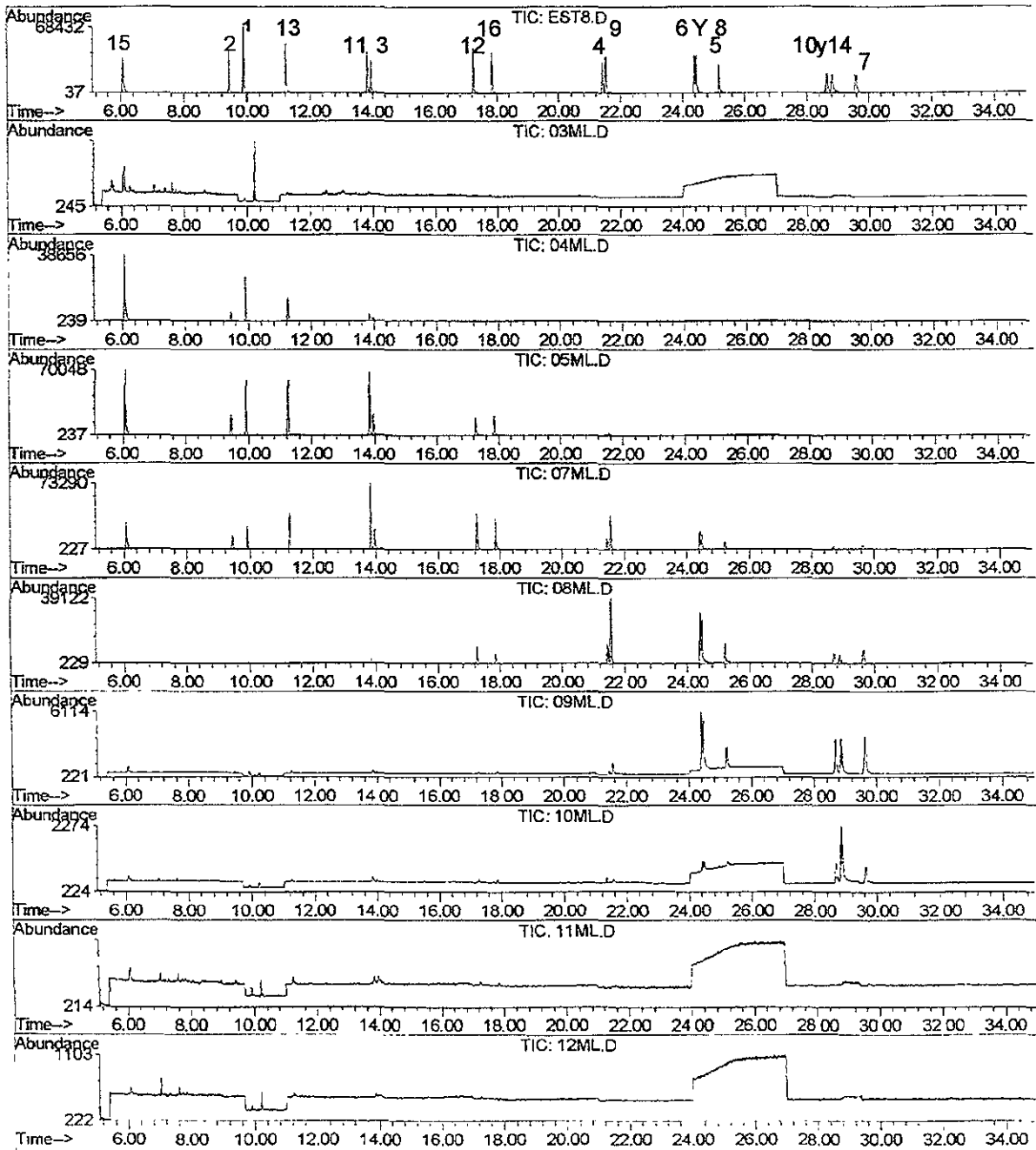


Figura 2.8. Elución de los 16 HAP en cartuchos de EFS de LC-NH<sub>2</sub>. El mililitro al que corresponden los cromatogramas están señalados en el título de cada uno.

#### 2.9.4. Determinación de la concentración de las muestras.

Una vez que las muestras fueron procesadas y analizadas por CG-EM la concentración de los HAP se obtuvo al interpolar el área de la respuesta de ion en la curva de calibración correspondiente.

Finalmente se consideró la dilución de las muestras y se calculó la concentración de las muestras aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg/kg de HAP} = \frac{C \times f}{M_m}$$

donde C es la concentración que se obtiene del equipo, f es el factor de dilución de la muestra, y  $M_m$  es el peso de la muestra.

#### 2.10. Control de calidad.

1. CG-EM se ajustó diariamente para obtener la máxima sensibilidad en todo el intervalo de barrido de masas, de acuerdo a lo sugerido por el proveedor.
2. Se realizó una curva de calibración diaria por medio de la inyección única de cada concentración. Solo se muestra una de las curvas.
3. Para evaluar el desempeño en el método se realizó el análisis de 5 muestras adicionadas, se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de una mezcla de estándares en hexano de una concentración de  $\sim 5 \text{ mg/l}$  de cada HAP en 1 g de suelo no contaminado. El disolvente se dejó evaporar durante 1 hora y posteriormente los suelos adicionados se procesaron junto con suelos blancos.

La determinación del % de recuperación para cada compuesto de las muestras adicionadas se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{C_1 \times V_1}{C_{1\text{ppm}} \times 1\text{ml}} \times 100$$

donde:  $C_1$  = Concentración obtenida con la respuesta del EM

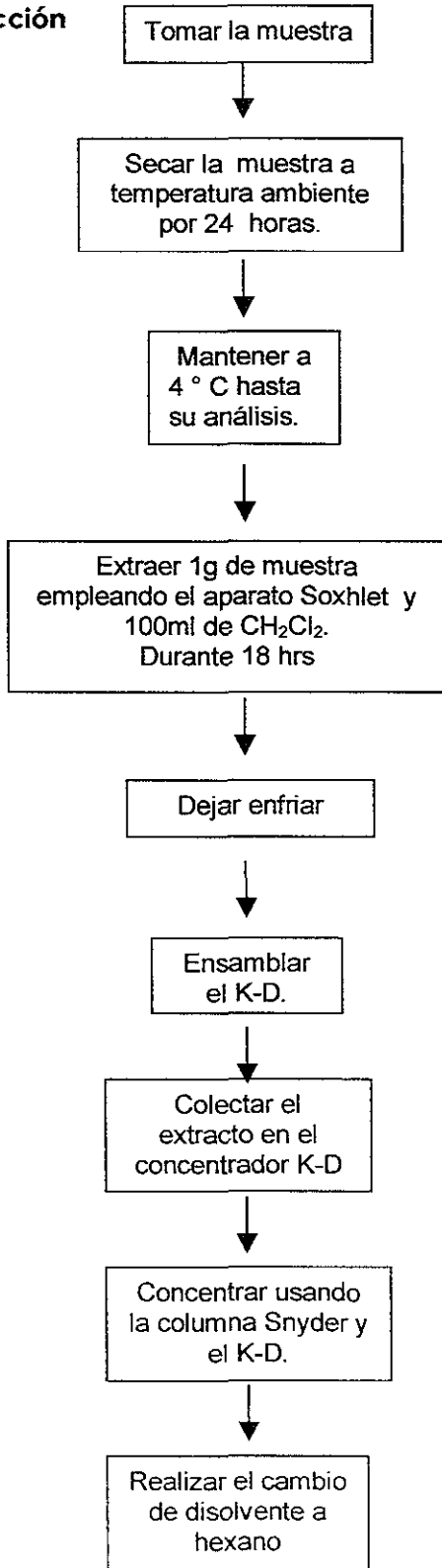
$V_1$  = Volumen la muestra

$C_{1\text{mg/l}}$  = Concentración inicial para cada compuesto en la mezcla de estándares ( $\sim 1 \text{ mg/l}$ )

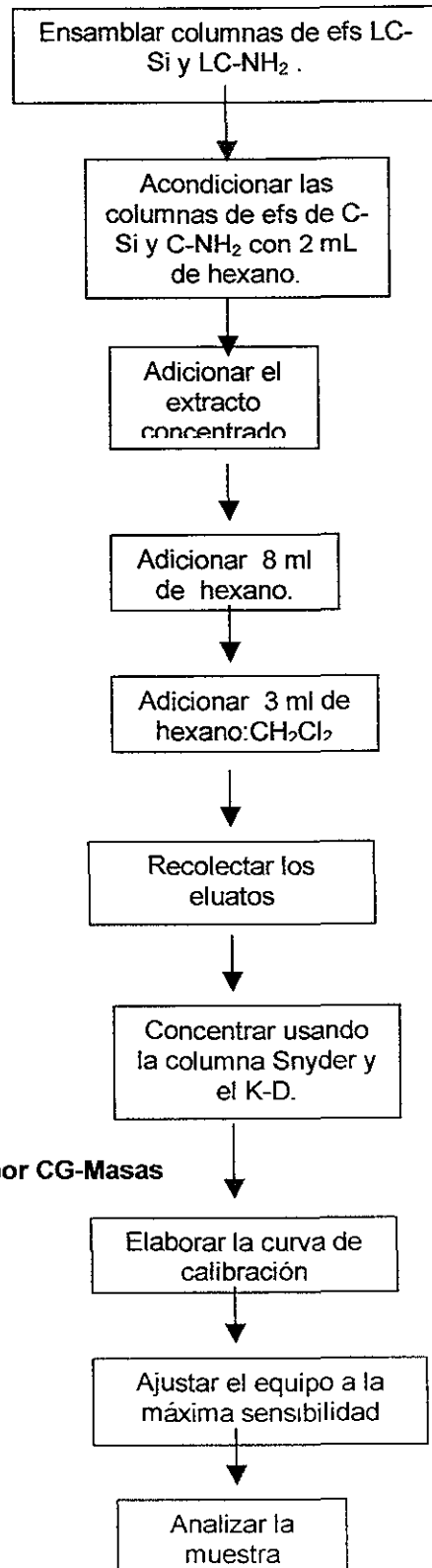
Se realizó, además, el análisis de muestras control entre las muestras reales de cada muestreo, que fueron preparadas tal como se indica el inciso 3.

### 2.11 Diagrama de flujo

#### Extracción



#### Purificación



#### Análisis por CG-Masas



## **CAPÍTULO 3**

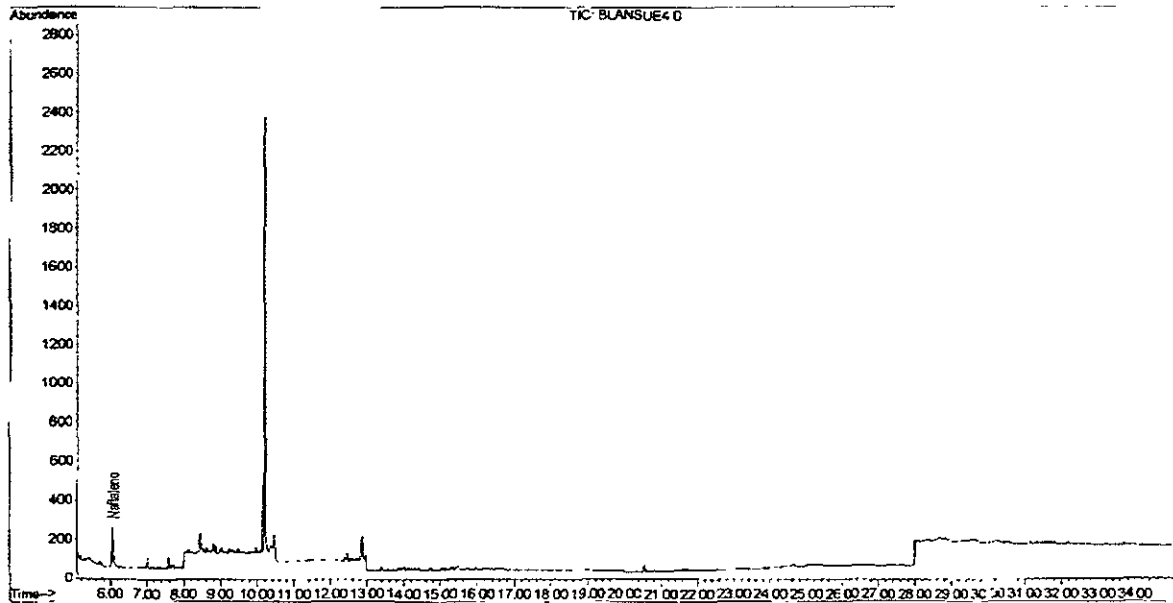
# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Resultados de la implantación método de cuantificación de HAP por CG-EM.

##### 3.1.1 Evaluación del método.

En la figura 3.1 se puede observar el cromatograma del suelo no contaminado (Capítulo 2, Materiales) que se usó como matriz para la evaluación del método de extracción.



**Figura 3.1 Cromatograma del suelo que se empleó como matriz en la evaluación del método de extracción y purificación de HAP.**

Como se puede observar el único HAP que se encuentra en el suelo limpio es el naftaleno, el cuál no es un hidrocarburo muy tóxico. La concentración promedio que se encontró fue menor al límite de detección estimado de 0.0594 ppm por lo que no se considera significativa.

En la tabla 3.1 se encuentran los resultados de los % de Recuperación para las muestras iniciales, promedio, desviación estándar y CV.

La EPA establece como criterio aceptable de % Recuperación el intervalo de 70-130 % (Método EPA 8000).<sup>56</sup>

Como se puede observar en la figura 3.2 los % Recuperación de los HAP que se cuantifican por este método van del 42 al 91 % y tienen CV que van desde un 4.31 a 15.2. De acuerdo, a los parámetros antes mencionados algunos de los % de

recuperación obtenidos por este método son bajos y en general tienen una alta dispersión.

- El Naftaleno es el analito que presenta los % de recuperación más bajos, que quizá son debidos a su volatilización ya que este compuesto tiene una presión de vapor alta a temperatura ambiente. (Figura 3.3)
- El otro compuesto que presenta % de recuperación bajos es el Antraceno, sin embargo, como se puede observar en la figura 3.2, su comportamiento no presenta una tendencia similar al de los otros HAP semejantes.
- El Benzo[a]pireno, Acenafeno y el Pireno presentan una tendencia media, entre el 50 y 60 % de recuperación.
- El Acenafileno, el B[g,h,i]perileno, el Fluoranteno y el Fluoreno presentan % de Recuperación que se encuentran entre el 70 % y el 80%. Estos compuestos presentan % Recuperación aceptables según la EPA.
- Finalmente los compuestos que presentan las recuperaciones más altas (entre el 80 y el 90 %) son: B[a]antraceno, I[1,2,3-c,d]pireno, Db[a,h]antraceno, Criseno, B[k]fluoranteno. Estos compuestos también presentan % Recuperación aceptables de acuerdo a los criterios establecidos por la EPA.
- Las pérdidas de los HAP de peso molecular alto no fueron debidas a volatilización ya que sus presiones de vapor son bajas, como se puede observar en la Figura 3.3
- Las bajas eficiencias en el proceso de extracción se deben probablemente a pérdidas durante las etapas de concentración; por volatilización de aquellos HAP cuyas presiones de vapor son altas; o durante la extracción ya que el disolvente no está en íntimo contacto con el suelo en el Método de extracción por Soxhlet o durante la etapa de la purificación.

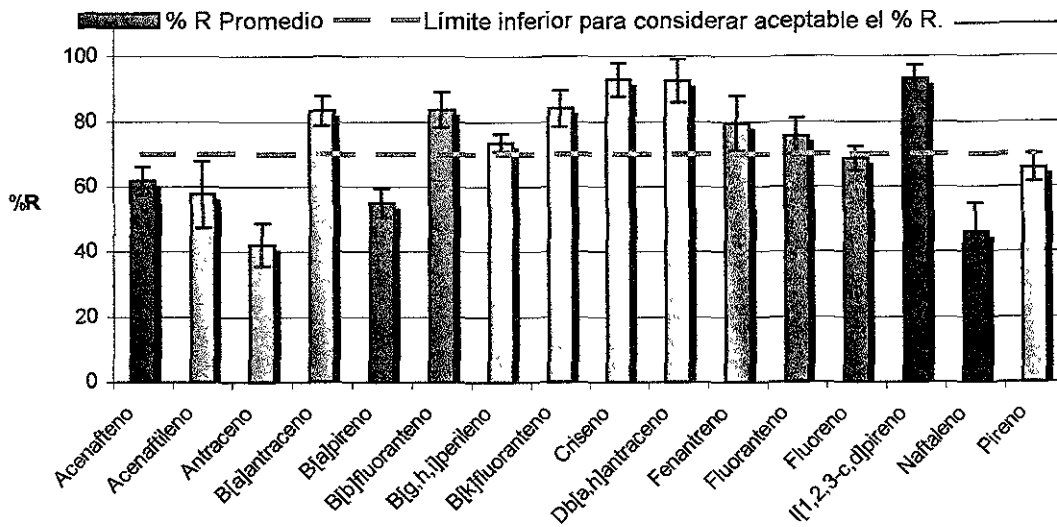
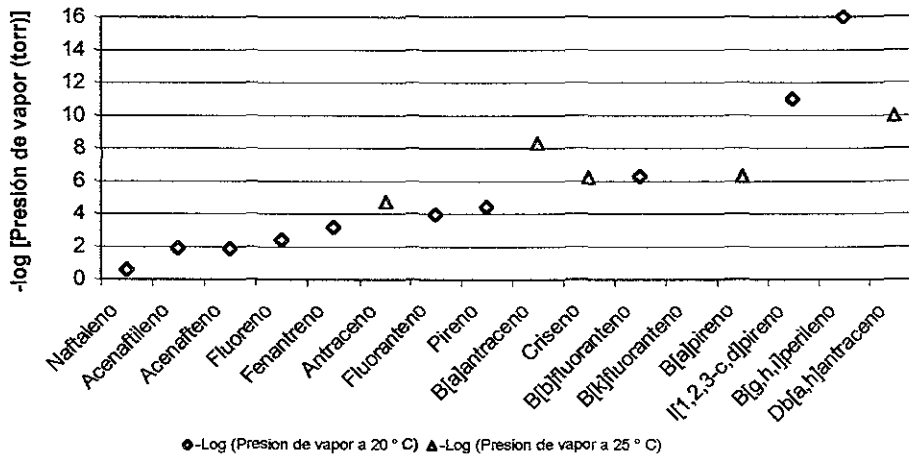


Figura 3.2. % Recuperación de la extracción de HAP en suelo por el método de Soxhlet y el % Recuperación más bajo considerado como aceptable.

Compuesto	% R					% R Promedio	s	CV
	% R 01	% R 02	% R 04	% R 05	% R 06			
Acenafteño	62.972	55.625	65.680	65.228	59.049	61.711	4.296	6.962
Acenaftileno	49.668	48.344	70.679	66.505	52.948	57.629	10.254	17.793
Antraceno	30.773	42.429	46.602	46.761	43.880	42.089	6.587	15.651
B[a]antraceno	83.230	86.090	85.262	86.116	75.083	83.156	4.663	5.608
B[a]pireno	48.805	51.648	56.386	59.734	57.814	54.877	4.522	8.240
B[b]fluoranteno	87.191	88.512	82.686	85.059	74.747	83.639	5.440	6.504
B[g,h,i]perileno	75.249	74.150	74.432	74.850	68.694	73.475	2.705	3.682
B[k]fluoranteno	89.103	88.005	84.171	83.827	74.951	84.012	5.568	6.628
Criseno	97.473	97.168	92.629	91.771	84.967	92.802	5.083	5.477
Db[a,h]antraceno	96.768	81.601	97.053	96.118	90.688	92.446	6.597	7.136
Fenantreno	64.832	85.697	78.827	83.427	84.267	79.410	8.546	10.761
Fluoranteno	68.251	82.915	76.933	76.966	72.220	75.457	5.534	7.333
Fluoreno	64.379	65.129	69.955	73.199	70.188	68.570	3.720	5.426
I[1,2,3-c,d]pireno	95.976	90.133	95.126	96.694	87.220	93.030	4.143	4.453
Naftaleno	56.151	54.910	38.534	41.197	38.475	45.853	8.913	19.438
Pireno	60.914	70.754	68.200	66.632	61.604	65.621	4.252	6.479

Tabla 3.1 % de Recuperación para HAP en suelo extraídos con Soxhlet y purificados con cartuchos acoplados de EFS de LC-Si y LC-NH<sub>2</sub> y cuantificados por CG-EM.



**Figura 3.3** Presión de vapor de HAP a 20 y 25 ° C. Los datos se pueden ver en la **Tabla 1.1.**

### 3.2 Resultados de los muestreos de suelo contaminado sometidos al proceso de fitorremediación.

#### 3.2.1 Identificación de los HAP presentes en las muestras de suelo contaminado por petróleo.

A los picos cromatográficos que coincidieron con los tiempos de retención de los estándares de los HAP se les realizó la corrección del ruido de fondo y sus espectros de masas fueron comparados con el de su estándar correspondiente.

Los criterios establecidos por la EPA 8270 c para considerar a los HAP como presentes en las muestras por el detector selectivo de masas son los siguientes:

- Los iones característicos de un espectro de referencia son definidos como los tres iones de mayor intensidad relativa o por cualquier ión que presente una intensidad relativa mayor al 30 % para el caso en el que menos de tres de tales iones se presenten en el espectro de referencia.
- Las intensidades relativas de los iones característicos en las muestras deben encontrarse en el intervalo de  $\pm 30\%$  de las intensidades relativas de los correspondientes iones en el espectro de referencia. Por ejemplo, para un ión con una abundancia de 50% en el espectro del estándar, la abundancia del ion correspondiente en la muestra debe estar entre el 30 y 70 %.
- Las intensidades relativas de los iones más importantes del espectro de referencia (iones > 10% de los iones más abundantes) deben de coincidir con los presentes en el espectro de la muestra.

- Las intensidades relativas de los iones más importantes deben encontrarse dentro del  $\pm 20\%$  establecido.
- El ion molecular que se encontró presente en el espectro de referencia también debe estar presente en el espectro de la muestra.

De acuerdo a estos, solamente: el B[g,h,i]perileno, B[k]fluoranteno, Naftaleno, Pireno fueron encontrados en las muestras y sus espectros se presentan en las figuras 3.3-3.8.

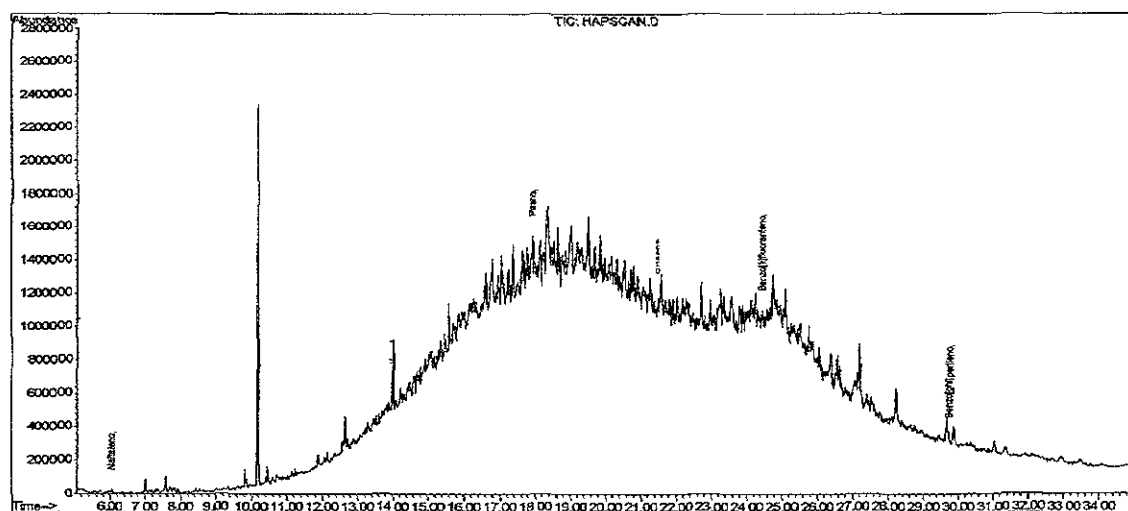
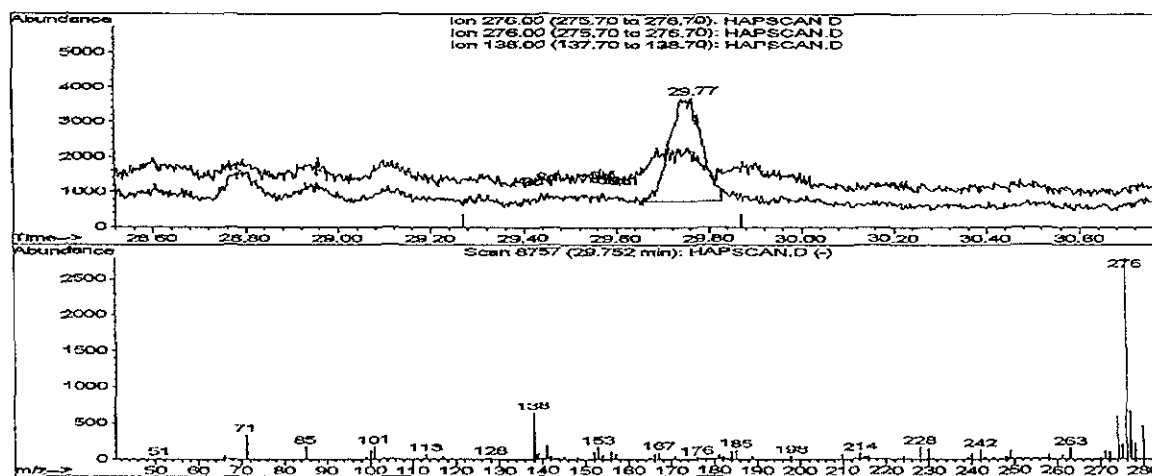


Figura 3.4 Cromatograma de la muestra M101PNE por modo SCAN donde se identifican los HAP presentes.



m/z	% de intensidad Muestra	% intensidad Estándar
276.0	100.0	100.0
277.0	27.5	23.2
138.0	23.2	24.6

Figura 3.5 Espectro de masa del Benzo[g,h,i]perileno en la muestra M101PNE por modo SCAN.

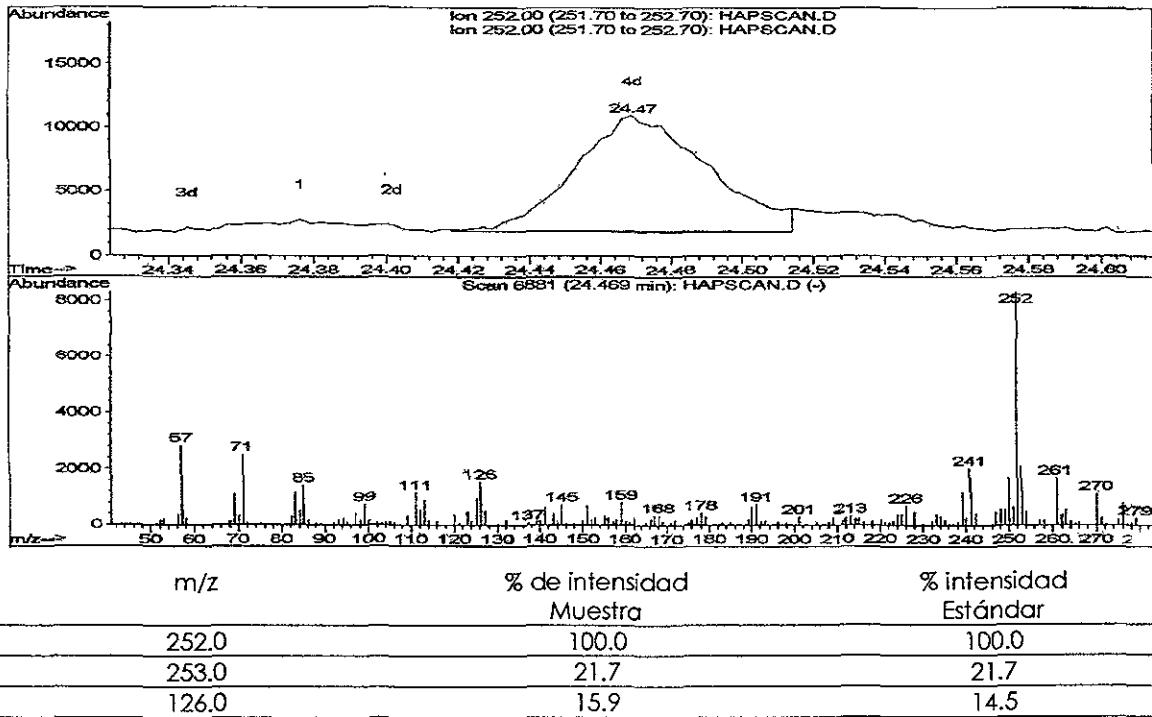


Figura 3.6 Espectro de masa del Benzo[k]fluoranteno en la muestra M101PNE por modo SCAN.

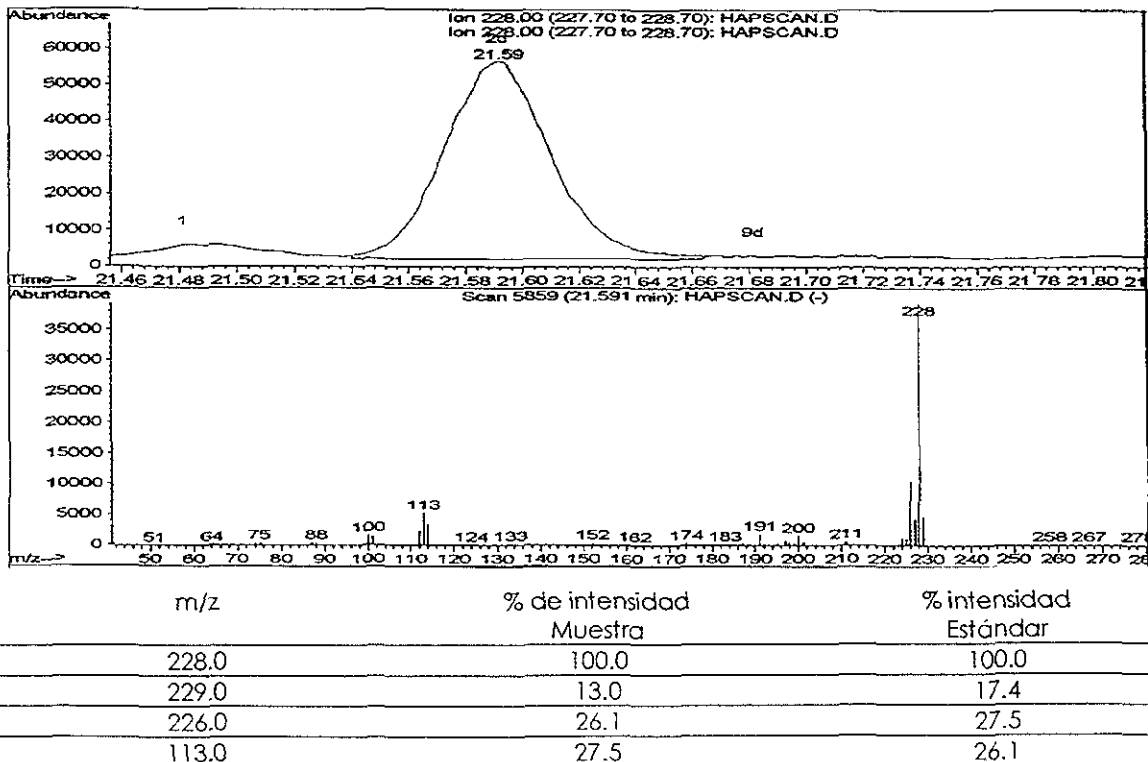
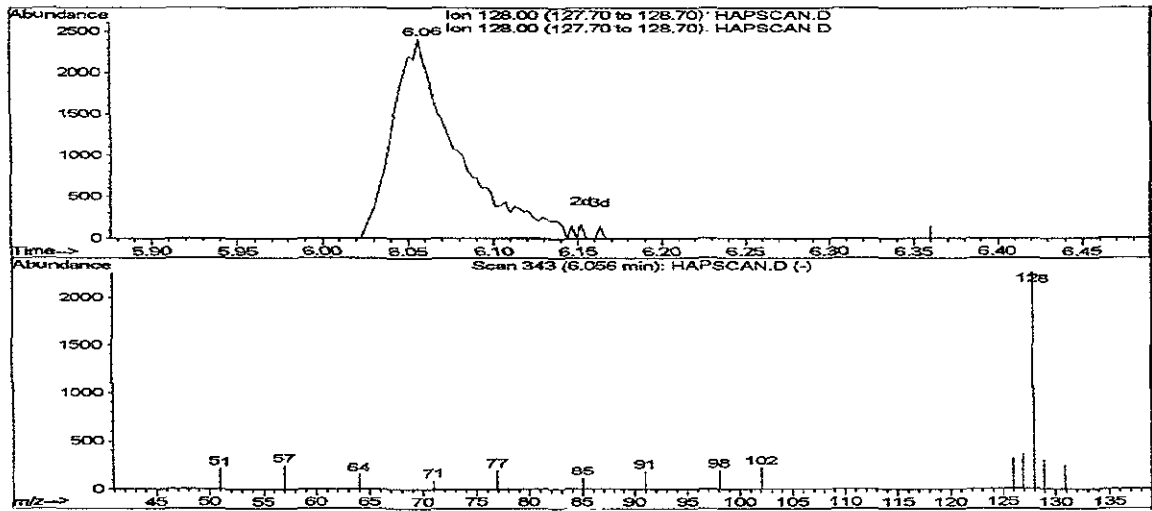
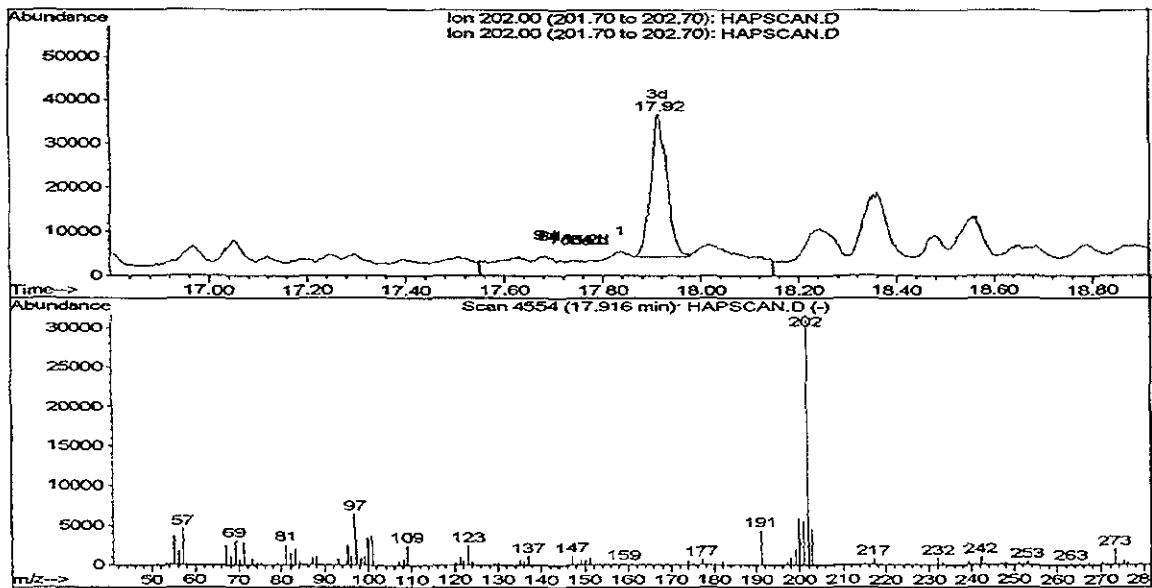


Figura 3.7 Espectro de masa del Criseno en la muestra M101NE por modo SCAN.



m/z	% de intensidad Muestra	% intensidad Estándar
128.0	100.0	100.0
129.0	11.6	10.1
127.0	14.5	11.6
64.0	5.8	4.3

Figura 3.8 Espectro de masa del Nafaleno en la muestra M101PNE por modo SCAN.



m/z	% de intensidad Muestra	% intensidad Estándar
202.0	100.0	100.0
203.0	15.9	15.9
200.0	18.8	18.8
101.0	11.6	14.5

Figura 3.9 Espectro de masa del Pireno en la muestra M103 PNE por modo SCAN.



### 3.2.2 Cuantificación de los HAP presentes en las muestras.

Finalmente, una vez que se identificaron los compuestos presentes en las muestras, la cuantificación del compuesto se basó en la integración de la abundancia del ion primario característico de cada compuesto en el tiempos de retención específico, por MSI.

Aunque el Naftaleno y el Pireno fueron encontrados en las muestras, sus resultados se omiten debido a que los por cientos de recuperación en la evaluación del método no se consideran como aceptables.

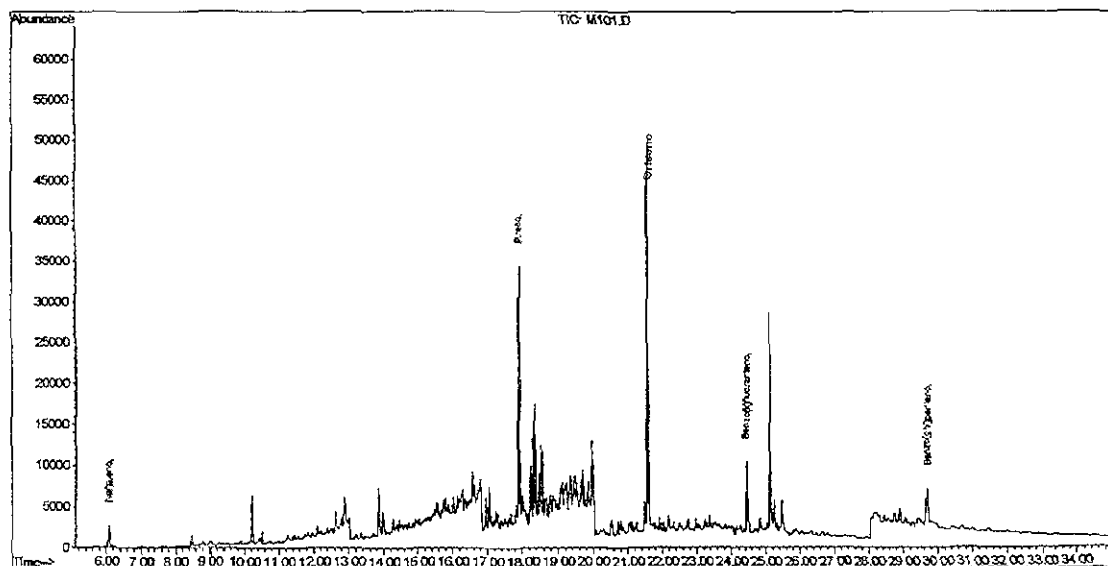
En las figuras 3.9-3.12 se muestran tanto el cromatograma de una de las muestras por modo MSI como la integración de los picos de los HAP que fueron cuantificados por este modo.

Para el B[g,h,i]perileno el % de intensidad de los iones fue:

m/z	Muestra % de intensidad	Estándar % intensidad
138	28.1	23.5
276	100.0	100.0

**Tabla 3.2 Intensidades de los iones de B[g,h,i]perileno en la muestra.**

Para el caso de B[k]fluoranteno, por omisión no se eligió un ion calificador lo que ocasiona que las mediciones sean menos confiables.



**Figura 3.10 Cromatograma de masas de la muestra M101PNE por medio del MSI donde se identifican los HAP presentes.**

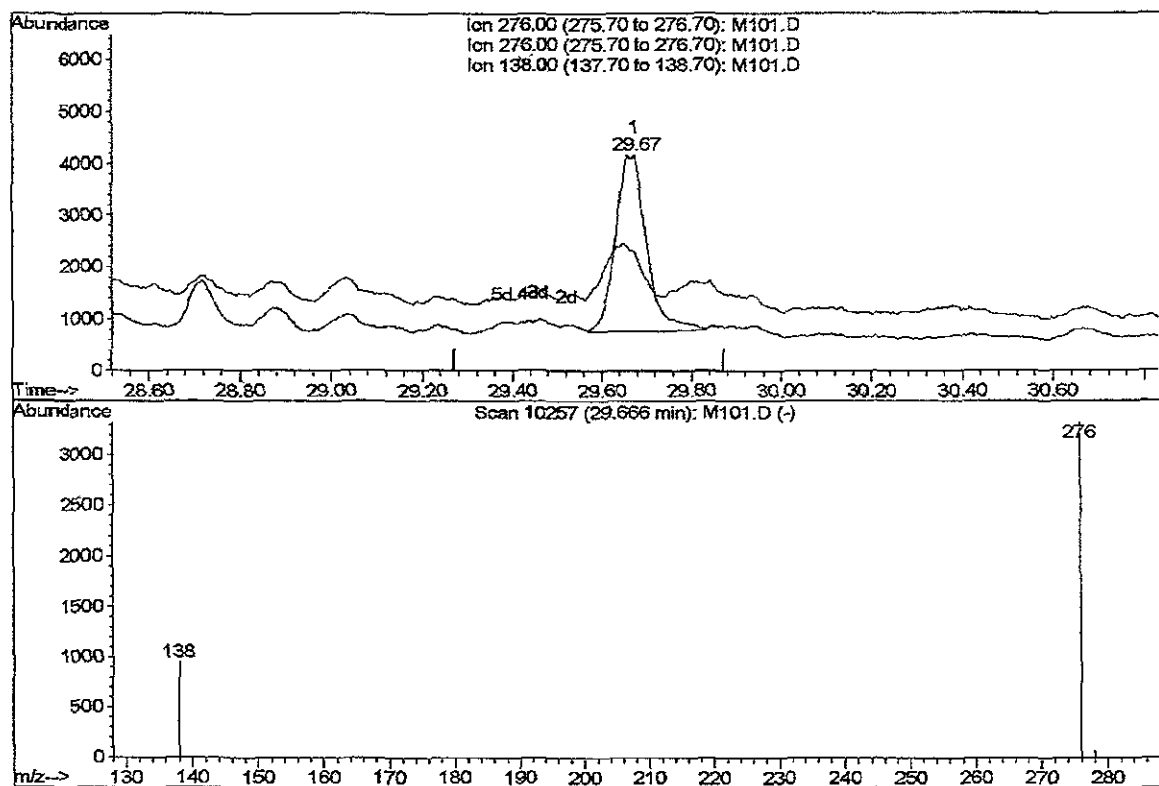


Figura 3.11 Cromatograma y espectro de masas de B[g,h,i]perileno por modo MSI.

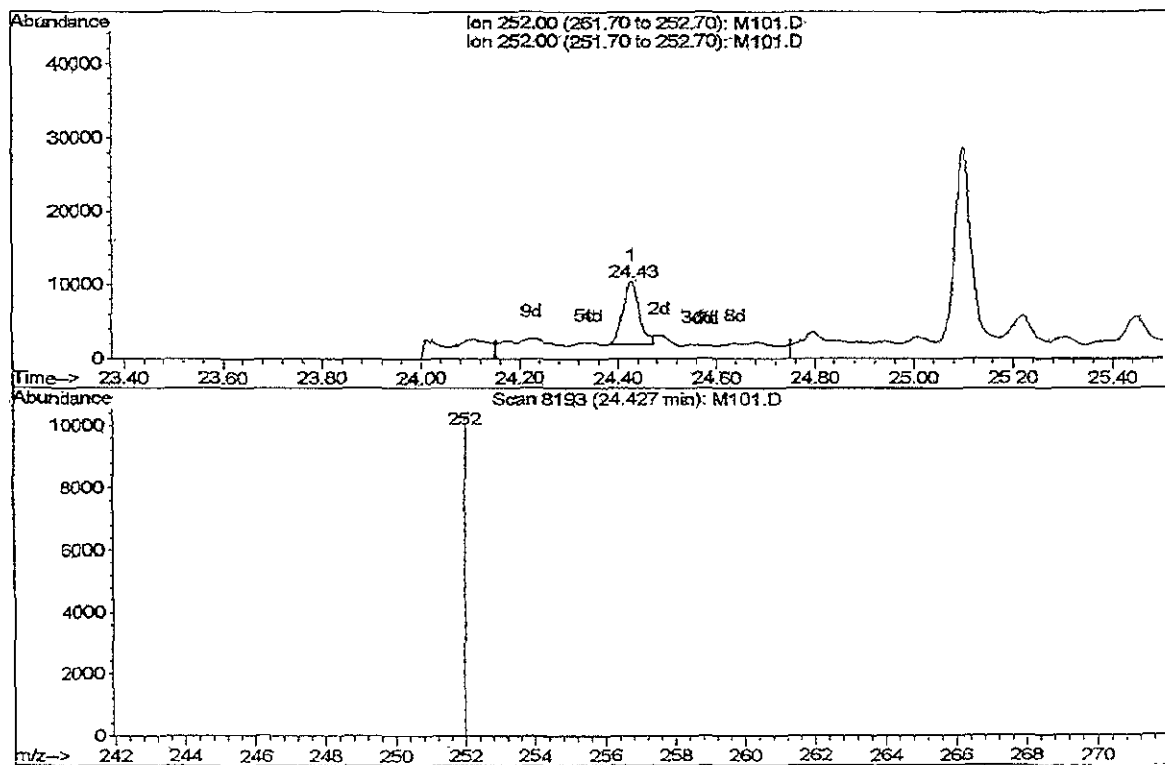


Figura 3.12 Cromatograma y espectro de masas de B[K]fluoranteno por modo MSI.

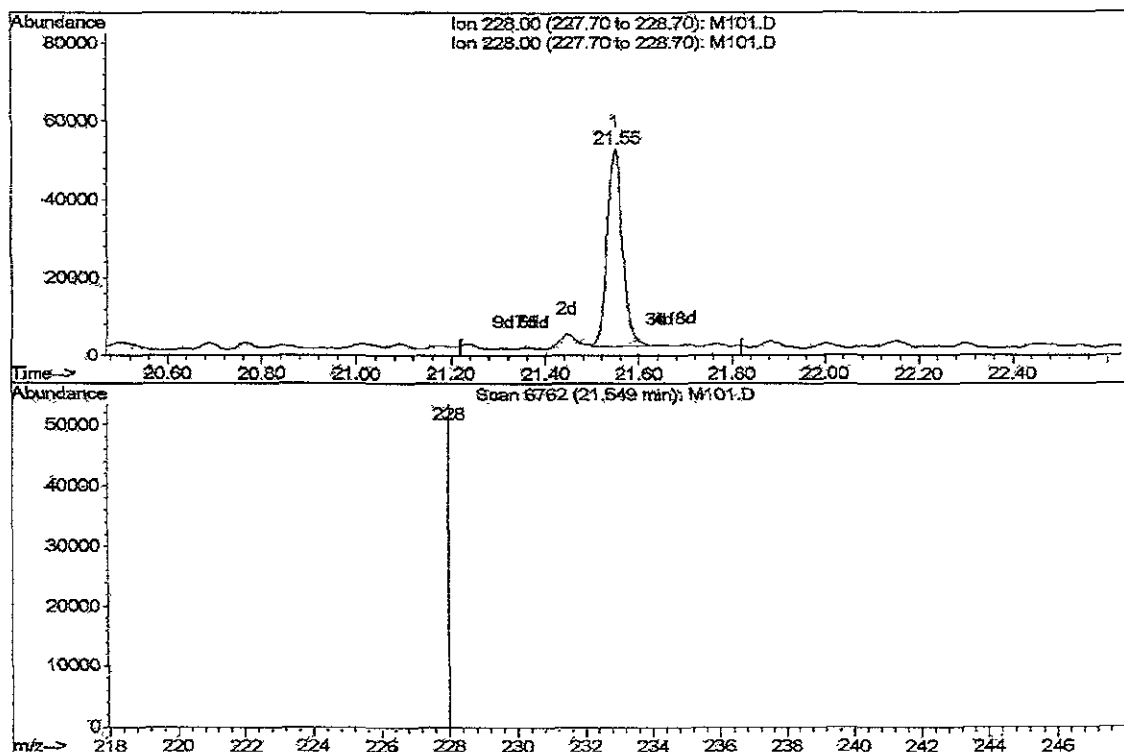


Figura 3.13 Cromatograma y espectro de masas de Criseno por modo MSI.

Se presentan a continuación los resultados de las muestras del proceso de remediación. Las claves de las muestras se indican por una clave MX-YAB donde X es el número de muestreo, Y indica el número correspondiente del triplicado y estos números están seguidos por letras que señalan el tipo de tratamiento: control del suelo no esterilizado (cne), suelo no esterilizado con planta (pne), suelo esterilizado con planta (pe), control del suelo esterilizado (ce). (Ver tabla 2.1)

**Muestreo 1 (5 May 2000)**

COMPUESTO	M101 ne	M102 ne	M103 ne	m1ne promedio	s	M101 e	M102 e	M103 e	m1e promedio	s
Criseno	3.718	4.231	4.408	4.123	0.362	4.046	4.249	3.784	4.030	0.228
B[k]fluoranteno	0.608	0.880	0.713	0.734	0.137	0.717	0.953	0.491	0.720	0.231
Benzo[g,h,i]perileno	0.616	0.735	0.542	0.631	0.097	0.611	0.719	0.731	0.687	0.066

Tabla 3.3 Resultados de las muestras de suelo contaminado con petróleo. Suelo no esterilizado (M101 ne-M103 ne) y esterilizado (M101e-M103e)

**Muestreo 2 (7Jul 2000)**

Compuesto	M201 pne	M202 pne	M203 pne	pne promedio	s	M201 cne	M202 cne	M203 cne	cne promedio	s
Críseno	4.108	3.383	4.087	3.860	0.413	4.071	3.726	4.037	3.945	0.190
B[k]fluoranteno	0.693	0.455	0.608	0.586	0.121	0.708	0.829	0.563	0.700	0.133
B[g,h,i]perileno	0.623	0.389	0.588	0.533	0.126	0.700	0.825	0.412	0.646	0.212

**Tabla 3.4 Resultados de las muestras de suelo contaminado con petróleo. Suelo no esterilizado (M201 pne-M203 pne) y esterilizado (M201 pne-M103pne)**

Compuesto	M201 pe	M202 pe	M203 pe	pe promedio	s	M201 ce	M202 ce	M203 ce	ce promedio	s
Críseno	4.058	3.870	4.547	4.158	0.349	3.615	3.660	4.213	3.829	0.333
B[k]fluoranteno	0.507	0.770	0.714	0.664	0.138	0.831	0.680	0.551	0.687	0.140
B[g,h,i]perileno	0.393	0.671	0.603	0.556	0.145	0.633	0.616	0.512	0.587	0.065

**Tabla 3.5 Resultados de las muestras de suelo contaminado con petróleo. Suelo no esterilizado (M201 pe-M203 pe) y esterilizado (M201 pe-M103pe)**

**Muestreo 3 (18 Nov 2000)**

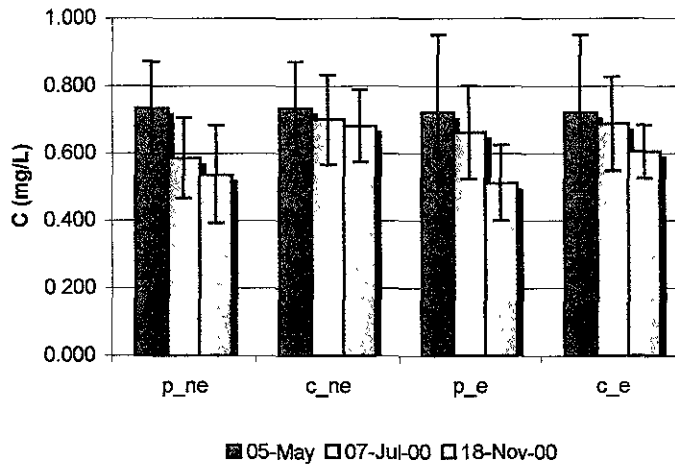
Compuesto	M301 pne	M302 pne	M303 pne	pne promedio	s	M301 cne	M302 cne	M303 cne	cne promedio	s
Críseno	5.439	3.148	3.460	4.029	1.234	4.243	3.483	3.093	3.606	0.585
B[k]fluoranteno	0.705	0.447	0.460	0.537	0.146	0.635	0.605	0.805	0.682	0.108
B[g,h,i]perileno	0.676	0.483	0.477	0.545	0.113	0.640	0.615	0.734	0.663	0.063

**Tabla 3.6 Resultados de las muestras de suelo contaminado con petróleo. Suelo no esterilizado (M301 pne-M303 pne) y esterilizado (M301 pne-M303 ne)**

Compuesto	M301 pe	M302 pe	M303 pe	pe promedio	s	M301 ce	M302 ce	M303 ce	ce promedio	s
Críseno	4.220	4.170	2.928	3.773	0.732	4.424	4.098	3.573	4.032	0.429
B[k]fluoranteno	0.603	0.547	0.387	0.510	0.110	0.688	0.531	0.598	0.606	0.079
B[g,h,i]perileno	0.595	0.467	0.539	0.534	0.064	0.606	0.709	0.632	0.649	0.054

**Tabla 3.7 Resultados de las muestras de suelo contaminado con petróleo. Suelo no esterilizado (M301 pe-M303 pe) y esterilizado (M301 pe-M303pe)**

**B[k]fluoranteno**



**Figura 3.14** Concentración de B[k]fluoranteno en función del tiempo en las muestras de suelo contaminado por petróleo para los diferentes tratamientos.

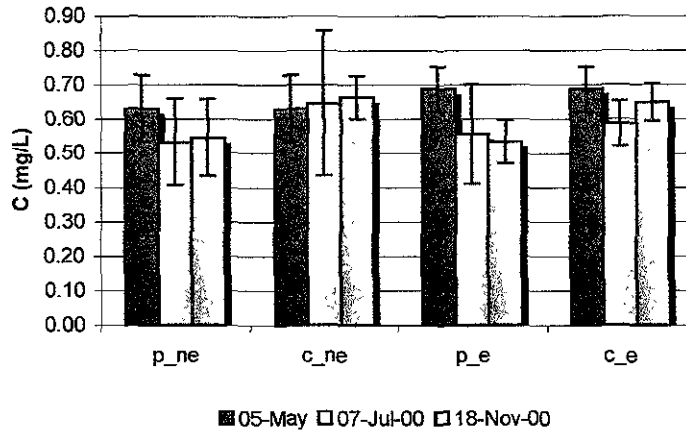
**ANOVA**

		Método jerárquico				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Concentración B[k]fluoranteno	Efectos principales (Combinadas)	.172	5	3.443E-02	1.536	.216
	tratamiento	3.980E-02	3	1.327E-02	.592	.626
	muestreo	.132	2	5.616E-02	2.951	.071
	Interacciones de orden 2 tratamiento * muestreo	3.475E-02	6	5.791E-03	.258	.951
	Modelo	.207	11	1.881E-02	.839	.606
	Residual	.538	24	2.242E-02		
	Total	.745	35	2.128E-02		

<sup>a</sup> Concentración B[k]fluoranteno por tratamiento, muestreo

**Tabla 3.8** Análisis de Varianza de las muestras entre muestreos y tratamientos para el B[k]fluoranteno

**B[ghi]perileno**



**Figura 3.15 Concentración de B[ghi]perileno en función del tiempo en las muestras de suelo contaminado por petróleo para los diferentes tratamientos.**

**ANOVA<sup>a,b</sup>**

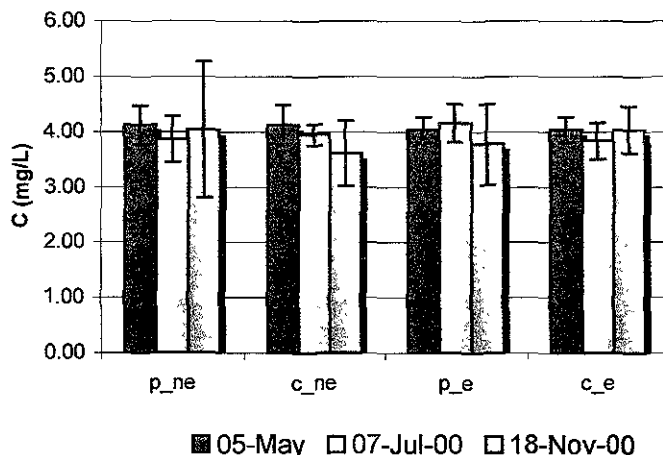
		Método único				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Concentración B[g,h,i]perileno	Efectos principales (Combinadas)	7.874E-02	5	1.575E-02	1.374	.269
	muestreo	4.091E-02	2	2.045E-02	1.785	.189
	tratamiento	3.783E-02	3	1.261E-02	1.100	.368
	Interacciones de orden 2					
	muestreo *	3.418E-02	6	5.697E-03	.497	.804
	tratamiento					
	Modelo	.113	11	1.027E-02	.896	.558
	Residual	.275	24	1.146E-02		
	Total	.388	35	1.108E-02		

a. Concentración B[g,h,i]perileno por muestreo, tratamiento

b. Todos los efectos introducidos simultáneamente

**Tabla 3.9 Análisis de Varianza de las muestras entre muestreos y tratamientos para el B[ghi]perileno**

**Criseno**



**Figura 3.16** Concentración de Criseno en función del tiempo en las muestras de suelo contaminado por petróleo para los diferentes tratamientos.

**ANOVA<sup>a,b</sup>**

		Método único				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Concentración Criseno	Efectos principales (Combinadas)	.350	5	6.994E-02	.248	.937
	tratamiento	6.635E-02	3	2.212E-02	.078	.971
	muestreo	.283	2	.142	.501	.612
	Interacciones de orden 2 tratamiento * muestreo	.548	6	9.134E-02	.323	.918
	Modelo	.898	11	8.161E-02	.289	.982
	Residual	6.781	24	.283		
	Total	7.678	35	.219		

a. Concentración Criseno por tratamiento, muestreo

b. Todos los efectos introducidos simultáneamente

**Tabla 3.10** Análisis de Varianza de las muestras entre muestreos y tratamientos para el Criseno

Al someter los resultados de los muestreos al análisis de varianza de dos factores se observó que:

- ✓ El proceso de esterilización no modificó significativamente las concentraciones de los HAP en el suelo, ya que los resultados del análisis de varianza entre el suelo esterilizado y no esterilizado, muestran que no hay diferencias significativas ( $\alpha \leq$  al 0.05)
- ✓ La concentración de B[k]fluoranteno, B[g,h,i]perileno y Criseno en cada uno de los tratamientos no presentan diferencias significativas a lo largo del tiempo en el que se llevó a cabo el experimento.
- ✓ No hubo diferencias entre los tipos de tratamientos para ninguno de los HAP lo que significa que su concentración no se modificó por la presencia de las especies vegetales.



## **CAPÍTULO 4**

# **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 4.1 CONCLUSIONES

### Del Método Analítico:

- ✓ El método que se desarrolló en este trabajo para la detección y cuantificación de los 16 HAP por CG-EM es confiable, en cuanto que sus curvas de calibración presentan una tendencia lineal y hay una buena resolución de los picos cromatográficos. Además de que se encontraron CV menores al 3.6% en la repetibilidad de las inyecciones. Sin embargo es necesario considerar iones calificadores para tener una mayor certeza de la identidad del analito al usar el MSI.
- ✓ El procedimiento de extracción de HAP en suelo es confiable para Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[g,h,i]perileno, Benzo[k]fluoranteno, Criseno, Db[a,h]antraceno, Fenantreno, Fluoranteno, Fluoreno, e I[1,2,3-c,d]pireno porque tienen rendimientos de extracción aceptables de acuerdo a los criterios establecidos por la EPA, sin embargo, para el Acenaffeno, Antraceno, Benzo[a]pireno, Naftaleno, y el Pireno el proceso no es confiable ya que presentan % de recuperación bajos que no cumplen con los criterios antes mencionados. Estos se debieron quizás a pérdidas por volatilización de los compuestos o a una baja eficiencia de la extracción con Soxhlet por falta de contacto del disolvente con el suelo o por una eficiencia baja en la purificación por lo que se recomienda realizar más experimentos para mejorar estas metodologías.

### **Del Proceso de Remedación del suelo contaminado por petróleo:**

- ✓ Se observó la presencia de B[k]fluoranteno, B[ghi]perileno, Criseno, Naftaleno y Pireno en las muestras de suelo contaminado que fue traído del estado de Veracruz.
- ✓ De acuerdo con los resultados estadísticos obtenidos no se observó la disminución de aquellos de los HAP presentes que fueron cuantificados durante el intervalo del tiempo en el que se llevó a cabo el experimento.
- ✓ El que no se hayan observado diferencias pudo ser ocasionado por varias razones:
  - Ni las plantas *Cyperus odoratus* ni los microorganismos afectan a los HAP
  - El intervalo de tiempo fue insuficiente, ya que el proceso parece ser un proceso lento.
  - Por lo tanto no se puede concluir que la planta presenta un efecto biorremediador, bajo estas condiciones.
  - La incertidumbre en la medición es superior a la disminución causada por las plantas y/o microorganismos.
- ✓ Finalmente estos resultados son congruentes con los altos tiempos de vida media de los HAP de alto peso molecular que se mencionaron en el capítulo 1.

#### 4.2 Recomendaciones:

- ✓ Se recomienda el uso de iones calificadores que nos permitan tener mayor evidencia de los analitos.
- ✓ Se recomienda el uso de estándares de verificación del cromatógrafo de gases, de estándares internos, de surrogados para mejorar la confiabilidad del método de cuantificación.
- ✓ Se recomienda realizar más experimentos con el fin de mejorar las técnicas aquí empleadas.
- ✓ Para muestras de baja concentración se requiere un flujo controlado de N<sub>2</sub> para concentrar las muestras a volúmenes menores de 3 ml.
- ✓ Se requiere determinar experimentalmente los límites de detección para cada uno de los HAP.
- ✓ Es necesario ampliar el tiempo experimental con las plantas de *Cyperus odoratus* para evaluar su efecto en la concentración de los HAP en suelos.

# **ÁNEXO A1**

## **FÓRMULAS ESTADÍSTICAS**

## A1. FÓRMULAS ESTADÍSTICAS

### A1.1 Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados.<sup>26,38,50</sup>

La respuesta lineal entre la variable de medición y la concentración del analito fue expresada por la ecuación de la recta.

$$y = m \cdot x + b$$

donde m es la pendiente y b es la ordenada al origen. Para encontrar la mejor recta, fueron calculados los valores de m y b que dan un mínimo en el error cuadrático.

Los valores numéricos de a y b se obtuvieron a partir de las siguientes fórmulas.

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - [\sum x]^2} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

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

$$\text{donde } S_{xx} = \left[ \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \text{ y } S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x \sum y)}{n}$$

### A.1.2 Comprobación de la idoneidad del modelo

#### A.1.2.1 Coeficientes de correlación (R<sup>2</sup>) y de determinación (R).<sup>38</sup>

El coeficiente de determinación se usa para juzgar la adecuación del modelo de regresión. La R<sup>2</sup> puede considerarse como la proporción de variabilidad de los datos explicada por el modelo lineal.

Los coeficientes de correlación (r<sup>2</sup>) y de determinación (r) fueron determinados a partir de:

$$r^2 = \frac{b^2 \left[ \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right]}{\sum y^2 - \frac{[\sum y]^2}{n}} = \frac{SC_{RL}}{SC_{Total}}$$

**A1.2.2 Prueba de linealidad de las curvas de calibración.<sup>50</sup>**

La prueba para determinar si los valores de la respuesta del equipo en función de la concentración del HAP correspondiente guardan una relación lineal fue realizada a partir de la prueba estadística de F, para lo cual se elaboró el análisis de varianza tal como se indica en la tabla A1.

Fuente de variación	de SC	g.l.	CM	F
Regresión lineal	SC <sub>RL</sub>	1	SC <sub>RL</sub> /g.l. <sub>RL</sub>	$\frac{CM_{RL}}{CM_R}$
Residual	SC <sub>R</sub>	n-2	SC <sub>R</sub> /g.l. <sub>R</sub>	
Total	SC <sub>total</sub>	n-1		

**Tabla A1 Análisis de varianza para la recta de regresión.**

Donde:

$$SC_{RL} = b^2 [S_{XX}]$$

$$SC_R = SC_{total} - SC_{RL}$$

$$SC_{total} = S_{YY}$$

$$y \quad S_{YY} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

**A1.2.3 Análisis de residuales.<sup>26</sup>**

Una herramienta útil para la evaluación de la linealidad de un sistema es el análisis de residuales.

Un residual es la diferencia entre el valor real de Y y el valor de predicción de Y' o Y-Y'. Es la parte de y que no se predice a partir de X (la parte sobrante o residual). Los valores residuales, Y-Y', se grafican contra los valores de X. La media de los residuales es cero y debido a que la pendiente se ha sustraído en el proceso de calcular los residuales, la correlación entre éstos y los valores X también deberá ser cero.

Si el modelo de regresión proporciona un ajuste adecuado para los datos, los valores de los residuales no se relacionan con los X.

### A1.3. Estimación del límite de detección.<sup>29</sup>

El Límite de detección estimado se determinó a partir de la siguiente fórmula:

$$LD = b + 3 S_{xx}$$

### A1.4 Determinación de la media muestral, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV).<sup>38</sup>

La media muestral y la desviación estándar son medidas de la tendencia central y la dispersión de la muestra respectivamente

La desviación estándar fue calculada a partir de la siguiente fórmula.

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

El coeficiente de variación es una estimación del error dividida por una estimación del valor absoluto de la cantidad medida, es un error relativo.

$$CV = \frac{DE * 100}{\bar{X}}$$



# **ÁNEXO A2**

## **CARACTERIZACIÓN DEL SUELO EMPLEADO**

## A2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL SUELO EMPLEADO. <sup>16, 20</sup>

### A2.1 Determinación de la textura (Método de Bouyoucos)<sup>14,20</sup>

La fracción mineral del suelo está constituida por partículas de diferentes tamaños: arena (200-20 micras), limo (20-2 micras) y arcillas (menores a 2 micras). La cantidad de cada uno de los componentes de esta fracción varía de un suelo a otro y depende directamente del material de origen. A la proporción relativa de arena, limo y arcilla, expresada en porcentaje se le conoce como textura del suelo. La textura afecta el número y el tamaño de los poros y por tanto el espacio poroso de cada suelo. En el suelo, la humedad, la aireación y consecuentemente la actividad de los microorganismos, está en función de la textura.

#### **Fundamento:**

El método de Bouyoucos está basado en el cálculo de la velocidad de sedimentación de las partículas, utilizando el principio de la ley de Stokes que establece lo siguiente: "la densidad de una disolución acuosa en reposo varía directamente con la cantidad de partículas en suspensión que se van asentando de acuerdo a su diámetro y al tiempo transcurrido".

#### **Desarrollo:**

Previo a la determinación de la textura 50 g de suelo se trataron con 20 ml de una disolución al 10% de peróxido de hidrógeno, dejándolos secar durante 24 horas a una temperatura de 80 °C. Los 50 g de suelo se colocaron en un vaso con un agitador mecánico y posteriormente se agregaron 5 ml de disolución de metasilicato de sodio al 5% y 5 ml de solución de oxalato de sodio también al 5%. Se completó el volumen a 400 ml con agua destilada y se agitó durante 10 minutos. La disolución se pasó a una probeta de 1 L y se aforó a 1L con agua destilada. Se agitó durante 1 minuto. Se dejó reposar 40 segundos y se tomó la primera lectura con un hidrómetro de Bouyoucos. Se midió la temperatura. Se dejó reposar durante 2 horas y se tomó la segunda lectura. Se midió nuevamente la temperatura.

**Datos obtenidos.**

A cada lectura del hidrómetro se le restó 0.2 por cada grado centígrado menor a los 20 °C. Y se realizaron los cálculos con las siguientes fórmulas.

$$\% \text{limos} + \% \text{arcillos} = \frac{\text{primera lectura}}{\text{gramos de suelo}} \times 100$$

$$\% \text{ de arenas} = 100 - (\% \text{ de limos} + \% \text{ de arcillas})$$

$$\% \text{ de arcilla} = \frac{\text{segunda lectura}}{\text{g de suelo}} \times 100$$

$$\% \text{ de limos} = (\% \text{ de limos} + \% \text{ de arcillas}) - \% \text{ de arcillas.}$$

Con los porcentajes obtenidos se determinó la clase de textura que le corresponde al suelo de acuerdo al triángulo de texturas.

% de arenas	% de arcillas	% de limos	Textura del suelo
52.4	7.6	40	Migajón arenoso

**Tabla A2.1 Textura del suelo empleado.**

**A2.2 Determinación del pH.<sup>31</sup>**

El pH es una propiedad química del suelo de primordial importancia en el desarrollo de las plantas. La medición del pH del suelo se refiere a la concentración de los hidrogeniones activos (H<sup>+</sup>) que se da en la interfase líquida del suelo, dentro de la interacción de los componentes sólidos y líquidos.

**Fundamento:**

El electrodo que mide el pH, mide el potencial de un electrodo sensitivo a los iones H<sup>+</sup> presentes en una disolución problema, usando como referencia un electrodo cuya solución no se modifica cuando cambia la concentración de los iones a medir, siendo generalmente un electrodo de calomel o de Ag/AgCl. El electrodo de vidrio desarrolla a través de sus paredes un potencial eléctrico.

**Desarrollo:**

Se pesaron 10 g de suelo, y se colocaron en un recipiente. Se agregaron 25 ml de agua destilada, se agitó y se dejó reposar durante 30 minutos. Se midió el pH con un potenciómetro, el cual se calibró previamente con soluciones amortiguadoras.

pH	Clasificación
4.34	Extremadamente ácido

**Tabla A2.2 Valor del pH del suelo empleado.**

**A2.3 Cantidad de materia orgánica.<sup>16,20</sup>**

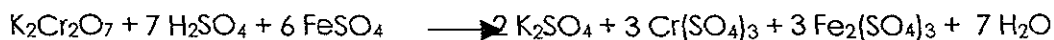
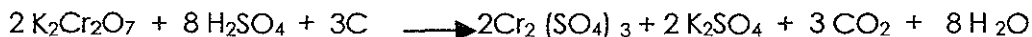
El contenido de la materia orgánica es un factor fundamental que afecta directa e indirectamente las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo tales como el color, la estructura, capacidad de retención del agua, capacidad de intercambio iónico, disponibilidad de nitrógeno, fósforo, azufre, pH, susceptibilidad a la erosión, etc.

La materia orgánica aporta al suelo macronutrientes como nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, sodio, potasio y magnesio; además de nutrientes como hierro, zinc, cobre, boro, cobalto y manganeso. Asimismo, incrementa la capacidad de intercambio catiónico total de los suelos y actúa como un regulador de pH. Al biodegradarse forma CO<sub>2</sub> que interviene en el intemperismo de las rocas y minerales mejorando algunas propiedades físicas de los suelos como la estructura granular. Favorece además la aireación, pues actúa como agente cementante lo que aumenta la cantidad de agregados que mejoran la capilaridad y permeabilidad de los suelos.

**Fundamento:**

El método de Walkey y Black está basado en la oxidación lenta de la materia orgánica con dicromato de potasio en presencia de ácido sulfúrico, formando ácido crómico cuyo exceso es valorado por titulación con sulfato ferroso y el indicador de difenilamina. Para eliminar la acción enmascaradora de los ácidos de hierro y como contribuyente al viraje de la solución se adiciona ácido fosfórico.

**Reacciones:**



**Desarrollo:**

Se pesaron alrededor de 0.2 g de suelo y se colocaron en un matraz Erlenmeyer. Se agregaron con una bureta 5 ml de solución de dicromato de potasio y con mucho cuidado se agregaron 10 ml de ácido sulfúrico. Se agitó durante 1 minuto y se dejó reposar durante 30 minutos más. Se agregaron 100 ml de agua destilada agua, 5 mL de ácido fosfórico con una probeta, 5 gotas del indicador de difenilamina. Se tituló con sulfato ferroso .

**Calculos:**

Para determinar la cantidad de materia orgánica se sustituyeron los valores en las siguientes fórmulas:

$$\text{Factor de corrección (FC)} = \frac{10}{\text{mL de FeSO}_4 \text{ gastado en el blanco}}$$

$$\% \text{ Materia orgánica (MO)} = \frac{5 - (\text{ml de FeSO}_4 \times \text{N} \times \text{F})}{\text{g de muestra}} \times 0.67$$

donde: 5 = ml de dicromato de potasio agregados

N = normalidad de sulfato ferroso (0.5 N)

0.67 = constante.

Este se deduce de la siguiente formula:

$$1\text{N} \times \frac{12}{4000} \times \frac{1}{0.77} \times \frac{100}{1} \times 1.72 = 0.67$$

donde 1N= Normalidad de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

12/4000= Peso miliequivalente del carbón

1/0.77= Cantidad de carbón total de la materia orgánica que se oxida por este método, que es igual al 77%.

1.72 = Factor de transformación de carbono orgánico a materia orgánica del suelo que contiene 58% de carbono orgánico.

cuando se usan 0.5 g de suelo, el factor 0.67 se sustituye por 1.34

**Datos obtenidos:**

	ml de FeSO <sub>4</sub> gastados en el blanco	Masa de la muestra (g)	Ml de FeSO <sub>4</sub> gastados	% Materia Orgánica
1	9.9	0.2038	3.1	22.98
2	9.4	0.2001	2.9	23.55
Promedio	9.65			23.26

**Tabla A2.3 Determinación de la materia orgánica**

De acuerdo a los resultados el suelo es rico en materia orgánica.

**A2.4 Densidad del suelo.**<sup>16,20</sup>

**A2.4.1 Densidad aparente.**

La densidad aparente es la medida del peso del suelo por unidad del volumen (g/cm<sup>3</sup>). Está relacionada con la gravedad específica de las partículas orgánicas, así como la porosidad de los suelos. La densidad aparente es un parámetro muy importante para estudios cuantitativos de suelos, pues su determinación es fundamental para calcular los movimientos del agua, el grado de formación de la arcilla y la acumulación de carbonatos en los perfiles de los suelos. Asimismo, es importante en la labranza y en la conservación del suelo. Cuando se practica la sobremecanización, el sobrepastoreo o se secan los suelos muy arcillosos, suele suceder que aumenta la compactación de las partículas y se incrementa la densidad aparente. Dicho aumento también puede provocar importantes desventajas como limitar el movimiento de aire, agua y nutrientes dentro del perfil; o reducir la germinación, el desarrollo radicular y la actividad microbiana y edafofaunística.

**Fundamento:**

La densidad aparente se calcula a través del peso de un volumen conocido de suelo tamizado y ligeramente compactado. En el valor del peso se consideran tanto la cantidad de espacio poroso como la masa de la fracción sólida del suelo.

**Desarrollo:**

Se pesó una probeta vacía de 10 mL y se le agregaron el suelo hasta completar 10 ml golpeando ligeramente y enseguida se agregó el suelo necesario para completar nuevamente 10 mL. Se pesó la probeta con el suelo y se le restó el peso de la probeta vacía.

Para obtener el valor de la densidad aparente se sustituyó en la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad aparente (g / cm}^3\text{)} = \frac{\text{Masa del suelo}}{\text{Volumen}}$$

**Resultados obtenidos:**

Masa del suelo (g)	Volumen (ml)	Densidad aparente
10.18	10	1.018

**Tabla A2.4 Determinación de la densidad aparente del suelo empleado.**

**A2.4.2 Densidad real.** <sup>16,20</sup>

La densidad real se define como el peso de las partículas del suelo por unidad de volumen y se expresa en g / cm<sup>3</sup>. Es también llamada densidad de partícula porque considera únicamente a las partículas sólidas, motivo por el cual la densidad real no varía con la magnitud del espacio poroso.

Fundamento:

La densidad real de un suelo se determina indirectamente mediante el cálculo del peso de un volumen de líquido desplazado por una masa conocida de suelo.

Desarrollo:

Se pesó un matraz perfectamente seco. Posteriormente se llenó con agua destilada hasta el aforo y se pesó nuevamente. Se vació el matraz y se agregaron 5 g de suelo. Se agregó

un poco de agua destilada, se agitó y se dejó reposar durante 15 minutos. Se aforó con agua destilada y se pesó el matraz con el suelo y el agua.

Se sustituyeron los datos en la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad real} = \frac{S}{(S+A)-M}$$

Donde : S = peso del suelo

A = peso del agua sin matraz.

M = peso de la mezcla del suelo + agua hasta el aforo.

Densidad real ( g / cm<sup>3</sup>)

1.736

**Tabla A2.5 Valor de la determinación real del suelo empleado**

#### **A2.4.3 Pruebas de esterilización.** <sup>16,20</sup>

Medio Lebac. (Utilizado en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Mexicano del Petróleo para el desarrollo de microorganismos degradadores de hidrocarburos).

Este medio se prepara para saber si existen microorganismos capaces de consumir hidrocarburos.

En un litro de agua destilada previamente esterilizada se disolvieron:

7 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 g de KHPO<sub>4</sub>

1 g de MgSO<sub>4</sub>

0.01 g de CaCl<sub>2</sub>

0.005 g de FeCl<sub>2</sub>

0.1 g de extracto de levadura.

Posteriormente se pasaron 10 ml de esta disolución a tubos de ensaye y se agregaron 0.1 ml de queroseno previamente esterilizado. Finalmente se agregó 1 g del suelo esterilizado.

Se encontró que después de 3 ciclos de 45 minutos cada uno en autoclave el suelo se encontraba esterilizado.



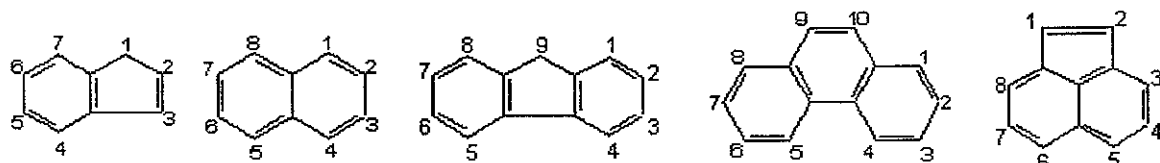
<b>Determinación</b>	<b>Valor</b>	<b>Comentario</b>
<b>% de arenas</b>	52.4	Textura del suelo
<b>% de arcillas</b>	7.6	Migajón arenoso
<b>% de limos</b>	40	
<b>pH</b>	4.34	Extremadamente ácido
<b>% Materia Orgánica</b>	23.26	Suelo rico en materia orgánica
<b>Densidad aparente</b>	1.018	
<b>Densidad real</b>	1.736	

**Tabla A2.6 Resumen de las propiedades de fisicoquímicas del suelo contaminado.**

### A.3 Nomenclatura de los hidrocarburos aromáticos policíclicos <sup>39</sup>

#### A.3.1 Nombres triviales y semitriviales.<sup>39</sup>

A.3.1.1 Los nombres de los hidrocarburos aromáticos policíclicos con un número máximo de dobles enlaces no acumulados terminan en **eno**. A continuación se mencionan los nombres de algunos de los HAP que siguen esta regla.



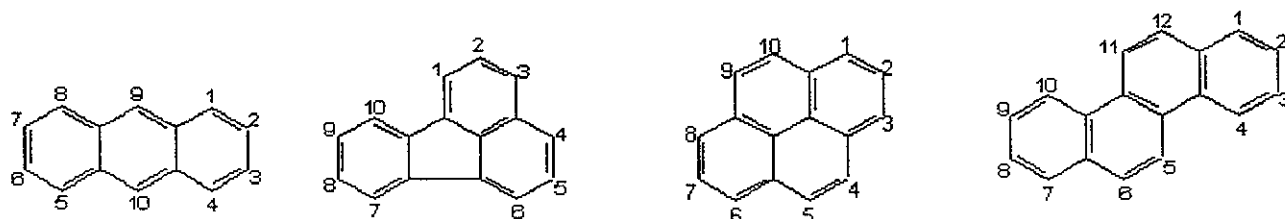
Indeno

Naftaleno

Fluoreno

Fenantreno

Acenaffileno



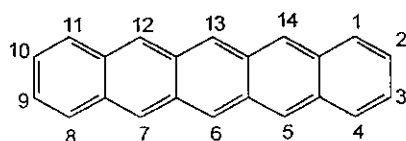
Antraceno

Fluoranteno

Pireno

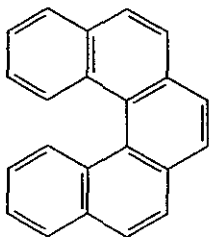
Criseno

A.3.1.2 Los nombres de los hidrocarburos que contienen 5 o más anillos de benceno fusionados ordenados con un arreglo lineal se nombran con el prefijo del número de anillos y la terminación **-aceno**.



Pentaceno

A.3.1.3 Los hidrocarburos aromáticos policíclicos no lineales y que no tienen un nombre trivial de acuerdo a la parte A.3.1 de ésta regla son nombrados con el prefijo del componente base de mayor número de anillos de acuerdo a la lista de la regla A.3.1 y los sustituyentes se nombran con los componentes más simples.



No se nombra como naftofenantreno ya que benzo es más simple nafto aunque haya dos anillos bencénicos y un nafto

Dibenzofenantreno

A.3.1.4 La terminación de los prefijos de los componentes no cambia. Cuando hay más de un prefijo, éstos se ordenan alfabéticamente. La terminación de los siguientes prefijos si cambia:

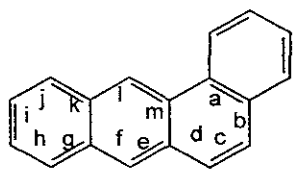
Acenafto de Acenaftileno

Antra de Antraceno

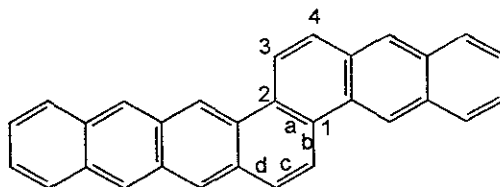
Benzo de Benzeno

Fenantro de Fenantreno

A.3.1.5 Los isómeros se distinguen nombrando con una letra los lados en la periferia del componente base *a*, *b*, *c*, etc., empezando con *a* para el lado "1,2", *b* para "2,3" y así sucesivamente para cada lado. El nombramiento de la letra, de acuerdo al alfabeto, denotará el lado donde la fusión ocurre. Si es necesario, se anteponen a este prefijo los números de las posiciones de unión del otro componente. Estos números deberán ser lo más pequeños como sea posible de acuerdo con la numeración del componente y sus otras conformaciones para la dirección del nombramiento del componente base. Cuando dos o más prefijos se refieren a posiciones equivalentes y pueden usarse varias letras, los prefijos son nombrados alfabéticamente de acuerdo a la regla A.2.4 y la localización del prefijo citado primero por la letra de acuerdo en el alfabeto. Los números y las letras son encerrados con paréntesis cuadrados y se colocan inmediatamente después de la designación del componente atacante. Esta expresión define simplemente la manera de la fusión de los componentes.

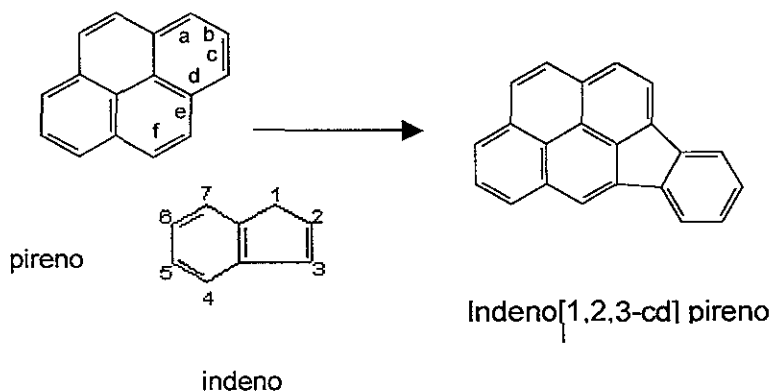


Benzo[a]antraceno

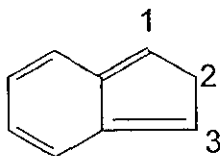


Antra[2,1,a]naftaceno

El nombre completo de los sistemas se forma a partir de la base del componente y de los otros componentes, renumerado de acuerdo a la regla A.3.2



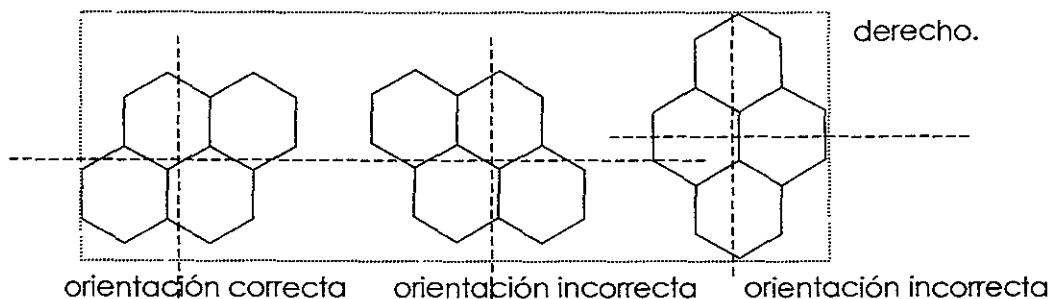
A.3.1.6 Cuando un nombre se aplica igualmente a dos o más isómeros de anillos condensados con el número máximo de dobles enlaces no acumulados y cuando éste puede ser especificado al indicar la posición de uno y más átomos de hidrógeno en la estructura, entonces se menciona la posición de la modificación, seguido de la letra capital itálica *H* para cada uno de estos átomos de hidrógeno. Tales símbolos ordinariamente preceden el nombre. El átomo o átomos nombrados son llamados indicador(es) de hidrogeno(s)



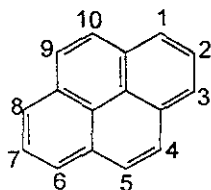
1 *H*-Indeno

### A.3.2 Numeración<sup>39</sup>

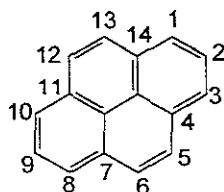
A.3.2.1 El sistema policíclico se orienta de tal forma que el mayor número de anillos se encuentre en una hilera horizontal con un número máximo de anillos en el cuadrante superior derecho.



El sistema así orientado, es enumerado de acuerdo a las manecillas del reloj comenzando con el átomo de carbono no comprometido y del anillo más a la derecha, omitiendo los átomos comunes a dos o más anillos.

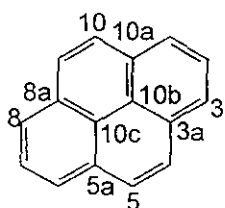


correcta

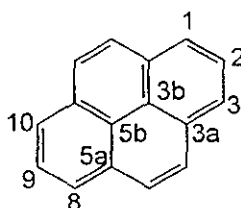


incorrecta

A.3.2.2 Los átomos comunes a dos o más anillos son nombrados al adicionar letras "a", "b", etc., al número de la posición inmediata precedida. Los átomos internos se nombran con el número mas alto, considerando la secuencia de la dirección de las manecillas del reloj cuando haya una opción.

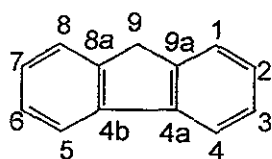


correcta

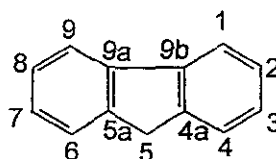


incorrecta

A.3.2.3 Cuando haya una opción, los átomos de carbono externos, comunes a dos o más anillos se nombran con los números más pequeños posibles.

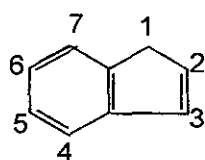


correcta

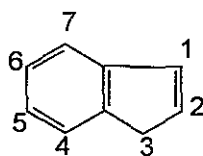


incorrecta

A.3.2.4 Cuando hay una opción, el átomo de carbono que sostiene un átomo de hidrogeno indicativo es numerado lo más pequeño como sea posible.

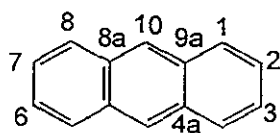


correcta

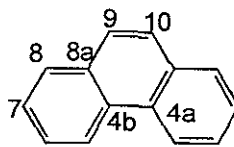


incorrecta

A.3.2.5 Las siguientes son algunas de las excepciones a la regla de numeración.



antraceno



fenantreno

## BIBLIOGRAFÍA:

- 1 Alexander M. *Environ. Sci. Technol.*, September 8, 2000.
- 2 Alexander, R.R.; Alexander, M. *Environ Toxicol. Chem.* 1999, 18, 1140
- 3 Alexander R.R., M. *Environ Toxicol. Chem.* 1999, 18, 1140.
- 4 Anderson T.A, Guthrie E. A. y Walton B.T. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 27, No. 13, 1993.
- 5 April, W; Sims, R.C. *Chemosphere.* 1990, 20(1-2):253-265.
- 6 Bartha. *Microbial Ecology*, (1986) 12: 155-172
- 7 Bossert I. Bartha R. (1984).10; The fate of petroleum in soil ecosystems. Inc Atlas R. (ed) *Petroleum Microbiol.*, Mc Millan Publishing, Co., E.U.A., pp. 435-473.
- 8 Caldwell. J.C, Documento EPA. Interim methodology to give estimates of potency for cumulative exposure project POM inventories. 1998.
- 9 Cerniglia C.E, Pothuluri J.V. *Botanica Marina* 23:121-124
- 10 Cerniglia C. *Biodegradation* 3: 331-368, 1992
- 11 Cripps RE, et al. (1978) Watkinson RJ *Applied Science Publisher Ltd*, London, 1978, pp 113-134.
- 12 Currier, H. B. ; Peoples, S.A. *Hilgardia* 1954, 23, 155-173
- 13 Diego-Perez N. (1997) Flora de Guerrero. *Manual No. 5 Cyperaceae*. Facultad de Ciencias , UNAM. Prensas de ciencias.
- 14 Dragun J. *The Soil Chemistry of Hazardous Materials*, 2<sup>nd</sup> edition. Amherst Scientific Publishers. Amherst, Massachusetts, 1998.
- 15 Dragun, J. Helling, C. S *Soil Sci.* 1985, 139,100.
- 16 Valdés M., Velazquez M., Vásquez L., *Microbiología del suelo (Manual Práctico)*, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología, Laboratorio de Microbiología Agrícola, IPN., México 1998.
- 17 EPA *Method EPA. 3540 Soxhlet extraction-Semivolatile and nonvolatile organics.* 1996.
- 18 Hall M. y Grover, PL, *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I*, 1990.
- 19 Hatzinger, P.B.; Alexander, M. *Environ. Sci. Technol.* 1995, 29, 537
- 20 Jackson, M.L, *Análisis Químico de Suelos*, Prantice Hall, México. 1976
- 21 Jones K.D *Environ. Sci. Technol.*, 33(4), 580-587, 1999.
- 22 Kastner, *Apply. Env. Microb.*, 1999
- 23 Karimi-Lotfabad S. Pickard M. y Gray M., *Environ. Sci. Technol.*, 30(4), 1145-1151.

- 24 Keck J., Sims R.C, Coover M., Park K. y Symons B.; *Wat. Res.* Vol. 23, No 12, pp. 1467-1476, 1989.
- 25 Larson A. y Weber (1994) *Reaction Mechanisms in Enviromental Organic Chemistry*. Lewis Publishers. Boca Ratón, Florida. EEUUA.
- 26 Dawson B., Trapp R. G.; *Bioestadística Médica*; Editorial El manual moderno S.A. de C.V; México 1995.
- 27 McGill, W. B. y Nyborborg, M.; *Reclamation of Agricultural Solis after oil spills*. I. Reserch (J.A. Toogood, ed). Publication No. M77-11. Alberta Institute of Pedology, 1975, 69-132. University of Alberta, Edmonton.
- 28 Neilson A. H., PAH and Related Compounds, Biology. *The handbook of environmental Chemistry*. Vol. 3 Anthropogenic Compounds, Part I Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany
- 29 Miller J.C. , Miller J. N. *Estadística para química analítica*, Segunda edición, 1988, Adisson Wesley Iberoamericana. EUA.
- 30 Salanitro J. *Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment*
- 31 Schwab A.P. Al-Assi A.A y Banks. *J. Environ Qual.* 27:220-224 (1998)
- 32 Seibl J. *Espectrometría de Masas*. Editorial Alambra, 1973.
- 33 Sims R.C. y Overcash, M. R. *Residue Rev* 1983, 88, 1-63 (Ing)
- 34 Skoog D. Leary J. *Análisis instrumental* . McGraw-Hill 1999. México.
- 35 Wade. *Química Orgánica*. 2da Edición Prentice May. 1993
- 36 Wayne A. y Sims R. *Chemosphere*, Vol. 20, 1-2, 1990, pp. 253-265.
- 37 Wilson, C.S. y Jones, C.K., *Environ . Pollut.* 81, 1993, 229-249
- 38 Montgomery D. *Diseño y análisis de experimentos*, Grupo Editorial Iberoamérica. México, 1991.
- 39 *Nomenclature of Organic Chemistry*, Secciones A, B, C, D, E, F, G, H, Pergamon Press, Oxford, 1979. Copyright 1979 IUPAC.
- 40 *Enciclopedia Microsoft® Encarta® 2000*. © 1993-1999 Microsoft Corporation
- 41 *Manual Operador detector selectivo de masas*. Agilent Technologies. HP Company 1997.
- 42 *Merck Index* . Ed. Merck & CO. 11 Ed. EUA, 1994
- 43 Monografías de la evaluación de riesgos carcinogénicos a humanos, (1972-1990) Vol 1-9. *International Agency for Reserch in Cancer*.



- 44 *Hazards in the Chemical Laboratory*. 5ta Ed. Editorial S.C Luxon Royal Society of Chemistry 1992
- 45 *Dictionary of Organic Compounds*. 5 Ed. Ed. Chapman and Hall , EU, 1982
- 46 EPA, *Metodo EPA 8270c*, Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography /Mass spectrometry (GC/MS); 1996.
- 47 Fessenden R. J. Fessenden J. S. *Química Orgánica*, Grupo Editorial Iberoamericana, México, 1982
- 48 Siuzdak G. *Mass spectrometry for biotechnology*, Academic Press 1996, EUA
- 49 Miller P.E. y Denton M.B.; *J. Chem Educ*, 1986,63,617.
- 50 Wayne W. D. *Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud*. Editorial Limusa, Méx. 1982.
- 51 <http://www.aiche.org/dipp>. Design Institute for Physical Property Data, American Institute of Chemical Engineers. E.U.A.
- 52 BeyNon J.H., Saunders R. A., Williams A.E., *Mass Spectra of Organic Compunds*, Elsevier Publishing Company. 1968, EUA.
- 53 Chapman J.R. *Practical Organic Mass Spectrometry*, 1993, 2da Edición, E.U.A.
- 54 Fakoussa R.M. Hofrichter M. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 1999, 52: 25-40
- 55 Richnow H.H. Seifert R., Hefter J. Kästner M. Mahro B., Michaelis W.; *Org. Geochem. Vol 22*; 3-5; 671-681;1994.
- 56 EPA, *Metodo EPA 8000*, Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography /Mass spectrometry (GC/MS);1996.
- 57 Shuttleworth K. L y Cerniglia C.E. *Appl. Biochem. and Biotech.* 54,1995, 291-302.